



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>

Thèse de Doctorat de l'Université de Metz
mention Sciences

présentée et soutenue publiquement le **24 Octobre 1988**
par **Annette LEXA-ROBIN**



Propriétés cholérétiques, antihépatotoxiques et diurétiques
d'**Eupatorium cannabinum L.**: approche ethnopharmacologique

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420288 2

Membres du jury:
M. J.M. Pelt, professeur (président du jury)
M. J. Atkinson, professeur (rapporteur)
M. J. Antin, maître de conférences (directeur de thèse)
M. Larrey, docteur
M. F. Mortier, professeur (rapporteur)
M. G. Mazarin, docteur
M. B. Capolaghi, docteur

Maître, de qui avez-vous appris le Tao?
demanda Man Po à Mu Yu.

- De l'écriture
de la lecture
de l'éveil
de l'attention
du travail
du son
de l'inconnu
du vide
de l'infini sans commencement
lui répondit-il.

Tchouang Tseu, 3^{ème} Siècle avant J.C.

A M^r le professeur J.M. Pelt,
merci.



BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE -METZ	
N° inv	198 0125
Cote	S/M ₃ 88/6
Loc	Magasin

A Jacques Fleurentin,
maître de conférences à l'université de Metz,
le guide de ces travaux.
Je n'ai cessé de louer sa disponibilité et son humeur égale en
toutes circonstances.

A M^r le professeur François Mortier,
professeur de pharmacognosie à la faculté de pharmacie de
Nancy,
la juste mesure entre compétence et sens de l'humour.

merci.

A Mme M.C. Fuzelier,
maître de conférences à la faculté de pharmacie de Nancy,
pour m'avoir fait gentiment et gracieusement bénéficier de ses
compétences et de son sérieux,

A Mr P.Lehr,
maître de recherche au C.N.R.S.,
pour l'aide et les conseils pratiques qui m'a apportés,

**A Claire Hoeffler, Marie-Claire Lanhers, Dominique Beaux,
Michel Joyeux, Hassan Hadi et Pierre-Yves Arvis,**
pour la pierre que chacun a apportée à cet "édifice",

A Alain Rolland,
le coeur sur la main,
une mention toute spéciale,

A Frédéric Bois,
pour sa contribution informatique,
avec toute mon amitié,

**A Jean-Claude Block, Paule Vasseur, Jean-François Ferrard,
Marcelle Grunfelder ainsi que tout le personnel et tous mes
collègues passés et présents du Centre des Sciences de
l'Environnement,**
Pour tous leurs conseils , leur gentillesse,
Pour tout ce que j'ai appris grâce à eux et qui ne se résume
pas à une thèse,

merci.

A M^r le professeur Atkinson,
professeur de pharmacologie à la faculté des Sciences
Pharmaceutiques de Nancy,

A M^r Mazars,
docteur , directeur du centre d'histoire de la
médecine à l'université Louis Pasteur de Strasbourg, pour sa
contribution ayurvédique,

A M^r Capolaghi,
docteur en sciences pharmaceutiques et biologiste à l'hôpital
Bel-Air de Thionville, qui m'a accueillie dans son laboratoire
pour me permettre d'effectuer divers dosages,

A Mr Larrey,
docteur, chargé de recherche I.N.S.E.R.M.,

pour avoir bien voulu accepter de juger cette thèse,
merci,

**A Eric Poitevin,
A Michel Lepetitdidier,**

à qui je dois la contribution graphique à cet ouvrage.
Recevez ici le témoignage de mon amitié fidèle et de mon
admiration,
j'ai toujours cru en vous, aujourd'hui je sais pourquoi.

merci.

A Etienne Robin,
docteur en médecine, praticien hospitalier, néphrologue et
endocrinologue,

A M^r Caraman,
docteur en médecine, praticien hospitalier, chef de service de
médecine interne et de néphrologie au C.H.R. de Thionville,

A Marc Robin,
docteur en Sciences Pharmaceutiques, pharmacologue,

pour avoir aimablement accepté de me conseiller.
La rencontre du milieu médical et celui de la recherche est
riche d'enseignements,

merci.

**A tous les petits rongeurs qui ont été sacrifiés pour ce
travail,
mille excuses....**

A Christophe,
j'ai puisé dans l'exemplaire oeuvre humanitaire que tu as accomplie loin d'ici, la force de mener ce travail à terme, Cette ascèse m'a permis de découvrir qu'il existe sinon une raison de vivre et d'espérer, du moins une raison de "mieux-être".

merci.

A ma mère,
qui m'a donné la plus belle leçon d' amour, de sagesse et de
joie de vivre.

A mon père,
l'esprit cartésien de la famille,
je le remercie de m'avoir donné le goût de l'étude,
De m'avoir permis de mener à bien mes années universitaires,
Et d'avoir bien voulu mettre ses compétences orthographiques au
service de la rédaction scientifique.

A ma famille,

merci.



Eupatorium cannabinum

F. Boissier del. 11

SOMMAIRE

	PAGES
INTRODUCTION	1
1ère PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
A ETUDE BOTANIQUE	
A.1 ETUDE DU GENRE <u>EUPATORIUM</u> L.	4
A.1.1 LA FAMILLE DES ASTERACEAE	4
A.1.1.1 TAXONOMIE	
A.1.1.2 DESCRIPTION BOTANIQUE	
A.1.2 POSITION SYSTEMATIQUE DU GENRE <u>EUPATORIUM</u> L. DANS LA FAMILLE DES ASTERACEAE	8
A.1.2.1 LA TRIBU DES EUPATORIEAE	
A.1.2.2 LA TRIBU DES EUPATORIINEAE	
A.1.2.3 LE GENRE <u>EUPATORIUM</u> L.	11
A.1.2.3.1 POSITION SYSTEMATIQUE	
A.1.2.3.2 CLE DE DETERMINATION DU GENRE <u>EUPATORIUM</u> L.	
A.2 ETUDE DE L'ESPECE <u>E.cannabinum</u> L.	14
A.2.1 CLE DE DETERMINATION DE L'ESPECE <u>E.cannabinum</u> L.	14
A.2.2 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE	20
A.2.3 NOMS VERNACULAIRES	20
B UTILISATION TRADITIONNELLE	20
C CHIMIE	25
C.1 TERPENOIDES	25
C.1.1 LACTONES SESQUITERPENIQUES	
C.1.2 TRITERPENES ET STEROIDES	
C.1.3 DITERPENES	
C.1.4 MONOTERPENES	
C.1.5 HUILE ESSENTIELLE	
C.2 FLAVONOIDES	33
C.3 DERIVES AMINES	35
C.3.1 ALCALOIDES	
C.3.2 AMINO-ALCOOLS	

C.4 ACIDES-PHENOLS	36
C.5 ACIDES-ALCOOLS	37
C.6 DERIVE DE BENZOFURANNE	37
C.7 DERIVES DE BENZOPYRANNE	38
C.8 SUCRES	38
D PHARMACOLOGIE DE CERTAINES STRUCTURES CHIMIQUES PRESENTES DANS LE GENRE <u>Eupatorium</u> L.	39
D.1 PHARMACOLOGIE DES FLAVONOIDES	39
D.2 PHARMACOLOGIE DES ACIDES-PHENOLS	41
D.3 PHARMACOLOGIE DES ALCALOIDES PYRROLIZIDINIQUES	42
E CHIMIE ET PHARMACOLOGIE DE DIFFERENTES ESPECES DU GENRE <u>Eupatorium</u> L.	43
E.1 LACTONES SESQUITERPENIQUES	43
E.2 FLAVONOIDES	46
E.3 ALCALOIDES	46
E.4 HUILE ESSENTIELLE	50
E.5 POLYSACCHARIDES	50
F ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'<u>E.cannabinum</u> L.	51
2^{ème} PARTIE PREPARATION ET CARACTERISATION DES EXTRAITS D'<u>E.cannabinum</u> L.	53
A COUPES HISTOLOGIQUES	54
B PREPARATION DE L'EXTRAIT AQUEUX D'<u>E.cannabinum</u> L.	56
B.1 PROTOCOLE D'EXTRACTION	
B.2 LOTS UTILISES	
C CARACTERISATION DE L'EXTRAIT	59
C.1 MATERIEL ET METHODES	
C.1.1 PREPARATION DES EXTRAITS	
C.1.2 IDENTIFICATION DES EXTRAITS EN C.C.M.	
C.2 RESULTATS ET DISCUSSION	
C.2.1 LACTONES SESQUITERPENIQUES	

C.2.2. FLAVONOIDES ET ACIDES-PHENOLS	
C.2.3 ACIDES-ALCOOLS	
C.2.4 ALCALOIDES	
C.2.5 TENEUR EN IONS Na ⁺ et K ⁺	
D CONCLUSION	68

**3^{ème} PARTIE ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE L'EXTRAIT
AQUEUX D'E.cannabinum L.**

CONDITIONS D'ELEVAGE ET D'EXPERIMENTATION DES ANIMAUX	69
A ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. CHEZ LA SOURIS	71
A.1 MATERIEL ET METHODES	
A.2 RESULTATS ET DISCUSSION	
B PROPRIETES CHOLERETIQUES D' <u>E.cannabinum</u> L.	74
B.1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	
B.1.1 LE FLUX ACIDES BILIAIRES DEPENDANT	
B.1.2 LE FLUX ACIDES BILIAIRES INDEPENDANT	
B.1.3 LE FLUX EXTRAHEPATOCYTAIRE	
B.2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. SUR LE FLUX BILIAIRE CHEZ LE RAT	80
B.2.1 MATERIEL ET METHODES	
B.2.2 STATISTIQUES	
B.2.3 RESULTATS	
B.2.4 ANALYSE DES RESULTATS	
B.3 RECHERCHE DU SITE D'ACTION D' <u>E.cannabinum</u> L. SUR LA FORMATION DE LA BILE	
B.3.1 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. SUR LE TAUX D'ACIDES BILIAIRES DANS LA BILE	90
B.3.1.1 MATERIEL ET METHODES	
B.3.1.2 STATISTIQUES	
B.3.1.3 RESULTATS	

B.3.1.4	ANALYSE DES RESULTATS	
B.3.2	INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. SUR LA CLAIRANCE BILIAIRE A L'ERYTHRITOL	95
B.3.2.1	MATERIEL ET METHODES	
B.3.2.2	EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES	
B.3.2.3	RESULTATS	
B.3.3.4	ANALYSE DES RESULTATS	
B.4.	DISCUSSION	106
B.4.1	ANALYSE COMPARATIVE	
B.4.2	RELATION STRUCTURE/ACTIVITE	
C	PROPRIETES ANTIHEPATOTOXIQUES D' <u>E.cannabinum</u> L.	
C.1	INFLUENCE DE L'EXTRAIT D' <u>E.cannabinum</u> L. VIS-A-VIS DE L'HEPATITE INDUITE PAR LE CCl ₄ <u>IN VIVO</u> CHEZ LE RAT	116
C.1.1	ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	
C.1.1.1	METABOLISME DU CCl ₄	
C.1.1.2	INTOXICATION EXPERIMENTALE AU CCl ₄ IN VIVO	
C.1.1.2.1	ADMNISTRATION DU TOXIQUE	
C.1.1.2.2	ANALYSES BIOCHIMIQUES	
C.1.1.3	LES ANTIHEPATOTOXIQUES	
C.1.1.3.1	LES MOLECULES DE SYNTHESE	
C.1.1.3.2	MOLECULES D'ORIGINE NATURELLE	
C.1.2	INFLUENCE D'UN PRETRAITEMENT ET D'UN POST-TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. VIS-A-VIS DE L'INTOXICATION EXPERIMENTALE AU CCl ₄ CHEZ LE RAT	130
C.1.2.1	MATERIEL ET METHODES	
C.1.2.2	STATISTIQUES	
C.1.2.3	RESULTATS	
C.1.2.4	ANALYSE DES RESULTATS	
C.2	MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EVALUATION DE L'EFFET ANTIHEPATOTOXIQUE D' <u>E.cannabinum</u> L. CHEZ LA SOURIS	141
C.2.1	ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	

C.2.2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'<u>E.cannabinum</u> L. SUR LE TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL CHEZ LA SOURIS INTOXIQUEE AU CCl₄	144
C.2.2.1 MATERIEL ET METHODES	
C.2.2.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES	
C.2.2.3 RESULTATS	
C.2.2.4 ANALYSE DES RESULTATS	
C.2.3 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'<u>E.cannabinum</u> L. VIS-A-VIS DE L'HEPATITE INDUITE PAR LE CCl₄ CHEZ LA SOURIS	148
C.2.3.1 MATERIEL ET METHODES	
C.2.3.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES	
C.2.3.3.RESULTATS	
C.2.3.4 ANALYSE DES RESULTATS	
C.3 APPROCHE DU MECANISME D'ACTION D'<u>E.cannabinum</u> L. PAR DES TECHNIQUES EXPERIMENTALES <u>IN VITRO</u> ET PAR LE TEST D'INTOXICATION AU CCl₄ CHEZ LA SOURIS	155
C.3.1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	
C.3.1.1 MODELE D'ETUDE SUR HEPATOCYTES ISOLES DE RAT	
C.3.1.2 ETUDE DU POUVOIR ANTIRADICALAIRE D'UNE SUBSTANCE	
C.3.2 ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'<u>E.cannabinum</u> L. SUR HEPATOCYTES ISOLES DE RAT	158
C.3.2.1 MATERIEL ET METHODES	
C.3.2.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES	
C.3.2.3 RESULTATS	
C.3.3 ETUDE DE L'EFFET ANTIHEPATOTOXIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'<u>E.cannabinum</u> L. VIS-A-VIS D'UNE INTOXICATION EXPERIMENTALE AU CCl₄ SUR HEPATOCYTES ISOLES DE RAT	161
C.3.3.1 MATERIEL ET METHODES	
C.3.3.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES	
C.3.3.3 RESULTATS	
C.3.4 RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTILIPEROXYDANTE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'<u>E.cannabinum</u> L. VIS-A-VIS D'UNE INTOXICATION EXPERIMENTALE AU TERBUTYLHYDROPEROXYDE (ter-BOOH)	165
C.3.4.1 PROTOCOLE	

C.3.4.2	RESULTATS	
C.3.5.	RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTIRADICALAIRE DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. <u>IN VITRO</u>	167
C.3.5.1.	PROTOCOLE	
C.3.5.2	RESULTATS	
C.3.6	RECHERCHE D'UN INFLUENCE DE L'EUPATORIOPICRINE SUR LE TEST D'INTOXICATION AU CCl ₄ CHEZ LA SOURIS	168
C.3.6.1	PROTOCOLE	
C.3.6.2	RESULTATS	
C.4.	ANALYSES DES RESULTATS	170
C.5	DISCUSSION	171
C.5.1	ETUDE COMPARATIVE DES EXTRAITS AQUEUX VEGETAUX ET DES SUBSTANCES NATURELLES ANTIHEPATOTOXIQUES RETENUES DE LA LITTERATURE	
C.5.2	ETUDE COMPARATIVE DE DIVERSES MOLECULES ANTINECROTIQUES	
C.5.3	APPROCHE DU MECANISME CYTOPROTECTEUR DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. VIS-A-VIS DU CCl ₄	
D	PROPRIETES DIURETIQUES D' <u>E.cannabinum</u> L.	185
D.1	RAPPEL SUR LA PHARMACOLOGIE DU REIN ET DES DIURETIQUES	
D.1.1	TRANSFERTS DES PRINCIPAUX PARAMETRES URINAIRES	
D.1.2	CONCENTRATION ET DILUTION DES URINES	
D.1.3	LES DIFFERENTS DIURETIQUES	
D.1.4	LES DIFFERENTS MODELES EXPERIMENTAUX	
D.2	INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> L. EN ADMINISTRATION CHRONIQUE SUR LA DIURESE ET LE BILAN IONIQUE DE L'URINE CHEZ LE RAT	193
D.2.1	MATERIEL ET METHODES	
D.2.2	EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES	
D.2.3	RESULTATS	

D.3 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'<u>E.cannabinum</u> L.	204
SUR LA DIURESE AQUEUSE ET LA VITESSE D'EXCRETION URINAIRE CHEZ LE RAT EN SURCHARGE HYDRIQUE	
D.3.1 MATERIEL ET METHODES	
D.3.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES	
D.4 ANALYSE DES RESULTATS ET DISCUSSION	214
D.4.1 MODELE CHRONIQUE	
D.4.2 MODELE AIGU	
CONCLUSION	226
TRAVAUX CITES	233

ERRATA

Par suite d'une erreur de numérotation, les pages 96, 128 et 172 n'existent pas.

Les pages 17 et 18 sont inversées

Complément à la référence d'Avicenne en page 22 :
Avicenne(980?-1037), Canonis Libris, Arabicum medicorum
principis, 2(5), per Fabium Paulinum Vtinensem , Venitiis, apud
Juntas, 1608.

Eupatorium *Capp. 240.*
Eupatorium quidam dicitur herba, quae in
Grecia, et in Italia, et in Sicilia, et in
Italia, et in Sicilia, et in Sicilia, et in Sicilia,
& in Sicilia, et in Sicilia, et in Sicilia, et in Sicilia,
& in Sicilia, et in Sicilia, et in Sicilia, et in Sicilia,
40 & in Sicilia, et in Sicilia, et in Sicilia, et in Sicilia,
Decorata. Est bonum in initio alopecia, & in
Kulnera, & plera. Linitur cum adipe veteri
per vlcera difficilis consolidationis, & eius succus
confert leabiei, & pruritus, quando bibitur cum
aqua fumiterre, et oxymelle, et similiter flos eius
& succus ipsius est fortior. *Membra nutrimenta.*
Confert doloribus hepatis, & oppilationibus
eius, & confortat ipsum, & confert duritiei sple
nis, & apostematibus hepatis, et apostematibus
50 stomachi, & eius herba, et succus conferunt
[inallueta forma] et accidentibus, hydropis.
Membra expulsiua. Datur in potu cum vino, et
confert vlcerebus intestinorum. *Febris.* Confert
febris chronicis, et antiquis, propria succus
eius, et proprie cum succo absinthii. *Pericula.*
Loco eius ponitur pondus de assaro, et medicas
pondens ipsius de absinthio.

INTRODUCTION



INTRODUCTION

La phytothérapie traditionnelle qui connut un intérêt constant depuis la plus haute antiquité jusqu'au début du 20^{ème} siècle, avait des bases empiriques et un caractère sacré : la plante, outre sa beauté, ses couleurs et ses odeurs, était sacralisée de par sa morphologie (loi de similitude), sa possible toxicité et ses dons curatifs. Sa désaffectation provient d'une part du développement de la pensée rationaliste et des découvertes majeures de la chimie de synthèse et de la chimiothérapie.

Le reproche majeur qui lui fut alors adressé était l'absence de fondement scientifique de son efficacité curative et le caractère inconstant des préparations.

Aujourd'hui, la phytothérapie bénéficie d'un arme, l'ethnopharmacologie, dont la démarche alliant travail sur le terrain et travail en laboratoire permet une approche scientifique des données empiriques.

La première démarche de l'ethnopharmacologie est de sélectionner les espèces végétales en fonction de la tradition culturelle, de l'originalité botanique en insistant sur les plantes endémiques et de la connaissance phytochimique moderne de ces espèces.

Ensuite des études chimiques et pharmacologiques sont entreprises en laboratoire de manière à confirmer ou infirmer la tradition thérapeutique.

Enfin, il est possible de standardiser les préparations, élaborer des formes galéniques adéquates et effectuer des contrôles à tous les stades.

Le but de ce travail était de rechercher les propriétés d'un extrait d'Eupatorium cannabinum L. rencontrées en médecine traditionnelle au moyen de techniques pharmacologiques expérimentales chez l'animal. Ce travail s'inscrit donc dans les finalités mêmes de l'ethno-pharmacologie qui, par son approche pluridisciplinaire, s'intéresse, entre autres, à la fois aux indications thérapeutiques et aux techniques modernes d'exploration pharmacologique.

Au travail sur le terrain s'est substitué une recherche bibliographique visant, entre autres, à établir des convergences d'utilisation dans diverses pharmacopées traditionnelles.

Quant au travail en laboratoire, le pari était délicat car il avait été décidé de respecter la posologie traditionnelle qui recommandait la prise de décoctions ou d'infusions de feuilles fraîches ou sèches.

La recherche en phytothérapie fait relativement peu état de travaux effectués avec des extraits végétaux totaux; il s'agit le plus souvent de fractions purifiées, enrichies en principes actifs au moyen de solvants organiques et bien souvent de molécules végétales pures.

Une analyse bibliographique a permis de préciser les caractéristiques botaniques et chimiques de l'espèce et de faire le point sur les indications thérapeutiques de cette plante très commune en Europe.

Une identification chimique a été réalisée : la finalité de ce travail n'était pas de fractionner l'extrait à l'aide de techniques sophistiquées mais d'obtenir une **carte d'identité chimique** de l'extrait végétal.

Des coupes histologiques de la plante fraîche sont venues compléter l'étude botanique d'E.cannabinum L.

L'activité d'E.cannabinum L. a été explorée sur deux niveaux d'action, souvent associés en phytothérapie, le foie et le rein.

* Au niveau hépatique, deux fonctions pharmacologiques ont été approfondies : l'activité cholérétique et l'activité antihépatotoxique.

** L'activité cholérétique a été étudiée sur le modèle classique d'étude de la cholérèse chez le rat par catéthérisme du canal cholédoque, la bile étant recueillie à intervalles réguliers. De manière à préciser l'origine du flux biliaire stimulé par l'extrait végétal, deux protocoles ont été choisis : la **clearance à l'érythritol** de manière à vérifier l'origine hépatocytaire du flux biliaire, et le **dosage des acides biliaires** afin de rechercher une éventuelle stimulation du flux acides biliaires dépendant.

** Nous avons ensuite exploré le **pouvoir antihépatotoxique** de l'extrait aqueux d'E.cannabinum L. sur un modèle expérimental **in vivo, chez le rat**, reproduisant toutes les étapes de l'hépatite. Un toxique largement étudié et utilisé pour l'étude de l'hépatotoxicité et l'hépatoprotection a été choisi : le tétrachlorure de carbone. Le modèle expérimental a ensuite été adapté à la **souris** de manière à mettre au point un test plus aisé à entreprendre et plus fiable pour le recherche de produits antihépatotoxiques **in vivo**.

** L'approche du **mécanisme d'action antihépatotoxique** de l'extrait végétal a été étudié au moyen de différentes techniques : Dans un but d'éthique et d'économie, l'utilisation d'**hépatocytes isolés de rat** était une méthode séduisante pour de larges "screenings". Celle-ci a été développée au laboratoire de manière à confirmer les résultats obtenus **in vivo**.

Le même modèle utilisant un toxique d'action plus spécifique de l'étude des mécanismes de la lipoperoxydation, le **terbutylhydroperoxyde**, a permis de préciser le niveau d'action antihépatotoxique de l'extrait.

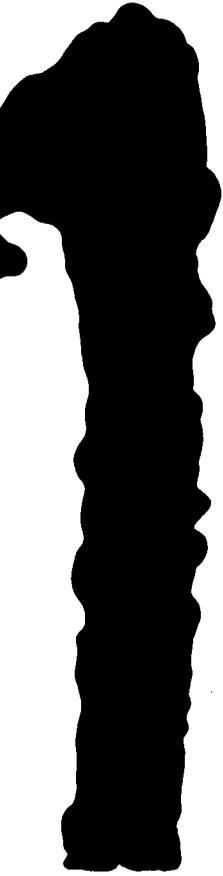
Le potentiel antiradicalaire de l'extrait a été testé sur un modèle simple utilisé au laboratoire, le test de l'inhibition du radical diphényl-picrylhydrazyl.

Enfin une seule molécule contenue dans l'extrait aqueux d'E.cannabinum L. a été testée sur le modèle d'intoxication expérimentale chez la souris car ce composé, l'eupatoriopicrine, est présent en quantité non négligeable et est caractéristique de l'espèce E.cannabinum L.

* Beaucoup de plantes à tropisme hépatique sont recommandées comme diurétiques et E.cannabinum en fait partie. Nous avons saisi l'occasion d'explorer cette propriété souvent rencontrée en phytothérapie et rarement étudiée expérimentalement. Un modèle d'étude chronique par voie orale, chez le rat, a été complété par l'utilisation d'un modèle aigu utilisant l'élimination d'une surcharge hypotonique.

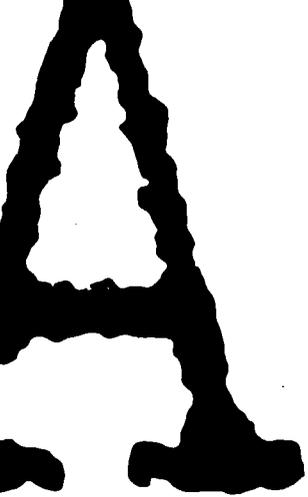
Au cours de cette étude des propriétés pharmacologiques d'E.cannabinum L., nous avons recherché à confirmer ou à infirmer les indications traditionnelles et à comparer nos résultats avec ceux rencontrés dans notre laboratoire et dans la littérature.

L'originalité de notre démarche tient au respect de l'utilisation et de la posologie traditionnelles en utilisant un extrait aqueux total de la plante et à l'approche des mécanismes d'action responsables de ces propriétés pharmacologiques recherchées, tâche délicate s'il en est compte tenu du produit testé. Par ailleurs, ce travail aura permis de faire le point sur les travaux effectués sur les plantes à tropisme hépatorénal.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE





Etude botanique



A. ETUDE BOTANIQUE

A.1. ETUDE DU GENRE EUPATORIUM L.

A.1.1. LA FAMILLE DES ASTERACEAE (HEYWOOD et coll, 1977; CRONQUIST, 1981; DELANGHE et coll, 1983)

A.1.1.1. TAXONOMIE

Cette famille, unique représentant de l'ordre des Astérales, se distingue essentiellement par sa structure florale uniforme, sa grande variété écologique, son caractère cosmopolite et l'importance et la plasticité de ses composés chimiques.

Les Asteraceae comprennent 1300 genres et environ 20000 espèces, généralement herbacées. Bien que très cosmopolites, elles préfèrent les régions tempérées, subtropicales et tropicales, particulièrement les régions boisées.

Ces nombreuses espèces se caractérisent notamment par une grande variété de molécules chimiques qui leur assurent également un système de défense efficace.

La première classification en 13 tribus est réalisée par Bentham en 1873, lequel s'inspire largement des travaux de Cassini, De Candolle et Lessing (tableau 1).

Un siècle plus tard, Cronquist abandonne la tribu des Heleniae et crée celle des Liabeae.

Un nouvel arrangement biphylétique est proposé par Carlquist en 1966. Ce dernier distingue deux sous-familles, les Chicorioideae et les Asteroideae, renfermant au total 12 tribus :

Sous-famille Cichorioideae : Mutiseae, Vernoniae, Arctotideae, Cichorieae, Eupatorieae.

Sous-famille Asteroideae : Heliantheae, Astereae, Inuleae, Calenduleae, Senecioneae, Anthemideae.

Les deux groupes de Wagnitz (1976 dans Heywood et coll, 1977) s'inscrivent également dans cette classification. Mais la tribu des Eupatorieae, classée dans la sous-famille des Asteroideae, passe ici dans le sous-groupe apparenté aux Cichorioideae:

Groupe 1 : Vernoniae, Liabeae, Carduceae, Echinopeae, Arctotideae

**TAB.1 : CLASSIFICATION DES ASTERACEAE SELON
BENTHAM (Heywood et coll, 1977).
(Appellations originales entre parenthèses)**

- Tribu 1 : Vernoniaeae (Vernoniaceae)**
- Tribu 2 : Eupatorieae (Eupatoriaceae)**
- Tribu 3 : Astereae (Asteroideae)**
- Tribu 4 : Inuleae (Inuloideae)**
- Tribu 5 : Heliantheae (Helianthoideae)**
- Tribu 6 : Helenieae (Helianthoideae)**
- Tribu 7 : Anthemideae**
- Tribu 8 : Senecioneae (Senecionideae)**
- Tribu 9 : Calenduleae (Calendulaceae)**
- Tribu 10 : Arctotideae**
- Tribu 11 : Cynareae (Cynaroideae)**
- Tribu 12 : Mutisieae (Mutisaceae)**
- Tribu 13 : Cichoriae (Cichoriaceae)**

Groupe 2 : Heliantheae, Astereae, Inuleae, Calenduleae, Senecioneae, Anthemideae, Heliantheae, Eupatorieae.

Jeffrey, en 1978, proposera une troisième sous-famille intermédiaire, incluant les Eupatorieae et les Senecioneae, mais en accord avec Heywood et coll. (1977), la classification des Asteraceae de Cronquist (1981) sera retenue.

Tribu 1 : Lactuceae (Hieracium, Crepis, Lactuca, Taxacum, Sonchus...).

Cette tribu peut prendre le rang de la sous-famille des Cichorioideae (Liguliflorae). L'autre sous-famille des Asteroideae (Tubuliflorae) comprend le reste de la famille:

Tribu 2 : Senecioneae (Senecio, Arnica, Tussilago).

Tribu 3 : Vernonieae (Vernonia).

Tribu 4 : Eupatorieae (Eupatorium, Ageratum, Mikania, Stevia...).

Tribu 5 : Cynareae (Centaurea, Cousinia, Arctium, Cardium, Carthamus, Cirsium, Echinops...).

Tribu 6 : Inuleae (Inula, Antennaria, Helichrysum, Leontopodium).

Tribu 7 : Astereae (Aster, Bellis, Erigeron, Solidago...).

Tribu 8 : Anthemideae (Anthemis, Crysanthemum, Tanacetum, Artemisia...)

Tribu 9 : Heliantheae (Ambrosia, Helianthus, Bidens, Cosmos, Dahlia, Rudbekia, Tagetes, Xanthium).

Tribu 10 : Calenduleae (Calendula...).

Tribu 11 : Mutiseae (Gerbera, Mutisia).

Tribu 12 : Arctotideae (Arctotis).

Tribu 13 : Liabeae (Liabum, Munnozia).

A.1.1.2 DESCRIPTION BOTANIQUE

* Les fleurs de cette famille, à symétrie radiale ou bilatérale, sont toutes regroupées en inflorescences. Généralement hermaphrodites, petites, nombreuses et épigynes, elles se réunissent autour d'un réceptacle commun sous forme de capitule, habituellement pédonculé et entouré d'un involucre. La corolle se compose de 3 ou 4 ou 5 pétales soudés en un tube prolongé d'autant de lobes (fleurs tubulées) ou en un tube prolongé d'une languette ou ligule (fleurs ligulées).

* Les feuilles, alternes, opposées ou basilaires, simples ou composées, sont généralement dépourvues de ligules.

* L'androcée renferme 4 à 5 étamines, à filets soudés au tube de la corolle et à anthères généralement soudées entre elles en un manchon à l'intérieur duquel passe un style.

* Le gynécée comprend 2 carpelles soudés entre eux. L'ovaire est infère, uniloculaire. L'ovule est basal, anatrope.

* Les fruits sont des akènes surmontés généralement d'un calice persistant ou aigrette de soies.

Les caractères communs des Asteraceae peuvent se résumer comme suit:

* Périanthe différencié en calice et corolle.

* Corolle à pétales soudés en tube ou en ligule.

* Fleurs épigynes, petites, nombreuses et réunies en capitule.

* 4 à 5 étamines à anthères généralement soudées entre elles autour du style.

* Carpelles soudés entre eux, renfermant un ovule infère, basal, anatrope.

A.1.2 POSITION SYSTEMATIQUE DU GENRE EUPATORIUM L. DANS LA FAMILLE DES ASTERACEAE

A.1.2.1.1 LA TRIBU DES EUPATORIEAE Cass.

La tribu fut décrite pour la première fois par Linné en 1753. Ce groupe fut ensuite reconnu par Cassini en 1813 et Humbolt en 1818. Après la classification de Bentham en 1873 et les travaux de Robinson et Cronquist, sa position exacte dans la famille reste encore discutée.

Cette tribu renferme 160 genres et environ 2000 espèces, la plupart sud-américaines. Robinson et King la subdivisent en 19 groupes comprenant de nombreuses sous-tribus potentielles :

- 1 : Adenostemmatinae (sous-tribu)
- 2 : Eupatoriinae (sous-tribu)
- 3 : Disynaphia (groupe)
- 4 : Gyptis (groupe)
- 5 : Acritopappus (groupe)
- 6 : Piqueria (groupe)
- 7 : Trichocoronis (groupe)
- 8 : Ayapana (groupe)
- 9 : Alomiinae (sous-tribu)
- 10 : Liatris (groupe)
- 11 : Fleischmania (groupe)
- 12 : Critonia (groupe)
- 13 : Praxelis (groupe)
- 14 : Hebeclinum (groupe)
- 15 : Neomicandea (groupe)
- 16 : Mikania (groupe)
- 17 : Ageratina (groupe)
- 18 : Homeisteria (groupe)
- 19 : Oaxacania (groupe)

Les caractères qui différencient la tribu des Eupatorieae des autres tribus sont les suivants :

- * Cette tribu est une des quelques Asteraceae à posséder des feuilles opposées.
- * Les pétioles sont très étroitement ailés et marqués de sillons dans la partie supérieure.
- * L'inflorescence est généralement un corymbe de capitules.
- * L'involucre est habituellement imbriqué, subimbriqué ou eximbriqué.
- * Les fleurs sont toutes hermaphrodites.
- * Les corolles sont blanchâtres, rougeâtres, jamais jaunâtres; Elles sont en forme de tube ou d'entonnoir.
- * Le style possède le plus important des caractères distinctifs des Eupatorieae : sa base est pubescente et ce caractère ne se rencontre dans aucune autre tribu, mais ceci n'est pas considéré comme taxonomiquement fiable.
- * Les akènes sont prismatiques, à 5 côtés.

A.1.2.2. LA SOUS-TRIBU DES EUPATORIINAE (Robinson et King dans Heywood et coll., 1977)

Ce groupe est principalement limité à l'est de l'Amérique du Nord et de l'Amérique du Sud et n'a sans doute jamais atteint l'ouest de ces régions. Deux genres se sont dispersés naturellement: Eupatorium L. qui a atteint l'Asie et l'Europe par l'Alaska et le genre Stomatanthus qui a donné naissance à 3 espèces africaines.

Les caractéristiques principales de cette tribu sont les suivantes :

- * Bractées involucreales subimbriquées.
- * Style pubescent à sa base.

Les Eupatoriinae renferment les genres mentionnés dans le tableau 2.

TABLEAU 2 : LES GENRES DE LA SOUS-TRIBU DES EUPATORIINAE

GENRES	NOMBRE	DISTRIBUTION
<u>Eupatorium</u> L.	38	Est des USA, Asie, Europe
<u>Eupatoriodelphus</u> K. & R.	4	Est de
<u>Austroeupatorium</u> K. & R.	11	l'Amérique du Nord, Amérique du Sud
<u>Stomatanthes</u> K. & R.	15	Brésil, Nord de
<u>Hatchbachiella</u> K. & R.	2	l'Argentine, Afrique

A.1.2.3 LE GENRE EUPATORIUM L.

A.1.2.3.1 POSITION SYSTEMATIQUE

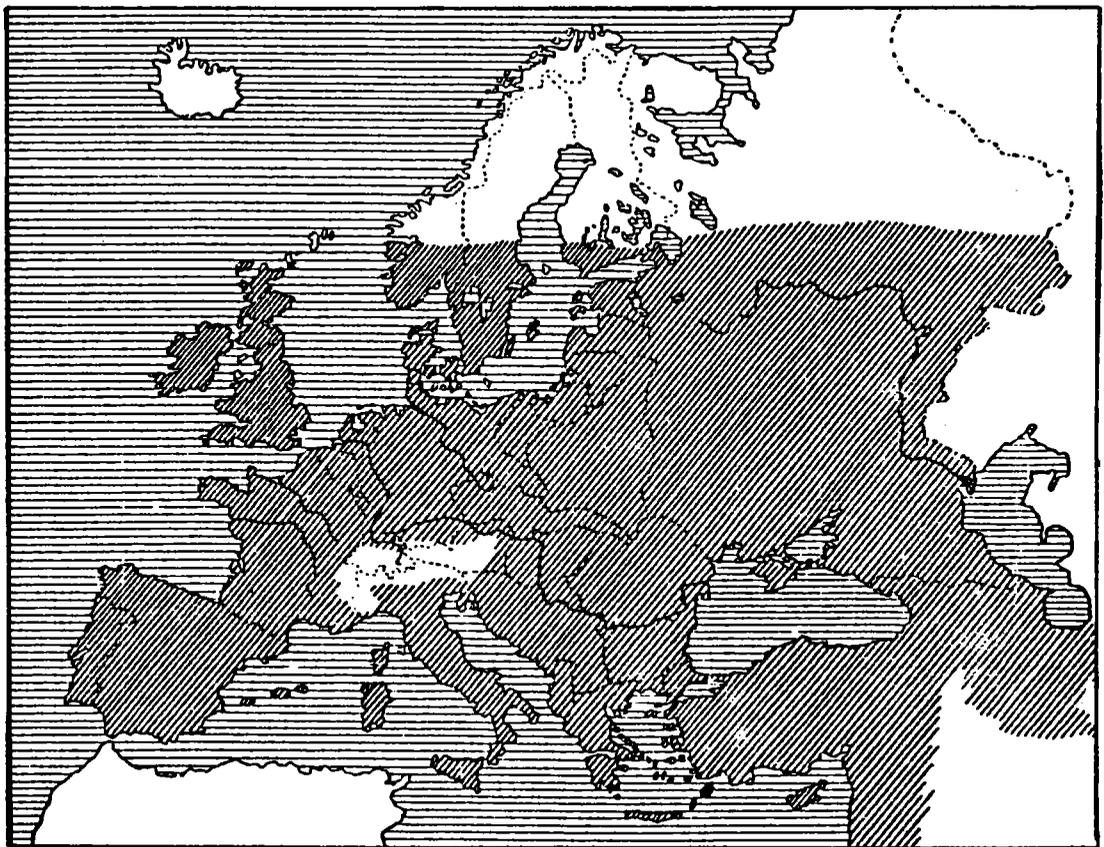
Eupatorium L. est un groupe naturel d'espèces partageant les caractères de base d' Eupatorium cannabinum L. :

- * Les sommités fleuries sont relativement pauvres en fleurs
- * Les fleurs renfermant les akènes sont presque exclusivement glandulifères
- * Absence de stomates au dos des lobes de la corolle
- * Absence d'épaississements annulaires dans les cellules du filet de l'anthere
- * Présence de poils à la base du style
- * Les branches du style sont très papilleuses
- * Absence de carpopodium distinct.

Le genre Eupatorium L. a été décrit pour la première fois en 1700 par Tournefort, puis repris par Linné dans *Species Plantarum* en 1753. Distribué dans les forêts tempérées de l'hémisphère nord, il est originaire d'Amérique du Nord où il est apparu au tertiaire. A la suite de variations climatiques, il a disparu de l'ouest de l'Amérique du Nord et s'est étendu aux régions tempérées d'Asie et d'Europe, ainsi qu'au Mexique (figure 1) Le genre renferme environ 37 espèces.

A.1.2.3.2 CLE DE DETERMINATION DE GENRE EUPATORIUM L.

Plusieurs clés de détermination ont été proposées par différents auteurs. Ainsi Tutin et coll. (1976) proposent:



inverse figure 3

**FIGURE 1 : CARTE DE LA REPARTITION MONDIALE DU GENRE
EUPATORIUM L. (King et Robinson, 1970)**

* Plantes habituellement sans latex ; au moins les fleurs intérieures non ligulées (sous-famille des Asteroideae).

* Feuilles et bractées involucriales très rarement épineuses ; fleurs ligulées souvent présentes ; style jamais fin ni couvert de poils.

** Au moins quelques feuilles opposées

*** Aigrettes de poils nombreux

@ Fleurs jaunes, ligule présent :

Arnica

@ Fleurs roses, ligule absent :

Eupatorium.

Delanghe et coll. (1983), quant à eux , établissent la clé suivante :

* Fleurs uniquement tubulées

* Limbe foliaire présentant des dents terminées en pointes piquantes; tiges parfois épineuses; akènes le plus souvent surmontés d'arêtes

** Feuilles opposées, toujours présentes au moment de la floraison

*** Akènes surmontés d'une aigrette de soies; capitules à 3 ou 6 fleurs rougeâtres ou rosées, disposées en corymbes denses : Eupatorium

**** Akènes surmontés de 2 ou 4 ou 5 arêtes épineuses; Capitules généralement à plus de 6 fleurs jaunes, solitaires ou disposées en corymbe lâche : Bidens.

Enfin la clé de détermination proposée par Garnier (1961) est décrite en ces termes :

* Fleurs toutes groupées en capitules, toutes munies d'une corolle colorée; fruit libre, inséré directement sur le réceptacle; anthères soudées ensemble et formant un tube autour du style

* Plantes sans latex; corolles toutes ou au moins celles du centre régulières et en tubes : Asteroideae

** Fruit surmonté d'une aigrette de soies ou de 2 ou 4 arêtes épineuses

*** Surface du réceptacle sans paillettes ou écailles mais parfois des alvéoles à bords dentés

@ Feuilles opposées, divisées en 3 ou 5 segments lancéolés; fleurs rosées en capitules très petits et très nombreux dans un même plan; plante élevée: Eupatorium.

A.2 ETUDE DE L'ESPECE EUPATORIUM CANNABINUM L.

King et Robinson (1970)proposent une liste des espèces du genre Eupatorium L (tableau 3) et établissent les caractéristiques du genre et de l'espèce type, E.cannabinum L. (figure 2).

A.2.1 CLE DE DETERMINATION DE L'ESPECE E.cannabinum L.

Parmi toutes les espèces d'Eupatorium L., il n'existe qu'une seule espèce européenne, représentée par E. cannabinum L. Les flores européennes signalent néanmoins 2 espèces américaines introduites, E. adenophorum Spreng (Tutin et coll. 1976 ; Guinochet et Vilmorin, 1982) et E. rugosum Houtt. (Delanghe et coll., 1983) Deux variétés d'E. cannabinum L sont décrites , syriacum Jacq. (Boiss.) et corsicum Req. Leur clé de détermination est la suivante (Tutin et coll., 1976; Delanghe et coll., 1983; Garnier, 1961, Meikle, 1985) :

**TABEAU 3 : LISTE DES ESPECES DU GENRE EUPATORIUM L.
(King et Robinson, 1970)**

<i>E. album</i> L.	E. North America
<i>E. altissimum</i> L.	E. North America
<i>E. anomalum</i> Nash	SE. United States
<i>E. benguetense</i> C. B. Rob.	Philippine Is.
<i>E. camiguinense</i> Merr.	Philippine Is.
<i>E. cannabinum</i> L. including <i>E. caucasicum</i> Stev. <i>E. corsicum</i> Reg., <i>E. punduahum</i> Wall., <i>E. syriacum</i> Jacq.	Europe, N. Africa, Asia minor, India
<i>E. capillifolium</i> (Lam.) Small	SE. United States, Cuba, Bahama Is.
<i>E. catense</i> Elm.	Philippine Is.
<i>E. chinense</i> L. including <i>E. glehnii</i> F. Schmidt ex. Trautv., <i>E. japonicum</i> Thunb., <i>E. sachalinense</i> Fr., <i>E. wallichii</i> DC.	E. Asia
<i>E. cuneifolium</i> Willd.	E. United States
<i>E. fernaldii</i> Godfrey	SE. United States
<i>E. formosanum</i> Hoyata	Formosa
<i>E. fortunei</i> Turcz. including <i>E. stoechadosum</i> Hance	E. Asia
<i>E. heterophyllum</i> DC.	China
<i>E. hyssopifolium</i> L.	E. United States
<i>E. lecheaefolium</i> Greene	SE. United States
<i>E. leptophyllum</i> DC.	SE. United States, Cuba
<i>E. lindleyanum</i> DC.	SE. Asia, Philippine Is.
<i>E. melanadenium</i> Hance	China
<i>E. mikanoides</i> Chapm.	SE. United States
<i>E. perfoliatum</i> L.	E. North America
<i>E. petaloideum</i> Britton	SE. United States
<i>E. pilosum</i> Walt.	E. United States
<i>E. pinnatifidum</i> Ell.	SE. United States
<i>E. quinqueflorum</i> Urb. & Ekman	Dominican Republic
<i>E. recurvans</i> Small	SE. United States
<i>E. reevesii</i> Wall.	S. Asia
<i>E. resinosum</i> Torr.	E. United States
<i>E. rotundifolium</i> L.	E. United States
<i>E. saltuense</i> Fern.	E. United States
<i>E. sambucifolium</i> Eln.	Philippine Is.
<i>E. semiserratum</i> DC.	E. United States
<i>E. serotinum</i> Michx.	E. United States
<i>E. sessilifolium</i> L.	E. North America
<i>E. shimadai</i> Kitamura	Formosa
<i>E. toppingianum</i> Elm.	SE. Asia, Philippine Is.
<i>E. yakushimense</i> Masam & Kitam.	Japan

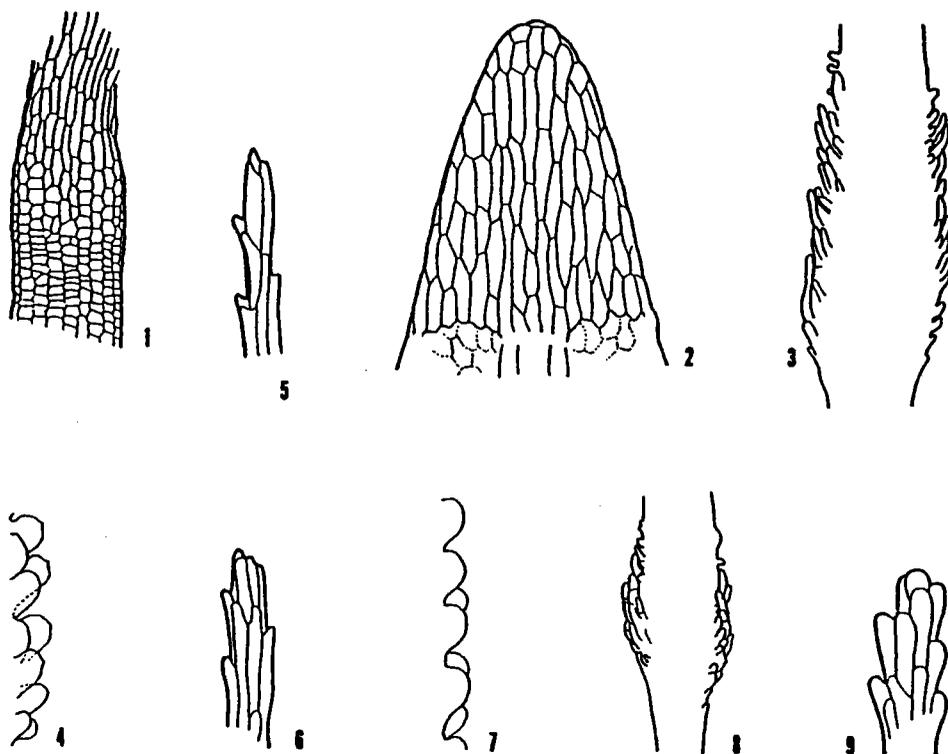


FIGURE 2 : CARACTERISTIQUES DU GENRE EUPATORIUM L. : ESPECE TYPE E.cannabinum L.(fig. 1 à 6) ET E.serotinum Michx.(fig.7 à 9) D'APRES King et Robinson (1970)

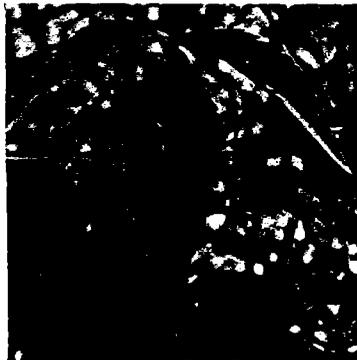
fig.1 à 6 : E.cannabinum L. 1 : collet d'anthere, vue axiale, x135. 2 : extrémité d'anthere, x135. 3 : base du style, x68. 4 : surface de la branche du style, x135. 5 et 6 : extrémités d'une soie (aigrette du fruit), x135.

fig.7 à 9 : E.serotinum Michx. 7 : surface de la branche du style, x135. 8 : base du style, x68. 9 : extrémité d'un soie(aigrette du fruit),x135.

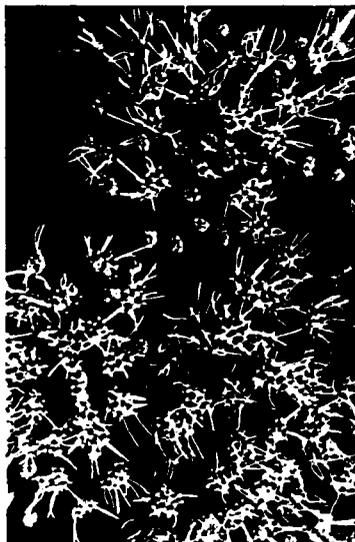
PLANTE ENTIERE FLEURIE
(Haute-Marne, Août 1987)



LA FEUILLE D'E.cannabinum L.



DETAIL DE L'INFLORESCENCE
D'E.cannabinum L.



* Tiges et pétioles pubescents et non glanduleux; feuilles trifides ou pentafides ou simples; fleurs roses à pourpres

** Feuilles tri- ou pentapalmitilobées; plante élevée (de 100 à 175 cm), robuste; tige simple, peu rameuse; capitules de 2 à 5 mm de diamètre, nombreux, en corymbe large et dense, involucre cylindrique; bractées externes plus courtes que les internes; akènes de 3 mm de long, noirs; aigrette de soies nombreuses et plus longue que l'akène; $2n=20$; toute la France, Europe, Asie, Afrique du Nord :

E. cannabinum (figures 2, 4a et 4b)

*** Plante naine ou peu élevée (de 30 à 80 cm), assez grêle; feuilles presque toujours toutes simples; capitule en corymbe peu volumineux; aigrette égalant au plus l'akène; étage inférieur et montagneux de la Corse, points humides:

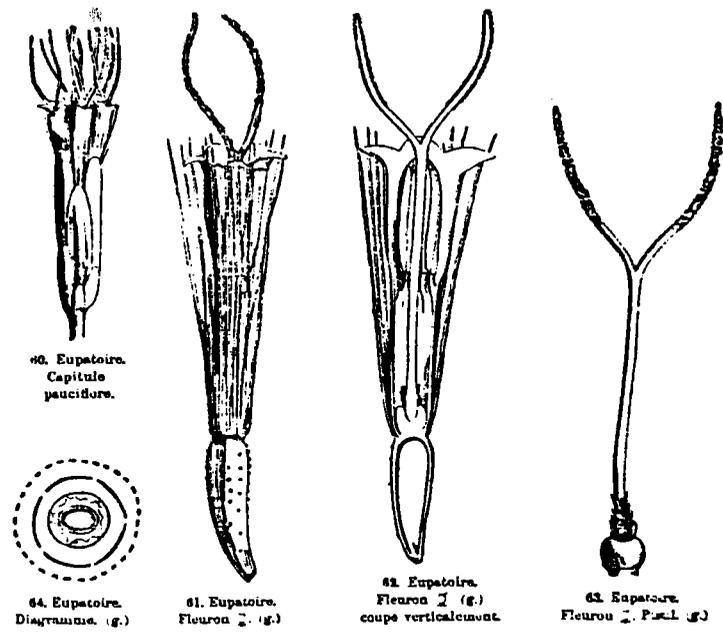
E. cannabinum L. subesp. **corsicum** Req.

*** Plante généralement moins robuste que l'espèce typique E. cannabinum L., division des feuilles plus petites mais plus larges, souvent ovales à elliptiques, pointues, moins de 7 cm de long (souvent 3 cm), souvent plutôt densément recouvertes de poils pubescents blancs comme les jeunes racines, corymbes plutôt petits, avec relativement peu de capitules, points humides, fleurs d'août à octobre, rare à Chypre, au Liban et en Palestine (Meikle, 1985) :

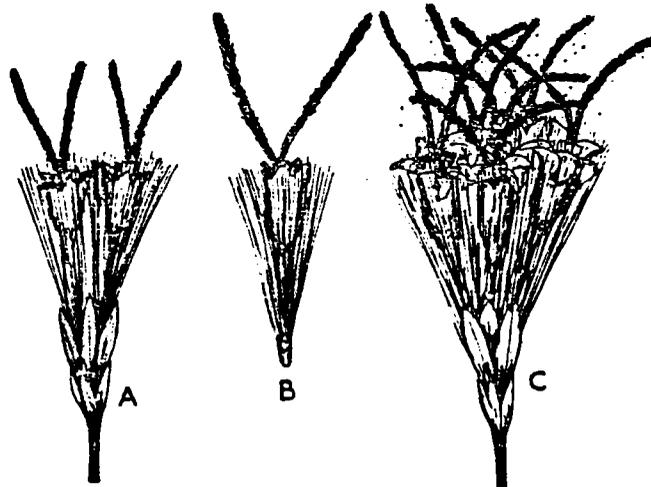
E. cannabinum L. var. **syriacum** (Jacq.) Boiss.

* Tiges ou pétioles pubescents et glanduleux; feuilles simples, rhombiques ou triangulaires, crénelées-dentées, sauf à la base; bractées externes de l'involucre égalant environ les internes; peut atteindre 2 m.; capitules de 5 à 10 mm de diamètre; akènes de 2 mm de long, noirs; aigrettes de 5 à 10 soies; $2n=51$; parfois cultivée comme plante ornementale et naturalisée en quelques points humides de l'étage inférieur de la Corse :

E. adenophorum Spreng.



**FIGURE 4a : LA FLEUR D'E.cannabinum L.
(Le Maout et Decaisne, 1876)**



**A, B, C : capitules avec involucres - B : fleur plus ancienne
que A et C (pollinisation)**

**FIGURE 4b : LA FLEUR D'E.cannabinum L. A DIFFERENTS STADES DE
LA FLORAISON (Ivime and Cook, 1958)**

A.2.2 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

E.cannabinum L. se rencontre dans toute l'Europe, principalement au nord et s'étend de la Finlande (63°N) à l'Asie (Hooker, 1973) et l'Afrique du Nord (figure 3). Cette plante est commune en France, Suisse et Belgique mais cependant rare dans la Creuse et les Ardennes. Elle croît généralement dans les endroits humides, tels que les bois, les bords de ruisseaux, les marais et ce jusqu'à 1700 m. d'altitude. La variété corsicum Req. ne se rencontre qu'à l'étage inférieur et montagneux de la Corse. La variété syriacum Jacq. (Boiss.) se rencontre en quelques points de la province de Gênes en Italie (Pagani et Romussi, 1967).

Du point de vue phytosociologique, elle se rencontre dans les Convolvulion sepilii surtout, Phragmitetalia, Molinietalia, Holschoentalia, Alno-Ulmion, Alnion-Glutinosae (Guinochet et De Vilmorin, 1982).

A.2.3 NOMS VERNACULAIRES (Bonnier, 1934; Fournier, 1948; Maldaus, 1933)

France: eupatoire à feuilles de chanvre, chanvrin, chanvre d'eau, eupatoire d'Avicenne, herbe de Sainte Cunégonde, origan des marais, pantagruelon (décrite par Rabelais).

Allemagne: Wasserdost, Kuningundenkraut, Alpenkraut, Hanfwasserdost, Bolkenkruit, Klettenkraut.

Hollande: Boelkenskruid, Leverkruid.

Italie: eupatorio di Avicenna, canapa salvatica, canapa acquatica, erba Santa Bibiana.

Angleterre: waterhemp, thoroughwort, hemp-agrimony, water mandlin, sweet mandlin, filayra.

Danemark: hamagtig, hjortetröst.

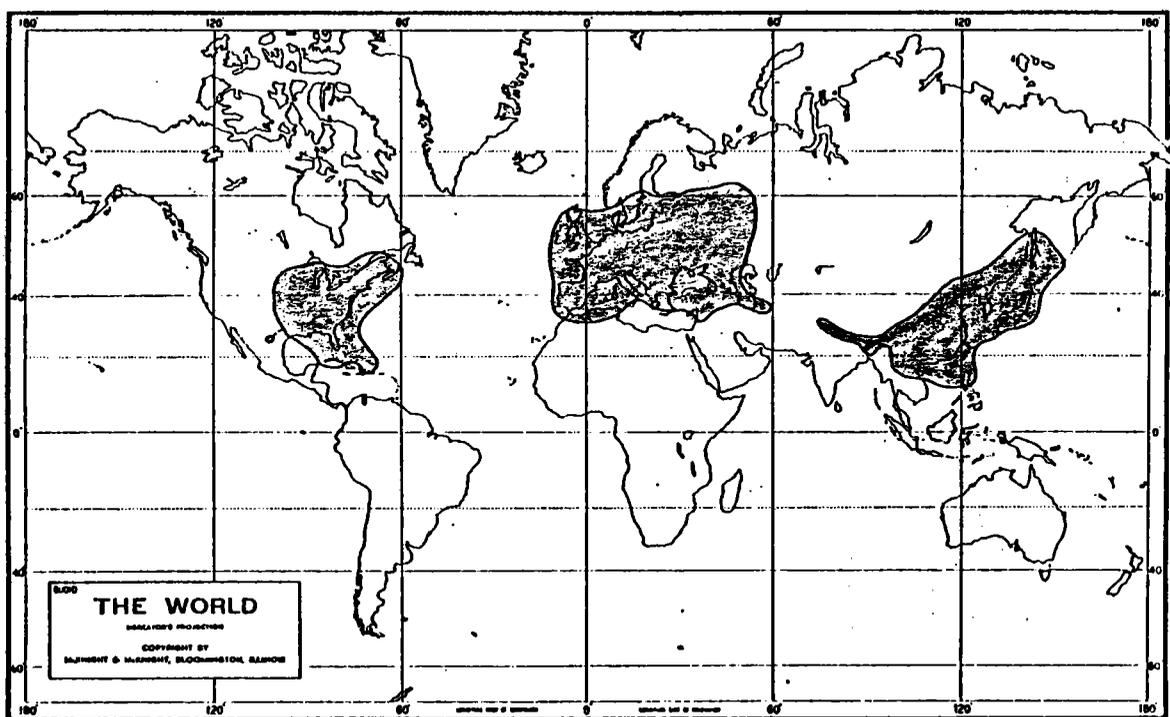
Pologne: sadziec, konopnica.

Russie: poskonnik

Suisse: hampfloks.

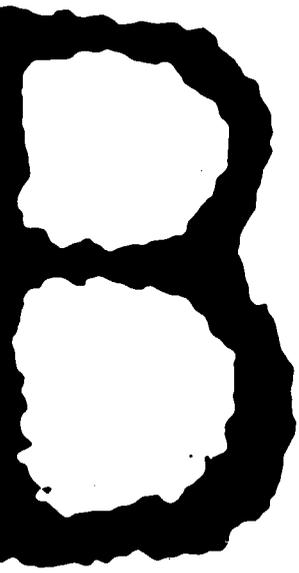
Tchécoslovaquie: konopàc, sadec.

Hongrie: vizikender.



inv. fig 1

**FIG. 3 : CARTE DE LA REPARTITION D'E.cannabinum EN EUROPE
(Maldaus, 1933)**



Utilisation traditionnelle



B.UTILISATION TRADITIONNELLE (Malingre, 1971; Fournier, 1948; Garnier et coll., 1961)

* L'Eupatoire était déjà citée dans les médecines savantes anciennes d'avant l'ère chrétienne:

** à l'époque romaine, l'Eupatoire de Pline correspond bien à Eupatorium cannabinum L. Elle doit d'ailleurs son nom à Pline, en hommage à Mithridate le Grand, roi des provinces pontiques de 111 à 63 avant J.C., surnommé Eupator (Eu=bon, Pater=père). Celui-ci fut le premier à l'utiliser contre les maladies du foie.

Par contre, en médecine grecque, l' ΕΥΠΑΤΟΡΙΟΥ de Dioscoride serait, en fait, Agrimonia eupatoria L.

** en médecine arabe, Avicenne, dans son Canon traduit en 1608 (*) recommande l'Eupatoire contre les affections du foie et l'hydropisie. Une décoction de la racine dans du vin était utilisée comme vomitif, purgatif et diurétique.

Avicenne la recommandait aussi pour les plaies à guérison difficile, la gale, le prurit.

Mais, selon Ibn al Baythar, traduit par Leclerc (1877-1883), l'Eupatoire d'Avicenne et celle de Dioscoride et de Galien ne ferait qu'une et serait Agrimonia eupatoria. En fait une grande confusion règne quant à l'utilisation de l'Eupatoire en médecine traditionnelle arabe.

** la médecine ayurvédique dont les enseignements, datant du 1^{er} et du 2^{eme} siècles après J.C., sont réunis dans deux traités sanskrits, la Carakasamhitâ et la Susrutasamhitâ, ne mentionnent pas l'utilisation de cette plante pourtant endémique en Inde (Mazard, communication personnelle).

* A l'époque médiévale, elle semble peu employée en France où l'on note un emploi tout à fait particulier par les cerfs blessés qui la recherchaient pour guérir leurs plaies. Cette utilisation est mentionnée également en Hollande où la plante porte d'ailleurs le nom de Hirschkleef.

Ses appellations d'herbe de Sainte Cunégonde, impératrice d'Allemagne morte en 1024, Kunigundenkraut et Koninginnekruid, font référence à la grande confiance du peuple germanique envers cette plante et les guérisons furent, dit-on, nombreuses sur le tombeau de cette sainte.

* Cette même espèce va connaître un regain d'intérêt aux dix-septième siècle et dix-huitième siècles avec Boerhaave en Hollande et Tournefort en France. Le premier, en la dénommant Rusticorum panacea, en fait le remède contre de nombreux maux et notamment contre les maladies du foie et les plaies extérieures. Tous deux la recommandent contre les obstructions des viscères, les fièvres intermittentes, le scorbut.

(*) : Canonis libris, Arabicum Medicorum principis, 2(5), Venise, traduction anonyme des canons d'Avicenne en latin.

En Hollande, Dodonaeus, en 1644, affirme qu'elle purifie le sang, chasse les fièvres intermittentes, s'emploie pour lutter contre les maladies de foie, de la vésicule et du pancréas. Sous forme d'oénolé, elle est cicatrisante.

* Eupatorium cannabinum est inscrite à la première édition de la pharmacopée française en 1818; ses feuilles, et plus encore sa racine, sont cholagogues et laxatives.

De nombreux médecins l'utilisent au dix-neuvième siècle. Cazin recommande la racine, fraîche et récoltée au printemps, comme cholérétique, purgatif, contre l'œdème, l'hydropisie et la cachexie paludéenne. Cet auteur cite aussi l'action vermifuge d'une décoction dans du vin ou de la bière. Dorvault (1875), dans son répertoire général de pharmacie pratique, mentionne l'utilisation d'E. cannabinum à l'intérieur contre les obstructions.

* En Allemagne, Thoms (dans Malingré, 1971) en 1929, cite ses propriétés diurétiques, émétiques, antipyrétiques, vulnéraires et anti-inflammatoires. Les travaux de Chabrol et coll. (1934) confirment, sur l'animal, les effets cholérétiques de nombreuses plantes appartenant à la famille des Asteraceae, dont notamment l'Eupatoire.

Fournier, en 1948, consacre un article à cette espèce dans son livre des plantes médicinales et vénéneuses de France, en recommandant son utilisation contre l'embarras gastrique, le catarrhe vésical et, en usage externe, pour la cicatrisation des plaies. L'infusion ou la décoction de 30 à 60 g de feuilles ou de racines fraîches par litre d'eau, la teinture mère, à raison de 15 à 25 gouttes, ainsi que 30 à 120 g de suc de feuilles peuvent être utilisés avec succès.

Leclerc (dans Fournier, 1948) lui attribue, outre ses propriétés antihypercholestérolémiantes, antihypertensives et anticellulitiques, une efficacité dans les dermatoses dues à une déficience de la sécrétion biliaire. Il propose une décoction pendant 10 minutes de 60 g de racines dans un litre d'eau, à raison de 2 à 3 tasses à jeun. Les feuilles peuvent être utilisées comme diaphorétiques, diurétiques et cholérétiques légers. Dans ce cas, on réalise une ébullition de 2 à 3 minutes, suivie d'une infusion de 15 minutes, de 15g de feuilles sèches dans 200 ml d'eau.

En 1983, Bézanger-Beauquesne mentionne une propriété originale: E.cannabinum renforcerait la résistance de l'organisme contre le virus de la grippe.

* En Afrique du Nord, l'utilisation d'E.cannabinum en médecine traditionnelle est confuse car il semblerait qu'elle ait été confondue avec Inula viscosa Ait. (Boulos, 1983; Bellakhdar, 1982). En effet, selon Renaud et Colin (1934), la plante, connue sous le nom de terhala sur les marchés (ou tubbaq), est en fait I.viscosa, très commune, alors qu'E.cannabinum est relativement rare dans le Maghreb.

* **En Inde**, où se côtoient différents types de médecines traditionnelles, Chopra et coll. (1956, 1969) citent les propriétés diurétiques, antiscorbutiques, diaphorétiques, émétiques d'E.cannabinum, ainsi que son emploi contre la jaunisse et pour la cicatrisation des plaies. Nadkarni (1927) la recommande aussi pour les maladies de foie et comme diurétique. La médecine ayurvédique contemporaine n'utilise pourtant pas E.cannabinum mais uniquement l'espèce E.triplinerve comme hémostatique (Sarma, 1969; Bapalal Vaidya, 1982).

* **En médecine traditionnelle cyprïote**, E.cannabinum L. var. syriacum Jacq. (Briss.) est employée à forte dose, comme cholagogue, purgatif, émétique et vermifuge; à faible dose comme tonique, apéritif, dépuratif, diurétique, sudorifique, fébrifuge et antiscorbutique. En usage externe, la plante est employée comme cicatrisant et résolutif (Arnold, 1985).

* **La médecine traditionnelle du Venezuela** accorde des vertus purgatives à la racine d'Eupatoire (Veles Salas, 1982)

Actuellement, E.cannabinum L. n'est plus inscrite à la 10^{ème} édition de la pharmacopée française et ne fait pas encore partie de la liste des plantes médicinales pouvant faire l'objet d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) allégée (Bulletin officiel n°87-20, Juin 1987, texte 9585)

Sur le marché, on rencontre actuellement quelques préparations renfermant de l'Eupatoire comme par exemple Eupatoline (Arkopharma) renfermant 225 mg de plante par gélule.

02



C. ETUDE CHIMIQUE

C.1. TERPENOIDES

C.1.1. LACTONES SESQUITERPENIQUES

Von Gizycki obtint en 1951 le premier principe amer de E.cannabinum, l'eupatoriopicrine (EUPP), à l'état cristallisé

La structure de l'EUPP, isolée des parties aériennes de la plante, fut élucidée par Dolejs et Herout (1962) qui obtinrent, par hydrolyse alcaline, l'eupatolide (EUP). Drozd et Bialek-Grygiel (1971) isolèrent des parties aériennes de la plante, l'EUP à l'état cristallisé (figure 7).

La structure de l'EUPP fut révisée en 1972 par Drozd et coll. (figure 6a). Ces derniers isolèrent l'eucannabinolide à l'état amorphe, difficilement séparable de l'EUPP (figure 6b).

Bos et coll. (1984) isolèrent la chromolaénide, l'eupasimplicine, 4 autres germacranolides (figure 6a et b) et un guaïanolide, l'eupachifoline (figure 8).

Woerdenbag et coll. (1986) isolèrent l'hyodorilactone E (figure 6a). Zdero et Bohlmann (1987) complétèrent l'étude des lactones des parties aériennes, isolant 6 germacranolides, identifiés dans d'autres plantes, la 3- β -hydroxyEUPP, la 20-deoxyEUPP, l'EUPP-19-0-acétate, 2 dérivés deoxy (figure 9) et la sachalinine (figure 10).

Ces auteurs identifièrent 2 nouveaux germacranolides, l'EUPP-19-0-linoléonate (figure 11) et le 8- β -acétoxy-2-hydroxycostunolide (figure 12), ainsi qu'un guaïanolide, le 2-acétyl-8- β [4, 5-dihydroxytigloyloxy] preeupatundine (figure 13).

Geissmann et Atala (1971) étudièrent la distribution de l'EUPP dans la famille des Asteraceae: l'EUPP se rencontre aussi dans certaines plantes appartenant toutes à la tribu des Heleniae :

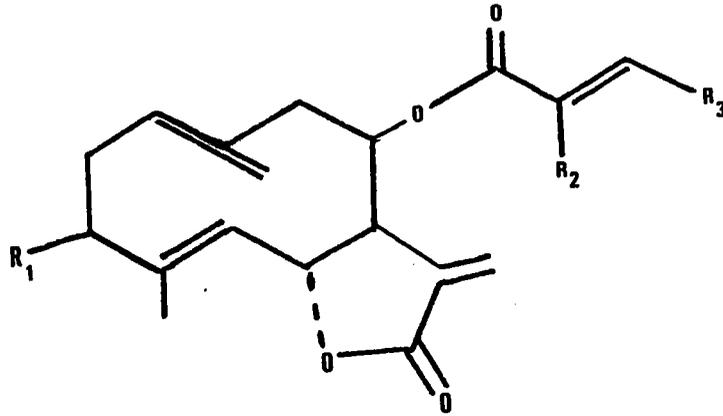
*Venegasia carpesioides D.C.

*Eriophyllum stachaedifolium Lag. var. artemisiaefolium (Less.) Macbr.

*Chaenactis douglasii (Hook.) dont elle est le principal constituant.

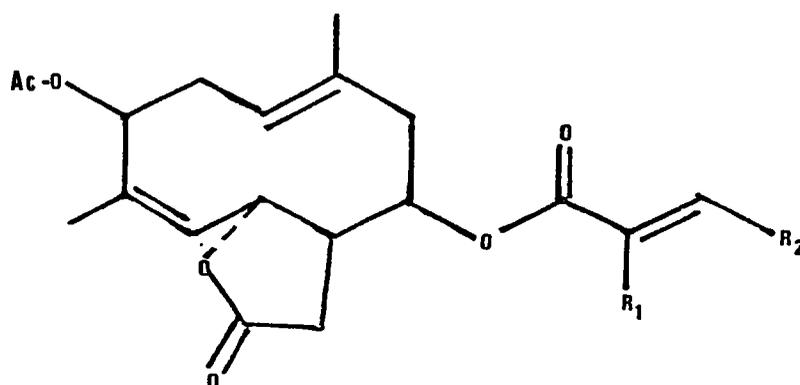
*Chaneactis carpoclinia Gray.

Dans E.cannabinum, elle est présente à raison de 0,94% des parties aériennes sèches (Bloszyk et coll., 1978).



LACTONES	R ₁	R ₂	R ₃
EUPP	-H	-CH ₂ OH	-CH ₂ OH
Composé 1	-H	-CH ₃	-CH ₂ OH
Composé 2	-H	-CH ₃	-CH ₃
Composé 3	-H	-CH ₃	C — O — OCH ₃
Hydorilactone E	-OH	-CH ₂ OCOCH ₃	-CH ₃ OH

FIG 6a : LES LACTONES D'E.cannabinum L.



LACTONES	R ₁	R ₂
Eucannabinolide	-CH ₂ OH	-CH ₂ OH
Chromolaenide	-CH ₃	-CH ₂ OH
Eupasimplicine	-CH ₂ OH	-CH ₃
Composé 4	-CH ₃	-CH ₃

FIG 6 b : LES LACTONES D'E.cannabinum L. (suite)

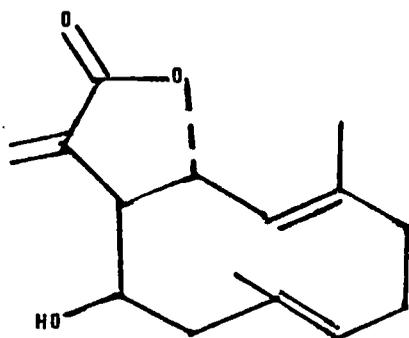


FIG 7 : EUPATOLIDE

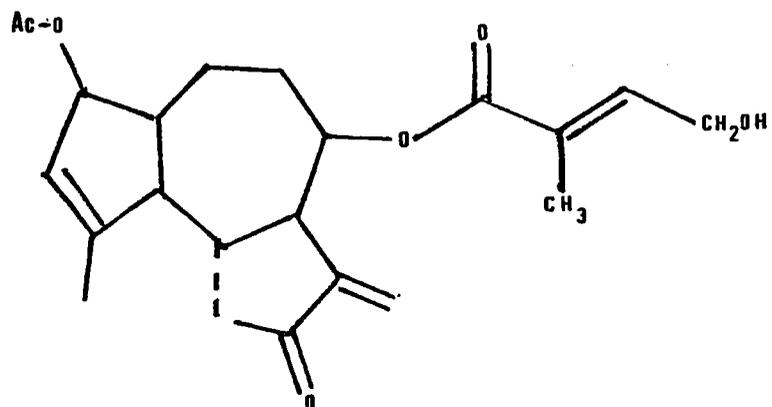
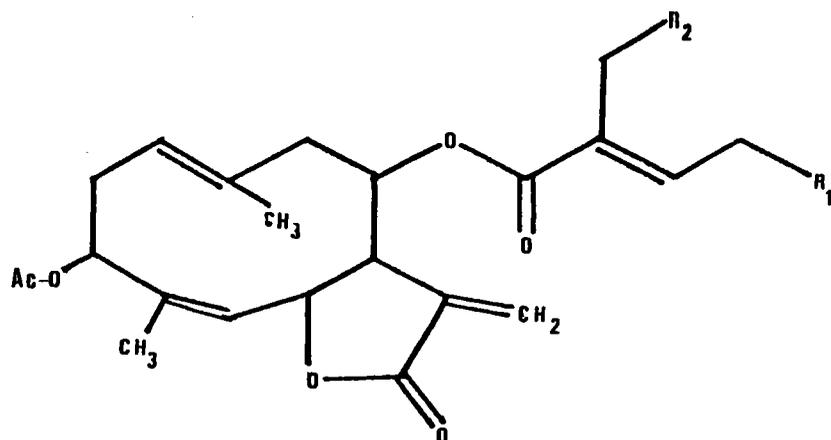


FIG 7 : EUPACHIFOLINE



R ₁	R ₂
1 -OH	-H
2 -H	-H

FIG 9 : DERIVES DEOXY DE L'EUPP (1 et 2)

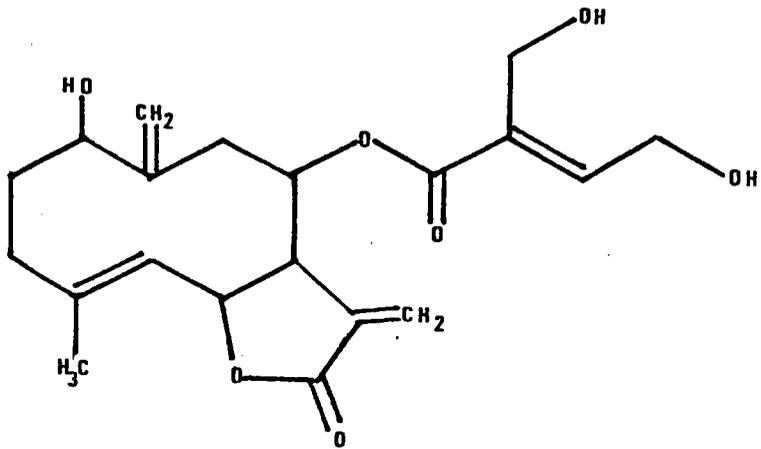


FIG 10 : SACHALININE

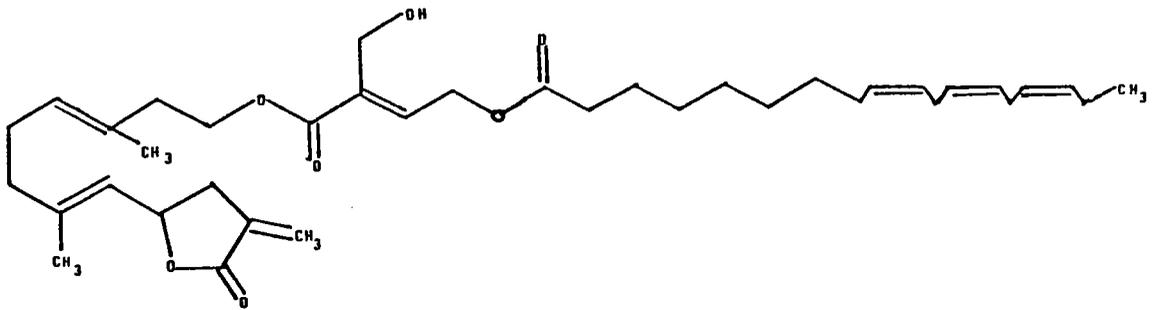


FIG 11 : EUPP 19-O-LINOLEATE

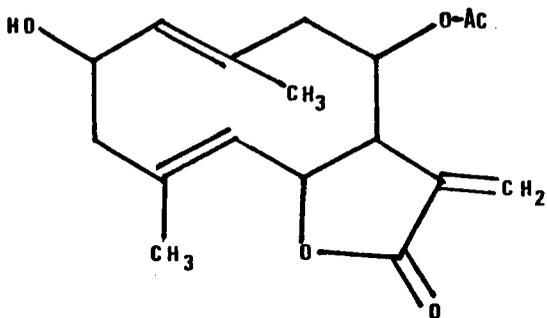


FIG 12 : 8β -ACETOXY-2α-HYDROXYCOSTUNOLIDE

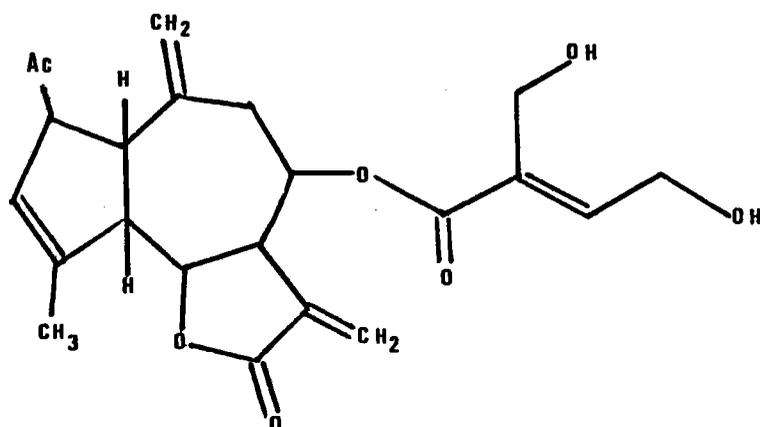


FIG 13 : 2-ACETHYL-8- β -PREEUPATUNDINE

C.1.2. TRITERPENES ET STEROIDES

L'acétate de dammaradiényle (figure 14) a été isolé d'*E.cannabinum* par Talapatra et coll. (1974) à partir de la plante entière séchée. C'est un triterpène rare qui ne se rencontre que dans deux autres espèces de la famille des Asteraceae : *Inula helenium* et *Olearia paniculata*. Elle représente 0,01% de la matière sèche.

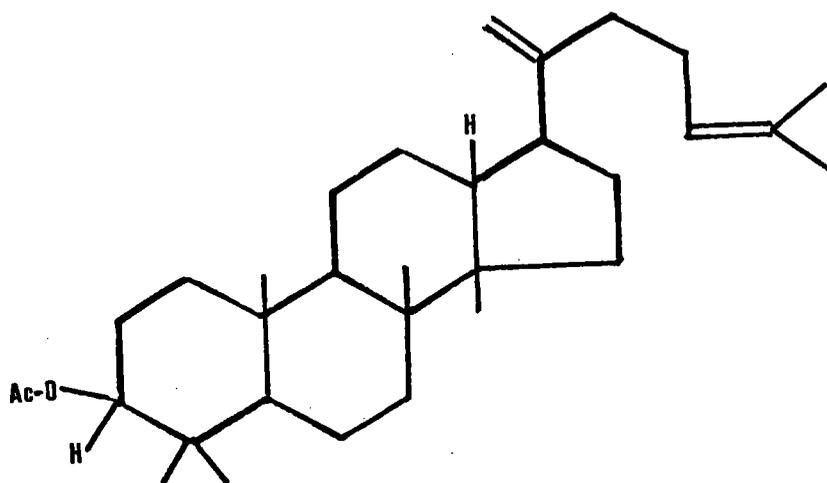


FIG 14 : ACETATE DE DAMMARADIENYLE

Taraxastérol (figure 20a) et stigmastérol (figure 20b) sont présents en très faibles quantités : 0,0008% et 0,0005% des parties aériennes sèches (Talapatra et coll., 1974).

Le taraxastérol se rencontre aussi dans d'autres Asteraceae : Cynara scolymus et Taraxacum officinale.

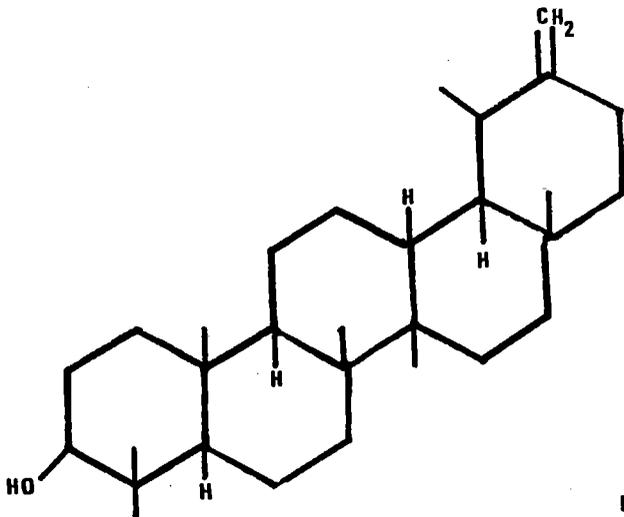


FIG 20a : TARAXASTEROL

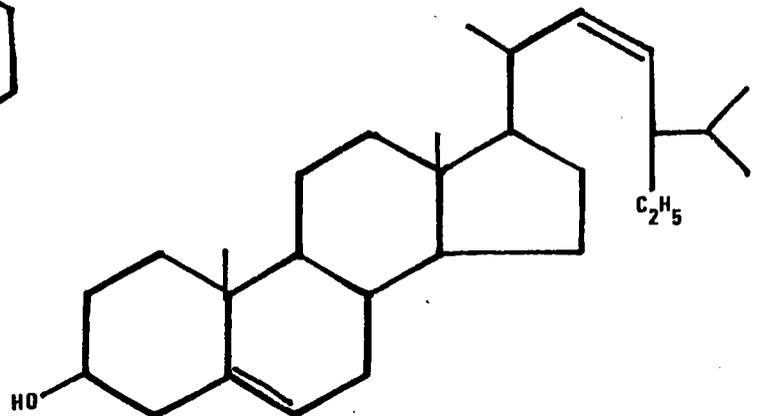


FIG 20b : STIGMASTEROL

C.1.3.DITERPENES

Zdero et Bohlmann (1987) isolèrent un dérivé de clérodane, le cannaclérodanolide (figure 15).

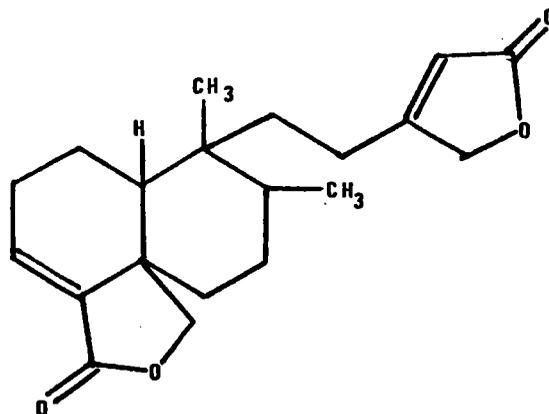


FIG 15 : CANNACLERODANOLIDE

C.1.4. MONOTERPENES

Zdero et Bohlmann (1987) isolent, de la racine, le 10-acetoxynérylacétate (figure 16).

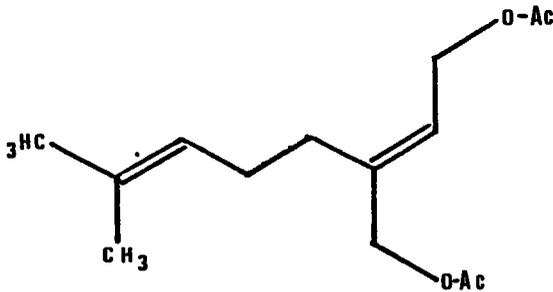


FIG 16 : 10-ACETOXYNERYLLACETATE

C.1.5. HUILE ESSENTIELLE

Hendriks et coll. (1985) identifièrent une huile essentielle (tableau 6) dans les feuilles (0,46% v/p), les fleurs (0,68% v/p) et les tiges (0,15% v/p). Le chromatogramme obtenu par chromatographie gazeuse a révélé la présence de nombreux monoterpènes et sesquiterpènes ainsi que quelques dérivés de phénylpropane.

**TAB.4a : PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE L'HUILE
ESSENTIELLE D'E.cannabinum L.**

MONOTERPENES	CARBURES	limonène, α et β pinène,
	MONOTERPENIQUES	ocimène, α -terpinène, α -terpinolène, camphène, β -myrcène.
	DERIVES OXYGENES	1-8-cinéol, linalol,
	MONOTREPENIQUES	α -terpinéol et acétate, acétate de néryle, acétate de bornyle.
SESQUITERPENES		β -éléémène, β -caryophyllène, D germacrène, β -bisabolène, α -farnésène, ζ -cardinène.
DERIVES DE PHENYLPROPANE		p-cimène, thymol méthyléther, thymolhydroquinone diméthyléther.

Une analyse plus fine a révélé en fait les précédents constituants dans la fraction pentane de l'huile essentielle et les composés suivants (tableau 4b) dans la fraction éther (Hendriks et coll., 1985) :

Zdero et Bohlmann (1987) mettent aussi en évidence , dans les parties aériennes, de l'acétate de néryl et du germacrène D.

C.2. FLAVONOIDES

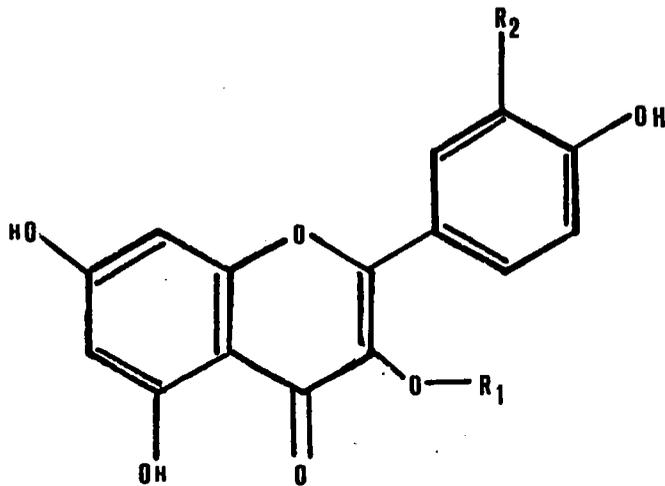
Oswiecimska et Sendra (1972) isolèrent, des parties aériennes sèches, trois flavonoïdes dont deux sous forme glycosidique (figure 17) : rutoside, hyperoside et quercétine à l'état de traces. Pagani et Romussi (1967) isolèrent de l'astragaline, des dérivés d'acide p-coumarique, de l'acide ferulique, de l'isoquercétine et du kaempferol 3-rhamnoside dans la variété syriacum.

La teneur en rutoside dépendrait de facteurs écologiques (Jerzmanowska dans Oswiecimska et Sendra, 1972).

TABLEAU 4b: COMPOSES DE LA FRACTION PENTANE DE L'HUILE ESSENTIELLE D'*E.cannabinum* (Hendriks et coll., 1985)

GC	RI	Compound	MW	(M-H)-	R ¹ COO	R ² O
1	993	<i>n</i> -octanal	128	127		
2	996	hexyl acetate	144	143	59	
3	1080	<i>n</i> -nonanal	142	141		
4	1085	heptyl acetate	158	157	59	
5	1190	decanal	156	155		
6	1196	octyl acetate	172	171	59	
7	1200	methyl salicylate	152	151		
8	1240	linalyl acetate	196	195	59	
9	1266	monoterpene acetate	196	195	59	
10	1270	bornyl acetate	196	195	59	
11	1272	lavendulyl acetate	196	195	59	
12	1285	β -terpenyl acetate	196	195	59	
13	1285	undecanal?	170	169		
14	1302	3-hexenyl tiglate*	182	181	99	
15	1327	monoterpene acetate	196	195	59	
16	1341	neryl acetate	196	195	59	
17		benzyl acetate	150	149	59	
18	1356	geranyl acetate	196	195	59	
19	1332	citronellyl acetate	198	197	59	
20	1362	bornyl propionate	210	209	73	
21	1371	thymylhydroquinone dimethylether	194			
22	1405	linalyl butyrate (iso?)	224	223	87	
23	1422	α -terpenyl propionate	210	209	73	
24	1433	neryl propionate	210	209	73	
25	1454	α phenyl butyrate?	218	217	87	147
26	1463	thymyl butyrate	220	219	87	149
27	1470	neryl butyrate (iso?)	224	223	87	
28	1506	bornyl isovalerate	238	237	101	
29	1510	α -terpenyl butyrate	224	223	87	
30	1545	<i>cis</i> -3-hexenyl benzoate	204	203	121	
31	1550	bornyl valerate?	238	237	101	
32	1550	α phenyl isovalerate?	232	231	101	147
33	1553	thymyl isovalerate	234	233	101	149
34	1555	neryl isovalerate	238	237	101	
35	1562	geranyl isovalerate	238	237	101	
36		bornyl tiglate?	236	235	99	
37	1632	α phenyl tiglate	230	229	99	
38	1637	thymyl tiglate	232	231	99	
39	1654	neryl tiglate	236	235	99	
40		sesquiterpene acetate	264	263	59	
41		sesquiterpene acetate	264	263	59	
42	1711	sesquiterpene acetate	262	261	59	
43	1780	benzyl benzoate	212	211	121	
44	1764	sesquiterpene acetate	264	263	59	

* No differentiation between tiglates and angelates can be made from the NCI mass spectra.



Dérivés du flavonol :

GLUCOSIDE	AGLYCONE	R ₁	R ₂
Hyperoside	quercetine	-OH	-galactose
Rutoside*	Quercetine	-OH	-glucose-Rhamnose
Astragaline*	Kaempférol	-H	-glucose
Kaempférol 3-Rhamnoside	Kaempférol	-H	-rhamnoside

FIG 17 : LES FLAVONOIDES D'E.cannabinum L(*)

C.3.DERIVES AMINES

C.3.1.ALCALOIDES

Deux alcaloïdes pyrrolizidiniques, souvent sous forme de N-oxydes dans la plante, ont été isolés des parties aériennes, par Pedersen (1975): échinatine (figure 18a) et supinine (figure 18b).

Il y aurait, outre ces deux molécules, des isomères de ces dernières telles que la lycopsamine et l'intermédiaire (Hendriks et coll., 1983). Selon ces auteurs, les parties souterraines en renfermeraient également.

Hendriks et coll.(1987) isolèrent en plus plusieurs esters de ces isomères : esters β-acéthyl, β-angelyl/tiglyl, β-(iso)- valeryl.

La fraction alcaloïdique représente 0,03% de la matière sèche (Pedersen, 1975).

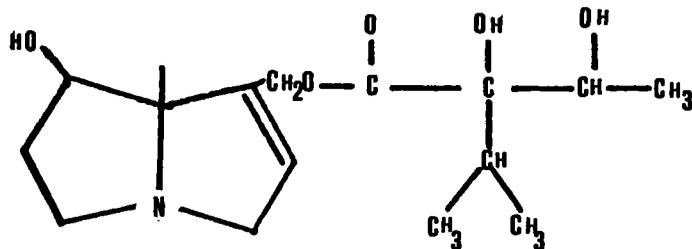


FIG 18a : ECHINATINE

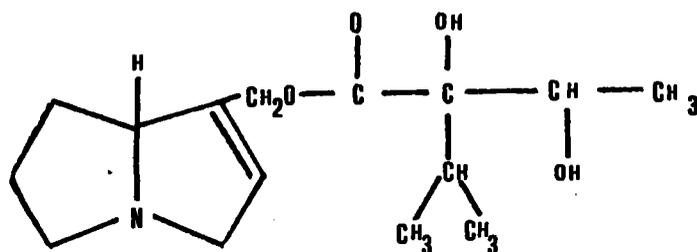


FIG 18b : SUPININE

C.3.2. AMINO-ALCOOLS

La présence de choline a été mise en évidence dans la variété syriacum (Pagani et Romussi, 1967).

C.4. ACIDES-PHENOLS

Acides cafeïques (figure 19a) , chlorogéniques (figure 19 b) et isochlorogéniques ont été isolés des parties aériennes sèches (Oswiecimska et Sendra, 1972).

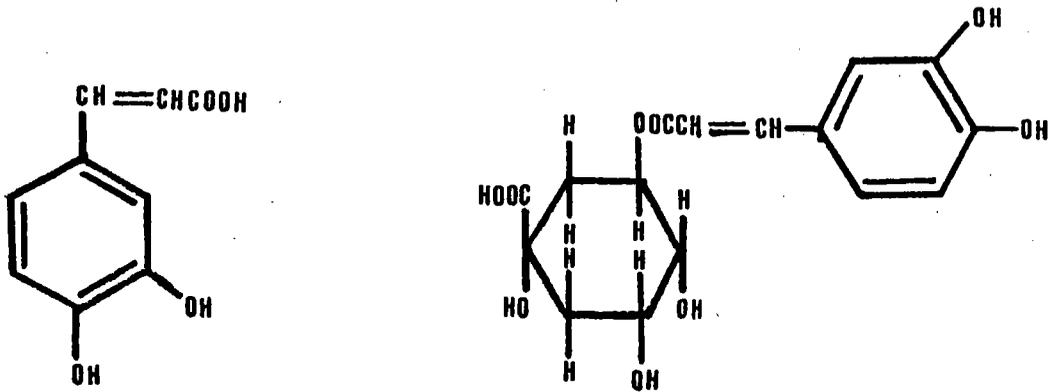


FIG 19a : ACIDE CAFEIQUE FIG 19b : ACIDE CHLOROGENIQUE

C.5.ACIDES-ALCOOLS

Les acides malique (62,5 mg/kg), citrique (2,5 mg/kg) et lactique (12,5 mg/kg) ont été isolés par Bogaert et coll. (1972) des parties aériennes sèches.

La variété syriacum renferme de l'acide ascorbique (Pagani et Romussi, 1967)

C.6.DERIVE DE BENZOFURANNE

L'euparine (figure 21) fut isolée des racines séchées (Jerzmanowska, 1951).

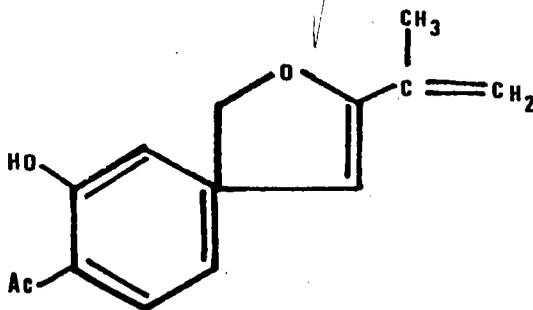


FIG 21 : EUPARINE

C.7 DERIVES DE BENZOPYRANNE

Zdero et Bohlmann (1987) isolèrent, de la racine, le 3 -isobutyryloxy-6-hydroxytrémétone (figure 22a) et le 3 -methacryloyloxy-6-hydroxytrémétone (figure 22b).

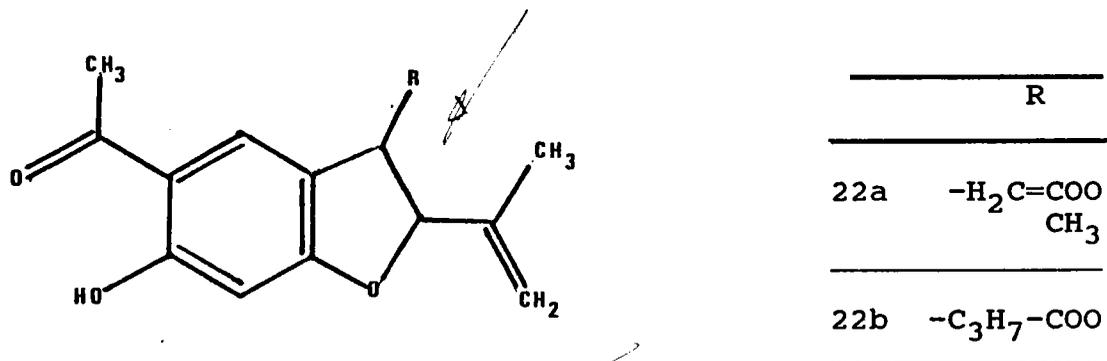


FIG 22 : DERIVES DE BENPYRANNE

C.8 SUCRES

Pagani et Romussi (1967) identifièrent du glucose et du fructose dans les fleurs, des fructanes ainsi que du rutinose, du fructose, du rhamnose et du glucose dans les tiges et les racines.

Enfin, 2 hétéroxylanes hydrosolubles furent isolés des parties aériennes (Vollmar et coll., 1986).

D

*Pharmacologie
de certaines structures chimiques
présentes dans le genre
Eupatorium L.*



D. PHARMACOLOGIE DE CERTAINES STRUCTURES CHIMIQUES PRESENTES DANS LE GENRE EUPATORIUM L.

D.1. PHARMACOLOGIE DES FLAVONOIDES

Les flavonoïdes, produits en grande quantité par les plantes où ils interviennent dans le processus de pollinisation et protègent des agressions extérieures (bactéries, champignons, herbivores), suscitent aussi, par leur importance dans l'alimentation humaine et la médecine traditionnelle, de nombreux travaux de recherche.

De faible toxicité (10 g/kg chez le rat) et non tératogènes (Périsoud et Testa, 1986), ils possèdent cependant un pouvoir mutagène sur les bactéries et les cellules de mammifères, mais leur carcinogénicité est controversée, dépendant beaucoup de l'espèce, de la structure moléculaire et des enzymes de la flore intestinale qui transforment des glycosides en aglycones carcinogènes (Mac Gregor, 1986; Hackett, 1986). Ainsi la quercétine serait à la fois cytostatique et mutagène : cytostatique en inhibant les enzymes de la glycolyse, en entrant en compétition avec l'ATP (Kyriakidys et coll., 1986) et en inactivant in vitro le benzopyrène (Shah et Bhattacharya, 1986) et mutagène en étant capable de potentialiser la mutagénicité de l'acétaminofluorène chez les bactéries (Ogawa et coll., 1986).

Ils peuvent modifier la toxicité et la pharmacologie des xénobiotiques par leur pouvoir inhibiteur du système P₄₅₀ microsomal et intestinal (Vernet et Siess, 1986). Il y aurait compétition ou altération du site d'action du substrat de l'enzyme et ainsi inhibition et potentialisation d'un métabolite carcinogène (Wood et coll., 1986).

Bracke et coll. (1987) démontrèrent que la (+)-catéchine inhibait la prolifération de cellules tumorales in vitro en se liant à une glycoprotéine, la laminine, gouvernant l'adhésion des cellules invasives aux tissus normaux (stade précoce dans la formation de métastases).

Donneurs d'hydrogène, ils possèdent un pouvoir antioxydant, inhibant la lipoperoxydation des acides gras polyinsaturés (Torel et coll., 1986).

Ils ont une grande affinité pour les métaux lourds (Cu²⁺, Zn²⁺) catalyseurs de nombreuses réactions biochimiques (Havsteen et coll., 1983).

Toutes ces propriétés expliquent leurs utilisations pharmacologiques:

* **ANTI-INFLAMMATOIRES ET ANTI-ALLERGIQUES** : ils inhibent la cycloxygénase et la lipoxygénase, empêchant le relargage d'histamine, la synthèse de prostaglandines et l'agrégation plaquettaire (Kimura et coll., 1986; Rossi et coll., 1986). Ils interviennent de la même manière contre les venins de serpents et les piqûres d'insectes (Havsteen, 1983).

* **ANGIOPROTECTEURS** : ils inhibent les enzymes protéolytiques, assurant une protection des tissus élastiques et conjonctifs (Jonadet et coll., 1986). Ils pourraient aussi agir comme antioxydants, inhibant la lipoperoxydation des acides gras membranaires (Torel et coll., 1986).

* **ANTIHEPATOTOXIQUES**: Les travaux sur la silymarine ont conduit à la découverte de nouveaux flavonoïdes antihépatotoxiques extraits de trois Asteraceae, Artemisia capillaris, Eclipta alba et Wedelia calendulacea (Wagner, 1986). Wagner souligne le pouvoir antihépatotoxique plus important des extraits totaux de flavonoïdes, comparativement aux molécules isolées. Ce dernier cite les bons résultats de la quercétine et de l'isorhamnétine vis-à-vis de l'hépatotoxicité au tétrachlorure de carbone in vitro. Inversement, Périssoud et Testa (1986), testant le pouvoir antihépatotoxique de quelques flavonoïdes ne trouvent aucune efficacité avec la quercétine et la rutine.

Récemment il a été démontré que les flavonoïdes surtout hydroxylés (à groupement 3-hydroxyl) comme la quercétine, la morine, la robinétine et la fisétine, sont actifs vis-à-vis de l'aflatoxine B1, hépatocarcinogène et mutagène. Ils agiraient par liaison avec les sites d'action des enzymes microsomaux responsables de la biotransformation de l'aflatoxine B1 en métabolite actif, par liaison avec les phospholipides membranaires, avec le cytochrome P₄₅₀ ou encore avec un métabolite (Bhattacharya et Firozi, 1988). La capacité à inhiber la stimulation de la chimioluminescence du foie a été évaluée pour certains flavonoïdes et polyphénols : cette chimioluminescence est produite par la génération de radicaux libres à partir de toxiques hépatiques (tétrachlorure de carbone, ter-butylhydroperoxyde), in vitro et in situ. Cette méthode, encore mal expliquée, est une mesure par compteur à scintillation du niveau des radicaux générés durant les processus oxydatifs. La (+) catéchine est le flavonoïde le plus actif. La présence de groupes hydroxylés en C₃ et C₄, est associée au pouvoir antioxydant. Par contre, la conjugaison d'un sucre diminue cette activité (rutine, hespéridine, kaempferol...). Cette inhibition de la chimioluminescence peut s'expliquer par le blocage des réactions d'oxydation en chaîne par les polyphénols, formant un composé stable avec des radicaux libres.

Bien que la lipoperoxydation soit initiée dans des domaines cellulaires hydrophobes (Cytochrome P₄₅₀), cette réaction se propage en milieux hydrophiles, atteignant les acides nucléiques, protéines, acides aminés et nucléotides. L'utilisation d'antioxydants hydrosolubles peut apporter une protection efficace à un stress oxydatif (Fraga et coll., 1987).

Outre ses propriétés antihépatotoxiques in vitro et in vivo, les essais cliniques de la (+) catéchine dans les traitements de l'alcoolisme et de l'hépatite B sont encourageants (Périssoud, 1986).

De plus la quercétine suscite actuellement des travaux sur sa dualité d'action inductrice de la libération et inhibitrice de l'absorption du calcium et de l'activité Ca⁺⁺-Mg⁺⁺-ATPase par le réticulum sarcoplasmique (Kurebayashi, 1986).

D.2. PHARMACOLOGIE DES ACIDES-PHENOLS

Très communs dans le règne végétal, les dérivés de l'acide cinnamique tels les acides caféique et chlorogénique surtout, suscitent l'intérêt des pharmacologues car leur toxicité et leurs propriétés pharmacologiques sont mal connues.

A doses non toxiques, ils sont antimutagènes chez les bactéries en piégeant les produits de dégradation électrophiles des mutagènes (Chan et coll., 1986). Les acides férulique, caféique, chlorogénique et surtout ellagique inhibent la mutagénicité du métabolite carcinogène du benzo [a] pyrène sur Salmonella typhimurium (Wood et coll., 1982).

In vivo, une diète d'acide chlorogénique a un effet préventif sur l'apparition de tumeurs induites chez le hamster (Mori et coll., 1986)

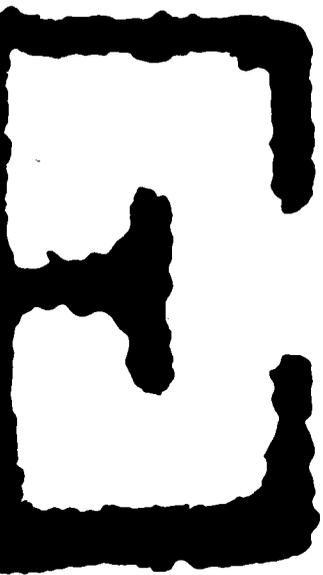
Outre leur pouvoir hydrocholérétique (Sharma et coll., 1973), ces acides-phénols ont un pouvoir antioxydant in vitro (Iwahashi et coll., 1986) et in vivo chez le rat où ils préviennent la lipoperoxydation (Kimura et coll., 1985).

Enfin ils inhibent la synthèse des leukotriènes (Iwahashi et coll., 1986), l'activité de la DOPA décarboxylase par similarité structurale avec les catécholamines (Escubedo et coll., 1986) et sont efficaces sur le virus de l'herpès in vitro (König et coll., 1985).

D.3. PHARMACOLOGIE DES ALCALOÏDES PYRROLIZIDINIQUES

Une centaine d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été isolés des végétaux dont 30 hépatotoxiques, surtout des diesters et esters cycliques contenant une base nécine, rétronécine et otonécine (Hirono, 1986). Certains provoquent en effet des nécroses hépatiques chez les animaux (Senecio, Eupatorium, Nardosmia, Erichtites parmi les Asteraceae, mais aussi des Boragineae et Léguminosae). Si leurs effets aigus sont connus, leur effets chroniques ne le sont pas. Souvent sous forme de N-oxydes, moins toxiques, ils sont réduits, après ingestion, en bases libres et métabolites toxiques (Kovack et coll., 1979). L'indicine N-oxyde, cytotoxique et antitumorale, a été testée comme molécule anticancéreuse (Suffness et Douros, 1982).

Récemment, il a été démontré que seuls les alcaloïdes pyrrolizidiniques insaturés sont cytotoxiques in vitro. Cette cytotoxicité et donc l'hépatotoxicité paraît corrélée à une structure ester 1,2-allylique (Wassel et coll., 1987).



*Chimie et pharmacologie
de différentes espèces
du genre Eupatorium L.*

E. CHIMIE ET PHARMACOLOGIE DE DIFFERENTES ESPECES DU GENRE EUPATORIUM L.

E.1. LACTONES SESQUITERPENIQUES

Les lactones sesquiterpéniques ne semblent pas avoir de voie métabolique spécifique à l'intérieur de la plante mais leur accumulation n'est pas sans désavantage (Sutherland et Parks dans Woerdenbag, 1986). Elles jouent le rôle de phytotoxines et protègent les plantes des insectes et des mammifères, le bétail tout particulièrement.

Les premières études des lactones sesquiterpéniques de genre Eupatorium sont dues aux travaux de Kupchan et coll. (1967). Ces travaux furent ensuite repris par l'équipe de Hladon : Hladon et coll. (1975a), Hladon et coll. (1975b), Hladon et Chodera (1975) et Hladon et coll. (1977), dans le cadre d'une recherche de composés antitumoraux d'origine naturelle. Kupchan et coll. (1967) isolèrent, d'E.rotundifolium, une lactone de type guaïanolide, cytotoxique sur le carcinome W256 chez le rat.

L'extrait alcoolique d'E.semiserratum est aussi cytotoxique sur le carcinome KB du nasopharynx humain (Kupchan et coll., 1965) ainsi que l'extrait chloroformique d'E.cuneifolium (Kupchan et coll., 1968).

Dobberstein et coll. (1977) démontrèrent aussi, chez la souris, l'activité cytotoxique et antitumorale sur la leucémie lymphocytaire P388 de l'extrait alcoolique d'E.altissimum.

L'extrait éthanolique d'E.formosanum est également antitumoral sur le carcinome W256, la leucémie P388 (Lee et coll., 1972, 1977), ce qui confirme son utilisation traditionnelle comme anticancéreux (Hall et coll., 1979). Lee et coll. (1972) isolèrent la molécule responsable de cette activité, l'eupatolide.

Les espèces d'Eupatorium L. américaines contiennent toutes des lactones sesquiterpéniques de types guaïanolide, germacranolide, héliangolide et eudesmanolide, à propriétés cytotoxique et antitumorale.

Le tableau 5 regroupe toutes les espèces contenant des lactones.

Les lactones sesquiterpéniques provoquent, chez l'homme, des dermatoses de contact. Cependant aucune allergie n'a été rapportée avec E.cannabinum. Le groupe α -méthylène γ -lactone se lie aux groupements sulfidryls des protéines cellulaires pour former des antigènes (Rodriguez et coll., 1976).

TABLEAU 5 : LES LACTONES DANS LE GENRE EUPATORIUM L.

ESPECES	ORIGINE	TYPE DE LACTONES	LACTONES IDENTIFIEES	BIBLIOGRAPHIE
<u>E.altissimum</u> L.	USA	héliangolides guaïanolides		Jakupovic <u>et coll.</u> , 1987 Boeker <u>et coll.</u> , 1986
<u>E. anomalum</u> Nash.	USA	héliangolides guaïanolides	eurecurvine	Herz <u>et coll.</u> , 1979a
<u>E. album</u> L.	USA	diterpenoïdes	eupatalbine, eupatoralbine	Herz <u>et coll.</u> , 1979b
<u>E. cannabinum</u> L.	Europe, Asie Afrique du Nord	germacranolides guaïanolides	eupatoriopicrine, eupatolide eucannabinolides, etc...	voir page 25
<u>E. formosanum</u> Hay.	Formose	germacranolides	eupatolide, eupaformosanine eupaformine	Lee <u>et coll.</u> , 1977
<u>E. hyssopifolium</u> L.	USA	germacranolides	eupahyssopine, eupassopine eupasofiline	Lee <u>et coll.</u> , 1976
<u>E. lancifolium</u> L.	USA	héliangolides	eupacunine, eupacunoline deacethyleupacunine	Herz <u>et coll.</u> , 1981b
<u>E. ligustrum</u> DC.	Mexique	guaïanolides	ligustrine	Quijano <u>et coll.</u> , 1970

TABLEAU 5 (SUITE) : LES LACTONES DANS LE GENRE EUPATORIUM L.

ESPECES	ORIGINE	TYPE DE LACTONES	LACTONES IDENTIFIEES	BIBLIOGRAPHIES
<u>E.mikanioides</u> Chapm.	USA	germacranolides	deacethyleupasserine	Herz <u>et coll.</u> , 1980
<u>E.mohrii</u> Greene	USA	héliangolides guaïanolides		Herz <u>et coll.</u> , 1979b
<u>E.quadrangulare</u>	Mexique	eudesmanolides	arbusuline, quadranguline α -cyclocostunolide quadranguline	Gonzales <u>et coll.</u> , 1985
<u>E.perfoliatum</u> L	USA	germacranolides	euperfoline, euperlolinine eufoliatine, eufoliatorine	Herz <u>et coll.</u> , 1977
<u>E.rotundifolium</u> L. ssp. <u>ovatum</u> (Bigel.) Montg. et Faribr.	USA	guaïanolides	eupatorine, etc...	Bohlmann <u>et coll.</u> , 1980
<u>E.sachalinense</u> Mak.	Japon	germacranolide	hiyodorilactone	Takahashi <u>et coll.</u> , 1979
<u>E.semiserratum</u> DC.	USA	germacranolides	eupasserine deacethyleupasserine	Herz <u>et coll.</u> , 1981b
<u>E. serotinum</u> Michx.	USA	germacranolides élémanolides		Bohlmann <u>et coll.</u> , 1984
<u>E. scrubidium</u>	USA	germacranolides	eupasserine deacetyhleupasserine eupatundine, eupachloroxine	Bohlmann <u>et coll.</u> , 1984 Herz et Kulanthaivel, 1982
<u>E. recurvans</u>	USA		eurecurvine	
»				

Elles possèdent en outre une activité antimicrobienne. Selon Lee et coll. (1977) cette propriété serait due au noyau cyclopenténone. Calzada et coll. (1980), au contraire, imputent cette activité à la présence du groupe -méthylène- -lactone. Cependant le mécanisme reste une alkylation des centres nucléophiles à l'intérieur des micro-organismes.

Les lactones sesquiterpéniques possèdent aussi une activité anti-inflammatoire et antihyperlipidémique (Hall et coll., 1979, 1980a, 1980b). Elles agiraient comme inhibiteurs potentiels des enzymes lysosomiaux, de la phosphorylation oxydative et de la synthèse protéique. La fraction α -méthylène γ -lactone joue là aussi le rôle le plus important.

Certains sesquiterpénoïdes eudesmanolides sont hépatoprotecteurs in vivo et in vitro sur des modèles utilisant le CCl_4 comme toxique (Handa et coll., 1986).

E.2. FLAVONOÏDES

De nombreux flavonoïdes ont été isolés des espèces d'Eupatorium (Tableau 6). Cependant ceux-ci ne semblent pas posséder d'activité pharmacologique ni de structure originale (Hendriks et coll., 1983). Beaucoup contiennent de la rutine. La cytotoxicité d'E.semiseratum, mise en évidence par Kupchan et coll. (1965) et attribuée à l'eupatorine, un flavonoïde méthoxylé, n'a pas été confirmée par Dobberstein et coll. (1977). L'activité est sans doute due aux lactones présentes dans la plante mais pas encore isolées.

E.3. ALCALOÏDES

Dans les Asteraceae, les alcaloïdes ne se rencontrent que chez les Senecioneae et à un degré moindre, chez les Eupatorieae. Il est intéressant de noter que tous les alcaloïdes isolés jusqu'ici dans le genre Eupatorium sont caractéristiques de ceux des Boraginaceae plutôt que de ceux des Senecioneae, responsables de troubles hépatiques chez les animaux (Hegnauer, 1977) : ce sont des esters en C_7 d'acides néciques avec des bases nécine, rétronécine, héliotridine, supinidine, trachelantamidine ou isorétronécanol.

Ces alcaloïdes se rencontrent essentiellement dans les espèces américaines et notamment chez E.serotinum, espèce qui en contient le plus.

Le tableau 7 regroupe les espèces possédant des alcaloïdes.

TABLEAU 6 : LES FLAVONOIDES DANS LE GENRE EUPATORIUM L.

ESPECES	ORIGINE	FLAVONOIDES ISOLES	BIBLIOGRAPHIE
<u>E. album</u> L	USA	hispiduline, eupafoline, hyperoside, astragaline, kaempférol, isoquercetine kaempférol-3-rutinoside, rutine, quercetine	Metwally et Ekijuba, 1981 = (1)
<u>E.altissimum</u> L	USA	eupatorine	Dobberstein, 1977
<u>E.cannabinum</u> L. var. <u>syriacum</u> (Jacq.)Briss.	Europe	rutine, hyperoside, quercetine astragaline, acide p-coumarique acide ferrulique, isoquecetine, kaempferol-3-rhamnoside	Oswiecimska et Sendra, 1972 Pagani et Romussi, 1967
<u>E.cuneifolium</u> Willd.	USA	hispiduline, eupafoline, astragaline, hyperoside	Kupchan <u>et coll.</u> , 1968
<u>E.foeniculaceum</u> Willd.	USA	3,4'-dihydroxyl-5,7'-dimethylflavone	(1)
<u>E.havanense</u> H.B. et K.	Cuba	sakuranetine	(1)

TABLEAU 6 (SUITE) : LES FLAVONOIDES DANS LE GENRE EUPATORIUM L.

ESPECES	ORIGINE	FLAVONOIDES IDENTIFIES	BIBLIOGRAPHIE
<u>E.inulaefolium</u> H.B.et K.	USA	pedatiline	(1)
<u>E.liqustrum</u> D.C.	Mexique	eupalitine, eupatolitine eupaline, eupatoline	Quijano <u>et coll.</u> , 1970
<u>E. macrocephalum</u> Less.	USA	rhamnocitrine-3- glucoside, aromadendrine 7 methyl ether-3-glucoside	(1)
<u>E. mikanioides</u> Chapm.	USA	eupatorine	Herz <u>et coll.</u> , 1980
<u>E. odoratum</u> L.	USA Niger	isosakuranetine, sakaranetine, odoratine tamarixétine, kaempferide, salvigenine	(1)
<u>E. semiserratum</u> D.C.	USA	eupatorine, pectolinarigenine, eupatiline, eupatorine	(1)
<u>E. serotinum</u> Michx.	USA	vicenine, hyperoside, astragaline, kaempferol-3- rutinoside	(1)
<u>E.subhastatum</u> Hook. et Arnott	Argentine	hispiduline, acide protocatechique acacetine, eriodictyol, quercetine, eupafoline, kaempferol	Ferraro <u>et coll.</u> , 1987

TABLEAU 7 : ALCALOIDES DANS LE GENRE EUPATORIUM L.

ESPECES	ORIGINE	ALCALOIDES PYRROLIZIDINIQUES	BIBLIOGRAPHIE.
<u>E. anomalum</u> Nash.	USA	-	Herz <u>et coll.</u> , 1980
<u>E. album</u> L.	USA	-	"
<u>E. altissimum</u> L.	USA	7- angelyléliotridine	Herz <u>et coll.</u> , 1981a
<u>E. cannabinum</u> L.	Europe	echinatine, supinine, intermediate, lycopsamine	Pedersen <u>et coll.</u> , 1975 Hendriks <u>et coll.</u> , 1983
<u>E. coelestinum</u> L.	USA	intermediate, lycopsamine	Herz <u>et coll.</u> , 1981a
<u>E. cuneifolium</u> Willd.	USA	traces	"
<u>E. jucundum</u> Greene	USA	traces	"
<u>E. maculatum</u> L.	USA	echinatine, trachelantamide	Tsuda et Marion in Hendriks <u>et coll.</u> , 1983
<u>E. mikanioides</u> Chapm.	USA	-	Herz <u>et coll.</u> , 1980
<u>E. pilosum</u> Walt.	USA	-	"
<u>E. stoechadosmum</u> Hance	Asie	lindifoline	Furaya et Hikishi in Hendriks <u>et coll.</u> , 1987
<u>E. serotinum</u> Michx.	USA	supinine, rinderine	Locock <u>et coll.</u> , 1966

(- : absence)

E.4.HUILE ESSENTIELLE

Une huile essentielle a été isolée d'E.japonicum et E.rugosum et E.serotinum (Bohlmann et coll., 1984).

E.triplinerve a été particulièrement étudiée pour son huile essentielle analgésique et sédative (Kokate et coll., 1971). Cette espèce est également utilisée en médecine traditionnelle comme stimulant, tonique, diaphorétique, hémostatique, contre les piqûres de serpents et pour la guérison des plaies (Chopra et coll., 1956).

E.5.POLYSACCHARIDES

Des polysaccharides anti-inflammatoires se rencontrent dans les extraits aqueux d'E.perfoliatum et E.cannabinum (Wagner et coll., 1985; Vollmar et coll., 1986).

*Etude pharmacologique
d'E. cannabinum L.*



F. ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'EUPATORIUM CANNABINUM L.

A ce jour, aucune étude pharmacologique complète tentant de confirmer ou d'infirmer l'utilisation traditionnelle d'E.cannabinum n'a été entreprise.

Il faut citer les travaux de Mortier (1972) sur les acides organiques alliphatiques de diverses plantes à réputation hépatorénale dont E.cannabinum.

Par contre, l'activité cytotoxique et antitumorale des lactones sesquiterpéniques d'E.cannabinum a été largement étudiée au cours de ces vingt dernières années.

Récemment l'extrait aqueux d'E.cannabinum et plus particulièrement la présence de polysaccharides, a retenu l'attention d'un groupe de chercheurs pour ses propriétés immunostimulantes.

F.1. LACTONES SESQUITERPENIQUES

Dans le cadre d'un programme de recherche de nouvelles molécules anticancéreuses, Hladon et coll. (1975 a) étudièrent la cytotoxicité de deux lactones isolées d'E.cannabinum.

Ces deux molécules, l'eupatoriopicrine (EUPP) et l'eupatolide, se révélaient actives in vitro sur culture de tissu humain (carcinome de nasopharynx KB, carcinome cervicis uteri HeLa, ascites d'Erlisch EAC). Leurs doses efficaces induisant 50% d'inhibition de croissance cellulaire (DE50) se situent entre 0,5 et 1,3 $\mu\text{g}/10^6$ cellules/ml de milieu, selon le type de cellules. L'EUPP perd son activité à pH 9,0 et en solution dans l'acétone.

Par la suite, 18 lactones sesquiterpéniques ont été testées in vitro (Hladon et coll., 1975 b) et, sur 11 molécules cytotoxiques, on distingue les germacranolides, parmi lesquelles l'EUPP et l'eupatolide.

Sept lactones ont été retenues pour des tests in vivo chez la souris (leucémie exhudative L 1210, sarcome Sa 180, ascites d'Erlisch EAC (E4)) parmi lesquelles l'alatolide, extraite de Jurinea alata (Asteraceae), et l'EUPP semblent les plus actives (Hladon et coll., 1977).

Les recherches s'orientèrent alors vers les mécanismes d'action de ces molécules antitumorales. Hladon et coll. (1977) montraient que l'alatolide inhibait la synthèse des protéines et de l'ARN.

La cytotoxicité des lactones sesquiterpéniques nécessite la présence d'une double liaison exocyclique C₁₁-C₁₃, conjuguée à une lactone. La présence d'un groupe fonctionnel (époxyde, hydroxyl, chlorydrine, cétone insaturée, O-acyl) adjacent à la lactone semble augmenter la réactivité de ce type de molécules avec les nucléophiles biologiques (Rodriguez et coll., 1976).

Leur cytotoxicité est en effet, liée à la présence de groupes fonctionnels électrophiles. Les lactones se lient par une alkylation sélective de type Michaël avec les groupements des protéines et enzymes cellulaires.

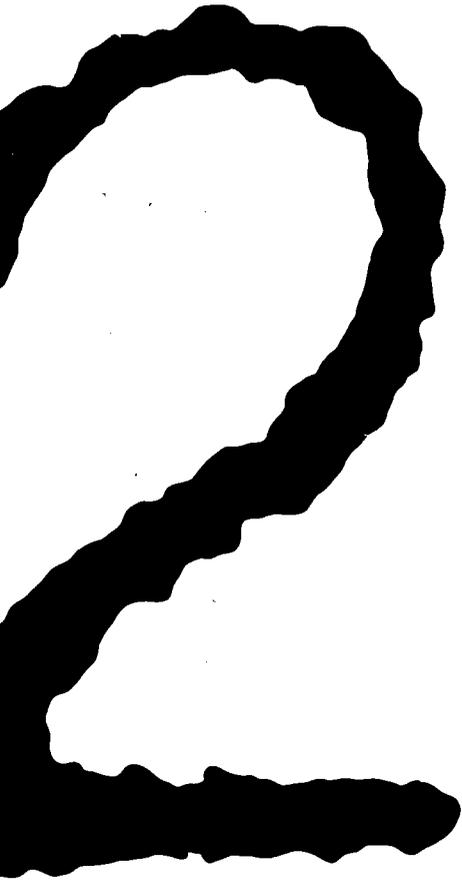
Hall et coll. (1978) démontrèrent que l'hélénaline, antitumorale, réduit l'activité glycolytique enzymatique, inhibe les enzymes de cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative mitochondriale. La synthèse de l'ADN et l'activité enzymatique ADN polymérase sont bloquées (Lee et coll., 1977). Ces auteurs enregistrent aussi une diminution de la synthèse du cholestérol.

Hall et coll. (1979) étudièrent les propriétés anti-inflammatoires de 9 lactones sesquiterpéniques dont l'eupatolide et remarquèrent que la structure δ -lactone était nécessaire à ce type d'activité.

Klimek et coll. (1981) étudièrent l'EUPP sur un modèle in vitro permettant de stimuler des lymphocytes humains à l'aide de la phytohéماغlutinine, ce qui induit une transformation blastique. Dans ces conditions, la présence d'EUPP entraîne une inhibition de la synthèse de l'ARN et de l'ADN, ce qui laisse supposer la mise en oeuvre d'un mécanisme agissant au stade initial du cycle cellulaire.

Baer et coll. (1983) démontrèrent que sur le même modèle, l'EUPP diminue la consommation de glucose, la formation d'acide lactique et inhibe la synthèse des enzymes du métabolisme glycolytique.

Woerdenbag et coll. (1986) étudièrent la cytotoxicité des lactones d'E.cannabinum sur un modèle in vitro permettant de tester l'incapacité des cellules de carcinome humains à se reproduire sur de courtes périodes de culture (4 jours). Ils montrent que la molécule entière est nécessaire pour une efficacité optimale et que la cytotoxicité est inversement proportionnelle à l'hydrophilie, entraînant une meilleure pénétration cellulaire. Ce modèle diffère de celui utilisé par l'équipe de Hladon dont le modèle consistait à tester la cytotoxicité des molécules sur des périodes d'incubation de quelques heures. De plus l'EUPP, à la dose de 20 mg/kg, s'avère cytostatique in vivo chez la souris pour deux systèmes de tumeurs solides transplantables: le fibrosarcome F1026 et le carcinome intestinal de Lewis (Woerdenbag et coll., 1987 a, 1987 b). Sur ces modèles l'EUPP, à dose cytostatique en injections intraveineuse (I.V.) ou intrapéritonéale (I.P.), réduit le taux de glutathion dans le tissu hépatique ainsi que dans le tissu tumoral. En injection I.V., ce taux est rapidement restauré contrairement à un injection I.P. La voie I.P. est plus toxique que la voie I.V. et la dose de 40 mg/kg en I.P. est létale en moins de 24 heures (Woerdenbag et coll., 1988).



*PREPARATION & CHARACTERISATION
DES EXTRAITS
D'Eupatorium Cannabinum L.*



Avant d'entreprendre toute étude pharmacologique, il a été effectué une étude botanique complémentaire de la systématique d'E.cannabinum L., visant à identifier la plante au moyen de coupes histologiques.

La préparation de l'extrait aqueux choisi pour l'étude pharmacologique a été standardisée et une identification chimique de ses principaux composés a été effectuée en chromatographie sur couche mince.

A COUPES HISTOLOGIQUES

La détermination systématique de l'espèce E.cannabinum L. a été complétée par une analyse histologique microscopique permettant de rechercher la présence éventuelle de tissus ou de structures spéciaux.

A.1 MATERIEL VEGETAL

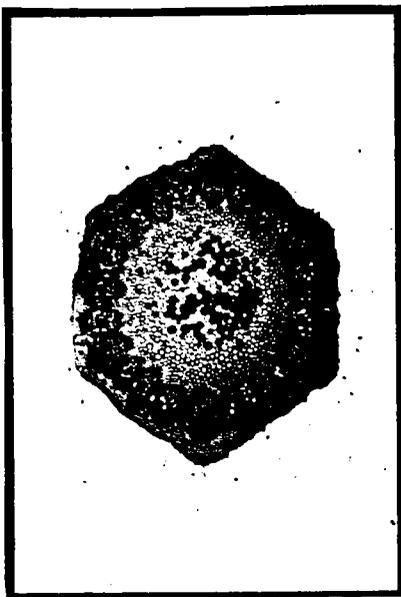
La plante fraîche a été récoltée en juillet 1988 sur les bords de la Seille (Moselle). Tiges, feuilles et racines ont été aussitôt immergées dans de l'alcool à 60° pendant 12 heures.

A.2 COUPES HISTOLOGIQUES

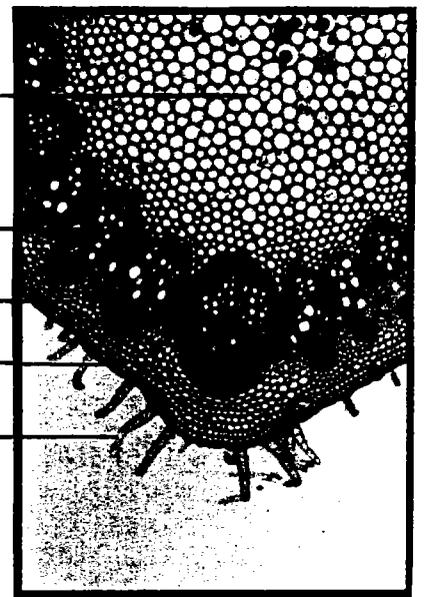
Les coupes transversales sont colorées au moyen de la technique en double coloration au carmin azuré et au vert d'iode (Genevès, 1962).

Les préparations sont ensuite passées successivement dans de l'alcool à 70°, 96° et absolu, puis placées dans une résine type Baume du Canada et recouvertes d'une lamelle. Après séchage et durcissement de la résine, les préparations peuvent être observées au microscope.

Les coupes transversales de tige, feuille et racine sont réunies dans le figure 5.



(X25) f.sc.



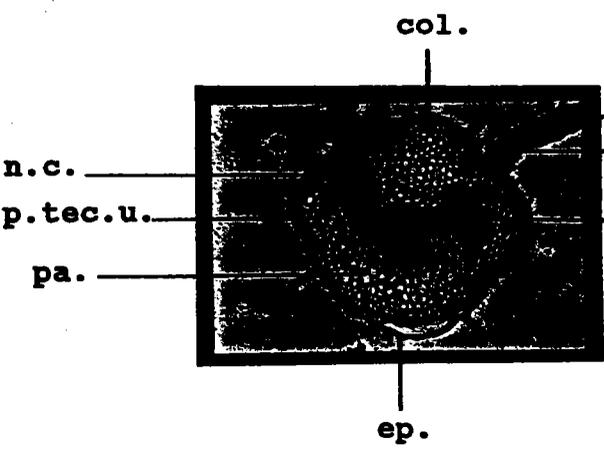
(X78)



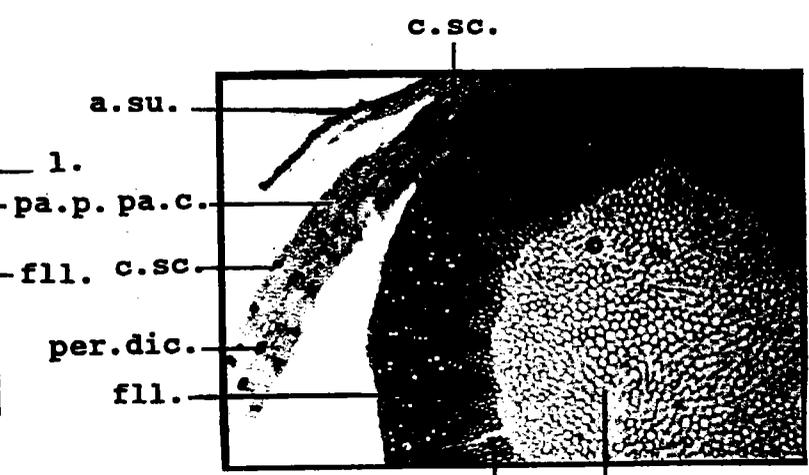
c.sec.
pa.c.
col.
p.tec.u.

xy.
phl.
sc.
ep.

FIG. 5a : C.T. DE TIGE (X200)



col.
n.c.
p.tec.u.
pa.
ep.



a.su.
l.
pa.p. pa.c.
fl. c.sc.
per.dic.
fl.

c.sc.
pa.sc. pa.m.

FIG. 5b : C.T. DE FEUILLE (X 78)

FIG. 5c : C.T. DE RACINE (X 78)

FIGURE 5 : COUPES TRANSVERSALES (C.T.) DE DIFFERENTES PARTIES D'E.cannabinum L.; ep: épiderme; col.: collenchyme; a.col.: assise collenchymateuse; pa.c.: parenchyme cortical ; pa.p.: parenchyme palissadique ; pa : parenchyme ; pa.m.: parenchyme médullaire ; pa.sc.: parenchyme scléreux; sc.: sclérenchyme; c.sc. : cellules scléreuses; a.su.: assise subéreuse; fl.: faisceau libéro-ligneux(structures secondaires); xy.: xylème; phl.: phloème; per.disc.: péricycle discontinu; c.sec.: canal sécréteur; l.: limbe; n.c.: nervure centrale, p.tec.u.: poils tecteurs unisériés pluricellulaires; f.sc.: fibres de sclérenchyme.

B. PREPARATION DE L' EXTRAIT AQUEUX D'E. cannabinum L.

Soucieux de respecter le mode d'emploi traditionnel de la plante et compte tenu de sa chimie ne comprenant pas de constituants majeurs non extractibles à l'eau, nous avons entrepris de réaliser une préparation aqueuse par décoction et macération et de la conserver par lyophilisation.

B.1 PROTOCOLE D'EXTRACTION

Le protocole d'extraction choisi pour la préparation des lots utilisés au cours de l'étude pharmacologique est une décoction-macération décrite ci-dessous :

30g de parties aériennes séchées incluant tiges, feuilles et fleurs (Phyto-Est, Strasbourg; Sanofi, Toulouse) sont mises en contact avec 300ml d'eau distillée bouillante. L'ensemble est porté à ébullition 5 à 10 minutes sous réfrigérant à reflux. Cette décoction est suivie d'une macération à l'étuve pendant 12 heures à 44°C. Après filtration, l'extrait aqueux est lyophilisé et conservé en flacons hermétiques contenant un dessiccateur, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Le rendement de l'extraction est d'environ 12% en moyenne.

Au moment de l'utilisation, le lyophilisat est dissous dans de l'eau distillée ou du NaCl à 0,9%.

Une fabrication "pilote" industrielle (E85) a été mise en oeuvre par le procédé de digestion à 80°C, filtration, concentration sous vide puis séchage final en tambour chauffé à la vapeur.

Les doses d'extrait aqueux testées au cours des études chromatographique, toxicologique et pharmacologique sont toutes exprimées en mg de plante sèche par kg de poids corporel ou par ml de suspension cellulaire.

B.2. LOTS UTILISES

L'ensemble de l'étude pharmacologique, toxicologique et chromatographique a été réalisé avec quatre lots différents, préparés selon le protocole décrit précédemment:

a) E83

E 83 a été préparé au laboratoire selon le protocole décrit ci-dessus. Plusieurs extractions ont été réalisées sur un même lot de parties aériennes séchées récoltées industriellement (Phyto-Est, Strasbourg) en été 1982.

Ce lot, de consistance légère, pulvérulente et de couleur brune, a fourni un rendement moyen de $12 \pm 3\%$.

E83 a été utilisé au cours de :
l'étude du flux biliaire chez le rat
l'effet antihépatotoxique chez le rat
l'effet diurétique chronique
l'expérience 1 de l'étude diurétique en surcharge hydrique hypotonique.

B) E84-3 et E84-4

Ces lots ont été préparés par le laboratoire de galénique Clin-Midy (Toulouse) avec un même lot de parties aériennes séchées récoltées en été 1984 (Phyto-Est, Strasbourg).

E84-3, d'un rendement de 15%, était de consistance légère et pulvérulente et de couleur brun clair.

E84-4 avait un rendement de 10%, un aspect plus dense et une couleur brun foncé.

E84-3 a été utilisé pour les études cytotoxique et antihépatotoxique sur hépatocytes isolés.

E84-4 a été utilisé pour :
l'étude antihépatotoxique chez la souris
le test du radical diphényl-picrylhydrazyl
le test de cytotoxicité sur hépatocytes isolés en suspension
l'expérience 2 de l'étude diurétique en surcharge hydrique hypotonique
l'étude de la toxicité aiguë chez la souris.

Ces deux lots ont fait l'objet d'une étude chromatographique sur couche mince pour la caractérisation chimique de l'extrait aqueux.

c) E85

Le E85 est une fabrication pilote de l'usine C.P.E. (S.P.I.; Chateaufort, Fr.) à partir d'un lot de 300 kg de plantes entières séchées, récoltées en été 1985 (Phyto-Est, Strasbourg).

E85 avait un rendement de 12,8%, un aspect moyennement léger et une couleur brune.

Ce lot a été testé pour sa cytotoxicité ainsi que pour l'étude de son effet antihépatotoxique in vitro.

D) E87

Le lot a été préparé à partir des parties aériennes séchées récoltées en été 1987 (Phyto-Est)

E87 avait un rendement de 9,2%, un aspect moyennement dense et une couleur brune.

E 87 a été utilisé au cours de l'étude chromatographique.

C. CARACTERISATION DE L'EXTRAIT

De manière à établir une carte d'identité chimique de l'extrait aqueux d'E.cannabinum, nous avons délibérément restreint cette étude à 4 composés choisis pour la constance de leur présence dans les parties aériennes de la plante et leurs concentrations non négligeables (Drozd et Bialek-Grygiel, 1971; Bloszyk et coll., 1978; Oswiecimska et Sendra, 1972; Bogaert et coll., 1972).

La caractérisation des extraits aqueux E84-3 (solution 1), E84-4 (solution 2) et E87 (solution 3) a été réalisée par chromatographie sur couche mince (C.C.M.) pour les 5 classes chimiques suivantes: lactones sesquiterpéniques, flavonoïdes, acides-phénols, acides-alcools et alcaloïdes.

Par ailleurs, un dosage des ions Na^+ et K^+ a été réalisé sur un extrait aqueux (E84-4) à 250 mg de plante sèche/ml à l'aide d'un photomètre de flamme. Cette dose est du même ordre de grandeur que celles prescrites dans la posologie traditionnelle (250mg/kg de poids corporel).

C.1. MATERIEL ET METHODES

C.1.1. PREPARATION DES EXTRAITS

Pour effectuer les CCM des lactones, des flavonoïdes, des acides-phénols et des acides-alcools, les lyophilisats sont dissous dans de l'eau distillée de telle sorte que 1 ml de solution corresponde à 0,125g de plante sèche.

Lactones sesquiterpéniques (Drozd et coll., 1972) : les solutions 1, 2 et 3 ainsi préparées, sont mises en présence d'acétate de Pb à 10%. Après défécation et centrifugation (500xg, 50 mn), elles sont épuisées par le chloroforme. Les extraits chloroformiques sont utilisés pour la CCM.

Flavonoïdes et acides-phénols (Nasr, 1984) : les solutions sont utilisées telles quelles pour la CCM.

Acides-alcools (Mortier, 1972) : les solutions aqueuses de lyophilisats sont additionnées d'HCl 1N jusqu'à pH 1,5. puis épuisées par un mélange de butanol-acétate d'éthyl (Merck, Darmstadt, RFA). L'extrait butanolique obtenu sera utilisé en CCM.

Alcaloïdes : 4g de lyophilisat sont dissous dans 40 ml d'acide sulfurique 2N par agitation magnétique pendant 15 minutes. Après centrifugation à 4000 tours/mn, le culot est à nouveau repris de la même manière. L'ensemble est amené à pH 10 avec de l'hydroxide d'ammonium 4N. Les alcaloïdes sont extraits après passage 3 fois en ampoule à décanter avec 40ml de chloroforme. Après évaporation sous vide jusqu'à siccité, l'extrait alcaloïdique est dissous dans 2ml de chloroforme (Rolland, com.pers.).

C.1.2. IDENTIFICATION DES EXTRAITS EN CCM

Les CCM sont réalisées sur plaques prêtes à l'emploi (Kieselgel G60, Merck, Darmstadt, RFA). Tous les solvants utilisés sont fournis par Merck (Darmstadt, RFA).

* **Lactones sesquiterpéniques** (Drozd et coll., 1972) :

Dépôts : 20 μ l de chacun des extraits chloroformiques des solutions 1, 2 et 3.

20 μ l de EUPP (Département de Pharmacologie, Académie de Médecine, Poznan, Pologne) à 0,1% dans un mélange chloroforme-éthanol 1:1 v/v .

Solvant de migration : chloroforme-acétone 3:1v/v.

Révéléateur : KMnO_4 1% en solution aqueuse.

* **Flavonoïdes et acides-phénols** (Nasr, 1984) :

Dépôts : 10 μ l des extraits aqueux 1, 2 et 3.

10 μ l de standards (rutoside, hyperoside, quercétine, acides caféique et chlorogénique) à 0.1% dans le méthanol.

Solvants de migration : acétate d'éthyl- méthylcétone-acide formique-eau (5:3:3:1:1 v/v).

Révéléateur : réactif de Neu(ester β -aminoéthylrique de l'acide borique à 1% dans le méthanol; Neu, 1957). La plaque est pulvérisée puis observée sous U.V. à 365 nm.

* **Acides-alcools** (Mortier, 1972) :

Dépôts : 10 μ l de chaque extrait.

Solvant : toluène-formiate d'éthyle-acide formique 50:40:10 v/v.

Révélateur : réactif de Schweppe (n butanol-glucose à 10% dans l'eau - aniline à 10% dans l'éthanol 10:2:2 v/v). La plaque est pulvérisée puis chauffée 10 minutes 110°C jusqu'à l'apparition de taches brunes.

* **alcaloïdes** (Wagner et coll., 1984) :

Dépôts : 10 et 20 μ l des extraits alcaloïdiques des lots E83 et E87; 10 μ l d'une solution de gramine (Serva, Heidelberg, RFA) à 1% dans le chloroforme, utilisée comme solution alcaloïdique témoin.

Solvant : toluol- acétate d'éthyle- diéthylamine 7:2:1 v/v.

Révélateurs : réactif de Draggendorf constitué du mélange de 2 solutions A et B (A : 0,85g de sous-nitrate basique de bismuth dans 50 ml d'acide acétique à 25%; B: 8g d'iode de potassium dans 20 ml d'eau distillée) filtrée au bout de 24 heures. Cette solution mère est diluée dans de l'acide acétique à 10% au moment de l'emploi.

C.1.3. DOSAGE DU POTASSIUM ET DU SODIUM DANS L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L.

Les teneurs en K^+ et en Na^+ d'une solution à 250 mg de plante sèche/ml (E84-3) sont dosées à l'aide d'un photomètre de flamme à étalon interne de lithium (Il, Italie). Les dosages ont été reproduits 4 fois.

C.2.RESULTATS ET DISCUSSION

C.2.1. Lactones sesquiterpéniques :

Une seule tache jaune pâle de Rf 0,23 a été identifiée dans chacun des 3 extraits. Cette tache a la même coloration et le même Rf que le standard EUPP. La surface et l'intensité de la coloration de la tache obtenue pour l'extrait 3 sont plus importantes.

Ce spot, comparé au standard EUPP, laisse supposer la présence de 10 à 15 μ g d'EUPP ce qui correspond à 0.6% au moins dans les parties aériennes séchées d'E.cannabinum.

Drozd et coll. (1972) identifiaient 3 lactones: EUPP, EUP et une lactone alors inconnue et obtenue non cristallisée. Dans notre expérimentation, seule l'EUPP a été identifiée. Cela peut s'expliquer par le mode de préparation de nos extraits car Drozd et coll. utilisèrent les parties aériennes séchées et nous avons réalisé notre C.C.M. à partir d'un extrait aqueux des parties aériennes sèches. Or les lactones sont difficilement solubles dans l'eau. Par ailleurs, l'extrait chloroformique du lyophilisat correspond à 0,25 g/ml de parties aériennes sèches, celui des auteurs à 1g/ml. Enfin, ils employèrent des plaques de silice et de gypse; quant à nous, nous avons choisi des plaques Kieselgel prêtes à l'emploi.

Toutes ces raisons expliquent qu'une seule lactone, en quantité importante dans l'extrait, ait été détectée dans nos conditions expérimentales.

C.2.2. Flavonoïdes et acides-phénols :

Les résultats sont consignés dans le tableau 8 et à la figure 23.

Les standards, rutoside, hyperoside et quercétine, apparaissent en couleur sombre sous U.V. et deviennent fluorescents, jaunes à jaune-orange après pulvérisation du réactif de Neu et observation sous U.V.

Les standards, acides caféiques et acides chlorogéniques, présentent une fluorescence bleue intense sous U.V.

En raison de la similarité de leur Rf et de leur coloration sous U.V. après pulvérisation du réactif de Neu, les composés suivants ont été identifiés dans les 3 extraits 1, 2 et 3: rutoside, hyperoside, quercétine, acides caféique et chlorogénique.

Outre ces 5 composés, il est à noter la présence de 3 taches supplémentaires dans les extraits 2 et 3 :

Rf 0,44, coloration fluorescente bleue sous U.V., verte sous U.V. après révélation du réactif de Neu.

Rf 0,62, coloration fluorescente bleue sous U.V.

Rf 0,32, coloration fluorescente bleue sous U.V., verte après pulvérisation du réactif de Neu.

Si les deux premières taches (Rf 0,44 et 0,62) sont à concentrations très faibles donc sans intérêt pour la carte d'identité chimique de la plante, la troisième (Rf 0,32) est importante de par sa surface et son intensité de coloration. Celle-ci laisse supposer qu'il s'agit d'un acide-phénol.

TABLEAU 8 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES FLAVONOIDES ET DES ACIDES-PHENOLS DE 3 EXTRAITS AQUEUX D'E.cannabinum L. : Rf ET COLORATION

SPOTS ET STANDARDS	Rf	COLORATION	
		UV	REACTIF DE NEU+ UV
rutoside	0,40	sombre	jaune
acide chlorogénique	0,57	bleu	vert
acide caféique	0,94	bleu	vert
quercétine	0,99	sombre	orange
hyperoside	0,67	bleu	orange
Extraits 1, 2, 3 : a	0,32	bleu	vert
b	0,39	sombre	jaune-orange
c	0,57	bleu	vert
d	0,67	bleu	orange
e	0,94	bleu	bleu
f	0,99	sombre	jaune

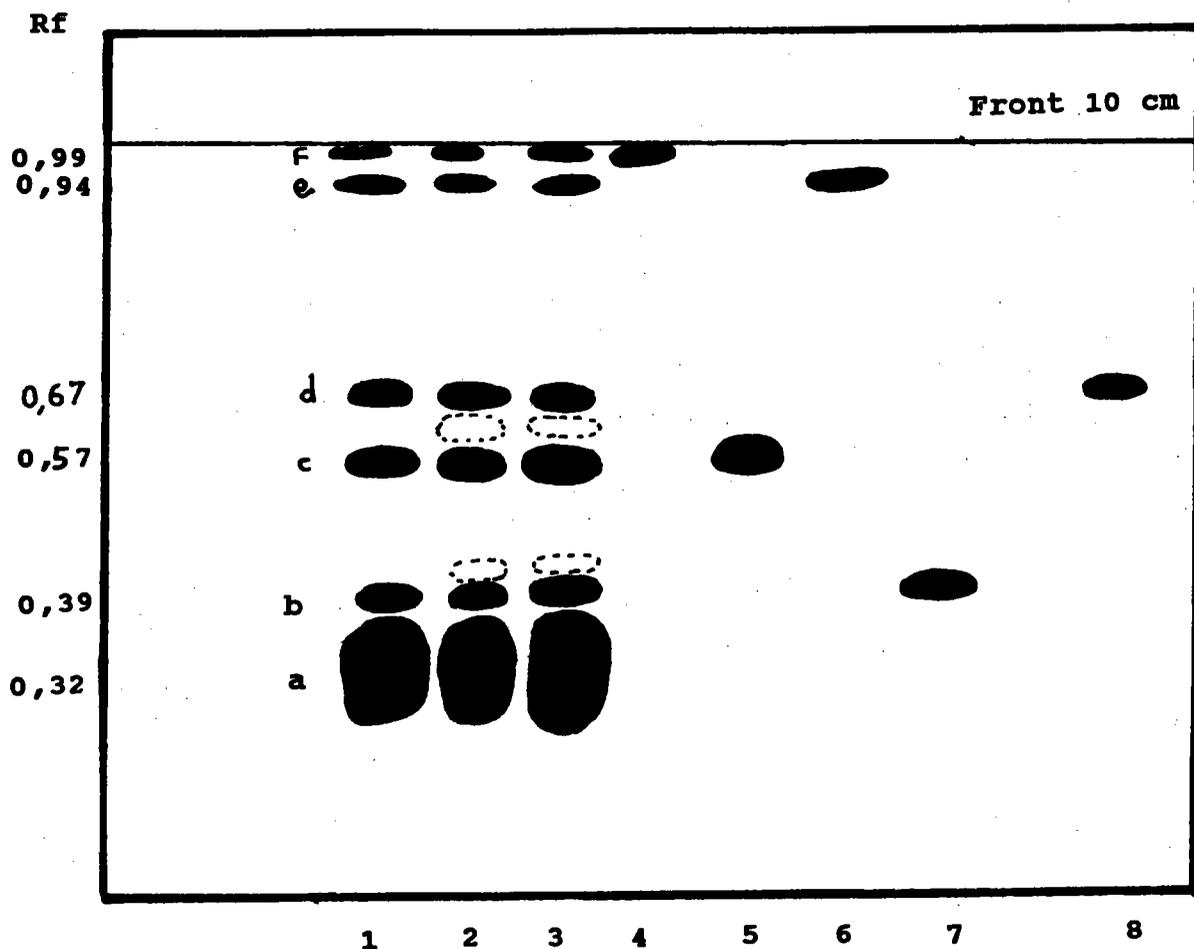


FIGURE 23 : CHROMATOGRAMME SUR COUCHE MINCE DES FLAVONOIDES ET DES ACIDES-PHENOLS DE 3 EXTRAITS AQUEUX D'*E.cannabinum* L. (1,2,3) REVELES SOUS U.V. APRES PULVERISATION DE REACTIFS DE NEU.

- 1 : EXTRAIT AQUEUX 1
- 2 : EXTRAIT AQUEUX 2
- 3 : EXTRAIT AQUEUX 3
- 4 : QUERCETINE
- 5 : ACIDE CHLOROGENIQUE
- 6 : ACIDE CAFEIQUE
- 7 : RUTOSIDE
- 8 : HYPEROSIDE

L'acide chlorogénique, également présent dans la plante a été signalé par Wagner et coll. (1984) avec des Rf de 0,50 à 0,75 après migration dans le solvant acétate d'éthyle-acide formique-acide acétique glacial-eau 100:11:11:27 v/v. La tache de Rf 0.62 pourrait correspondre à l'acide chlorogénique.

C.2.3. Acides-alcools :

Les résultats sont condensés dans le tableau 9.

L'acide malique a été identifié dans les extraits 1, 2 et 3. L'acide succinique est également présent dans l'extrait 3 et, à un degré moindre, dans l'extrait 2.

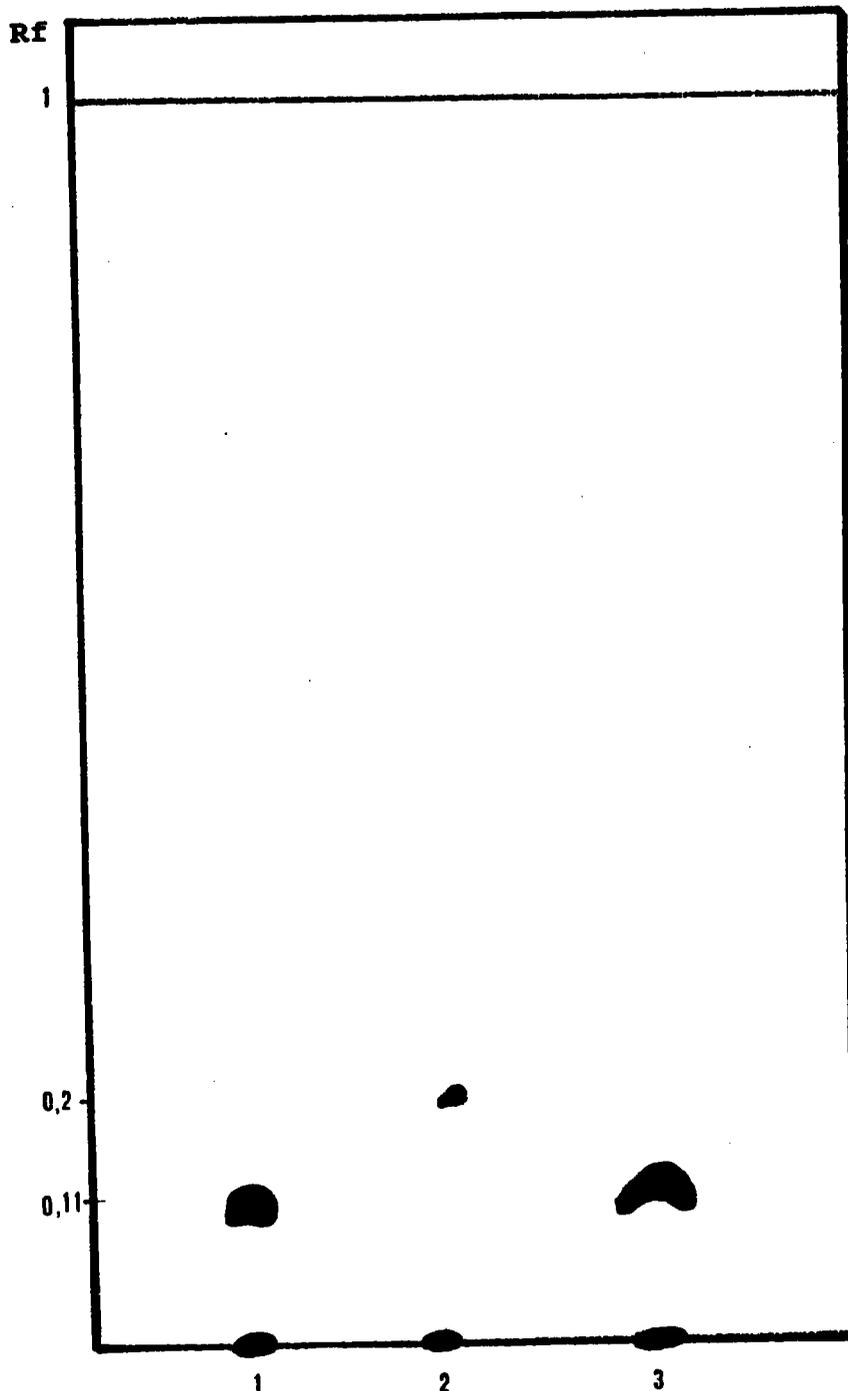
Mortier (1972), dans les mêmes conditions, avait identifié dans E.cannabinum, les acides lactique, glycolique, fumarique, succinique, citrique et l'acide O- α -dihydroxyméthylacrylique. Dans notre cas, seuls les acides malique et succinique ont été identifiés. Là encore, le procédé d'extraction (en milieu aqueux) peut être incriminé et les lyophilisats présentent des concentrations faibles en certains acides-alcools.

TAB 9 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES ACIDES-ALCOOLS DES EXTRAITS A(E84-3), B(E84-4), C(E87) D'E.cannabinum L.: Rf ET COLORATION

ACIDES-ALCOOLS	Rf	COLORATION
Acide citrique	0,10	brun
Acide fumarique	0,48	"
Acide glycolique	0,24	"
Acide lactique	0,41	"
Acide malique	0,06	"
Acide succinique	0,44	"
Extrait 1	0,41	"
Extrait 2	0,41 0,44	" "
Extrait 3	0,41 0,44	" "

C.2.4 Alcaloïdes

Le chromatogramme obtenu est représenté à la figure 24. Un alcaloïde est présent dans l'extrait aqueux d'E83 et d'E87 (Rf 0,11). Une analyse semi-quantitative, par comparaison avec le dépôt de gramine (Rf0,20), laisse supposer que l'extrait contient 0,25% d'alcaloïdes. Cette teneur est du même ordre que celle trouvée par Pedersen (1975) : 0,3% de la matière sèche. Ce dernier avait isolé deux alcaloïdes; ici un seul est apparu en CCM mais sa technique d'extraction était différente de la nôtre.



**FIGURE 24 : CHROMATOGRAMME SUR COUCHE MINCE DE LA FRACTION
ALCALOÏDIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum APRES
PULVERISATION DE REACTIF DE DRAGGENDORF.**

- 1: fraction alcaloïdique de l'extrait aqueux E83
- 2: gramine 1%
- 3 : fraction alcaloïdique de l'extrait aqueux E87

C.2.5 Teneur en ions Na⁺ et K⁺

Les résultats sont exprimés en milliequivalents par litre d'extrait aqueux à 250 mg/ml, par g de plante sèche puis, pour une dose posologique donnée de 500mg/kg de poids corporel, en milliequivalents par 100g de poids corporel de manière à rendre compte de l'apport en ions Na⁺ et K⁺ d'une administration de l'extrait chez l'animal.

CONCENTRATION	Na ⁺	K ⁺
mEq/l	65±2,6	10,7±0,3
mEq/g de plante sèche	0,26±0,01	0,43±0,01
µEq/100g	12,97±0,51	2,1±0,06

D. CONCLUSION

Cette étude chimique succincte de 3 extraits aqueux d'E.cannabinum [1 (E84-3), 2 (E84-4), 3 (E87)], permet de dresser une carte d'identité chimique de la plante. En effet, divers composés ont été retrouvés dans chacun des 3 extraits en proportion constante: lactone sesquiterpénique (EUPP), flavonoïdes (rutoside, hyperoside, quercétine), acides-phénols (acides caféique et chlorogénique), acide-alcool (acide malique) et alcaloïde (non identifié). La présence d'acide isochlorogénique a été suspectée dans les 3 extraits. Parmi les acides-alcools, l'acide succinique a été identifié dans les extraits 2 et 3.

Les dosages de Na⁺ et K⁺ ont révélé une quantité faible de ces deux ions dans une concentration d'extrait équivalent à une posologie de 500 mg/kg.

Les 3 extraits ont été obtenus à partir de plants récoltés sur des lieux différents et sur plusieurs années mais le protocole d'extraction reste le même. Nous pouvons conclure à la présence constante, dans l'extrait aqueux d'E.cannabinum obtenu par décoction et macération, des composés chimiques suivants, révélés par C.C.M.:

- Lactone sesquiterpénique** : eupatoriopictine.
- Flavonoïdes** : rutoside, hypéroside, quercétine.
- Acides-phénols** : acides caféique et chlorogénique.
- Acides-alcools** : acide malique.
- Alcaloïde** : non identifié.



***ETUDE PHARMACOLOGIQUE
DE L'EXTRAIT AQUEUX
D'Eupatorium Cannabinum L.***



De manière à confirmer la prescription de la médecine traditionnelle, recommandant l'usage d'E.cannabinum L. essentiellement pour lutter contre les maladies du foie, l'expérimentation pharmacologique s'est orientée vers l'étude des propriétés cholérétiques puis antihépatotoxiques de l'extrait aqueux. Les propriétés diurétiques de la plante ont ensuite été examinées.

Avant toute étude pharmacologique, il était indispensable de standardiser l'élevage et les conditions d'expérimentations des animaux utilisés puis de s'assurer de l'absence de toxicité de l'extrait végétal étudié.

CONDITIONS D'ELEVAGE ET D'EXPERIMENTATION DES ANIMAUX

Les rats :

Des rats mâles OFA (Iffa-Credo, L'Arbresle, Fr.), d'un poids moyen de 250 à 350 g au moment des tests sont répartis au hasard dans des cages standards en macrolon par groupe de 10 dans une animalerie où le cycle nuit/jour est de 12H/12H, la lumière s'éteignant à 21 heures pour s'allumer à 9 heures. La température est maintenue à $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Ils sont nourris et abreuvés ad libitum. Les cholérèses sont réalisées entre 9 heures et 17 heures. Les tests d'intoxication sont tous effectués à partir de 14 heures.

Les souris :

Des souris Swiss mâles sont conditionnées pendant 15 jours avant les expérimentations au cycle jour/nuit 12H/12H, la lumière s'allumant à 1 heure et s'éteignant à 13 heures. Elles sont réparties au hasard par groupes de 5 en cages standards en macrolon où elles ont accès à la nourriture et à l'eau ad libitum. La température de l'animalerie est maintenue à $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Tous les tests sont réalisés au début de la phase de nuit (14 heures).

La toxicité est réalisée sur des souris de l'élevage Janvier (Le Genest, Fr.) qui avaient 11 semaines au moment du test.

Les tests d'induction du sommeil barbiturique ont été réalisés avec des souris provenant de l'élevage Césal (Montmédy, Fr.) qui avaient 8 à 9 semaines au moment des tests.

Les tests d'intoxication au CCl_4 ont été effectués sur des souris provenant de l'élevage Janvier (Le Genest, Fr.) qui avaient 13 à 14 semaines au moment des tests.

La composition des croquettes utilisées pour l'alimentation des rats et des souris est détaillée au tableau 10.

SUBSTANCES DIVERSES (Composition %)	
Eau.....	12
Matières minérales.....	7,4
Matières grasses.....	4,5
Matières azotées (N X tot X 6,25)....	24
Cellulose brute.....	3,8
Extractif non azoté.....	48,3
Matière sèche.....	88
Energie cal. Métabolisable/kg.....	3040
MINERAUX (Grammes/kg)	
Calcium.....	15
Phosphore.....	9,5
Potassium.....	7
Chlore.....	4,5
Sodium.....	5
Magnésium.....	2
OLIGO ELEMENTS MINERAUX (Milligrammes/kg)	
Manganèse.....	140
Zinc.....	48
Cuivre.....	16
Cobalt.....	1,4
Iode.....	4
Fer.....	430
ACIDES AMINES (Grammes/kg)	
Arginine.....	13,1
Lysine.....	15
Méthionine.....	4,5
Cystine.....	4
Tryptophane.....	2,7
Glycolle.....	16,9
Isoleucine.....	11
Leucine.....	16,4
Phénylalanine.....	10,4
Thréonine.....	9,4
Valine.....	10,4
Histidine.....	5
Tyrosine.....	8
VITAMINES (U.I. p/kg)	
A.....	5500
VITAMINES (Milligrammes/kg)	
B 1.....	6,7
B 2.....	4,4
B 6.....	2,9
B 12.....	0,02
Acide Pantothénique.....	10
Niacine.....	50
Biotine.....	0,5
Acide folique.....	2,1
Vitamine E.....	30
Vitamine K.....	0,6
Acide ascorbique.....	
Choline.....	1300

TABLEAU 10 : COMPOSITION CHIMIQUE DES CROQUETTES M25 POUR RATS ET SOURIS DES LABORATOIRES EXTRA-LABO (PROVINS)

A

Etude toxicologique



A ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. CHEZ LA SOURIS

Avant toute étude pharmacologique, il était indispensable de s'assurer de l'absence de toxicité de l'extrait aqueux qui allait être testé sur divers modèles pharmacologiques in vivo et in vitro. Pour ce faire, le modèle de la toxicité aiguë chez la souris avec un suivi durant 14 jours de divers paramètres symptomatologiques a été choisi.

A.1 MATERIEL ET METHODES

Les animaux utilisés sont des souris Swiss (Janvier, Le Genest, Fr.) mâles et femelles de 11 semaines, répartis en lots de 5.

L'extrait aqueux d'E.cannabinum testé est le lot 5141-4, dissous dans NaCl 0,9% et injecté par voie intra-péritonéale aux doses de 500 et 2000 mg/kg sous un volume de 10ml/kg. les lots "placebo" reçoivent NaCl 0,9%.

Les animaux sont surveillés pendant les 4 premières heures qui suivent l'injection puis tous les jours pendant 14 jours. La symptomatologie étudiée comporte les paramètres suivants :

*comportement: activité, démarche, convulsions, tremblements.

*aspect extérieur : état nutritionnel, fourrure, peau, yeux, oreilles, dents, muqueuses.

*fonctions : respiration, digestion, selles, urines, système cardio-vasculaire.

*mortalité.

*poids.

A.2 RESULTATS ET DISCUSSION

Les souris mâles (3 sur 5) et femelles (5 sur 5) ayant reçu l'extrait aqueux à 2000 mg/kg présentent, pendant les 4 premières heures, des flancs rentrés et une activité réduite.

Leurs urines sont plus colorées que celles des témoins.

**TABLEAU 11 : EVOLUTION DU POIDS AU COURS DU TEST DE TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT AQUEUX
D'E.cannabinum L.(E84-4) CHEZ LA SOURIS**

TRAITEMENTS		N	J ₀	J ₇	J ₁₄	REMARQUES
Mâles	placebo	5	38,4± 1,3	39,4± 2,1	40,4± 1,5	
	<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg	5	38,6± 2,7	40,6± 3,5	41± 3,1	
	<u>E.cannabinum</u> 2000 mg/kg	5	35,6± 3,8	37,8± 3,3	38,6± 3,2	flancs rentrés urines foncées pendant les 1 ^{ères} heures
Femelles	placebo	5	32,2± 0,9	32,5± 0,6	32,5± 1,7	
	<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg	5	29,2± 3,0	29,7± 1,7	31,2± 2,2	
	<u>E.cannabinum</u> 2000 mg/kg	5	27,8± 1,6	30± 0,7	32,6± 2,1	flancs rentrés urines foncées pendant les 1 ^{ères} heures

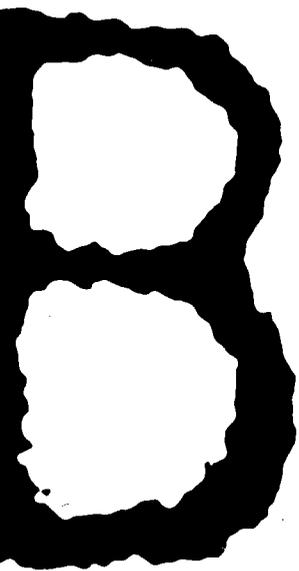
Le suivi du poids est présenté au tableau 11 : une prise de poids régulière est observée durant les 14 jours de l'expérience dans tous les lots mâles et femelles (placebo, extrait aqueux 500 et 2000 mg/kg).

Aucune mortalité n'a été enregistrée.

Outre le phénomène temporaire et localisé au niveau péritonéal observé chez la majorité des animaux ayant reçu l'extrait à 2000 mg/kg, aucune modification des autres paramètres n'a été constatée. L'extrait aqueux d'E.cannabinum ne présente donc pas de toxicité particulière et de mortalité jusqu'à la dose de 2000 mg/kg.

A.3.DISCUSSION ET CONCLUSION

Le modèle d'étude de la toxicité aiguë chez la souris a permis de ne constater aucune toxicité de l'extrait aqueux d'E.cannabinum jusqu'à la dose de 2000 mg/kg. L'étude a été menée également avec les lots E84-3 et E85 qui n'ont montré aucune toxicité jusqu'à 10 g/kg si ce n'est une démarche imprécise et une fermeture des paupières chez les souris traitées à 10 g/kg pendant 2 jours (Arvis, communication personnelle).



*Propriétés cholérétiques
d'E. cannabinum L.*



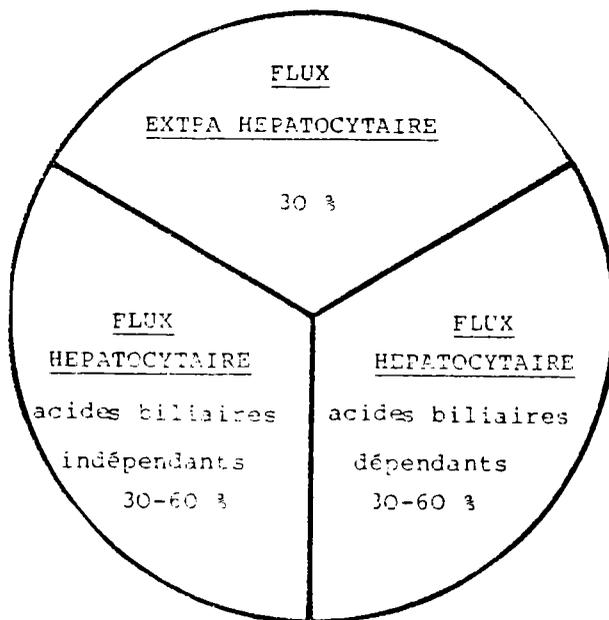
B.1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE (BOYER, 1980, 1983; ERLINGER 1982a, 1982b; CORBIC, 1986; OKOLICSANYI, 1986)

La recherche d'une hypercholérèse provoquée par l'administration de l'extrait aqueux d'E. cannabinum constitue la première étape dans l'étude pharmacologique de cette plante à tropisme hépatorénal.

La bile, formée dans les hépatocytes, est déversée dans les canalicules biliaires formés par la membrane plasmique canaliculaire des hépatocytes. Elle est collectée ensuite dans un réseau de canaux biliaires où elle subit des modifications : en effet, les cellules épithéliales de ces canaux secrètent et réabsorbent des substances organiques. La bile est enfin déversée dans le cholédoque, où elle est la résultante de deux flux (FIG.25) :

* le flux hépatocyttaire constitué d'une fraction acides biliaires dépendante (FABD) et d'une fraction acides biliaires indépendante (FABI).

* le flux extra hépatocyttaire, formé au niveau des canaux biliaires.



SCHEMA DES DIFFERENTES FRACTIONS CONSTITUANT LA BILE

Ainsi la bile est formée de 3 fractions :

B.1.1 LE FLUX ACIDES BILIAIRES DEPENDANT (FABD)

Il représente 30 à 60 % du flux biliaire total.

Les acides biliaires, synthétisés dans le foie à partir du cholestérol, sont excrétés dans la bile, conjugués à la taurine et la glycine. Au niveau hépatocytaire, ils régulent le métabolisme lipidique et assurent le transport des lipides dans la bile. Il est ainsi admis que leur sécrétion hépatique est le facteur déterminant dans la formation de la bile (Erlinger, 1982b).

Déversés ensuite dans les intestins, ils assument des fonctions de solubilisation en particulier des lipides ainsi que des fonctions de transport et de régulation grâce à leur propriété émulsionnante. Réabsorbés à ce niveau, ils regagnent ensuite le système porte. Leur biosynthèse est régulée par homéostasie (Danielsson et Sjoval, 1975). Le recyclage constitue la circulation entérohépatique.

Un récepteur spécifique des acides biliaires a été mis en évidence à la partie externe de la membrane plasmique des hépatocytes (Carey, 1982; Von Dippe, 1986). Cette translocation est sous la dépendance d'un transport couplé à la pompe à sodium $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ dépendante. Cette pompe, excrétant les ions Na^+ , crée un gradient électrochimique favorisant l'entrée des Na^+ couplés aux acides biliaires (Erlinger, 1982b).

Les acides biliaires, couplés à la lécithine et au cholestérol, forment des vésicules qui, transformées en micelles, migrent vers la membrane canaliculaire, par l'intermédiaire du complexe de Golgi (Carey, 1982).

L'excrétion des acides biliaires et le gradient osmotique ainsi formé, crée une force osmotique favorisant le passage de l'eau et des électrolytes au travers de la membrane canaliculaire : c'est le FABD.

L'administration de certains sels biliaires exogènes augmentent le FABD : acides cholique, déhydrocholique, déoxycholique, ursocholique et ursodéoxycholique. Les formes non conjuguées de ces acides biliaires sont plus cholérétiques que les formes conjuguées.

La figure 25 schématise la formation hépatocytaire de la bile.

Il existe une relation linéaire entre flux biliaire et acides biliaires chez tous les Vertébrés (Boyer et Bloomer, 1974).

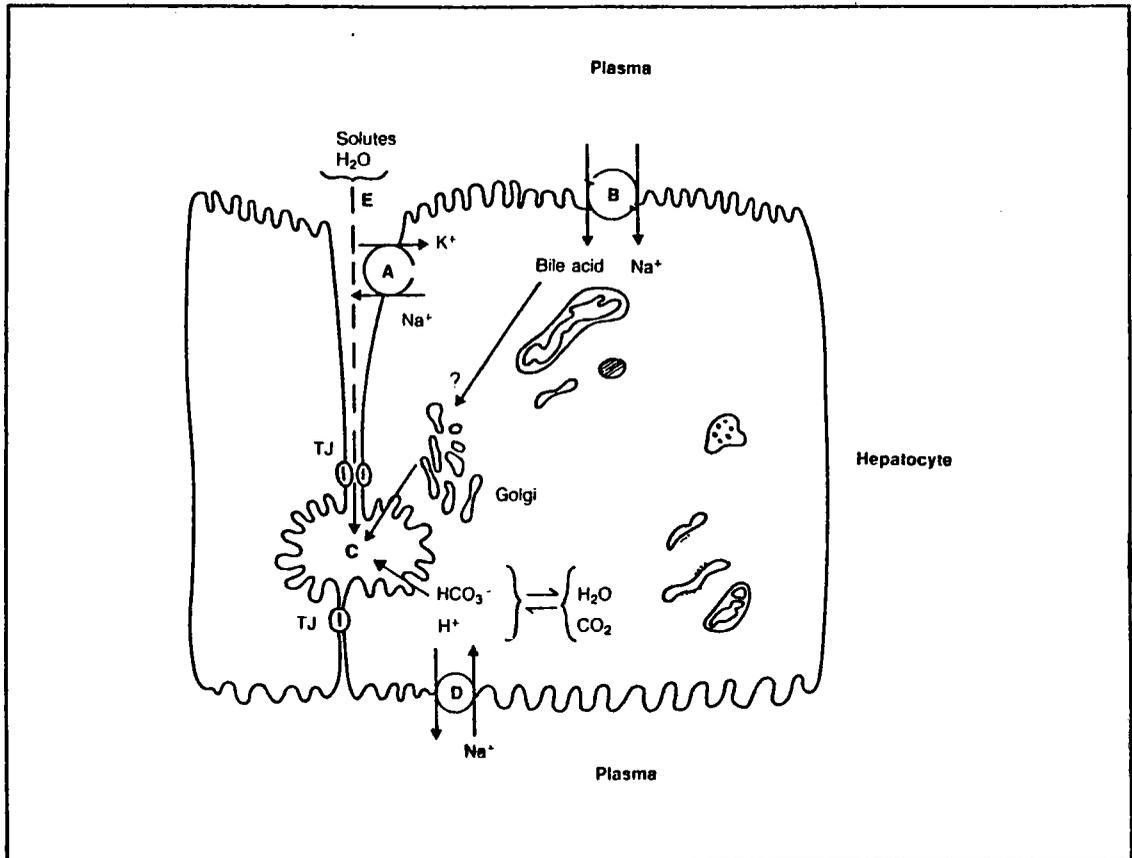


FIGURE 25 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA FORMATION HEPATOCYTAIRE DE LA BILE (Okolicsanyi et coll., 1986)

La pompe à sodium Na⁺-K⁺-ATPase(A) en créant un gradient électrochimique, favorise l'entrée d'ions Na⁺(B) couplés aux acides biliaries, secrétés dans la lumière du canalicule(C) après transport au travers de la cellule. Les bicarbonates jouent un rôle important dans la formation du FABI(D).
E= flux extrahépatocyttaire.

Le dosage des acides biliaires dans la bile renseigne sur l'origine de l'hypercholérèse: une augmentation du flux biliaire corrélée à une augmentation des acides biliaires révèle une stimulation du FABD.

B.1.2. LE FLUX ACIDES BILIAIRES INDEPENDANT (FABI) (Corbic, 1986)

Il représente 30 à 60% du flux biliaire total. L'origine de ce flux reste encore hypothétique. Le rôle de la pompe à sodium, située probablement sur la membrane sinusoidale et intercellulaire, ne suffit pas actuellement à expliquer l'origine du FABI.

Il a été démontré que le transport des bicarbonates au travers de la membrane canaliculaire pourrait jouer un rôle important dans le FABI (Mathisen et Raeder, 1983). Le FABI, stimulé par certains acides biliaires comme les acides ursodéoxycholique, 7-céto-lithocholique et nor-chénodéoxycholique est corrélé à une augmentation des bicarbonates dans la bile.

Certains anions organiques tels que les salicylates mais aussi les acides aminés ou des substances conjuguées aux anions (Graff, 1983) peuvent être aussi responsables d'une stimulation du FABI : du fait de la limitation de leur passage à travers les jonctions intercellulaires, ils pourraient avoir un pouvoir osmotique

Enfin l'hypothèse d'une action directe des acides biliaires, secrétés sous forme anionique et capables d'augmenter le débit d'eau par un mécanisme osmotique, est actuellement envisagée. Ce mécanisme, étudié dans le cas des nor-acides biliaires, très cholérétiques chez les rongeurs (Kirkpatrick et coll., 1988) et appelé "chole-hepatic shunt" s'expliquerait ainsi (Palmer et coll. in Corbic, 1986) : après avoir pris un proton à l'acide carbonique (libérant un anion bicarbonate), l'acide biliaire serait réabsorbé par les voies biliaires du fait d'un gradient de concentration entre les voies biliaires et les plexus sanguins adjacents; il y aurait transfert du pouvoir osmotique de l'acide biliaire au bicarbonate et l'acide biliaire n'apparaît pas dans la bile; le retour de l'acide biliaire à l'hépatocyte expliquerait son pouvoir cholérétique élevé du fait du grand nombre de cycles ainsi possibles.

La figure 26 schématise la formation du FABI.

L'analyse de la relation linéaire entre flux (x) et acides biliaires (y) montre que l'extrapolation de la ligne de régression au 0 de l'abscisse, intercepte l'ordonnée positive: c'est le FABI (Erlinger, 1982). Il a été suggéré une relation curvilinéaire à faible concentration en acides biliaires (Blitzer et Boyer, 1982).

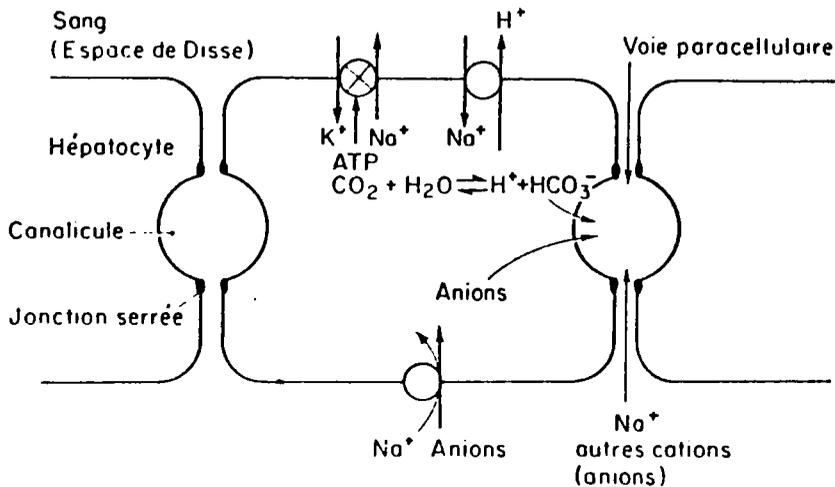


FIG 26 : REPRESENTATION DES MECANISMES (CONNUS OU HYPOTHETIQUES) DE TRANSPORT D'IONS IMPLIQUES DANS L'ELABORATION DE LA FRACTION INDEPENDANTE DES ACIDES BILIAIRES DE LA SECRETION BILIAIRE (CORBIC, 1986)

Ces ions doivent établir (directement ou non) un gradient osmotique capable d'entraîner la sécrétion d'eau des sinusoides vers les canalicules. Le gradient de sodium transmembranaire dû à l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ maintient le potentiel de membrane et sert de source d'énergie à des transports secondairement actifs tels que l'échange Na^+/H^+ ou le co-transport de sodium et de certains ions. Des anions comme le bicarbonate ou certains ions organiques pourraient être sécrétés dans la bile par diffusion le long d'un gradient électrochimique. La voie paracellulaire est partiellement perméable aux électrolytes (davantage aux cations qu'aux anions) et permet le passage d'ions qui diffusent le long d'un gradient électrochimique ou qui accompagnent un mouvement d'eau (appelé, en anglais, "solvant drag").

B.1.3 LE FLUX EXTRAHEPATOCYTAIRE

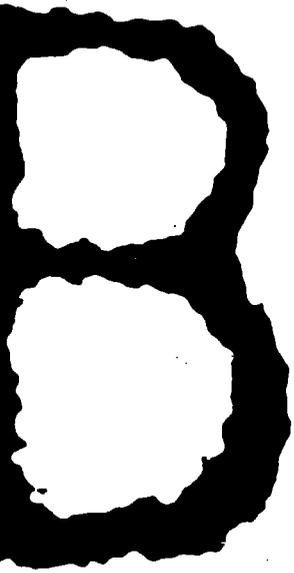
Il représente environ 30% du flux biliaire total. Eau et solutés peuvent circuler dans les espaces intercellulaires vers les canalicules, en traversant les complexes de jonction (Blitzer et Boyer, 1982; Boyer, 1983).

Ces mécanismes d'excrétion et de sécrétion au niveau des canaux biliaires sont régulés par des hormones : sécrétine et gastrine stimulent la sécrétion en particulier des bicarbonates et d'eau (Boyer et Bloomer, 1974; Barnhart et Combes, 1978). La somatostatine agit inversement en diminuant l'excrétion des bicarbonates (Lewis et coll., 1982; Ricci et Fevery, 1981; René et coll., 1983).

La clairance biliaire à l'érythritol permet d'estimer l'origine du flux biliaire: en effet, une augmentation conjointe du flux biliaire et de la clairance indique que l'augmentation du flux biliaire est d'origine hépatocytaire. Inversement, si la clairance n'augmente pas, l'hypercholérèse fait intervenir des mécanismes extrahépatocytaires.

Nous avons donc recherché, dans un premier temps, l'action cholérétique d'E.cannabinum. La cholérèse a été étudiée par la technique du cathétérisme du canal cholédoque chez le rat. Une étude dose/effet et effet/temps a été entreprise.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à préciser le site d'action de l'extrait aqueux d'E.cannabinum sur la formation de la bile. Pour ce faire nous avons dosé les acides biliaires dans la bile par réaction enzymatique, de façon à apporter des précisions quant à l'origine de ce flux biliaire stimulé (FABD ou FABI). Puis la technique de la mesure de la clairance à l'érythritol ^{14}C a été utilisée pour déterminer l'origine hépatocytaire ou extrahépatocytaire du flux biliaire.



*Propriétés cholérétiques
d'E. cannabinum L.*

**B.2. INFLUENCE D'E.cannabinum L. SUR LE FLUX BILIAIRE CHEZ
LE RAT**

B.2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. SUR LE FLUX BILIAIRE CHEZ LE RAT

La détermination de la cholérèse, par cathétérisme du canal cholédoque chez le rat anesthésié, est une technique couramment utilisée mais elle nécessite un contrôle rigoureux de certains paramètres pour obtenir une bonne reproductibilité.

*** La température :**

Elle modifie le volume de bile excrétée (Bar, 1962). Entre 32 et 40°C, les variations sont réversibles mais au-delà, il apparaît des altérations irréversibles (Brauer et coll, 1954). De plus, l'anesthésie au pentobarbital induit une hypothermie. L'animal est donc réchauffé (lampe 100 W, table chauffante) et des sondes thermiques rectales et abdominales permettent de maintenir la température à $38 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

*** L'interruption de la circulation entérohépatique :**

Le cathétérisme du canal cholédoque induit une baisse de la teneur en acides biliaires circulants. Pour compenser cette perte, une solution de taurocholate de sodium dans NaCl 0.9% est perfusée par voie I.V. à $0,2 \mu\text{môles}/\text{min}/100\text{g}$, à $7,5 \mu\text{l}/\text{min}$ (Corbic et coll., 1982).

*** Le flux biliaire basal :**

Avant toute administration de produit à tester, le flux biliaire basal est déterminé sur 30 minutes, le rat étant son propre témoin. Sur 85 rats mâles Sprague Dawley de 250 à 480 g, le flux biliaire moyen est de $7,7 \pm 1,12 \text{ mg}/\text{min}/100\text{g}$.

B.2.1.MATERIEL ET METHODE

Des rats mâles Sprague Dawley (Iffa credo, L'Arbresle, Fr.), pesant 300g à 400 g, nourris ad libitum avec une alimentation standard (Extralabo, Provins, Fr.), sont mis à jeun 18 heures avant l'expérimentation. Ils sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (Nembutal, Abbot) à la dose de 60 mg/kg de poids corporel et reçoivent si nécessaire 1/3 de cette dose en cours d'expérience. La température abdominale, maintenue à $38 \pm 0,5^\circ\text{C}$ grâce à des tables d'opération chauffantes, est contrôlée par une sonde thermique (Technoderm, Forbach, Fr.).

Le rat , placé en décubitus dorsal, est trachéotomisé avec un cathéter n°7 (Biotrol, Paris) et une veine jugulaire est cathétérisée (n° 1). Après laparotomie médiane, le canal cholédoque est cathétérisé (n° 1). Une solution de taurocholate de sodium (Sigma) est perfusé par la veine jugulaire, à débit constant (0.2 môle/mn/100g) dans NaCl 0,9%; 7.5 l/mn) à l'aide d'une pompe à perfusion (Microperpex, LKB). La bile, recueillie toutes les 10 minutes dans des tubes de 0,4 ml, préalablement pesés, est mesurée par gravimétrie.

Après obtention d'un flux biliaire régulier pendant 30 minutes, 5 lots de 5 rats reçoivent un extrait aqueux d'E.cannabinum à 62,5, 125, 250, 500, 1000 mg/Kg.

Un lot de référence de 6 rats reçoit 10 mg/kg de déhydrocholate de sodium (D.H.C.: Dycholium, Théraplix S.A., Paris).

Un lot "placebo" de 9 rats reçoit du NaCl 0,9%.

Toutes les injections sont effectuées par la veine jugulaire à 0.3 ml/100 g.

B.2.2.STATISTIQUES

Toutes les 30 minutes après l'injection de l'extrait aqueux, de DHC ou de NaCl 0,9%, la variation du flux biliaire basal (% FB), pour chaque animal, est calculée comme suit:

$$(FB - FB_{\text{basal}}) / FB_{\text{basal}}$$

Les résultats sont aussi exprimés en pourcentages de flux biliaire cumulés, pour les lots E.cannabinum et DHC, et corrigés par rapport au lot "placebo". Les % FB pour chaque animal et par périodes de 30 minutes, sont soustraits de la moyenne du %FB du groupe placebo puis cumulés par périodes de 30 minutes.

Les différences des valeurs moyennes, sur 30 minutes, entre les flux biliaires de base et les flux biliaires après administration des produits testés, sont comparés aux différences moyennes du lot "placebo" par le test "t" de Student, après analyse de variance par le test "F" de Snedecor.

B.2.3.RESULTATS

L'effet d'une injection unique de l'extrait aqueux d'E.cannabinum est montrée sur les figures 27 et 28 ainsi qu'aux tableaux 12, 13 et 14.

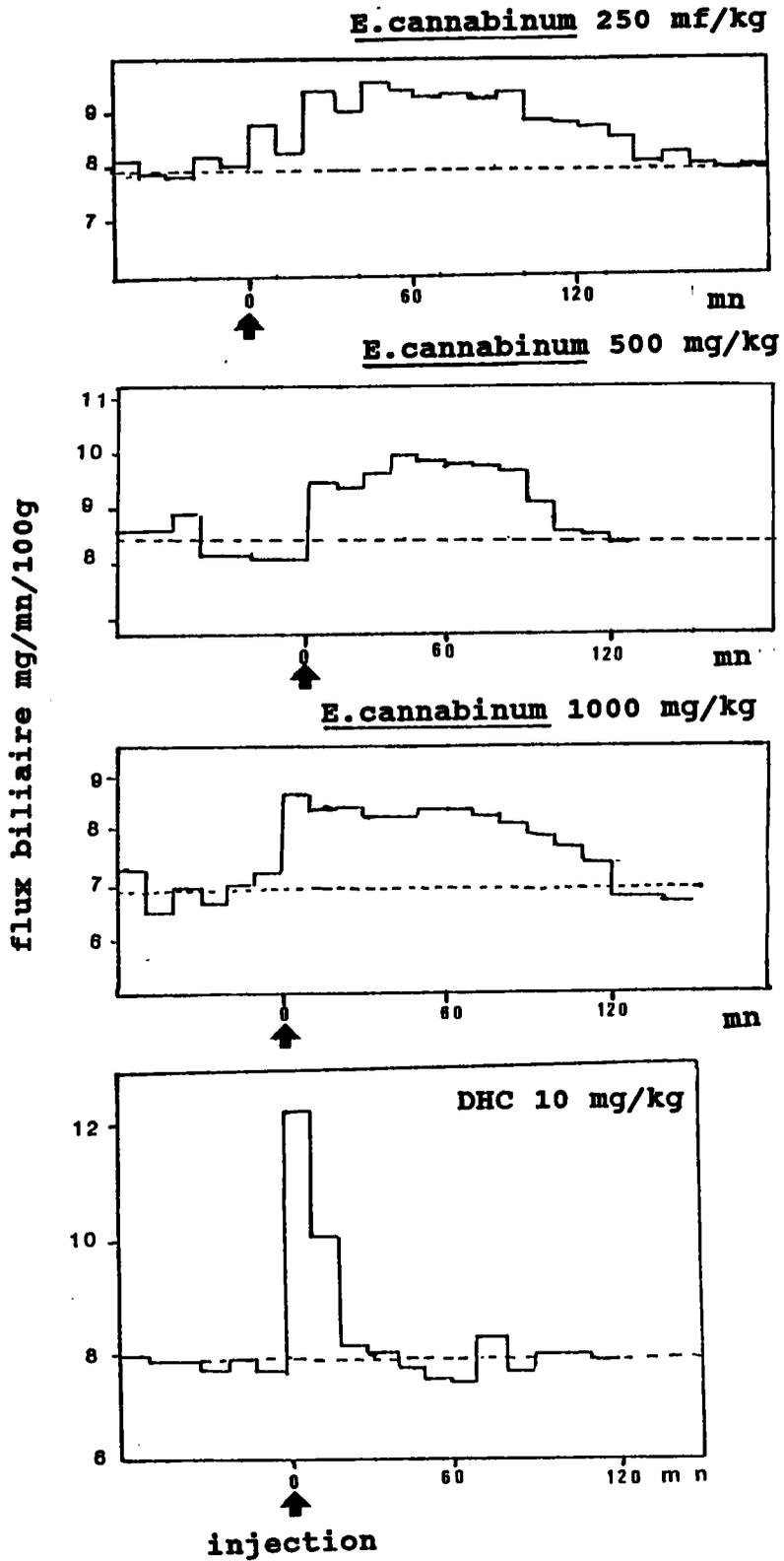


FIGURE 27 : COURBES TYPQUES DE VARIATION DU FLUX BILIAIRE OBTENUES CHEZ LE RAT APRES ADMINISTRATION DE DHC ET D'E.cannabinum L.

TABLEAU 12 : FLUX BILIAIRE APRES ADMINISTRATION D'E.cannabinum, de DHC et de NaCl 0,9 % CHEZ LE RAT

FLUX BILIAIRE mg/30mn/100g	PLACEBO	EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> mg/kg/ml					DHC
	62,5	125	250	500	1000	10mg	
NOMBRE D'ANIMAUX	9	4	5	5	5	5	6
FLUX BASAL(contrôle)	223± 9	217± 17	215± 36	221± 36	238± 29	253± 14	245± 6
+ 30 MINUTES	218± 10	213± 15	239± 11***	245± 2***	274± 41***	286± 16***	330± 23***
+ 60 MINUTES	216± 12	200± 14	235± 11**	262± 29***	278± 37***	280± 10	251± 8***
+ 90 MINUTES	209± 9	198± 15	224± 13**	256± 26***	270± 38***	269± 9***	234± 8
+ 120 MINUTES	209± 11	193± 15	216± 13*	243± 13***	245± 33	248± 9	237± 5
+ 150 MINUTES	207± 12	180± 12	198± 11	231± 26**	238± 27	232± 22	233± 11

Différence statistiquement significative par rapport au flux basal(test"t") :
 $p \leq 0,05$ *
 $p \leq 0,01$ **
 $p \leq 0,001$ ***

1
83
1

TABEAU 13 : FLUX BILIAIRE, EXPRIME EN % DE VARIATION PAR RAPPORT AU CONTROLE, APRES ADMINISTRATION D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum, DHC ET NaCl 0,9%

FLUX BILIAIRE %	PLACEBO	EXTRAIT AQUEUX <u>E.cannabinum</u> mg/kg/ml					DHC
		62,5	125	250	500	1000	
NOMBRE D'ANIMAUX	9	4	5	5	5	5	6
FLUX BASAL	0	0	0	0	0	0	0
+ 30 MN	2,3± 0,8	-1,7± 2,4	11,5± 3,2***	11,8± 4,2***	14,8± 3,1***	13,0± 3,0***	34,2± 7***
+ 60 MN	-2,9± 1,6	-7,1± 3,2	9,7± 2,6***	19,8± 3,6***	16,2± 1,1***	10,9± 2,6***	3,0± 1,5*
+ 90 MN	-5,9± 1,1	-7,8± 6,9	4,2± 2,9**	17,3± 4,9***	13± 1,8***	6,6± 3,8**	-3,5± 2,8
+ 120 MN	-6,0± 1,0	-10,5± 6,1	0,2± 2,2*	11,0± 4,5**	2,8± 0,7**	-1,7± 4,4**	-2,3± 2,2
+ 150 MN	-6,9± 2,3	-16,4± 5,2	-7,6± 2,9	5,3± 3,9*	0,1± 0,9	-8,1± 7,8	-3,9± 2,6

Différence statistiquement significative par rapport au flux basal(test"t") :
 $p \leq 0,05$ *
 $p \leq 0,01$ **
 $p \leq 0,001$ ***

TABLEAU 14 : FLUX BILIAIRE EXPRIME EN POURCENTAGES MOYENS DE VARIATION CUMULES SUR 150 MINUTES ET CORRIGES PAR RAPPORT AUX VALEURS DU LOT "PLACEBO"

	EXTRAIT AQUEUX D' <u>E.cannabinum</u> mg/kg/ml					DHC
	62,5	125	250	500	1000	10mg/kg/ml
% DE VARIATION CORRIGES PAR RAPPORT AU LOT PLACEBO ET CUMULE SUR 150 MN	-20,2± 40,3	41,4± 27,6 **	88,4± 43 ***	70,2± 10,6 ***	44,1± 35,2 **	47,4± 20,1 ***

Différences statistiquement significatives par rapport au controle(test "t") : $p < 0,01$ **
 $p < 0,001$ ***

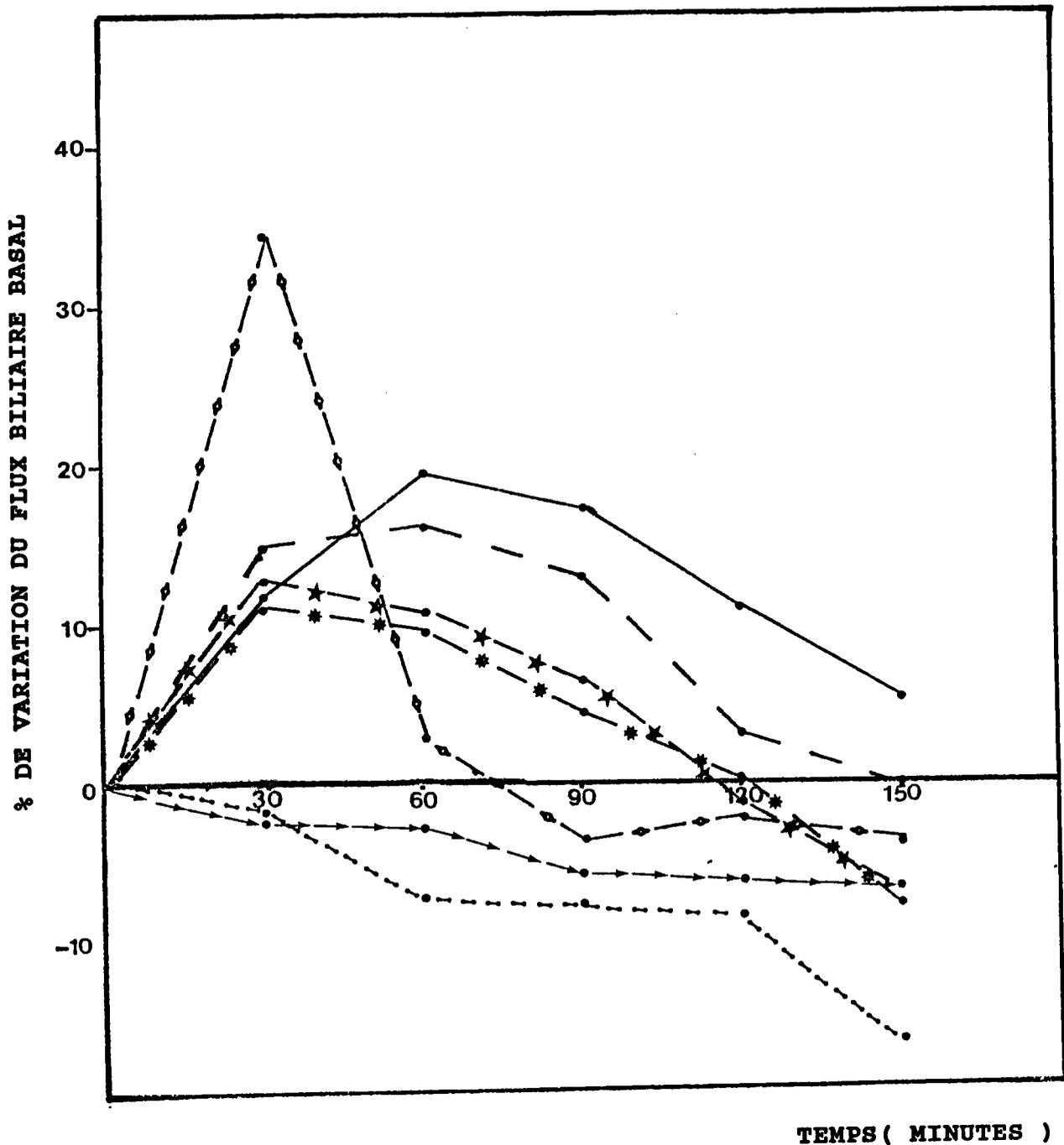


FIGURE 28 : FLUX BILIAIRE CHEZ LE RAT EXPRIME EN MOYENNE DE % PAR RAPPORT AU FLUX BASAL ET POUR CHAQUE LOT

62,5 mg/kg : - - - -
125 mg/kg : * - *
250 mg/kg : —
500 mg/kg : - -
1000 mg/kg : ★ - ★
DHC 10 mg/kg : ◊ - ◊
placebo : → - →

Le DHC 10 mg/kg induit une forte mais fugace hypercholérèse durant les 30 premières minutes. Elle diminue rapidement pour atteindre une cholérèse non significative par rapport au groupe "placebo", au bout de 90 minutes (tableau 12 et figure 28).

Le lot "placebo" présente une baisse discrète mais régulière de la sécrétion biliaire durant toute l'expérimentation, pour atteindre -7% à 150 minutes (tableau 13).

Le flux biliaire est augmenté de manière significative après une injection de l'extrait aqueux d'E.cannabinum à 125, 250, 500 et 1000 mg/kg.

Il atteint un maximum 60 minutes après (19%) à 250 mg/kg et l'hypercholérèse persiste 150 minutes. A 62,5 mg/kg par contre, la cholérèse diminue progressivement tout au long de l'expérience.

La figure 29 et le tableau 14 représente les pourcentages moyens cumulés sur 150 minutes du flux biliaire corrigé par rapport au lot "placebo".

Ce pourcentage permet d'estimer plus distinctement l'activité cholérétique aux différentes doses testées. L'effet maximal est obtenu avec l'extrait aqueux à 250 mg/kg (+ 87%) puis, par ordre décroissant, 500 mg/kg (+74%), 1000 mg/kg (+47%), DHC (+47%) et 125 mg/Kg (+38%). La dose de 62,5 mg/kg est inefficace(-21%).

B 2.4 ANALYSE DES RESULTATS

Nous avons entrepris une étude des relations effet/temps et effet/doses des propriétés cholérétiques de l'extrait aqueux d'E.cannabinum.

* Relation effet / temps

Nous avons démontré l'hypercholérèse persistante sur 150 minutes d'une injection d'extrait aqueux d'E.cannabinum chez le rat (88 % d'augmentation du flux 150 minutes après injection de 250 mg/kg).

Le produit de référence, le DHC, qui est un sel biliaire, entraîne, quant à lui, une stimulation de 47% à 10 mg/kg.

Il est intéressant de remarquer, comme Yamahara et coll. (1983, 1985b) comparant le DHC 10 mg/kg à différents extraits végétaux cholérétiques que les extraits agissent de manière modérée mais persistante dans le temps alors que le DHC provoque une hypercholérèse forte mais fugace.

* Relation effet / dose (figure 29)

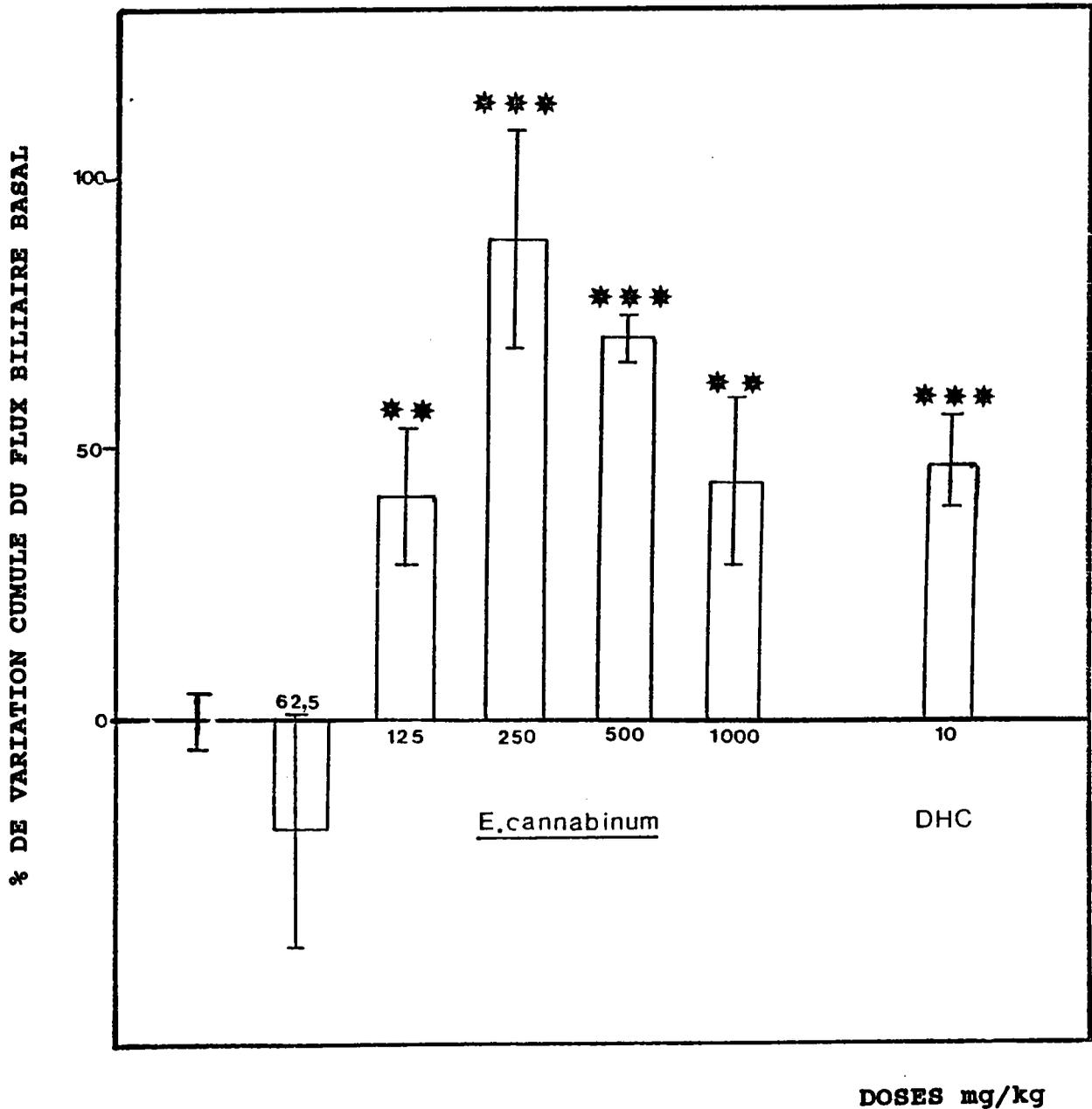


FIGURE 29 : FLUX BILIAIRE CHEZ LE RAT EXPRIME EN % DE VARIATION CUMULES SUR 150 MINUTES ET CORRIGES PAR RAPPORT AU LOT "PLACEBO" APRES ADMINISTRATION D'E.cannabinum

Différences statistiquement significatives par rapport au lot "placebo":
* $p \leq 0,05$
** $p \leq 0,01$
*** $p \leq 0,001$

Il existe une corrélation entre la concentration de l'extrait aqueux et le pourcentage de variation cumulé du flux biliaire comparé au lot "placebo" : 250 mg/kg de plante sèche constitue la concentration la plus efficace. De part et d'autre (125 et 500 mg/kg) le pouvoir cholérétique persiste mais avec une plus faible intensité. De surcroît, lorsque l'on diminue la dose (62,5 mg/kg), on diminue l'activité cholérétique. Par contre, lorsque l'on augmente la dose, l'effet persiste mais de manière moindre (1000 mg/kg).



*Propriétés cholérétiques
d'E. cannabinum L.*

**B.3 RECHERCHE DU SITE D'ACTION D'E. cannabinum L. SUR LA
FORMATION DE LA BILE**

B.3.1 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. SUR LE TAUX D'ACIDES BILIAIRES DANS LA BILE

B.3.1.1 MATERIEL ET METHODES

Le protocole expérimental utilisé est le même que celui précédemment décrit pour l'étude de la cholérèse.

Les acides biliaires sont dosés dans la bile, prélevée par période de 10 minutes, 30 minutes avant et 60 minutes après l'administration des produits testés: un groupe de 5 rats reçoit l'extrait aqueux d'E.cannabinum 500 mg/kg et un groupe "placebo" de 3 rats reçoit NaCl 0,9%.

Le dosage est effectué par la méthode enzymatique utilisant la 3- α -déshydrogénase décrite par Berthelot et coll (1970) et modifiée par Corbic et coll. (1982).

Le principe repose sur une déshydrogénation de l'hydroxyde 3- α des acides biliaires par la 3- α -déshydrogénase en présence de NAD⁺. Le NAD libéré est mesuré par spectrophotométrie à 340 nm. On quantifie les acides biliaires à l'exception des acides biliaires 3- α conjugués qui ne représentent que 5% des acides biliaires totaux (Samuel et Eik-Nes, 1968). Les réactifs sont utilisés dans la séquence suivante :

- * 100 μ l de 3- α déshydrogénase 1.2 Unité/ml (Worthington Biochemical Corporation N.J., USA) dans un tampon Tris 0.03 M et HCl 0,03 M, pH 7,2.
- * 100 μ l d'hydrazine 1 M (Merck, Darmstadt, All.).
- * 50 μ l de NAD 4.9 mM (Merck).
- * 600 μ l de pyrophosphate de sodium 0,1 M (Merck).
- * 2 μ l (Microcaps Drummond) de bile ou de taurocholate de sodium (Sigma).

Le "blanc dosage" est réalisé avec 900 μ l de pyrophosphate de sodium et 2 μ l de bile.

30 à 45 minutes après, on lit la D.O. dans les microcuvettes de 1 ml (Ratiolab) à 340 nm et à 25°C avec un spectrophotomètre double faisceau (Uvikon 810, Kontron).

Le pyrophosphate inactive les enzymes présents dans la bile et maintient le pH entre 9,1 et 10,3 car, en milieu plus acide, la réaction est réversible.

Une gamme d'étalonnage est établie à partir d'une solution de taurocholate de sodium à 10, 20, 30 et 40 mM.

B.3.1.2 STATISTIQUES

Les moyennes du flux biliaire et des concentrations en acides biliaires sont exprimées par périodes de 30 minutes. La régression linéaire, par ajustement au modèle $y=ax+b$ est analysée par le test "F" de Snedecor.

B.3.1.3 RESULTATS

L'influence d'E.cannabinum sur le flux biliaire et la sécrétion d'acides biliaires est présentée au tableau 15 et à la figure 30.

Bien que le flux biliaire (y) augmente en parallèle avec la concentration en acides biliaires (x) (respectivement 19% et 8%), la relation linéaire $y= 3,6 x+ 7,8$ n'est pas significative.

Dans le groupe "placebo", la baisse significative, durant les 30 premières minutes, est due à l'interruption de la perfusion de taurocholate de sodium pendant l'injection de NaCl 0,9%.

Dans le groupe traité par E.cannabinum, cette baisse est compensée par l'augmentation du flux biliaire (effet cholérétique); de plus la sécrétion d'acides biliaires est aussi augmentée (environ 10%) mais pas de façon significative.

B.3.1.4 ACIDES BILIAIRES

Il y a absence de corrélation entre le flux biliaire et le taux d'acides biliaires dans la bile. Comme l'origine du flux biliaire stimulé par E.cannabinum est hépatocytaire, l'extrait doit stimuler le FABI.

Dans la littérature, le flux biliaire basal chez le rat est compris entre 3 et 15 mg/mn/100g (Erlinger, 1982). Au cours de l'étude des propriétés cholérétiques menées sur 785 rats mâles Sprague Dawley de 250 à 480 g, le flux biliaire moyen est de $7,7 \pm 1,12$ mg/min/100g.

L'extrapolation linéaire de la relation flux/acides biliaires à l'ordonnée indique l'existence d'une sécrétion hépatocytaire en l'absence d'une excrétion d'acides biliaires. Le flux biliaire est maintenu même si le taux d'acides biliaires est extrêmement diminué (Erlinger, 1982).

TABLEAU 15 : FLUX BILIAIRE ET SECRETION D'ACIDES BILIAIRES APRES ADMINISTRATION D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum

		PLACEBO	<u>E. cannabinum</u> 500 mg/kg/ml
NOMBRE D'ANIMAUX		3	5
FLUX BILIAIRE ng/mn/100g	FLUX BASAL(30 MN)	7,95± 0,02	7,46± 0,46
	+ 30 MN	7,45± 0,13*	8,89± 0,47
	+ 60 MN	7,85± 0,10	8,42± 0,47
CONCENTRATION EN ACIDES BILIAIRES nmôles/l	CONCENTRATION BASALE (30 MN)	47,3± 1,3	36,8± 22,7
	+ 30 MN	38,3± 1,3**	33,9± 2,7
	+ 60 MN	48,6± 14	32,7± 1,8
SECRETION D'ACIDES BILIAIRES nmôles/min/100g	SECRETION BASALE (30 MN)	372± 10	281± 10
	+ 30 MN	283± 14**	303± 26
	+ 60 MN	377± 9	272± 19

Différence statistiquement significative par rapport au contrôle(test"t") : $p \leq 0,05$ *
 $p \leq 0,01$ **

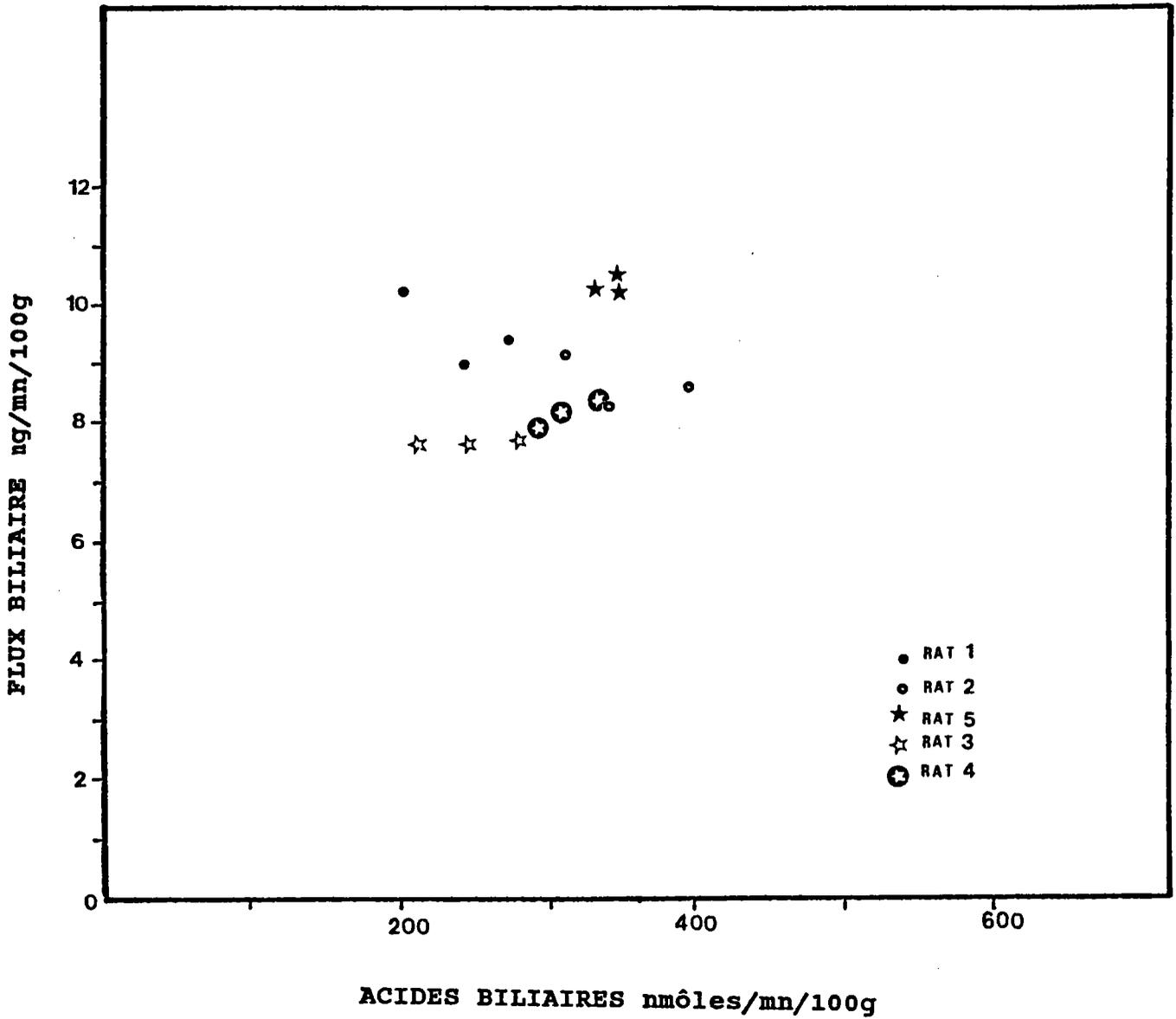


FIGURE 30 : RELATION ENTRE LE FLUX BILIAIRE ET LES ACIDES BILIAIRES APRES ADMINISTRATION D'E.cannabinum

Le FABI calculé (6,4 mg/kg/10g), qui représente 74% du FAB total, est supérieur à celui rencontré dans la littérature (environ 60% chez les lagomorphes et les rongeurs) (Klaasen et Watkin, 1984). Ceci suggère que le FABI puisse être stimulé.

Dans les mêmes conditions expérimentales, deux plantes cholérétiques de la pharmacopée traditionnelle yéménite ont présenté deux modes d'action différents d'E.cannabinum (Lanhers et coll., 1986):

Anisotes trisulcus augmente la sécrétion d'acides biliaires de 20% et stimule le FABD puisque le FABI calculé par extrapolation à l'ordonnée représente 57% du FAB total, valeur conforme à la littérature. De plus une relation linéaire entre le flux biliaire et la sécrétion d'acides biliaires a été démontrées.

Crepis ruepellii diminue la sécrétion d'acides biliaires de -26% et stimule le FABI. Cet extrait végétal renferme vraisemblablement des composés entrant en compétition avec les acides biliaires.

Cet exemple montre que la sécrétion de bile stimulée par un extrait végétal peut avoir des origines différentes.

Nombreuses substances médicamenteuses ou toxiques cholérétiques stimulent le FABI. Cette cholérèse n'est d'ailleurs pas corrélée avec l'induction enzymatique microsomale. Ainsi, la cholérèse induite par le phénobarbital est due à une stimulation du FABI et la sécrétion endogène des acides biliaires est diminuée. Ce phénomène s'explique par une modification de l'activité enzymatique de glucuroconjugaison. Les acides biliaires conjugués sont moins efficacement réabsorbés au niveau des intestins et des reins et la perte urinaire des acides biliaires glucuroconjugués est ainsi augmentée. Un mécanisme secondaire évoquant la participation de l'enzyme $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ dans l'augmentation du FABI est aussi envisagé : une modification du micro-environnement lipidique de la membrane plasmique et de sa microviscosité (par le phénobarbital par exemple) affecte sensiblement cette enzyme (Okuda et coll., 1988).

Le mécanisme détoxifiant de la glucuroconjugaison intervient pour une part importante dans l'élimination de nombreuses molécules d'origine végétale. La stimulation du FABI par l'extrait aqueux d'E.cannabinum pourrait supporter ainsi cette hypothèse sans pour autant oublier le pouvoir osmotique de certains cations et anions organiques éliminés dans la bile à la faveur d'un gradient électrochimique.

B.3.2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. SUR LA CLAIRANCE BILIAIRE A L'ERYTHRITOL

Cette technique permet d'estimer le flux biliaire canaliculaire d'origine hépatocytaire. L'érythritol ^{14}C et le mannitol ^3H sont actuellement les molécules les plus utilisées : elles pénètrent dans les canalicules par un transport actif au travers des hépatocytes et ne sont ni excrétées ni réabsorbées.

L'érythritol est un tétrose rapidement réabsorbé par les hépatocytes grâce à la perméabilité de leurs membranes sinusoidales séparant les milieux sanguin et hépatocytaire.

L'équilibre des concentrations, dans ces deux milieux est rapidement atteint (Forker, 1982).

La clairance biliaire est égale au produit de flux biliaire (F) par le rapport des concentrations biliaires (B) et plasmatiques (P) : $C = F \times (B/P)$

Lorsque l'augmentation de la cholérèse est d'origine canaliculaire, il y a une augmentation proportionnelle du flux et de la clairance.

Par contre, si l'hypercholérèse met en jeu des mécanismes extrahépatocytaires au niveau des canaux biliaires, la clairance n'augmente pas.

Certains auteurs ont montré que l'érythritol pouvait, malgré tout, diffuser au niveau des cellules épithéliales des canaux biliaires (Barnhart et Combes, 1978; Hottinger et Preisig, 1980; Lewis et coll., 1982); René et coll., 1983). Cependant **cette sécrétion est faible et l'érythritol demeure à l'heure actuelle, la seule substance fiable pour déterminer l'origine d' une hypercholérèse.**

B.3.2.1 MATERIEL ET METHODES

Le protocole expérimental est sensiblement le même que celui du flux biliaire.

La bile est collectée à partir de $t = 0$, toutes les 10 minutes. A $t = 20$ minutes, un groupe de 3 rats, dont les pédicules rénaux ont été préalablement ligaturés, reçoit une injection unique de 4 Ci (0,2 ml) de ^{14}C érythritol (Radiochemical centre, Amersham, G.B.) dans la veine jugulaire. A $t = 70$ minutes, les animaux reçoivent l'extrait aqueux d'E.cannabinum 400 mg/kg dans la veine jugulaire. 150 l de sang, prélevés par l'artère carotide préalablement cathétérisée (n° 3), sont collectés dans des tubes héparinés et préalablement pesés, à $t = 10, 35, 40, 65, 75, 85, 95$ minutes.

Des échantillons de 0,05 ml de sang sont placés dans des flacons de verre avec 0,5 ml de solvène 350 (Packard) /isopropanol (Merck) 1:1 v/v pendant une nuit. 0,5ml d'eau oxygénée à 30% sont ajoutés et laissés 30 minutes à 40°C. Après refroidissement, 15 ml d'Instagel (Packard)/HCl 0,5N 9:1 v/v sont ajoutés et la radioactivité est mesurée dans un spectrophotomètre à scintillation liquide qui détermine les désintégrations par minute (Minibetta 1211, LKB).

Les échantillons de bile sont traités de la même manière, excepté l'addition d'eau oxygénée qui est remplacée par une exposition d'une heure à la lumière du jour et de 6 heures à l'obscurité.

Deux mesures sont effectuées, de façon à pallier les interférences biologiques et chimiques du sang et de la bile produisant un affaiblissement lumineux. Une correction du quenching est déterminée par la méthode du standard externe: on mesure la radioactivité d'un échantillon renfermant du ^{14}C étalonné à 98300 dpm et celle de ce même échantillon lorsqu'on ajoute un rayonnement connu provenant d'une source externe de ^{226}Ra .

Une gamme de 10 échantillons, renfermant les différentes substances biologiques (sang et bile) et chimiques (solvène 350, isopropanol, H_2O_2 , Instagel et HCl) est réalisée et on détermine le déplacement du spectre des impulsions (ipm) de comptage de la source externe et du ^{14}C sur les deux canaux. La courbe de quenching (affaiblissement du comptage) établie en fonction de l'efficacité de comptage (E) et du rapport de standardisation externe permet le calcul des dpm :

$$\text{dpm} = \text{ipm} / \text{E}$$

Les gammes réalisées à partir du sang et de la bile sont présentées dans les tableaux 16a, 16b, 17a, 17b et les courbes de quenching correspondantes dans les figures 31a, 31b, 32a et 32b (Fleurentin, 1983).

B.3.2.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES

La clairance à l'érythritol est calculée en divisant le taux de radioactivité excrétée dans la bile par unité de temps, par la radioactivité dans le sang.

Les résultats sont exprimés à l'aide des paramètres suivants :

les moyennes du flux biliaire en $\text{mg}/\text{mn}/100\text{g}$ exprimées par périodes de 10 minutes.

le rapport ^{14}C bile/ ^{14}C sang.

la clairance en $\text{mg}/\text{mn}/100\text{g}$ exprimée par périodes de 10 minutes.

TABLEAU 15a : GAMME DE DETERMINATION DU QUENCHING DANS LE SANG (Fleurentin, 1983)

POS. N° FLACON	SANG ml	SOLUENE ISOPROP. ml	H ₂ O ₂ ml	INSTAGEL ml	HCl ml	¹⁴ C ETALON dpm	¹⁴ C MESURE CPM l	EFF %	RATIO RAPPORT
1	-	-	-	15		98 300	85 882	87,37	1,570
2	-	-	-	13,5	1,5	98 300	81 403	82,81	1,162
3	-	0,5	-	13,5	1,5	98 300	80 798	82,20	1,120
4	-	1	-	13,5	1,5	98 300	80 507	81,90	1,092
5	-	0,5	0,5	13,5	1,5	98 300	77 277	78,61	0,932
6	0,025	0,5	0,5	13,5	1,5	98 300	78 974	80,34	1,019
7	0,05	0,3	0,5	13,5	1,5	98 300	78 284	79,64	0,965
8	0,05	0,5	0,5	13,5	1,5	98 300	79 369	80,74	1,036
9	0,1	0,5	0,5	13,5	1,5	98 300	78 778	80,14	1,001
10	0,2	0,5	0,5	13,5	1,5	98 300	78 064	79,41	0,974

TABLEAU 15b : D.P.M. DE LA GAMME APRES QUENCHING DANS LE SANG (Fleurentin, 1983)

POS	TIME	CPM1	CPM1X	DPN1	DPN1X	RATIO	RZ	CLMZ	CPMS
001	00600	85986.3	.1	98483.7	.1	1.563	.4	.00	90192.7
002	00600	81456.7	.1	98469.6	.1	1.156	.4	.00	85657.3
003	00600	80570.2	.1	98168.8	.1	1.108	.4	.00	84260.9
004	00600	80392.0	.1	98273.6	.1	1.085	.4	.00	83720.4
005	00600	77079.8	.1	98931.6!		.920	.4	.00	114306.5
006	00600	79039.1	.1	98540.8	.1	1.004	.4	.00	94962.5
007	00600	78101.3	.1	98083.0	.2	.965	.4	.00	115262.2
008	00600	79289.8	.1	98691.9	.1	1.019	.4	.00	95202.5
009	00600	78953.1	.1	98425.9	.1	1.005	.4	.00	100332.0
010	00600	78021.8	.1	98156.4	.2	.960	.4	.00	107112.2

TABLEAU 16a : GAMME DE DETERMINATION DU QUENCHING DANS LA BILE (Fleurentin, 1983)

POS N° FLACON	BILE ml	SOLU-ENE ml	ISO-PROP ml	H ₂ O ₂ ml	INSTA GEL ml	HCl ml	¹⁴ C ETALON DPM	¹⁴ C MESURE CPM 1	EFF %	RATIO RAPPORT
1	-	-	-	-	15		98 300	85 716	87,20	1,567
2	-	0,2	-	-	15	0,2	98 300	84 740	86,21	1,417
3	0,025	0,2	-	0,5	13,5	1,5	98 300	79 149	80,52	0,986
4	0,025	0,17	0,34	0,5	13,5	1,5	98 300	78 356	79,71	0,962
5	0,05	0,2	-	0,5	13,5	1,5	98 300	79 006	80,37	0,985
6	0,05	0,17	0,34	0,5	13,5	1,5	98 300	78 313	79,67	0,966
7	0,05	0,2	-	0,5	15	0,2	98 300	81 545	82,96	1,144
8	0,05	0,17	0,34	0,3	13,5	1,5	98 300	79 269	80,64	1,015
9	0,1	0,2	-	0,5	13,5	1,5	98 300	78 869	80,23	0,983
10	0,1	0,17	0,34	0,5	13,5	1,5	98 300	78 690	80,05	0,965

TABLEAU 16b : D.P.M. DE LA GAMME APRES QUENCHING DANS LA BILE (Fleurentin, 1983)

POS	TIME	CPM1	CPM1X	DPM1	DPM1X	RATIO	RZ	CLMZ	CPM5
001	00600	85609.2	.1	98313.7	.1	1.553	.4	.00	89784.5
002	00600	84703.9	.1	98276.7	.1	1.415	.4	.00	92046.2
003	00600	79079.7	.1	98287.9	.8	.986	.4	.00	131006.9
004	00600	78254.9	.1	97957.7	1.9	.965	.4	.00	129819.9
005	00600	79164.3	.1	98768.9	.2	.981	.4	.00	132326.5
006	00600	78412.2	.1	98235.9	.2	.971	.4	.00	129264.0
007	00600	81601.3	.1	98525.9	.1	1.136	.4	.00	86420.4
008	00600	79177.9	.1	98219.9	.1	1.008	.4	.00	110021.7
009	00600	78788.3	.1	97849.2	.1	.986	.4	.00	128618.0
010	00600	78420.8	.1	98170.8	.6	.964	.4	.00	121509.1

ISOTOPE 1, WINDOW 1

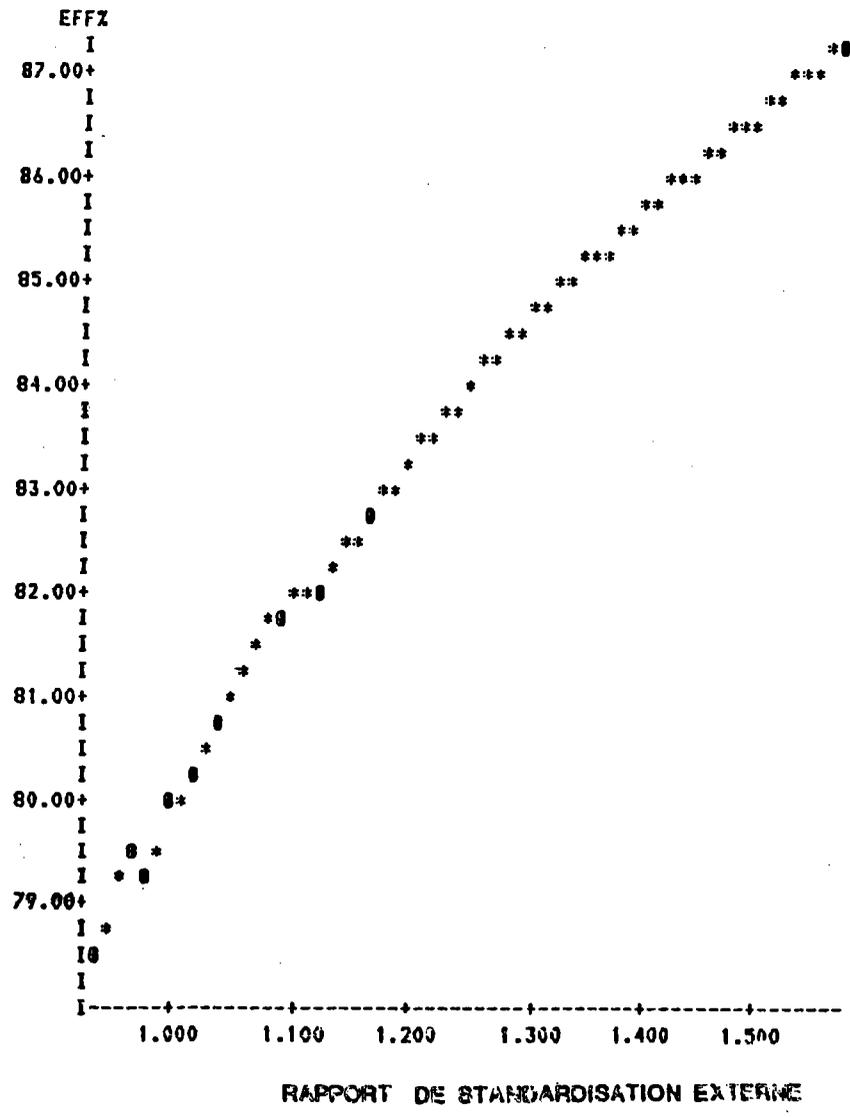


FIGURE 31 : COURBE DE QUENCHING DANS LE SANG (METHODE DU STANDARD EXTERNE : SOURCE DE ²²⁶Ra) (FEURENTIN, 1983)

ISOTOPE 1, WINDOW 1

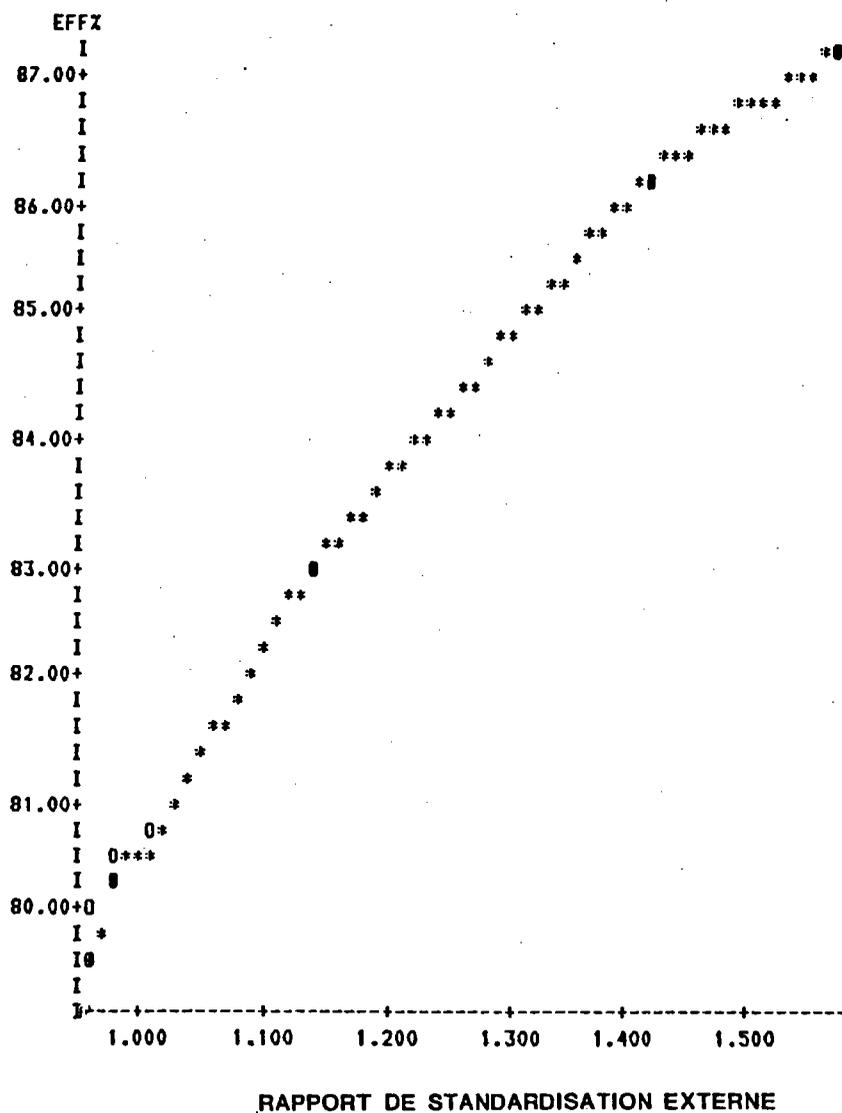


FIGURE 32 : COURBE DE QUENCHING DANS LA BILE (METHODE DU STANDARD EXTERNE : SOURCE DE ^{226}Ra) (FLEURENTIN, 1983)

Les moyennes sont comparées aux contrôles respectifs par le test "t" de Student. La régression linéaire, ajustée sur le modèle $y = ax + b$ est analysée par le test "F" de Snedecor et le test "t" de Student.

B.3.2.3 RESULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau 18 et à la figure 33.

a) L'administration d'E.cannabinum provoque une hypercholérèse significative pendant les 60 minutes qui suivent l'injection, atteignant une augmentation maximale de 14%, 10 minutes après.

Ces résultats confirment les expérimentations précédentes bien que l'hypercholérèse soit, dans ce cas, moins intense et plus rapide.

b) L'augmentation du rapport ^{14}C bile/ ^{14}C sang est importante dès les 10 premières minutes après l'injection: cela provient de la diminution du ^{14}C sanguin et de l'augmentation du ^{14}C dans la bile.

Lors des prélèvements suivants, le rapport B/S, après avoir à nouveau atteint un maximum 40 minutes après injection, diminue progressivement en fonction de la diminution du ^{14}C dans la bile car le ^{14}C dans le sang se stabilise de plus en plus.

c) La clairance augmente durant les 50 minutes après injection avec un maximum à 40 minutes.

La figure 33 représente l'ensemble des mesures effectuées sur les 3 rats. La régression linéaire calculée à partir de 26 points définis par le flux biliaire x_i et la clairance y_i donne une droite de type $y = 1,63 x - 3,70$, avec un coefficient de corrélation de $R = 0,83$. Cette droite est significative à $p < 0,001$. Cette relation linéaire indique que l'hypercholérèse induite par l'extrait aqueux est d'origine hépatocytaire.

B.3.2.4 ANALYSE DES RESULTATS

La régression linéaire significative entre flux biliaire et clairance à l'érythritol ^{14}C suggère que la cholérèse est d'origine hépatocytaire. Aburada et coll. (1980), dans leur étude des propriétés cholérétiques des iridoïdes, avaient aussi démontré l'origine hépatocytaire du flux stimulé.

TABEAU 18 : FLUX BILIAIRE, RAPPORT ¹⁴C BILE/¹⁴C SANG ET CLAIRANCE APRES ADMINISTRATION D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum

	TEMPS APRES INJECTION D'<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg/ml						
	CONTROLE (30 MN)	10	20	30	40	50	60
FLUX BILIAIRE mg/mn/100g	8,12± 0,70	9,28± 0,92	9,09± 0,89	9,09± 0,88	8,95±1,09	8,48± 1,44	8,34±0,98
¹⁴C BILE ¹⁴C SANG	1,14± 0,11	1,22± 0,05	1,17± 0,11	1,19±0,03	1,33±0,16	1,29± 0,11	1,16±0,11
CLAIRANCE μl/mn/100g	9,34± 1,56	11,3± 1,33	10,73±1,96	10,83±0,86	11,95± 2,5	11,0± 2,76	9,65±1,29

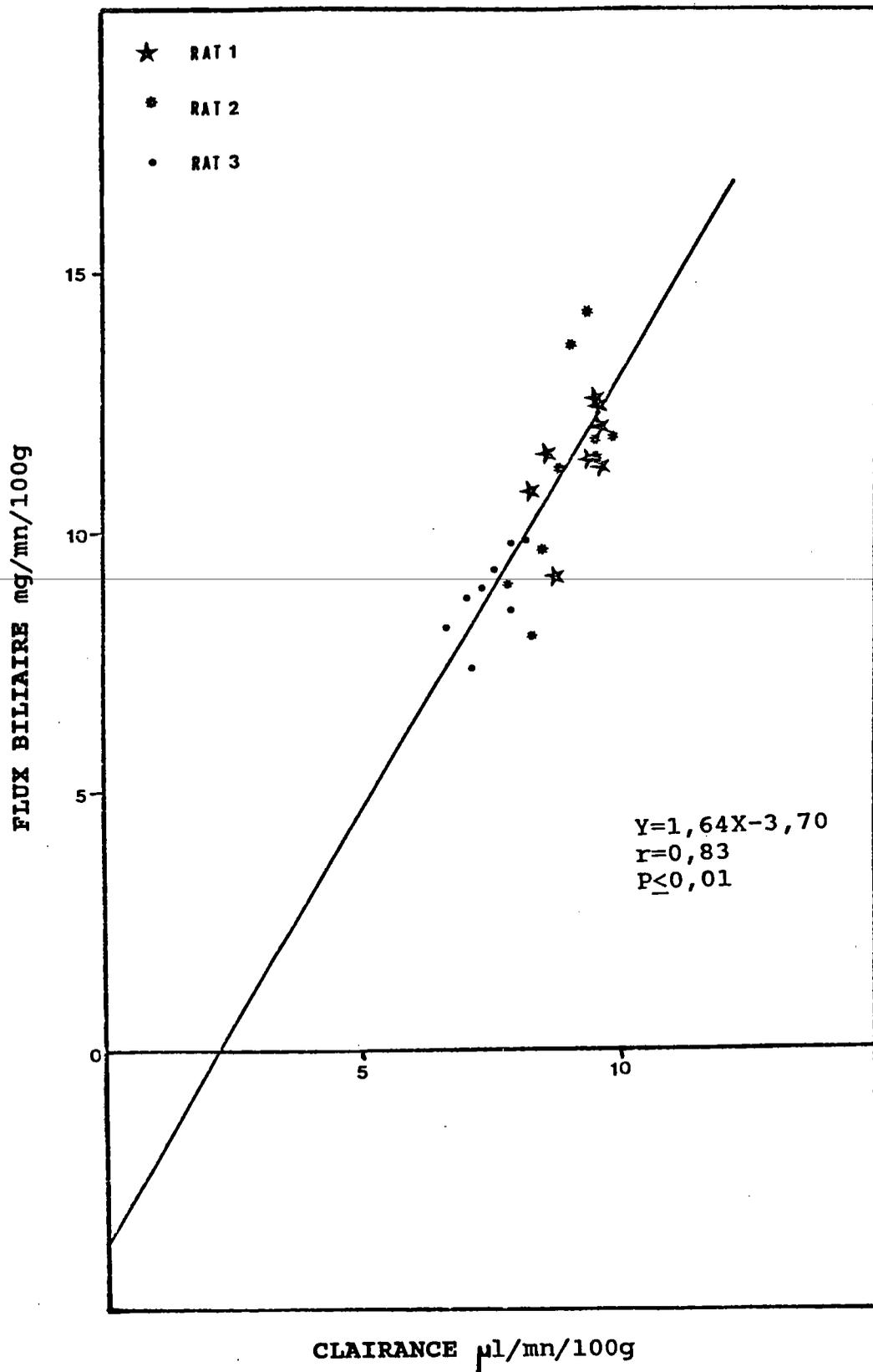


FIGURE 33: RELATION ENTRE LE FLUX BILIAIRE ET LA CLAIRANCE A L'ERYTHRITOL APRES ADMINISTRATION D'E.cannabinum 500 mg/kg CHEZ LE RAT

Tanayama et Kanai (1977), étudiant les propriétés hypercholérétiques des polyoxybenzènes d'origine naturelle, concluaient aussi à l'origine hépatocytaire du flux biliaire stimulé, acides biliaires dépendants.

Le rapport B/S est toujours supérieur à 1 : ceci peut s'expliquer par la perméabilité canaliculaire de l'érythritol (Barnhart et Combes, 1978; René et coll., 1983; Ricci et Fevery, 1981; Corbic, 1986). Cependant, tous ces auteurs s'accordent à penser que cette perméabilité est faible et ne remet pas en cause la fiabilité de cette clairance.

B.4 DISCUSSION

L'extrait aqueux d'E.cannabinum est cholérétique chez le rat, selon un relation effet/dose et effet/temps : L'effet, maximal à la dose de 250 mg/kg, n'est pas très intense mais se prolonge dans le temps contrairement au DHC, sel biliaire choisi comme cholérétique de référence.

L'extrait aqueux stimule la fraction hépatocyttaire du flux biliaire, acide biliaire indépendant.

Il a paru intéressant de comparer des résultats obtenus avec E.cannabinum et les résultats obtenus avec d'autres plantes étudiées au laboratoire.

Une étude comparative des effets cholérétiques de molécules et d'extraits végétaux rencontrés dans la littérature a ensuite été entreprise de manière à mieux situer l'extrait d'E.cannabinum parmi les autre plantes à pouvoir cholérétique et à tenter une approche des relations structure/activité.

B.4.1 ANALYSE COMPARATIVE

a) Avec les plantes étudiées au laboratoire

Cette étude comparative, représentée au tableau 19, porte exclusivement sur le pouvoir cholérétique de différents extraits végétaux étudiés au laboratoire selon le même protocole.

Tous ces extraits ont présentés une activité cholérétique **significative**. Les plantes suivantes ont été comparées avec E.cannabinum :

Rosmarinus officinalis L., Lamiaceae (Hoefler et coll., 1987)

Carlina acaulis, Asteraceae (Tabary, 1986)

Laserpitium latifolium L., Apiaceae (Davrainville et coll., 1988)

Crepis ruepellii Sch. Bip., Asteraceae (Lanhers et coll., 1983)

Anisotes trisulcus (Forssk.)Nees.,Acanthaceae (Lanhers et coll., 1983).

E.cannabinum et R.officinalis sont, de loin, les plantes possédant le plus fort pouvoir cholérétique (88,4% et 81%).

A pouvoirs cholérétiques égaux, la dose d'E.cannabinum est 8 fois moins importante que celle de R.officinalis. Le procédé d'extraction de R.officinalis est une macération alcoolique à froid alors que pour E. cannabinum, c'est une décoction suivie d'une macération aqueuse.

TABLEAU 19 : POUVOIR CHOLERETIQUE, EXPRIME EN POURCENTAGE D'AUGMENTATION CUMULES SUR 150 MINUTES, DE DIFFERENTES PLANTES ETUDIEES AU LABORATOIRE SELON LE MEME PROTOCOLE EXPERIMENTAL CHEZ LE RAT

PLANTE	MATERIEL VEGETAL	PLANTE SECHE mg/kg	SOLVANT D'EXTRACTION	%D'AUGMENTATION CUMULES (150 MN)
<u>E.cannabinum</u>	parties aériennes	250	eau	88,4***
<u>R.officinalis</u>	jeunes pousses	2000	éthanol/eau	81,0***
<u>C.acaulis</u>	racines	250	eau	36,5
<u>L.latifolium</u>	racines	50	eau	35,0
<u>C.ruepellii</u>	feuilles	1920	éthanol	53,0*
<u>A.trisulcus</u>	feuilles	3800	éthanol	58,0*

Différences statistiquement significatives par rapport au lot "placebo" (test "t") : * $p \leq 0,05$
 *** $p \leq 0,001$

Si C.ruepellii et A.trisulcus sont moins cholérétiques qu'E.cannabinum, par contre A.trisulcus stimule le FABD en augmentant, conjointement au flux biliaire, l'excrétion des acides biliaires de 20%, cela ayant pour conséquence une potentialité lithogénique. Par contre C.ruepellii stimule le FABI mais diminue le FABD sans doute par la présence de composés chimiques entrant en compétition avec les acides biliaires (Lanthers et coll., 1985).

b) avec les extraits végétaux étudiés dans la littérature

Cette étude comparative porte sur différents extraits végétaux étudiés, selon un protocole sensiblement identique à celui utilisé au laboratoire chez le rat. Les plantes suivantes ont été comparées avec E.cannabinum :

- *Caryophyllus sp., Caryophyllaceae (Yamahara et coll., 1983)
- *Zingiber sp., Zingiberaceae (Yamahara et coll., 1985d)
- *Saussureae lapa, Asteraceae (Yamahara et coll., 1985b)
- *Menta arvensis L., Labiatae (Yamahara et coll., 1985a)
- *Cynara scolymus L., Asteraceae (Lietti, 1977)

Faute de données précises sur la quantité de toutes les plantes sèches utilisées par les différents auteurs, il a paru préférable de s'exprimer en mg d'extrait végétal obtenu après évaporation du solvant d'extraction/ kg de poids corporel. Ainsi, E.cannabinum 250 mg/kg correspond à 30mg d'extrait aqueux/kg.

Les résultats, présentés dans le tableau 20, ont été exprimés en pourcentages d'augmentation cumulés sur 150 minutes après l'injection: ils ont été obtenus par mesures graphiques des courbes des lots traités et des lots "placebo", d'après les figures présentées dans les publications .

Nous n'avons retenu de la littérature que les résultats obtenus dans des conditions opératoires les plus proches des nôtres. Néanmoins les résultats de l'équipe de Yamahara ont été obtenus par injection intraduodénale des extraits, ceux de Lietti par injection intrapéritonéale; quant aux nôtres ils sont le résultat d'une injection intra-veineuse. De plus, aucun des auteurs n'a pallié l'interruption du cycle entérohépatique par addition d'acides biliaires.

Les cholérèses obtenues par l'équipe de Yamahara sont très importantes mais le matériel végétal utilisé l'est aussi: Zingiber (gingembre), à 500 mg d'extrait acétonique/kg, provoque 250% d'augmentation corrigés par rapport au lot "placebo" et cumulés sur 150 minutes. Cette dose correspond en fait à 14,75g de racines/kg . En conséquence de quoi la concentration en principes actifs injectés à l'animal est sans commune mesure avec l'utilisation traditionnelle de ces plantes.

**TABLEAU 20: POUVOIR CHOLERETIQUE DE DIFFERENTS EXTRAITS VEGETAUX RETENUS DANS LA LITTERATURE
(EXTRAPOLATION GRAPHIQUE)**

PLANTE	MATERIEL VEGETAL	PLANTE SECHE mg/kg	SOLVANT D'EXTRACTION	% D'AUGMENTATION CUMULES (150)
<u>E.cannabinum</u>	parties aériennes	30	eau	87
<u>Zingiber</u> sp.	racines	500	acétone	250
		500	eau	35
<u>Caryophyllus</u> sp.	fleurs	500	acétone	525
<u>S.radix</u>	parties aériennes	500	acétone	360
		3000	eau	15
<u>M.arvensis</u>	parties aériennes	500	acétone	472
		500	méthanol	174
<u>C.scolymus</u>	feuilles	2000	éthanol/eau	56

De plus les extraits aqueux (Zingiber, S.radix) sont inefficaces alors que tous les extraits cholérétiques sont réalisés à partir de solvants organiques (acétone, éthanol, méthanol) : E.cannabinum est la seule plante dont l'extrait aqueux soit cholérétique.

Par ailleurs, Yamahara et coll. (1983, 1985b, 1985c, 1985d) remarquent le même type de relation effet/temps sur 150 minutes que celui observé avec E.cannabinum : les extraits végétaux ont un effet identique en cinétique (effet cholérétique pendant au moins 150 minutes) mais plus important en intensité. Ces auteurs observent avec le DHC 100 mg/kg, soit 10 fois la dose choisie dans notre étude, une efficacité forte (200 %) mais brève : ce cholérétique de référence provoque un pic de cholérèse à 30 minutes et son action s'annule au bout de 90 minutes.

Lièvre et Guillot (1985) remarquent aussi cette relation effet/temps obtenue pour Chrysantellum americanum, spécialité pharmaceutique à propriété cholérétique (bénéficiant d'une A.M.M.).

Bien que les travaux de la littérature sélectionnés soient difficilement comparables (solvants d'extraction, doses injectées, voies d'injection) l'extrait aqueux d' E.cannabinum est intéressant à plusieurs titres:

* Il agit en respect de l'indication thérapeutique traditionnelle c'est-à-dire par utilisation d'une décoction-macération de la plante entière séchée en milieu aqueux.

* La dose la plus efficace , 250 mg/kg est très faible comparativement aux extraits végétaux étudiés dans la littérature. Cette dose correspond à la dose recommandée par Leclerc (dans Fournier, 1948) : un décocté de 15g de feuilles sèches /200ml d'eau, en prise quotidienne, équivaut à 250 mg/kg pour un adulte de 60 kg.

* Il exerce une activité nette et durable (plus de 150 minutes à 250 mg/kg).

B.4.2 RELATION STRUCTURE/ACTIVITE

a) comparaison bibliographique

De nombreux composés chimiques d'origine végétale sont cholérétiques: iridoïdes (Takeda et Aburada, 1981; Takeda et coll., 1980; Tanayama et Kanaï, 1977), composés phénoliques et coumariniques (Takeda et Aburada, 1981; Fontaine et coll., 1968; Yamahara et coll., 1983), terpènes monocycliques (Yamahara et coll., 1985a, 1985b et 1985d), acides-phénols (Lietti, 1971; Sharma et coll., 1973; Presiozi, 1961).

On rencontre aussi des lactones sesquiterpéniques (Yamahara et coll., 1985b) et des alcaloïdes (Danielak et coll., 1973).

Par ailleurs le mécanisme d'action de certains composés a été étudié: les composés phénoliques, coumariniques et les iridoïdes seraient excrétés dans les canaux biliaires sous forme de glucuronides, comme des anions organiques, couplés à Na^+ et Cl^- , par transport actif des hépatocytes vers les canalicules biliaires et l'eau serait alors passivement excrétée. Il y aurait compétition avec les acides biliaires et le gradient osmotique ainsi créé entraînerait une augmentation du FABI (Takeda et Aburada, 1981; Aburada et coll., 1980).

Une étude comparative du pouvoir cholérétique de différentes molécules d'origine végétale, relevé dans la littérature, est synthétisée dans les tableaux 21a, 21b et 21c.

Il apparaît dans ces tableaux que l'activité cholérétique est presque toujours liée à la présence d'un groupement méthoxy ($-\text{OCH}_3$) ou acetoxy ($-\text{COCH}_3$) sur le noyau phénol des dérivés phénoliques (acides-phénols et dérivés d'acide cinnamique), des coumarines et des alcaloïdes.

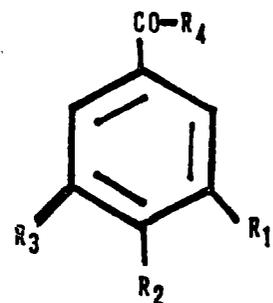
Néanmoins ceci n'est pas une règle car l'acide 1-4 dicaffeylquinique, la cynarine extraite de *Cynara scolymus*, n'a pas de radical méthoxy et exerce cependant un fort pouvoir cholérétique. Il en est de même des monoterpènes cycliques, menthol et terpinéol, ainsi que du costunolide.

E.cannabinum pourrait exercer son activité cholérétique par l'intermédiaire de ses lactones sesquiterpéniques riches en groupements acétoxy et partiellement solubles dans l'eau. Ses acides-phénols peuvent être aussi impliqués, bien que sans groupement OCH_3 et COCH_3 , mais solubles dans l'eau. Enfin, son huile essentielle possède des monoterpènes cycliques susceptibles d'être aussi actifs. Cependant leur concentration faible dans l'extrait aqueux ne permet pas de retenir cette dernière hypothèse.

b) comparaison avec les spécialités pharmaceutiques cholérétiques

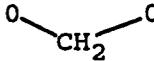
Un recensement des plantes à réputation cholérétiques (Bézanger-Beauquesne, 1986; Paris et Moyse, 1971) fait apparaître une majorité de Labieae et d'Asteraceae. Dans les spécialités pharmaceutiques à visée cholérétique, renfermant presque toujours plusieurs plantes, les plus citées sont les suivantes:

TABLEAU 21 : MOLECULES CHOLERETIQUES D'ORIGINE NATURELLE



MOLECULES	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	ACTION CHOLERETIQUE	BIBLIOGRAPHIE
DERIVES EN C ₆ -C ₁ :						
acide gallique	-OH	-OH	-OH	-OH	-	Sharma <u>et coll.</u> , 1973
acide 4 hydroxybenzoïque	-H	-OH	-H	-OH	-	"
acide procatéchique	-OH	-OH	-H	-OH	-	"
acide vératrique	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OH	+	"
vanilline	-OCH ₃	-OH	-H	-H	+	Takeda et Aburada, 1981
paénol	-OH	-OCH ₃	-H	-CH ₃	+	"

TABLEAU 21 (SUITE) : MOLECULES CHOLERETIQUES D'ORIGINE NATURELLE

MOLECULES	R1	R2	ACTION CHOLERETIQUE	BIBLIOGRAPHIE
DERIVES EN C₆-C₃ :				
acide 3-4-dimethoxy- cinnamique	-OCH ₃	-OCH ₃	+	"
acide ferulique	-OCH ₃	-OH	+	"
acide cinnamique	-H	-H	-	"
acide 4-hydro-cinnamique	-H	-OH	-	"
curcumine	-OCH	-OH	+	Wagner <u>et coll.</u> , 1980
acide 1-4-dicafeyl -quinique	-OH	-OH	+	dans Mortier, 1972
acide caféique	-OH	-OH	-	Sharma <u>et coll.</u> , 1973
isoeugénol	-OCH ₃	-OH	+	Takeda et Aburada, 1981
safrol			-	"
DERIVES DE PHENOL :				
gingerol	-OCH ₃	-OH	+	Yamahara <u>et coll.</u> , 1985d

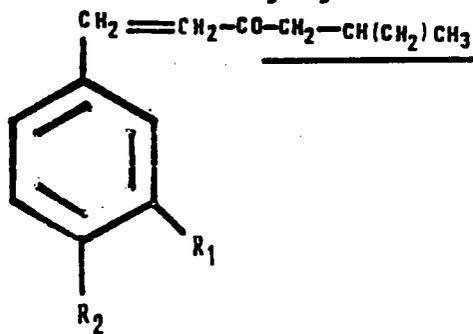
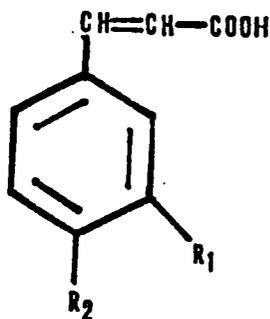
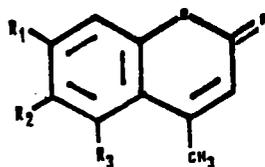


TABLEAU 21(SUITE) : MOLECULES CHOLERETIQUES D'ORIGINE NATURELLE



MOLECULES	R ₁	R ₂	R ₃	ACTION CHOLERETIQUE	BIBLIOGRAPHIE
DERIVES COUMARINIQUES :					
methylumbelliferone	-H	-H	-H	+	Takeda et Aburada, 1981
isofraxidine	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	+	Nieschulz et Shermshahl, 1968
dimethylesculétine	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-	Takeda et Aburada, 1981
ALCALOIDES (DERIVES D'ATROPINE) :					
boldine *				+	Danielak <u>et coll.</u> , 1973
glaucine **				+	-
LACTONES :					
costunolide				+	Yamahara <u>et coll.</u> , 1985b
TERPENES MONOCYCLIQUES :					
menthol				+	Yamahara <u>et coll.</u> , 1985a
α-terpinéol				+	Yamahara <u>et coll.</u> , 1985c

Pneumus boldus= Boldo (Momimiaceae)

Cynara scolymus L.= Artichaut (Asteraceae)

Mentha pipera L.= Menthe (Labiaceae)

Rosmarinus officinalis L.= Romarin (Labiaceae)

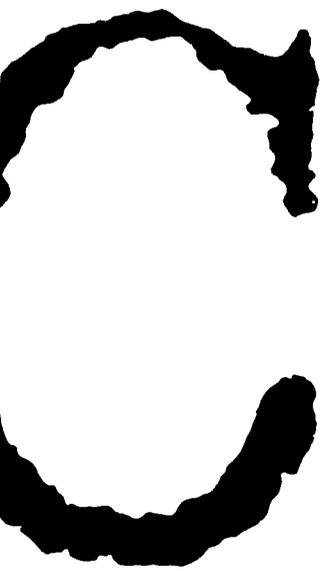
Combretum micranthum G.Don.= Kinkileba (Combretaceae)

Taraxacum officinalis L.= Pissenlit (Asteraceae)

Curcuma xanthorrhiza Roxb.= Curcuma (Zingiberaceae)

Rhamnus frangula L.= Séné (Leguminoseae)

Pour toutes ces plantes comme pour E.cannabinum, il serait vain de vouloir réduire l'activité cholérétique à une molécule même si celle-ci est particulièrement active. Suivant le mode d'extraction et le solvant utilisés, les molécules présentes seront variables en quantité et en qualité (hydrolyse...). Une molécule inactive à l'état naturel dans la plante peut très bien devenir active à la suite de réactions chimiques provoquées par la chaleur (ébullition) ou le solvant. Enfin l'activité cholérétique peut être due à différents composés chimiques et un effet de synergie n'est pas exclu.



*Propriétés antibépatotoxiques
d'E. cannabinum L.*



*Propriétés antihépatotoxiques
d'E. cannabinum L.*

C.1. INFLUENCE D'E.cannabinum L. VIS-A-VIS DE L'HEPATITE
INDUITE PAR LE CCl_4 IN VIVO CHEZ LE RAT

C.1 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. VIS-A-VIS DE L'HEPATITE INDUITE PAR LE CCl₄ CHEZ LE RAT

C.1.1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

De nombreuses substances sont capables d'induire une hépatotoxicité, reproduisant la pathologie rencontrée lors de l'hépatite chronique, le cirrhose biliaire ou l'alcoolisme.

Ces composés chimiques responsables de la toxicité expérimentale se rangent en trois catégories (Kaplowitz et coll., 1986) :

* Les électrophiles dont les métabolites produits par oxydation au niveau du cytochrome P₄₅₀, se lient aux sites nucléophiles (acétaminophène, bromobenzène)

* Les radicaux libres, à un électron célibataire, produits par réaction d'oxydoréduction au niveau du cytochrome P₄₅₀ et qui sont responsables des processus de lipoperoxydation (LPO) et de liaisons covalentes avec des acides gras insaturés [tétrachlorure de carbone (CCl₄), halothane].

* Les radicaux oxygénés : certains composés chimiques (paraquat, doxorubicine, nitrofurantoïne) ont une structure permettant l'acceptation d'un électron célibataire formant ainsi un radical libre; ce dernier réagit avec l'oxygène pour former un anion superoxyde (O₂⁻) et le composé initial est régénéré. Les métabolites de l'oxygène sont responsables de processus toxiques de lipoperoxydation.

C.1.1.1 METABOLISME DU CCl₄

Le CCl₄ est un toxique capable d'induire in vivo, de manière reproductible, des lésions hépatiques rencontrées en clinique humaine: stéatose, fibrose, cirrhose.

Largement utilisé in vitro sur hépatocytes, il a permis d'affiner l'étude des processus biochimiques de l'hépatotoxicité ainsi que d'étudier l'action de substances qui présentent une hépatoprotection.

L'hépatite induite au CCl₄ peut schématiquement se décomposer en 3 grandes étapes même si cette coupure est artificielle car les réactions s'enchaînent. Lepage et coll. (1988) utilisent aussi un découpage similaire pour différencier les trois phases de l'action du CCl₄. La nécrose n'est pas spécifique du CCl₄.

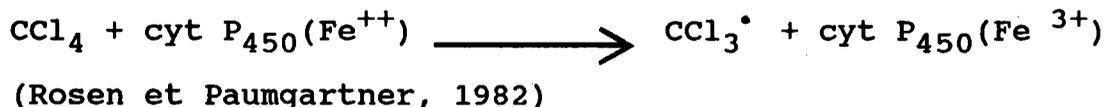
- * bioactivation du CCl₄ en radicaux libres
- * lipoperoxydation autocatalytique et liaisons covalentes

* cytolyse

a) Bioactivation du CCl_4

Le CCl_4 atteint rapidement les cellules hépatiques. Il agit précocement et réversiblement sur l'intégrité de la membrane plasmique, du fait de sa liposolubilité. Dans les minutes qui suivent l'exposition au CCl_4 1 mg/ml il y a une diminution de la consommation d'oxygène (observable même avec 0,25 mg/ml), une fuite enzymatique des transaminases et de la lactate deshydrogénase, une fuite de potassium et ce jusqu'à 10 à 30 minutes après l'intoxication, puis ces effets tendent à se stabiliser (Berger et coll., 1986). Cet effet est observé in vitro et in vivo où l'atteinte directe devient irréversible à partir de 2 mM per os (Berger, 1987). L'impact direct du CCl_4 sur la membrane plasmique n'est pas dû à une activation locale en radicaux actifs CCl_3^\bullet (Lepage et coll., 1988).

La bioactivation du CCl_4 se déroule au niveau du réticulum endoplasmique (Sipes et coll., 1977). Elle consiste en une réduction de la molécule au niveau du système enzymatique transporteur d'électrons, le cytochrome P_{450} réductase/cytochrome P_{450} , grâce à un électron provenant du NADPH. Le transfert d'électrons du cytochrome P_{450} au CCl_4 conduit à la formation d'un intermédiaire réactif, le radical trichlorométhyl CCl_3^\bullet , de demi-vie estimée à 10^{-4} secondes.



La présence de ce radical a été effectivement identifiée (Tomasi et coll., 1980).

Outre la lipoperoxydation (LPO) qu'il va engendrer, le radical CCl_3^\bullet pourra réagir différemment : interaction avec des protéines, nucléotides (Slater, 1978) ou avec le cholestérol (Anzari, 1982), deuxième réaction en carbanion CCl_3^- pouvant aboutir au $:\text{CCl}_2$ (Hines, 1954), conversion en $\text{CO}\cdot\text{Cl}^-$ hydroxylé en acide carboxylique ou déchloriné pour donner CO_2^- (Connors et coll., 1986).

Certaines substances sont capables d'inhiber la biotransformation du CCl_4 en diminuant l'activité du système enzymatique cytochrome P_{450} . La diète protéique augmente la résistance au CCl_4 en altérant la synthèse du P_{450} (Korsrud et coll., 1976).

b) Lipoperoxydation autocatalytique et liaisons covalentes (Recknagel et coll., 1982)

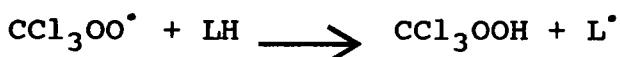
*** Lipoperoxydation :**

Si le radical CCl_3^\bullet correspond à l'activation métabolique initiale, la pathogénie du CCl_4 ne peut être réduite à ce seul métabolite. Il doit être considéré comme le point de départ de voies métaboliques aboutissant à des désordres cellulaires divers. L'importance de la participation de chacun de ces métabolites à l'hépatotoxicité du CCl_4 reste incertaine (Reynolds et coll., 1984). Normalement pris en charge par des systèmes endogènes tels que la superoxyde dimutase, le glutathion ou la vitamine E, lorsque ceux-ci sont dépassés, les radicaux libres vont interagir avec des produits variés, et notamment avec les lipides.

Le CCl_3^\bullet peut se lier à l'oxygène pour former un radical trichlorométhylpéroxy (Packer, 1978) :



Ce radical va réagir avec les acides gras polyinsaturés (AGPI) membranaires (LH) déclenchant la phase d'initiation de la LPO:



Le radical L réagit avec l'oxygène moléculaire, formant un radical d'hydroperoxyde d'AGPI:



LOO^\bullet peut arracher un hydrogène à un AGPI voisin (phase de propagation).



Les hydroxyperoxydes d'AGPI finissent par réagir entre eux, formant un produit non radicalaire.



Il existe bien sûr d'autres voies métaboliques au cours de ce processus de lipoperoxydation.

Cet aperçu rend compte de la diversité des réactions métaboliques du CCl_4 .

Les radicaux libres ainsi formés se retrouvent non seulement au niveau du foie mais aussi dans d'autres organes: reins, coeur, intestins, testicules, et à un degré moindre dans le sang et le cerveau (Ahmad et coll., 1987).

*** Liaisons covalentes :**

Les métabolites du CCl_4 se lient comme des agents alkylants ou arylants, par des liaisons covalentes aux sites nucléophiles des protéines, aux lipides membranaires, altérant l'intégrité des membranes. En se liant à l'ADN, ils deviennent carcinogènes (Lévy et Brabec, 1984).

C'est en se liant aux groupements thiols de la cystéine du glutathion que ce tripeptide endogène joue son rôle de détoxifiant, et protège de la nécrose induite par le CCl_4 (De Ferreyra et coll., 1986).

La relation entre la toxicité des xénobiotiques polyhalogénés (CCl_4 ...), la LPO et le fer, et par voie de conséquence la porphyrie, est actuellement étudiée. En effet, il a été observé, chez les animaux exposés à ces toxiques, une porphyrie imputée à la réaction d'un métabolite avec la partie sulfydryl de l'uroporphyrinogène décarboxylase (Goel et coll., 1988).

Trois à cinq heures après intoxication, lorsque les processus de la LPO se sont enclenchés, il y a une élévation d'un des produits finaux de la LPO, la malonaldehyde (MAD) et du glutathion oxydé (GSSG). L'élévation précoce de la MAD observée par certains auteurs serait obtenue dans des conditions bien particulières (animaux à jeun ou prétraités au phénobarbital) (Lepage et coll., 1988).

Les substances capables d'inactiver cette étape de lipoperoxydation sont classées en trois principales catégories:

* Les antiradicalaires, capables de piéger les radicaux

* Les antilipoperoxydants, ayant la capacité d'interrompre l'auto-oxydation initiée par les lipoperoxydes dans les lipides insaturés. De plus ils ont la capacité d'inhiber la cycloxygénase contrairement aux antiradicalaires

c) Cytolyse

Cette étape finale, non spécifique au CCl_4 , va conduire à la destruction de la membrane plasmique de la cellule hépatique.

Les radicaux libres, de demi-vie brève, vont être responsables de la destruction du réticulum endoplasmique (RE).

Les hydroxyperoxydes d'AGPI peuvent se décomposer en composés variés; leur demi-vie plus longue entraînera des phénomènes lésionnels plus tardifs et plus éloignés du RE.

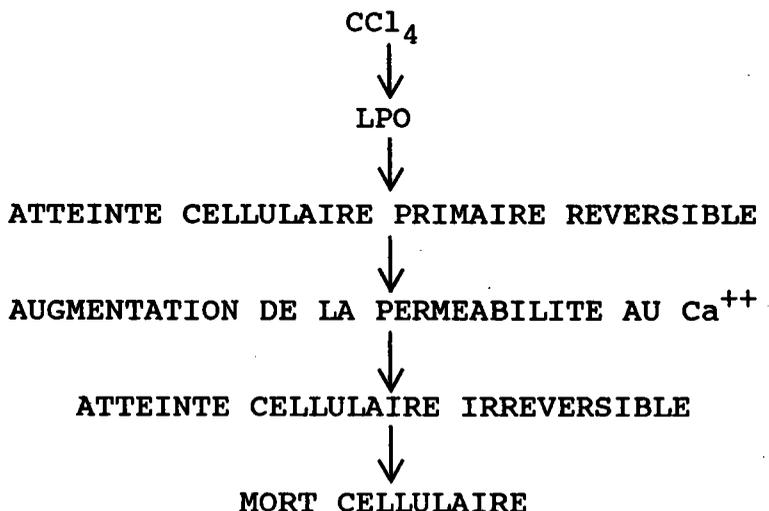
Parmi les produits finaux de la LPO, la malonalaldéhyde joue un rôle majeur en diminuant la fluidité membranaire, modifiant ainsi les interactions entre les diverses protéines. Il s'ensuit des perturbations profondes de la perméabilité membranaire et des réactions enzymatiques.

Les hydroxycalcènes, autres dérivés de la LPO, sont peut-être plus toxiques en se liant étroitement aux protéines plasmatiques. Ils inhibent la division cellulaire par action sur la tubuline et les fuseaux mitotiques (Dianzani, 1982) et inhibent aussi la synthèse protéique.

L'altération de la pompe à sodium, par flux de Ca^{++} dans le cytosol, est souvent considérée comme l'événement crucial conduisant à une atteinte irréversible (Popper, 1982; Younes et coll., 1984; Agarwal, 1984a, 1984b). Le calcium est réparti en un pool dynamique dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique, en un pool faiblement échangeable dans le noyau et en un pool de calcium insoluble non échangeable dans les mitochondries. La concentration du calcium dans l'hépatocyte est 3 à 4 fois plus faible que dans le milieu extracellulaire. Il semble que les thiols, principalement le glutathion réduit (GSH) dans les cellules hépatiques, protège l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique en protégeant les groupes thiols de l'oxydation cruciale pour l'activité Ca^{++} -ATPase (Orrenius et coll., 1983).

Le caractère irréversible de cette altération a été discuté par Mac Donald et coll. (1986) ainsi que Lamb et coll., (1984). Ces derniers défendent l'hypothèse de la dégradation des phospholipides et l'incapacité à générer de nouveaux phospholipides comme étape cruciale conduisant à la nécrose. Selon Faris et Reed (1985), la réponse chimique induisant la mort n'est pas une augmentation du Ca^{++} résultant d'un flux de Ca^{++} .

La majorité des auteurs s'accordent cependant pour attribuer un rôle crucial au Ca^{++} dans cette étape et le schéma de Younes et Siegers (1984) peut être retenu:



D'ailleurs l'importance des ions Ca^{++} a été démontrée dans le processus de régénération hépatocellulaire : la stimulation de la synthèse d'ADN est régulée par des catécolamines, via des récepteurs qui utilisent les ions Ca^{++} comme messagers et ont besoin d'une certaine concentration en Ca^{++} intracellulaire (Tsukamoto et Kojo, 1987). Ces auteurs ont ainsi démontré qu'après hépatectomie partielle, le blocage des canaux calciques par le vérapamil ou la nifédipine se traduisait par un baisse du taux d'ADN dans les cellules hépatiques en régénération; l'entrée de calcium dans l'hépatocyte serait un événement essentiel de la régénération cellulaire.

Le rôle de la calmoduline dans les derniers stades de l'intoxication au CCl_4 (nécrose) ainsi que dans les processus de régénération suscitent l'intérêt de certains auteurs (Tsukamoto et Kojo, 1987; De Ferreyra et coll., 1986, Fernandez et coll., 1986): cette protéine cytosolique est capable de former un complexe calcique susceptible d'agir avec un grand nombre d'enzymes Ca^{++} -dépendants et de les activer.

Il a été récemment proposé divers mécanismes invoqués dans l'impact du CCl_4 sur la membrane plasmique et le RE (Lepage et coll., 1988) :

- 1) L'effet direct du CCl_4 décrit au C.1.1.a. Il est insuffisant à lui seul pour déclencher la nécrose.
- 2) L'effet dû à l'activation métabolique du CCl_4 au niveau du RE entraînant des anomalies de fonctions membranaires.
- 3) Les produits de la LPO, en diffusant, inhibent certaines enzymes, diminuent la fluidité membranaire et agissent sur les microtubules et les microfilaments.
- 4) La perturbation de l'homéostasie calcique.
- 5) L'action du CCl_4 sur la phospholipase A_2 - Ca^{++} -dépendante, localisée dans le RE et la membrane plasmique, fortement liée à la fluidité membranaire (Glende et coll., 1986).

Vingt-quatre heures après l'intoxication, la fuite enzymatique et la LPO sont les plus élevées in vivo, c'est pourquoi les dosages sont faits à cette période.

Les substances capables de s'opposer à la nécrose cellulaire sont intéressantes d'un point de vue thérapeutique car elles peuvent être utilisées après intoxication chimique ou virale.

effet direct sur la membrane

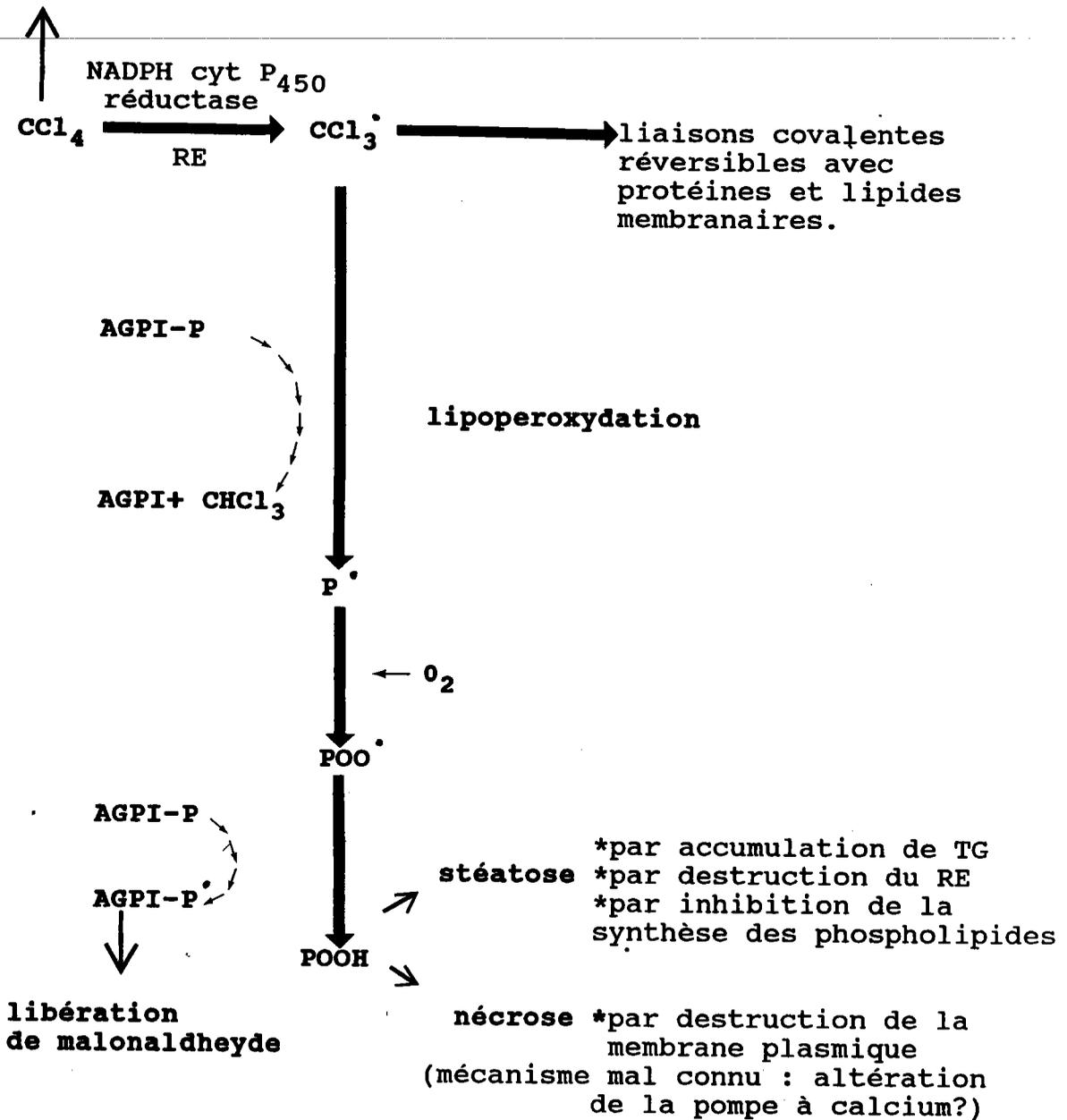


FIGURE 34 : EFFET DU CCl_4 SUR LA CELLULE

RE : réticulum endoplasmique; AGPI : acides gras poly-insaturés, P : phospholipide de la membrane, $\text{P}\cdot$: radical libre des phospholipides, $\text{POO}\cdot$: radical libre peroxyde, POOH : peroxyde.

Outre le glutathion, détoxifiant endogène, capable de s'opposer aux effets tardifs du CCl_4 , certains composés s'opposent à la nécrose cellulaire en stimulant le taux de glutathion, en stimulant la synthèse de protéines ou de phospholipides ou en diminuant leurs dégradations; certaines substances antinécrotiques, favorisant en outre la régénération hépatique, sont des inhibiteurs de la calmoduline et suscitent un intérêt tout particulier (De Ferreyra et coll., 1986; Fernandez et coll., 1986).

La figure 34 résume, de manière synthétique, les mécanismes d'action du CCl_4 sur la cellule hépatique *in vivo*.

C.1.1.2 INTOXICATION EXPERIMENTALE AU CCl_4 IN VIVO

Pour étudier l'effet antihépatotoxique de l'extrait aqueux d'E.cannabinum, nous avons choisi, dans un premier temps, le modèle d'intoxication in vivo au CCl_4 chez le rat en nous efforçant d'induire une hépatite minimale et reproductible, compatible avec notre objectif qui est de proposer un traitement phytothérapeutique. L'extrait aqueux d'E.cannabinum a été testé en traitement protecteur et curatif et a été comparé à un hépatoprotecteur de référence, la silymarine. Les dosages des transaminases, de la bilirubine, des protéines plasmatiques et des triglycérides hépatiques ont permis d'estimer le degré d'intoxication et d'hépatoprotection.

C.1.1.2.1 ADMINISTRATION DU TOXIQUE

Outre l'effet direct du CCl_4 sur la membrane plasmique, la LPO et les premières inhibitions enzymatiques apparaissent dès les 15 premières minutes (Recknagel et coll., 1983; Matsubara et coll., 1983).

Une administration unique de CCl_4 à dose suffisante entraîne dès la première heure, une accumulation de graisse dans le complexe de Golgi et le RE (Recknagel et Ghoshal, 1966; Périssoud, 1981).

Dès la sixième heure, il y a apparition de gouttelettes lipidiques et hypertrophie des hépatocytes par gonflement du RE.

A plus forte dose, le CCl_4 conduit, en 12 à 24 heures, à la nécrose, stade irréversible pouvant entraîner la mort de l'animal.

La dose de CCl_4 , chez le rat, a été choisie en fonction de l'objectif à atteindre, c'est-à-dire une hépatite réversible. Des injections intrapéritonéales de 0,01 à 5 ml/kg ont été retenues dans la littérature :

- *0,01 à 1 ml/kg (Moore, 1983)
- *0,25 ml/kg (Mac Donald, 1986)
- *0,1 ml/kg (Traiger et Bruckner, 1976; Lindstrom et Anders, 1977)
- *1,2 ml/kg (Brabec et coll., 1982; Fernandez et coll., 1986; De Ferreyra et coll., 1986)
- *5ml/kg (De Ferreyra et coll., 1977).

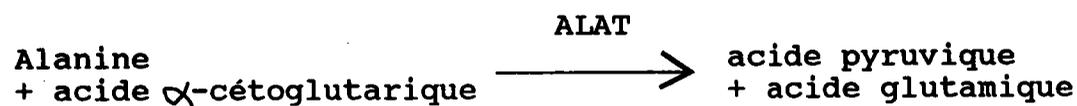
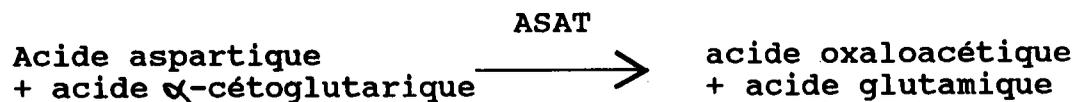
Lors de la mise au point préalable du protocole, nous avons retenu la dose de 0,3 ml/kg, la plus faible dose présentant une augmentation significative du taux de transaminases (Fleurentin, 1983).

C.1.1.2.2 ANALYSES BIOCHIMIQUES

Nous avons sélectionné les paramètres biochimiques classiques reflétant l'atteinte hépatique: le degré de cytolysse est estimé par le dosage des transaminases plasmatiques, l'activité épuratrice du foie par le dosage de la bilirubine plasmatique totale, la synthèse protéique par le dosage des protéines plasmatiques totales.

a) Dosage des transaminases plasmatiques

Les transaminases catalysent le transport d'un groupement α -aminé d'un amino-acide sur un acide α -cétonique récepteur. L' aspartate amino transférase (ASAT) à localisation intracytoplasmique et mitochondriale et l'alanine amino transférase (ALAT) intracytoplasmique catalysent les réactions suivantes :



La biotransformation du CCl_4 va être responsable de l'apparition de la nécrose cellulaire. Celle-ci se traduit par une fuite des ASAT et des ALAT hors des hépatocytes, ce qui provoque une augmentation de leurs taux plasmatiques. L'augmentation du taux absolu des ASAT, également présentes dans les cellules myocardiques, musculaires, rénales et pancréatiques, sera plus élevée que celui des ALAT; mais l'élévation du taux de ces dernières sera plus spécifique d'une atteinte hépatique.

Le taux d'ALAT dans le sang circulant augmente dès les 30 premières minutes (Fracasso et coll., 1980) et atteint un maximum 12 à 48 heures après l'intoxication (Teschke et coll., 1983). Le dosage, réalisé sur le plasma, s'effectue par une méthode de cinétique enzymatique (Wroblewski et coll., 1956).

b) Dosage de la bilirubine plasmatique

La bilirubine est captée, conjuguée puis excrétée par les hépatocytes. L'altération des fonctions épuratrices des hépatocytes se traduit par une augmentation du taux de bilirubine plasmatique.

La méthode colorimétrique de Jendrassik et coll. (1938) a été retenue pour doser la bilirubine totale.

Le taux physiologique de la bilirubine plasmatique, pour 53 rats, varie de 0,8 à 1,8 mg/ml (Fleurentin, 1983).

De façon à observer une augmentation significative de la bilirubine après intoxication, les animaux ont été mis à jeun aussitôt après l'injection du CCl_4 (Fleurentin, 1983).

c) Dosage des protéines plasmatiques

Le foie synthétise l'albumine, composant majeur des protéines plasmatiques. Dès 30 à 60 minutes après intoxication, l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines est diminué (Slater, 1978) et, dès la deuxième heure, l'excrétion des protéines est ralentie (Fracasso et coll., 1980).

Nous avons utilisé la classique méthode du biuret (Weichselbaum, 1946).

Le taux physiologique moyen des protéines plasmatiques, sur 77 rats, est de 63 ± 6 g/l.

Nous avons choisi d'effectuer le dosage 48 heures après intoxication, car la diminution du taux de protéines est plus important qu'après 24 heures (Fleurentin, 1983).

d) Dosage des triglycérides plasmatiques (TG)

Les triglycérides, réserve énergétique de l'organisme, sont synthétisés essentiellement au niveau du foie où ils sont aussi catabolisés en acides gras, au cours de la lipolyse. Une atteinte hépatique peut entraîner une perturbation du métabolisme lipidique, qui évolue en dégénérescence graisseuse avec accumulation des triglycérides dans les hépatocytes. Ce phénomène, appelé stéatose, précède dans la majorité des cas la nécrose.

L'intensité de la stéatose est détectée ar le dosage des TG hépatiques.

L'intoxication au CCl_4 atteint les mitochondries et inhibe, dès la première heure, la β -oxydation des acides gras : ces derniers stimulent la synthèse des TG hépatiques dont le taux atteint un maximum 24 à 48 heures après (Klaasen et coll., 1969; Gravela et coll., 1979). La stéatose induite par le CCl_4 est aussi due à la diminution des VLDL et à la perturbation de la synthèse protéique ainsi qu'à l'altération des coenzymes impliqués dans la régulation des réactions enzymatiques. La stéatose diminue dès 72 heures et les altérations sont réversibles.

Le jeûne est indispensable pour obtenir une stéatose suffisante (Perissoud, 1981; Siegers et coll., 1982). Après prélèvements sanguins pour les divers dosages plasmatiques, les rats sont anesthésiés à l'éther qui ne perturbe pas l'accumulation des TG hépatiques (Cagen et Klaasen, 1979, Périssoud, 1981). Le dosage des TG s'effectue, après extraction des fragments hépatiques et saponification pour libérer le glycérol, par une méthode enzymatique (Schettler et Nussel, 1975).

Les valeurs des TG hépatiques chez le rat sain, relevées dans la littérature sont les suivantes:

- * $11 \pm 3,5$ mg/g de foie frais (Perissoud, 1981).
- * $7,08 \pm 1,69$ mg/g de foie frais (Butler, 1961).
- * $9,23 \pm 0,27$ mg/g de foie frais (Beaux, 1984).

C.1.1.3 LES ANTIHEPATOTOXIQUES

C.1.1.3.1 Les molécules de synthèse

Les modèles d'intoxication expérimentale, au CCl_4 , notamment, ont permis de rechercher et d'étudier des composés capables de s'opposer à la biotransformation des toxiques. Leurs modes d'action sont divers :

* **Inhibiteurs du Cytochrome P_{450}** : cystamine, diphényl-2-2 valérate de diéthylamino-2-éthyl (SKF 525A), chloremphénicol

* **Antilipoperoxydants, antiradicalaires, composés anti-oxygène** : phénolthiazine, -tocophérol, gallate de propyle, N-N- diphényl para phénylène diamine, chloramphénicol, prométhazine

* **Antinécrotiques** : propyl thiouracile, SKF 525 A, cycloheximide, diéthylthiocarbamate, orotate d' amino-4-imidazole carboxamide- 5 (AICA), imipramine, trifluopérazine, cystamine, cystéine

* un mode de protection peut être acquis par stimulation de la synthèse ou par prévention de la baisse du glutathion hépatique comme avec la N-acetyl-cystéine (Ioannides et coll., 1983; Corcoran et Wong, 1986) ou avec la cimétidine (Pederson et coll. dans Corcoran et Wong, 1986).

C.1.1.3.2 Molécules d'origine naturelle

Parmi les principes actifs de plantes antihépatotoxiques ayant fait l'objet de travaux pharmacologiques intéressants, la silymarine et le (+)-cyanidanol-3[(+)-catéchine] bénéficient d'une littérature abondante : ces deux molécules sont devenues des spécialités pharmaceutiques utilisées dans le traitement des hépatites virales et de l'alcoolisme.

La silymarine, extrait de Silybum marianum Gaertn. est un flavolignan constitué d'un mélange de trois isomères structuraux, la silybine, la silydianine et la silychristine. Elle protège in vivo de l' α -amanitine, de la phalloïdine, de la galactosamine, du CCl_4 et du thioacétamide. C'est un stabilisateur membranaire et un inhibiteur de la lipoperoxydation, inhibant la formation d'agents peroxydants dans les mitochondries et les microsomes hépatiques. En outre, la silymarine induit la formation de glutathion hépatique (Valenzuela et coll., 1985).

Le cyanidanol est un flavonoïde, rencontré dans de nombreuses espèces végétales, capable d'inhiber la déplétion du glutathion induite par l'éthanol et la lipoperoxydation. Il s'est montré hépatoprotecteur sur des modèles animaux utilisant le paracétamol, le CCl₄ ou la galactosamine comme toxiques. C'est un antioxydant qui inhibe les effets cytolytiques des radicaux libres générés par les systèmes enzymatiques mitochondriaux et cytosoliques lors d'intoxications hépatiques (Hackett et coll., 1984, Périssoud, 1981) Il a été utilisé avec succès comme la sylimarine en clinique humaine contre les effets de l'alcoolisme (Morgan, 1986). Il est actuellement retiré du commerce.

La médecine traditionnelle orientale, bien étudiée, a fourni la majorité des autres espèces végétales mentionnées ces dernières années dans la littérature (Hikino, 1984; Handa, 1986; Wagner, 1980).

Les mécanismes d'action de ces molécules antihépatotoxiques, à structures chimiques variées, restent mal connus et souvent hypothétiques. Il ne semble pas y avoir d'unité dans la relation structure/activité. Wagner (1980) fait remarquer que la grande majorité de ces molécules sont des dérivés du phénol ou du phénylpropane.

C.1.2 INFLUENCE D'UN PRETRAITEMENT ET D'UN POSTRAITEMENT D'UN EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. VIS-A-VIS DE L'INTOXICATION EXPERIMENTALE AU CCl₄ CHEZ LE RAT

C.1.2.1 MATERIEL ET METHODES

Les rats pesant de 250 à 300 g, nourris et abreuvés ad libitum, reçoivent une injection I.P. de CCl₄ à 6% (Rectapur, Prolabo, Fr.) dans l'huile d'olive (F. H. O., Marseille, Fr.) sous un volume de 5ml/kg.

Deux hépatoprotecteurs de référence ont été choisis :

* le nébulisat de Silybum marianum Gaertn. ou chardon-marie (Expansion aromatique française, Ivry/Seine, Fr.).

* le principe actif pur des graines de S.marianum, la silymarine (Roger Bellon, Neuilly/Seine, Fr.), représentant 10% des graines séchées.

Prétraitement I.P. : E.cannabinum (250, 500, 1000, mg/kg), S.marianum (1000 mg/kg) et la silymarine (100 mg/kg) sont injectés en I.P. sous un volume de 2ml/kg dans NaCl 0,9%, trente minutes avant le CCl₄.

* **Prétraitement per os:** E.cannabinum (500, 1000 mg/kg) est administré sous un volume de 2ml/kg dans NaCl 0,9% par gavage à l'aide d'une sonde gastrique, 90 minutes avant le CCl₄.

* **Post-traitement I.P. :** E.cannabinum 1000 mg/kg est injecté sous un volume de 2 ml/kg dans NaCl 0,9%, trente minutes après le CCl₄.

Dans tous les traitements, un groupe "placebo" intoxiqué reçoit un volume équivalent de NaCl, et un groupe de contrôle non intoxiqué reçoit l'huile d'olive sous un volume de 5ml/kg.

Les animaux sont ensuite mis à la diète et, 24 heures après l'intoxication, ils sont anesthésiés légèrement avec une injection intramusculaire de 100 mg/kg de Kétamine (Kétalar, Parke-Davis, Fr.) de façon à recueillir 150 µl de sang du sinus rétro-orbital dans des tubes en plastique de 1,5 ml préalablement héparinés (Héparine Fournier) Le plasma est obtenu par centrifugation (3000xg; 5mn) et les dosage de l'activité enzymatique des ALAT, de la bilirubine, des protéines sont effectués à l'aide des kits de dosages suivants : kit GPT opt. ref 161071, kit protéines totales ref 124281, kit bilirubine ref 124919 (Boehringer, Darmsadt, RFA.).

Les lectures se font avec un spectrophotomètre automatique à double faisceau (Uvikon 810, Kontron, RFA.), à 25°C et à 340 nm pour les GPT, 578 nm pour la bilirubine et 576 nm pour les protéines.

*** Dosage des triglycérides plasmatiques :** la méthode a été mise au point dans notre laboratoire par Beaux (1985). Après prétraitement avec l'extrait aqueux d'E.cannabinum à 500 mg/kg, intoxication au CCl₄ et dosage des ALAT plasmatiques, les rats sont anesthésiés au diéthyloxyde. Deux échantillons de tissus hépatiques (50 à 100mg) sont prélevés du lobe latéral gauche: un à la périphérie, l'autre au centre du lobe. Ils sont ensuite lavés avec NaCl 0,9% à 0°C, séchés sur papier filtre, pesés et stockés à -20°C en tubes de verre.

Le dosage des TG est déterminé par extraction et saponification pour libérer la partie glycérol des TG. Les lipides extraits des échantillons avec un mélange chloroforme-méthanol (2:3 v/v) pendant 8 heures au minimum. Les échantillons sont enlevés et le solvant d'extraction est évaporé à 70°C au bain-marie. On ajoute 0,5 ml de potasse alcoolique 0,5 N aux résidus lipidiques secs qui sont incubés 30 minutes à 70°C. Un ml de sulfate de magnésium 0,15 M est ajouté dans chaque tube. Après mélange les tubes sont centrifugés (3000xg; 10 mn, 20°C). Les TG sont déterminés dans le surnageant par le kit de dosage des triglycérides ref 125032 dans l'U. V. à 365nm (Boehringer, Darmsdadt, RFA).

C.1.2.2 STATISTIQUES

Une transformation logarithmique est appliquée aux valeurs des ALAT plasmatiques (Heath, 1967). Après analyse de variance, le test "t" de Student est utilisé pour comparer les moyennes. Les ALAT sont exprimées en unités internationales (UI/l de plasma, la bilirubine et les protéines en mg/l et les TG hépatiques en mg/g de foie frais. Les pourcentages de protection sont calculés selon la formule suivante, où les valeurs moyennes des ALAT des animaux intoxiqués sont retranchées des valeurs moyennes rencontrées chez les animaux sains (20 UI/l) :

$$\{[(ALAT_{\text{traités}}^{-20}) - (ALAT_{\text{placebo}}^{-20})] / [(ALAT_{\text{placebo}}^{-20})]\} \times 100$$

C.1.2.3 RESULTATS

a) Influence d'un traitement préventif d'extrait aqueux d'E.cannabinum L.

Les résultats sont présentés dans les tableaux 22 à 24 et à la figure 36.

Une injection de CCl_4 0,3 ml/kg induit, 24 heures après injection I.P., une augmentation significative des ALAT plasmatiques par rapport au groupe de contrôle (huile d'olive).

* Le prétraitement I.P. (tab. 22) avec l'extrait aqueux d'E.cannabinum à 250, 500, 1000 mg/kg induit une diminution significative des ALAT plasmatiques (resp. 71, 82 et 73%). Un effet identique est obtenu avec le nébulisat de S.marianum à 1000 mg/kg (71%) ainsi qu'avec la silymarine à 100 mg/kg (77%).

Il n'y a pas de différence significative entre les 3 doses d'E.cannabinum et entre E.cannabinum, S.marianum 1000 mg/kg et la silymarine 100 mg/kg.

L'extrait aqueux d'E.cannabinum (250 et 1000 mg/kg) ainsi que la silymarine n'ont pas empêché l'augmentation des taux de bilirubine et de protéines plasmatiques.

L'extrait aqueux d'E.cannabinum à 500 mg/kg n'a pas empêché l'accumulation de TG hépatiques (tab. 23).

* Le prétraitement oral de l'extrait aqueux d'E.cannabinum (500 et 1000mg/kg) est inefficace sur la fuite des ALAT (tab. 24).

b) Influence d'un post-traitement de l'extrait aqueux d'E.cannabinum L. (tableau 25)

L'extrait aqueux d'E.cannabinum, administré 30 minutes après le CCl_4 à 1000 mg/kg, diminue le taux des ALAT plasmatiques. Par contre, S.marianum à 1000 mg/kg ne présente pas d'effet curatif.

C.2.4 ANALYSE DES RESULTATS

L'extrait aqueux d'E.cannabinum inhibe la fuite des transaminases lorsqu'il est administré en I.P.chez le rat 30 minutes avant le CCl_4 .

Les doses de 250, 500 et 1000 mg/kg sont efficaces sans qu'il soit possible de mettre en évidence une relation dose/ effet.

TABLEAU 22 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT IP,30 MINUTES AVANT INTOXICATION AU CCl₄, D'E.cannabinum, DE S.marianum ET DE SILYMARINE SUR LES TAUX D'ALAT, BILIRUBINE ET PROTEINES PLASMATIQUES CHEZ LE RAT

TRAITEMENT	DOSE mg/kg	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT UI/l		BILIRUBINE mg/l		PROTEINES g/l 48H
			24H		24H	48H	
Huile	-	5	20 (16-23)		1,4 (0,8-2,4)	3,3 (2,9-3,9)	68,1± 2,3
placebo	-	10	227 (186-278)		2,2 (1,3-3,8)	2,1 (1,3-3,6)	56,7± 2,3
<u>E.cannabinum</u>	250	10	81 ** (67-99)		2,4 (1,1-5,0)	2,0 (1,2-3,3)	53,1± 7,3
placebo	-	8	78 (55-109)		-	-	-
<u>E.cannabinum</u>	500	8	28* (22-35)		-	-	-
placebo	-	15	150 (126-190)		-	-	-
<u>E.cannabinum</u>	1000	15	55** (45-68)		-	-	-
placebo	-	6	290 (126-190)		-	-	-
<u>S.marianum</u>	1000	5	98* (73-133)		-	-	-
placebo	-	5	750 (245-2298)		2,2 (1,7-2,9)	3,3 (2,7-4,0)	51,6± 4,2
silymarine	100	5	73 (11-493)		2,6 (1,7-4)	2,0 (0,9-4,3)	53,5± 3,5

Différences statistiquement significatives par rapport au lot "placebo" (test "t") : * p<0,05
** p<0,01

TABEAU 23 : INFLUENCE D'UN PRETRAITEMENT D'E.cannabinum 30 MINUTES AVANT LE CCl₄ SUR LE TAUX DE TRIGLYCERIDES HEPATIQUES ET D'ALAT PLASMATIQUES

TRAITEMENT	DOSE mg/kg	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT UI/l 24H	TG mg/g DE FOIE FRAIS 24H
CONTROLE (HUILE)	0	6	20 (13-22)	9,2±1,6
PLACEBO	0	7	84 (25-280)	14,2±6,7
<u>E.cannabinum</u>	500	7	26 (13-54)*	14,4±5,2

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" (test "t") : * $p \leq 0,05$

TABLEAU 24 : INFLUENCE D'UN PRETRAITEMENT D'E.cannabinum PAR VOIE ORALE 90 MINUTES AVANT L'INTOXICATION AU CCl₄ SUR LE TAUX D'ALAT PLASMATIQUES CHEZ LA RAT

TRAITEMENT	DOSE mg/kg	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT UI/l	% DE PROTECTION
PLACEBO	0	12	74 (31-176)	
<u>E.cannabinum</u>	500	12	54 (32-96)	35%
PLACEBO	0	12	173 (111-253)	
<u>E.cannabinum</u>	1000	12	160 (94-171)	34%

TABLEAU 25 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT IP , 30 MINUTES APRES INTOXICATION AU CCl₄, D'E.cannabinum, DE S.marianum ET DE Silymarine SUR LE TAUX D'ALAT, DE BILIRUBINE ET DE PROTEINES PLASMATIQUES, CHEZ LE RAT

TRAITEMENT	DOSE mg/kg	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT UI/l	BILIRUBINE mg/l		PROTEINES g/l
			24H	24H	48H	24H
placebo	-	10	396 (280-563)	2,4 (1,8-3,2)	3,6 (1,0-4,9)	59,0±5,0
<u>E.cannabinum</u>	1000	10	171* (123-239)	2,4 (1,7-3,4)	3,2 (2,2-4,7)	59,6±5,0
placebo	-	10	348 (272-446)	-	-	-
<u>S.marianum</u>	1000	10	242 (172-340)	-	-	-
placebo	-	10	68 (57-80)	-	-	-
silymarine	100	10	64 (64-88)	-	-	-

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" (test "t") : * p<0,05

TABLEAU 32 : INFLUENCE D'UN PRETRAITEMENT D'EUPATORIOPICRINE (EUPP) 30 MINUTES AVANT INTOXICATION AU CCl₄ SUR LE TAUX D'ALAT PLASMATIQUES CHEZ LA SOURIS

TRAITEMENT	CCl₄ %	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT U.I./1 24H
CONTROLE: Ethanol 10%	0	3	26 (25-27)
PLACEBO : NaCl 0,9%	0,07	3	180 (89-357)***
PLACEBO : Ethanol 10%	0,07	3	117 (44-311)***
CONTROLE : Ethanol 10%	0	10	16 (14-19)
PLACEBO : Ethanol 10%	0,07	10	232 (194-278)***
EUPP 5mg/kg	0,07	10	206 (172-244)***

Différence statistiquement significative par rapport au contrôle : *** $p \leq 0,001$

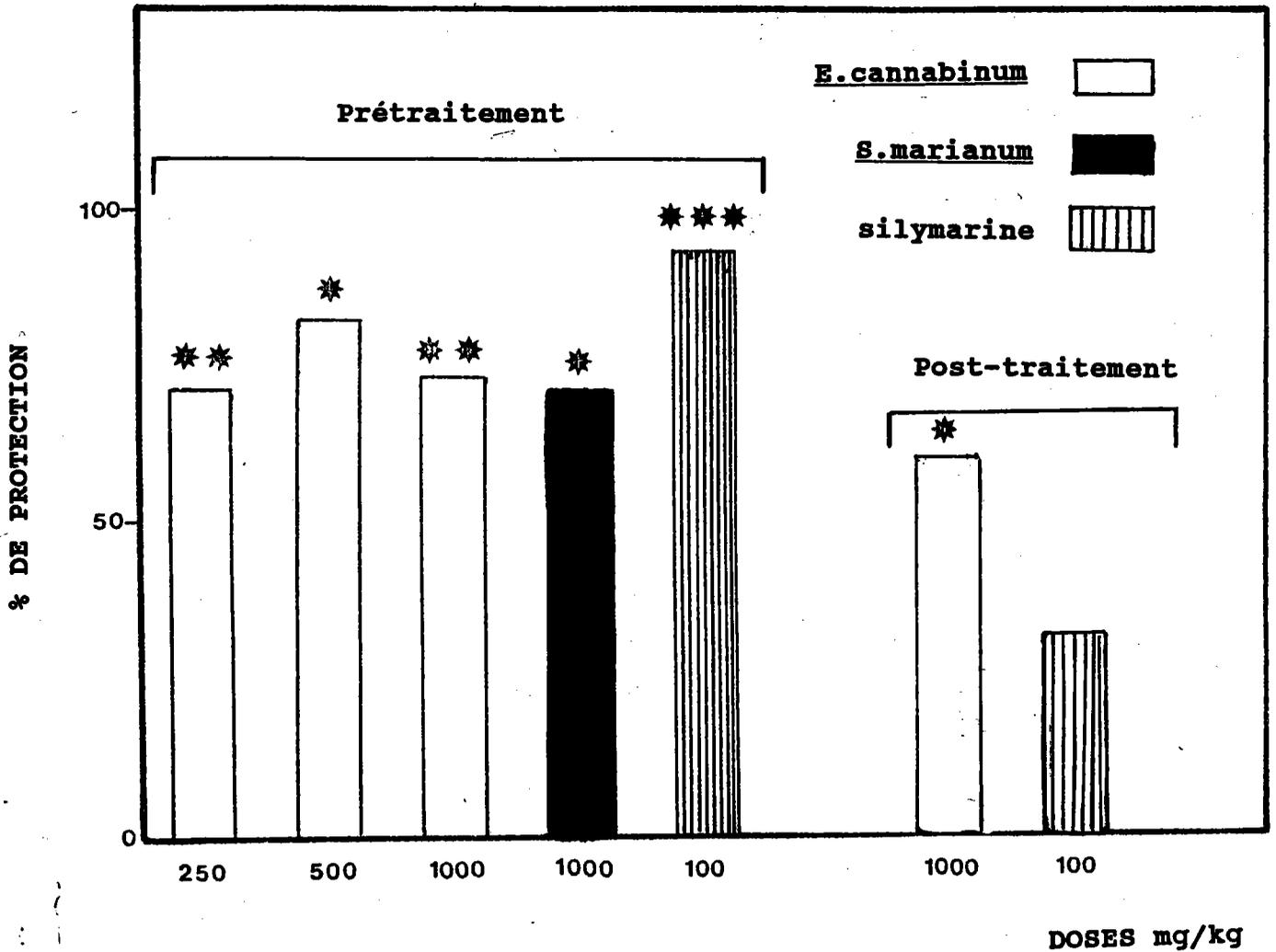


FIGURE 36 : ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE D'E.cannabinum, DE S.marianum ET DE LA SILYMARINE, ADMINISTRES 30 MINUTES AVANT ET 30 MINUTES APRES INTOXICATION AU CCl₄, SUR LE TAUX D'ALAT PLASMATIQUES CHEZ LE RAT

Différences statistiquement significatives par rapport au lot "placebo" :
* $p \leq 0,05$
** $p \leq 0,01$
*** $p \leq 0,001$

Les pourcentages de protection obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec la silymarine à la dose de 100 mg/kg ou avec le nébulisat de S.marianum à la dose équivalente à la même teneur en son principe actif, la silymarine.

Par contre, ni E.cannabinum ni la silymarine n'ont protégé l'animal de l'augmentation de la bilirubine plasmatique ni de la baisse de la synthèse protéique. De plus E.cannabinum ne s'est pas opposée à l'accumulation de triglycérides hépatiques.

Administré 30 minutes après le toxique, l'extrait aqueux à 1000 mg/kg est protecteur vis-à-vis de la fuite des ALAT mais les protections obtenues dans les mêmes conditions, avec S.marianum 1000 mg/kg et avec la silymarine à 100 mg/kg, ne sont pas significatives .

Administré par voie orale 90 minutes avant le toxique, l'extrait aqueux est inefficace. Cette inactivité est sans doute due à une mauvaise absorption du produit ou à une dégradation enzymatique digestive. Le même problème a été rencontré au laboratoire au cours de l'étude d'une plante à activité psychotrope, E.californica. L'effet était perdu par la voie orale, mais persistait par voie rectale. Une amélioration de l'effet par voie orale était obtenue avec l'utilisation d'un excipient approprié (Rolland, 1988).

Les doses efficaces sont du même ordre que celles retenues dans la posologie traditionnelle et celles étudiées pour leur actions cholérétiques :

* Leclerc dans Fournier (1948) recommande 15g de feuilles sèches pour 200ml d'eau soit 250mg/kg pour un adulte de 60 kg.

* l'étude des propriétés cholérétiques étudiées au chapitre précédent a révélé une efficacité maximale à 250 mg/kg, l'efficacité persistant à 500 et 1000 mg/kg.

La dose de silymarine a été choisie dans la littérature. Elle protège totalement la souris d'une intoxication à la phalloïdine et à l' α -amanitine lorsqu'elle est injectée en I.V., suggérant un effet sur la membrane plasmique : la phalloïdine réagit avec les microfilaments de l'actine et l' α -amanitine inhibe l'ARN polymérase B dans le noyau (Wagner, 1980). Administrée 16 heures avant le CCl₄, le silymarine stimule le glutathion hépatique (Valenzuela et coll., 1985).

Il a été démontré qu'elle stimulait la synthèse protéique et la régénération cellulaire en cas d'intoxication à la galactosamine (Wagner, 1980). Nous n'avons pas retrouvé cet effet protecteur en prétraitement I.P. Ceci est à rapprocher des travaux de Williams et Priestly (1973) qui n'observèrent aucune activité de la silymarine 100 mg/kg per os vis-à-vis d'une intoxication au CCl₄ 1 ml/kg per os.

Il est très fréquent qu'un même produit se révèle actif ou inactif selon le protocole employé (dose, toxique utilisé, temps et voie d'injection).

Cela a conduit certains auteurs à remettre en cause la validité des résultats d'autres auteurs mais il faut plutôt rechercher la cause dans le protocole expérimental. C'est d'ailleurs en confrontant résultats positifs et négatifs que l'on approche du mécanisme d'action d'un produit.

Ainsi notre voie d'injection (I.P.) et le toxique que nous avons utilisé (CCl_4) sont différents de ceux employés dans la plupart des travaux de l'équipe de Wagner (Vogel, 1977). Ceci peut expliquer la protection obtenue seulement sur la fuite enzymatique. Par contre, l'absence d'efficacité 30 minutes après est corrélée avec la littérature : la silymarine n'est active qu'en administration prophylactique jusqu'à 10 minutes après l'administration du toxique. En effet, c'est un stabilisateur membranaire appelé aussi cytoprotecteur (Valenzuela et coll., 1985) ainsi qu'un antilipoperoxydant et sa présence est indispensable au moment de l'injection du toxique.



*Propriétés antihépatotoxiques
d'E. cannabinum L.*

**C.2. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EVALUATION DE L'EFFET
ANTIHEPATOTOXIQUE D'E.cannabinum L. IN VIVO CHEZ LA SOURIS**

C.2.1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le modèle d'intoxication expérimentale au CCl_4 chez le rat, bien qu'ayant fourni des résultats intéressants, reste un test lourd à entreprendre et relativement coûteux. Il a paru judicieux de rechercher dans la littérature un autre modèle expérimental in vivo plus facile à mettre en oeuvre et moins coûteux.

Le modèle utilisant la souris a retenu notre attention bien qu'elle soit assez peu utilisée in vivo pour l'étude des phénomènes d'hépatotoxicité, à tort pourtant car cet animal présente deux avantages :

* Elle est très sensible aux toxiques hépatiques et répond à de très faibles doses. Ceci explique d'ailleurs son utilisation dans les tests de carcinogénèse car son foie est atteint de manière privilégiée et les résultats sont reproductibles (Newbrene, 1982)

* Moins coûteuse que le rat, elle permet d'effectuer un plus grand nombre de tests

Relativement peu de publications font référence à son utilisation pour la recherche de substances hépatoprotectrices vis-à-vis du CCl_4 . Elle a pourtant été utilisée avec succès pour l'étude des propriétés hépatoprotectrices de la silymarine (Vogel, 1977).

Les doses de CCl_4 utilisées en injection intrapéritonéale, pour obtenir des intoxications suffisantes, sont très variables :

- *0,01 ml/kg en I.P. (Tien Tung, 1977)
- *0,15 ml/kg en I.P. (Vogel, 1977)
- *0,5 à 1 ml/kg en I.P. (Miranda et coll., 1983)
- *1ml/kg en I.P. (Williams et Priestly, 1973)
- *0,037 ml/kg P.O. (Hikino et coll., 1979)
- *5 ml/kg en I.P. (Fraga et coll., 1987).

Selon Berger et coll. (1987), 15 μ l/kg sont suffisants pour induire une libération enzymatique.

Nous avons d'abord tenté d'adapter à la souris le modèle utilisé chez le rat par Vogel pour tester la silymarine (1977) car le test avait été développé et optimisé au laboratoire. Le test consiste à estimer le pouvoir antihépatotoxique d'une substance par la réduction du temps de sommeil induit par un barbiturique chez l'animal préalablement intoxiqué au CCl_4 . Les barbituriques exercent un effet dépresseur général sur le système nerveux central. Certains d'entre eux comme l'hexobarbital ou le pentobarbital sont métabolisés par le système hépatique NADPH-cytochrome P₄₅₀ réductase-cytochrome P₄₅₀ (figure 35).

PB = PENTOBARBITAL

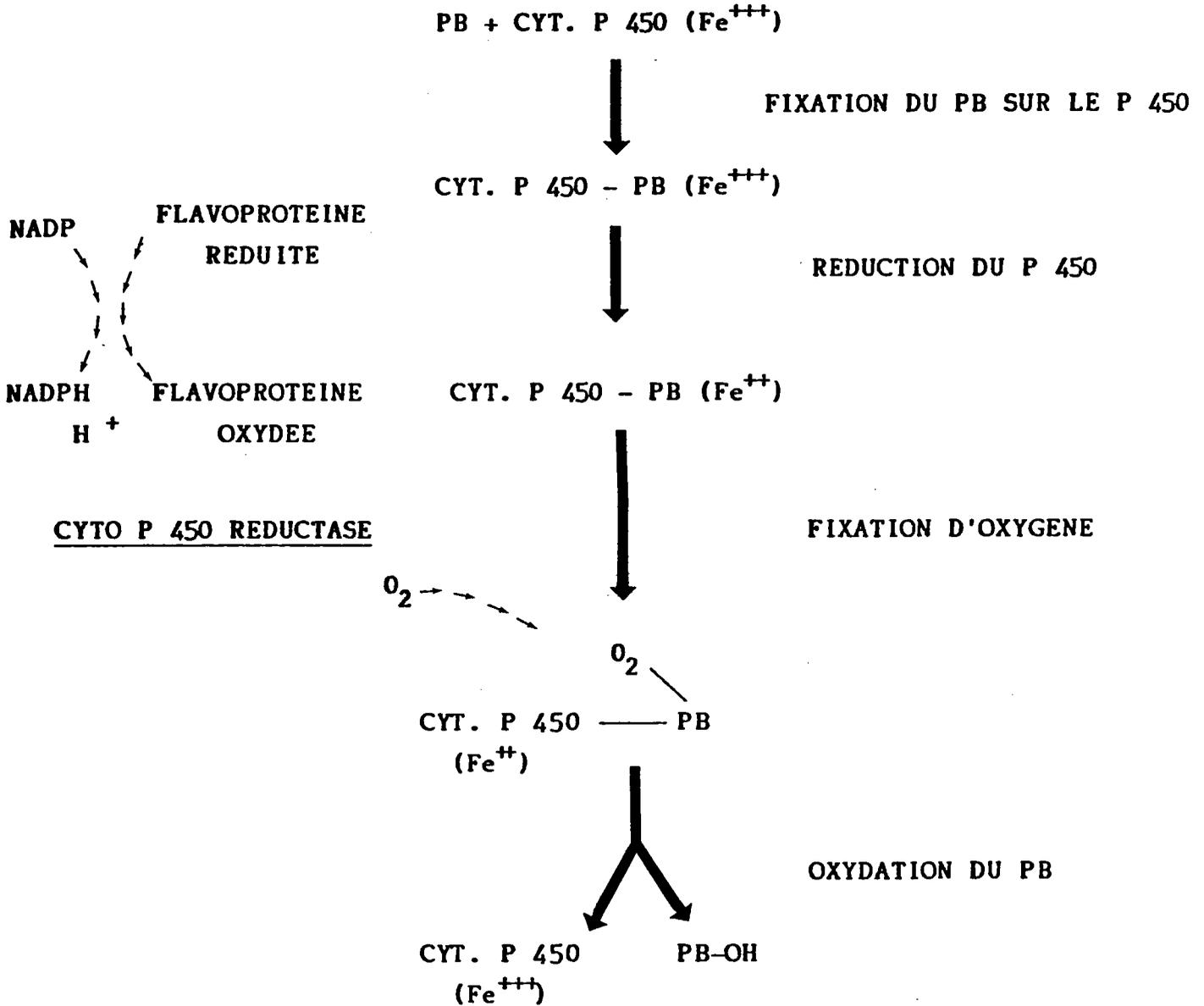


FIGURE 35 : ROLE DU CYTOCHROME P₄₅₀ DANS LE METABOLISME DU PENTOBARBITAL (PB) D'APRES WAROT et coll. (1979)

Leur lipophilicité favorise leur affinité pour les zones hydrophobes des protéines et du cytochrome P₄₅₀ (Tateoka et coll., 1987). Chez les animaux prétraités au CCl₄, du fait de la dégradation du cytochrome P₄₅₀ hépatique, le temps de sommeil induit par le pentobarbital est augmenté. Si l'animal est prétraité avec un antihépatotoxique (comme la silymarine par exemple) capable d'inhiber la biotransformation du CCl₄, le temps de sommeil sera diminué par rapport aux animaux intoxiqués.

Vogel développa ce test chez le rat en injectant la silymarine par voie I.V. et l'hexobarbital par voie orale. Mavier et coll. (1983) utilisent aussi le rat et choisissent l'hexobarbital en injection I.P.

Dans un premier temps, nous avons adapté le test optimisé et standardisé au laboratoire par Rolland (1984) en intoxicant auparavant les souris au CCl₄. En effet le pentobarbital est préféré par la plupart des auteurs (Rolland, 1988). Après avoir déterminé la dose de CCl₄ à une dose suffisante pour augmenter significativement le temps de sommeil induit par le pentobarbital, l'extrait aqueux d'E.cannabinum a été testé aux doses dont l'efficacité était significative dans l'étude des effets cholérétique et antihépatotoxique chez le rat.

Puis nous avons donc entrepris de développer le modèle d'intoxication expérimentale au CCl₄ chez la souris dans le même esprit que celui précédemment choisi chez le rat au chapitre C.1.2 de manière à pouvoir comparer aisément les résultats. Le seul dosage des transaminases plasmatiques a été retenu pour estimer l'hépatoprotection. Après avoir recherché la dose de CCl₄ nécessaire et suffisante pour induire une intoxication du même ordre de grandeur que celle obtenue chez le rat, l'extrait aqueux d'E.cannabinum a été testé en prétraitement et en post-traitement. La silymarine a été utilisée comme antihépatotoxique de référence.

C.2.2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. SUR L'INDUCTION DU TEMPS DE SOMMEIL BARBITURIQUE CHEZ LA SOURIS INTOXIQUEE AU CCl₄

C.2.2.1 MATERIEL ET METHODES

Les souris nourries et abreuvées ad libitum, reçoivent les injections par voie I.P. sous un volume de 0,1ml/10g.

*Le CCl₄ (Prolabo Rectapur, Fr.) est dissous dans l'huile d'olive (F.H.O., Marseille, Fr.)

*L'extrait aqueux d'E.cannabinum (E83) est dissous dans NaCl 0,9%

*Le pentobarbital (Nembutal[®], Abbot,) est injecté à la dose de 40 mg/kg; à cette dose, le pentobarbital induit un sommeil voisin de 30 minutes.

Le mesure du temps de sommeil est l'intervalle de temps entre le début du sommeil et le réveil. Le début du sommeil correspond au moment où les souris acceptent la position en décubitus dorsal. Le temps de réveil étant estimé au moment où l'animal quitte cette position après trois tentatives de remise en position initiale.

a) choix de la dose de CCl₄ et du délai entre l'intoxication et l'injection du pentobarbital

Des solutions de CCl₄ à 0,25 et 0,5% sont injectées à des temps différents: 24 heures, 60 et 30 minutes avant l'injection du pentobarbital. Un lot de contrôle reçoit l'huile d'olive sous le même volume.

b) recherche d'une influence de l'extrait aqueux d'E.cannabinum sur le temps de sommeil induit par le pentobarbital chez les souris intoxiquées au CCl₄

Le CCl₄ est injecté à la dose de 0,25% et l'extrait aqueux est testé aux doses de 0, 250, 500 et 1000 mg/kg 60 minutes avant le CCl₄. Le pentobarbital est injecté 60 minutes après. Un lot de contrôle reçoit l'huile d'olive sous le même volume.

C.2.2.2. EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES

Les moyennes et erreurs standards (E.S.) des temps de sommeil obtenus pour chacun des lots sont exprimés en secondes.

Les pourcentages d'augmentation du temps de sommeil par rapport au lot de contrôle non intoxiqué ont aussi été représentés. Les valeurs ont été comparées d'abord globalement par une analyse de variance puis à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon.

C.2.2.3 RESULTATS

Tous les résultats sont représentés sur le tableau 26.

a) choix de la dose et du délai d'injection

Les doses de 0,125, 0,25 et 0,5 %, injectées 24 heures, 30 ou 60 minutes avant le pentobarbital, ont été testées.

*Les souris ayant reçu le CCl_4 24 heures avant le pentobarbital ne se sont réveillées que 24 heures plus tard.

*Chez les souris ayant reçu les doses de 0,25 et 0,5% 30 minutes avant le pentobarbital, le temps de sommeil a été augmenté d'environ 30%

*Injecté 60 minutes avant, le CCl_4 à 0,25 et 0,5% augmente respectivement de 41 et 70% le temps de sommeil.

b) influence de l'extrait aqueux d'E.cannabinum

L'extrait aqueux a été injecté 60 minutes avant le CCl_4 à 0,25%.

Aucune différence statistiquement significative n'a été constatée entre les lots traités avec E.cannabinum 250, 500 et 1000 mg/kg et le lot intoxiqué.

C.2.2.4 ANALYSE DES RESULTATS

La dose de CCl_4 injectée 60 minutes avant le pentobarbital augmente de manière significative le temps de sommeil induit par le barbiturique. Injecté 24 heures avant, le CCl_4 produit des altérations hépatiques maximales et le cytochrome P_{450} est incapable de cataboliser le pentobarbital dont l'effet se prolonge.

Il faut remarquer que plusieurs tests effectués aux mêmes doses de CCl_4 (et même à 0,125%) n'ont pu être menés à bien car les animaux ne se réveillaient que plusieurs heures après l'injection du barbiturique.

Néanmoins l'extrait aqueux a été testé et aucune protection vis-à-vis du CCl_4 n'a été constatée aux doses antihépatotoxiques chez le rat.

TABEAU 26 : INFLUENCE D'UN PRETRAITEMENT D'E.cannabinum 30 MINUTES AVANT LE TOXIQUE SUR LE SOMMEIL BARBITURIQUE CHEZ LA SOURIS INTOXIQUEE AU CCl₄

PRETRAITEMENT	DELAI D'INTOXICATION AVANT L'INDUCTION DU SOMMEIL	DOSE CCl ₄	NOMBRE D'ANIMAUX	TEMPS DE SOMMEIL m±E.S. (sec)	%
CONTROLE	30 mn	0	5	1347±276	41% 70%
		0,25%	5	1788±2760	
		0,5%	5	1746±118	
CONTROLE	60 mn	0	5	1164±212	33% 30%
		0,25%	5	1956±576	
		0,5	5	1980±234	
CONTROLE	60mn	0	5	1788±295	60% 52% 40% 22%
PLACEBO		0,25%	5	2868±9145	
<u>E.cannabinum</u> 250 mg/kg		0,25%	5	2720±108 1)	
500 mg/kg		0,25%	5	2496±445 1)	
1000 mg/kg		0,25%	5	2184±446 1)	

1) Aucune différence statistiquement significative entre lots traités et "placebo"

Le nombre d'animaux par lot est trop faible (10 animaux auraient été nécessaires) mais n'ont été présentés que les tests où tous les animaux se sont réveillés en un temps correct. Certains tests, à nombre d'animaux plus important par lot, n'ont pas été représentés car une partie des animaux mettait plusieurs heures à se réveiller, rendant impossible tout calcul.

Devant cette grande irrégularité de réaction à l'intoxication au CCl_4 chez la souris, nous avons décidé de ne pas poursuivre ce test. Malgré tout, nous pouvons supposer que l'extrait aqueux d'E.cannabinum n'ayant pas apporté de protection, son action ne doit pas se situer au niveau de la biotransformation de CCl_4 car il n'a pas empêché la dégradation du système enzymatique cytochrome P_{450} , reflétée par l'augmentation du temps de sommeil au pentobarbital.

C.2.3 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum VIS-A-VIS DE L'INTOXICATION EXPERIMENTALE AU CCl₄ CHEZ LA SOURIS

C.2.3.1 MATERIEL ET METHODES

Des souris mâles Swiss (Césal, Montmédy, Fr.) de 13 à 15 semaines, pesant environ 30g, nourries et abreuvées ad libitum, sont choisies pour les expérimentations. Elles reçoivent le CCl₄ (Rectapur, Prolabo, Fr.) dissous dans l'huile d'olive vierge (F.H.O., Marseille, Fr.) sous un volume de 10 ml/kg.

La sylimarine (Roger Bellon, Neuilly/Seine, Fr.), choisie comme hépatoprotecteur de référence et l'extrait aqueux d'E.cannabinum (lot 84-4) ont été dissous dans NaCl 0,9% (10 ml/kg). Un lot "placebo" reçoit, pour chaque test, le NaCl 0,9% (10 ml/kg).

Toutes les injections ont été faites par voie intrapéritonéale.

Après intoxication, les animaux sont mis à jeun.

Les dosages enzymatiques des ALAT plasmatiques (Boehringer, Darmsstadt, RFA) sont effectués 24 heures après intoxication au CCl₄. Pour ce faire, les animaux sont préalablement anesthésiés à la Kétamine 100 mg/kg par voie intramusculaire (Kétalar, Parke-Davis, Fr.). Le sang est prélevé dans le sinus veineux rétro-orbital à l'aide de microcapillaires (Microcaps Assistant, RFA) et des volumes d'environ 0,5 ml sont recueillis dans des tubes de plastique préalablement héparinés (Héparine Fournier).

a) Choix de la dose

Quatre lots de souris reçoivent respectivement 0,02, 0,04, 0,07% et 0,08% de CCl₄ sous un volume de 10 ml/kg. Un lot "placebo" reçoit l'huile d'olive sous le même volume.

b) Influence de l'extrait aqueux d'E.cannabinum L.en prétraitement

L'extrait aqueux est administré 30 minutes avant le CCl₄ (0,07%) aux doses de 62,5, 125, 250, 500 et 1000 mg/kg.

La sylimarine est testée dans les mêmes conditions aux doses de 25, 50 et 100 mg/kg

c) Influence de l'extrait aqueux d'E.cannabinum L.en post-traitement

L'extrait aqueux à 1000 mg/kg est administré 30 minutes après le CCl₄ (0,07%).

C.2.3.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES

Après transformation logarithmique, les valeurs des ALAT sont exprimées et analysées exactement comme dans le chapitre C.1.2.2.

Les taux des ALAT sont exprimés en UI/ml de sérum.

Après vérification de l'homogénéité des variances, une analyse de variance suivie d'un test "t" de Student sont effectués pour comparer les lots témoins intoxiqués avec les lots traités.

Les pourcentages de protection sont calculés selon la formule suivante, où les valeurs moyennes d'ALAT des souris intoxiquées sont retranchées de la valeur moyenne rencontrée chez les souris saines (21 UI/L) :

$$\{[(ALAT_{\text{traités}} - 21) - (ALAT_{\text{placebo}} - 21)] / [ALAT_{\text{placebo}} - 21]\} \times 100$$

C.2.3.3 RESULTATS

a) Choix de la dose :

Les résultats sont réunis dans le tableau 27.

TABLEAU 27 : INFLUENCE DE DIVERSES CONCENTRATIONS EN CCl₄ ADMINISTREES EN I.P. SUR LE TAUX D'ALAT 24 HEURES APRES, CHEZ LA SOURIS

DOSE DE CCl ₄	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT UI/1 24H
0 (solvant)	21	21 (16-27)
0,02%	3	54 (42-69)***
0,04%	3	76 (45-128)***
0,07%	4	183 (157-213)***
0,08%	3	487 (403-586)***

Différence statistiquement significative par rapport au lot de contrôle (solvant) : *** $p \leq 0,01$.

Toutes les doses de CCl₄ élèvent significativement le taux d'ALAT plasmatiques chez la souris. Mais la dose de 0,02% est insuffisante pour provoquer une élévation conséquente du taux d'ALAT et la dose de 0,08% provoque une élévation importante.

De manière à harmoniser les résultats avec ceux obtenus chez le rat, la dose de 0,07% sera retenue pour les expérimentations suivantes car les taux d'ALAT sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus chez le rat avec une dose à 6% de CCl₄ 10 mg/kg.

b) Influence d'un prétraitement et d'un post-traitement d'E.cannabinum

Les résultats sont présentés aux tableaux 28 et 29 et à la figure 37.

Les taux des transaminases plasmatiques sont analysés, après une analyse de variance, à l'aide du test de Student.

Un prétraitement à l'extrait aqueux d'E.cannabinum 30 minutes avant le CCl₄ est significativement protecteur aux doses de 500 (70 %) et 1000 mg/kg (65 %). Les doses inférieures (62,5, 125 et 250 mg/kg) sont inefficaces (resp. 51%, 56% et 21%). La silymarine injectée à 25, 50 et 100 mg/kg diminue la fuite des ALAT et la dose de 100 mg/kg est la plus efficace (86%).

TABLEAU 28 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT IP, 30 MINUTES AVANT INTOXICATION AU CCl₄, D'E.cannabinum ET DE SILYMARINE SUR LE TAUX D'ALAT PLASMATIQUES CHEZ LA SOURIS

TRAITEMENT	DOSE mg/kg	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT UI/l 24H	% DE PROTECTION
placebo	-	14	160 (121-212)	
<u>E.cannabinum</u>	62,5	10	88 (37-180)	51%
	125	10	81 (65-268)	56%
	250	10	131 (65-268)	21%
placebo	-	14	139 (74-261)	
<u>E.cannabinum</u>	500	10	56 (33-93)***	70%
placebo	-	20	122 (59-252)	
<u>E.cannabinum</u>	1000	10	36 (19-68)***	84%
placebo	-	15	165 (123-220)	
silymarine	25	5	99 (76-130)**	46%
	50	5	106 (38-290)*	41%
	100	10	41 (20-86)***	86%

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" (test "t") : * p<0,05

TABLEAU 29 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT, 30 MINUTES APRES INTOXICATION AU CCl₄, D'E.cannabinum SUR LE TAUX D'ALAT PLASMATIQUES CHEZ LA SOURIS

TRAITEMENT	DOSE mg/kg	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT UI/1 24H	% DE PROTECTION
placebo	-	8	115 (57- 235)	
<u>E.cannabinum</u>	1000	10	85 (41-176)	33%

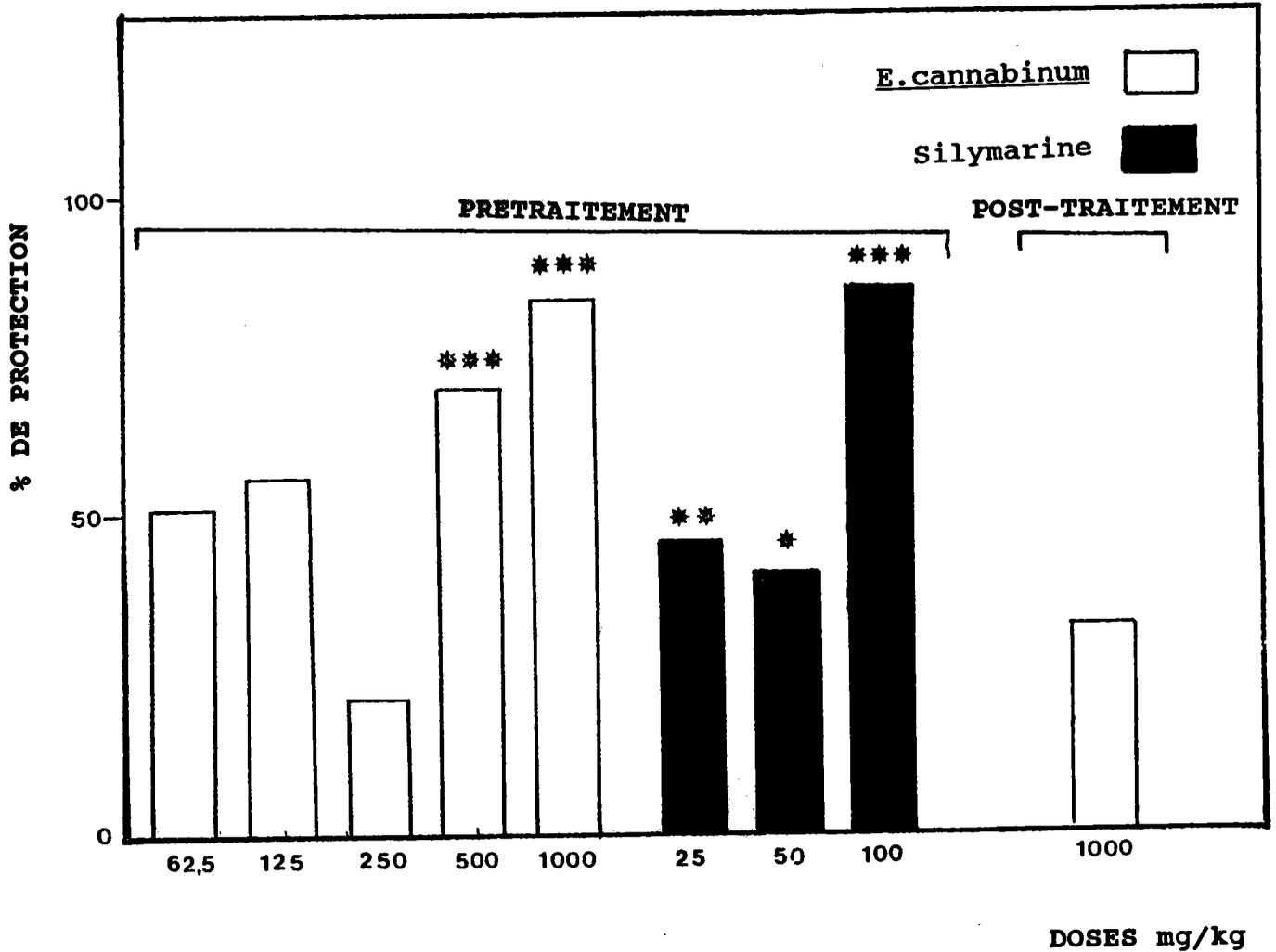


FIGURE 37 : ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE D'E.cannabinum ET DE LA SILYMARINE, ADMINISTRES 30 MINUTES AVANT ET 30 MINUTES APRES INTOXICATION AU CCl₄, SUR LE TAUX D'ALAT PLASMATIQUES CHEZ LA SOURIS

Différences statistiquement significatives par rapport au lot "placebo" :
* p < 0,05
** p < 0,01
*** P < 0,001

Le post-traitement à l'extrait aqueux d'E.cannabinum 1000 mg/kg 30 minutes après n'est pas significativement protecteur vis-à-vis de la fuite des ALAT induite par le CCl₄.

C.2.3.4 ANALYSE DES RESULTATS

L'extrait aqueux d'E.cannabinum inhibe la fuite des transaminases lorsqu'il est administré en I.P. chez la souris 30 minutes avant le CCl₄.

L'extrait aqueux est efficace à 500 et 1000 mg/kg. Ces doses sont les mêmes que celles utilisées pour induire une diminution de la fuite des ALAT chez le rat et correspondent donc avec les doses employées dans la posologie traditionnelle (chapitre C.1.3).

Les pourcentages de protection obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec la silymarine à la dose de 100 mg/kg.

Lorsque l'extrait aqueux est administré 30 minutes après le toxique, les protections obtenues avec E.cannabinum à 1000 mg/kg chez la souris sont faibles et non significatives, contrairement aux tests pratiqués chez le rat qui ont révélé une protection significative dans ces conditions.



*Propriétés antibépatotoxiques
d'E. cannabinum L.*

C.3. APPROCHE DU MODE D'ACTION D'E.cannabinum L. PAR DES
TECHNIQUES EXPERIMENTALES IN VITRO

C.3.1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

C.3.1.1 Modèle d'étude sur hépatocytes isolés de rat

Le modèle d'étude de l'hépatotoxicité *in vitro* sur hépatocytes fraîchement isolés de rat a été développé au laboratoire pour les raisons suivantes :

* l'étude pharmacologique sur animal, bien que souvent indispensable car prenant en compte l'ensemble de l'organisme face à une substance testée, reste toujours discutable d'un point de vue éthique

* parmi tous les modèles d'études de l'hépatotoxicité *in vitro* (foie perfusé, tranche de foie, culture d'hépatocytes en lignée, culture primaire d'hépatocytes, culture mixte d'hépatocytes, suspension d'hépatocytes), le modèle utilisant des suspensions d'hépatocytes isolés présente des avantages certains : pas de flux sanguins, de perturbations hormonales ou nerveuses, nombre important de cellules, coût moindre de la manipulation, exploration de nombreux paramètres biologiques.

a) Technique d'isolement des hépatocytes

La méthode de dissociation des hépatocytes fait appel à la collagénase perfusée *in situ*, méthode développée par Berry et Phillips (1969). L'enzyme lyse les liaisons inter-cellulaires en respectant l'intégrité de la membrane plasmique. La technique fut optimisée notamment par Seglen (1976) et Berry (1974, 1976). La technique a été développée au laboratoire par Arvis (1985). Ce dernier a obtenu une bonne viabilité cellulaire (>86%) et des mesures d'activités enzymatiques intracellulaires fiables, répétables, avec de faibles écarts types.

b) Choix du toxique utilisé

* le CCl₄ a d'abord été choisi car étant le plus souvent rencontré dans la littérature et permettant la comparaison avec l'étude *in vivo*. Dissous soit dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), soit dans l'éthanol (Kiso *et coll.*, 1983a) à des doses de l'ordre de 2 à 10 mM, il entraîne une fuite enzymatique sans provoquer de chute dramatique de la viabilité cellulaire (Aguiar, 1985; Périssoud, 1981).

* le ter-butyl hydroperoxyde (t-BOOH) produit une LPO importante, une fuite enzymatique, une alkylation des macromolécules, une altération des l'homéostasie calcique et des altérations morphologiques et structurales comme l'apparition de "bulles" à la surface membranaire. Il apparaît que des inhibiteurs spécifiques de la LPO n'ont pas d'effet sur le relargage enzymatique traduisant la nécrose cellulaire ni sur les altérations morphologiques. Sur de courtes périodes d'incubation, la LPO n'est pas primordiale dans la toxicité du t-BOOH mais l'élévation du taux de MAD, un des produits finaux de la LPO, est suffisante pour apprécier l'activité antilipoperoxydante d'une substance testée. In vitro sur hépatocytes isolés de rat, le t-BOOH est métabolisé par la glutathion réductase, produisant ainsi une oxydation du glutathion réduit. Puis une oxydation des nucléotides pyridiniques (via la glutathion réductase) conduit à une altération de l'homéostasie calcique des mitochondries et du réticulum endoplasmique. La concentration en Ca^{++} cytosolique augmente et la cellule forme des "bulles" à la surface de la membrane plasmique (Rush et coll., 1985; Rush et coll., 1986).

c) analyses biochimiques

Trois marqueurs enzymatiques de l'atteinte hépatique ont été choisis :

* mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), 100% cytoplasmique, par la méthode optimisée (Weissmaier et coll., 1975) mettant en jeu la réaction suivante :



* mesure des activités de l'alanine-amino-transférase (ALAT) et de l'aspartate-amino-transférase (ASAT) dont les principes sont décrits au chapitre B.2.1.2.2.

* le dosage de la malonaldéhyde (MAD) a été choisi afin d'estimer l'impact du toxique et de l'extrait aqueux sur le processus LPO. La production de MAD lors de la LPO provient de l'atteinte des phospholipides (Nielhaus et Samuelson, 1968).

L'appréciation de la LPO in vitro par cette technique de dosage de la MAD n'est que partiel (moins grande précision que par chromatographie HPLC, sensibilité moindre aux faibles concentrations, métabolisation de la MAD au niveau mitochondrial), cependant cette technique continue à être largement utilisée.

La méthode, décrite par Slater et Sawyer (1969) et développée au laboratoire par Joyeux (1986), se déroule en 2 étapes : action de l'acide trichloracétique de manière à bloquer la réaction de LPO puis action du réactif, l'acide thiobarbiturique, qui réagit avec la MAD en donnant une coloration rouge orangé.

C.3.1.2 Etude du pouvoir antiradicalaire d'une substance

Il existe un test simple et rapide pour rechercher le pouvoir antiradicalaire d'un composé : le test d'inhibition du radical diphenyl-picrylhydrazyl décrit pour la première fois par Deby et coll. (1970).

Ce test consiste à mettre en présence la substance dont on recherche le potentiel antiradicalaire avec une solution de diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), un radical libre stable à température ordinaire. Ce dernier présente une intense coloration violette d'absorption maximale à 517 nm. Le réappariement d'électrons célibataires entraîne une décoloration de la solution. La diminution de la densité optique (DO) rend compte du pouvoir de "piégeur de radicaux libres". La technique a été développée au laboratoire par Joyeux (communication personnelle) .

C.3.2 ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. SUR HEPATOCYTES ISOLES DE RAT

C.3.2.1 MATERIEL ET METHODES

a) Animaux : rats mâles de 200 à 350 g nourris et abreuvés ad libitum.

b) Matériel

Collagénase grade 11 (Boehringer, Darmsdat, RFA; Sigma, Saint-Louis, USA), milieu minimum de Eagle MEM (Flow Lab., Asnières, Fr.), solution saline de Hanks (Eurobio), héparine 5000 UI (Fournier, Fr.), diméthylsulfoxyde (Prolabo, Fr.), kit LDH opt.ref 543039 (Boehringer), kit GPT opt.ref 161071 (Boehringer), kit GOT opt.ref 158178 (Boehringer), spectrophotomètre Uvikon 810 (Kontron, RFA).

c) Extrait aqueux : le lot E83-3 a été testé aux doses de 0,25, 2,5 et 25 mg/ml de suspension d'hépatocytes, le lot E85 aux doses de 1,25, 2,50 et 5 mg/ml et le lot E85-4 aux doses de 1 et 5 mg/ml. Le lyophilisat est dissous dans le milieu minimal de Eagle utilisé pour les suspensions d'hépatocytes.

c) technique d'isolement des hépatocytes

Après anesthésie au pentobarbital sodique 60 mg/kg (Clin-Midy, Toulouse, Fr.) et injection d'héparine 1 mg/kg en I.P., l'abdomen de l'animal est incisé, la veine porte catéthérisée (Cathlon 4, Critikon) et la veine cave inférieure est sectionnée sous les veines rénales. Le foie est perfusé par une solution saline de Hanks (sans Ca⁺⁺, sans Mg⁺⁺, sans rouge de phénol; pH 7,4; 37°C), gazée par un mélange 95% O₂/ 5% CO₂ sous un débit de 30 ml/mn. La veine cave supérieure est catéthérisée après ouverture de la cage thoracique et la veine cave inférieure est clampée au-dessus des veines rénales. Après 5 à 10 minutes de cette perfusion, le foie est perfusé par une solution saline de Hanks (sans Ca⁺⁺, sans Mg⁺⁺, sans rouge phénol) contenant du CaCl₂ 5mM et de la collagénase 0,05%, avec recirculation pendant 15 à 20 minutes à un débit de 15 ml/mn. Après excision du foie et transfert dans une

boîte de Pétri, la capsule de Gilson est retiré et les hépatocytes dispersés délicatement. La suspension est filtrée sur soie de 68 μ m et centrifugée 3 fois à 50g pendant 2mn. A chaque opération, le surnageant est jeté et les culots remis en suspension dans du MEM de Eagle. La viabilité cellulaire est mesurée au moyen du test d'exclusion du bleu Trypan (Flow Lab.). La concentration de la suspension d'hépatocytes est ajustée à 1×10^6 cellules/ml de milieu (chapitre C.3.4 sur l'activité antilipoperoxydante) ou 2×10^6 (activité antihépatotoxique) après comptage à la cellule de Malassez. Les suspensions cellulaires sont maintenues en survie dans le milieu minimum de Eagle. Les hépatocytes en suspension sont répartis en fractions aliquotes de 2ml dans des erlenmeyers de 25 ml, recouverts de Parafilm, maintenus à 37°C en bain-marie sous agitation (60 oscillations/mn) et gazés individuellement par un mélange 95% O₂/5% CO₂

d) déterminations biochimiques

ASAT, ALAT et LDH relarguées dans les milieux d'incubation sont dosées à l'aide des kits de dosage.

C.3.2.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES

Moyennes et écart-types sont exprimés en milli-unités internationales (mU.I.) de LDH, ALAT et ASAT par ml de suspension d'hépatocytes.

Après avoir testé l'homogénéité de variance à l'aide du test de Cochran, les comparaisons statistiques sont effectuées par analyse de variance puis par le test "t" de Student.

C.3.2.3 RESULTATS

Les résultats sont réunis dans le tableau 22. Seul le lot 5141-3A à la dose de 25 mg/ml augmente la fuite enzymatique des ALAT, ASAT et LDH après une heure d'incubation. Aux doses inférieures (0,25 à 5 mg/ml), aucune cytotoxicité n'a été constatée.

TABLEAU 22 : TOXICITE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabiniunum L. SUR HEPATOCYTES ISOLES DE RAT ESTIMEE PAR LA FUITE ENZYMATIQUE DES ALAT, ASAT ET LDH

TRAITEMENT	DOSES mg/ml)	N	FUITE ENZYMATIQUE mU.I./10 ⁶ cell x ml (mISE)		
			ALAT	ASAT	LDH
placebo		5	19± 2	84± 12	242± 16
<u>E.cannabiniunum</u> (E84-3)	0,25	5	25± 2	102± 18	154± 48
placebo		3	43± 8	61± 18	154± 48
<u>E.cannabiniunum</u>	2,5	3	40± 3	60± 6	464± 5
placebo		5	60± 9	86± 15	268± 47
<u>E.cannabiniunum</u>	25	5	123± 11***	170± 11***	789± 54***
placebo		4	35± 2	56± 3	707± 47
<u>E.cannabiniunum</u> (E85)	1,25	4	32± 1	51± 3	645± 21
	2,5	4	30± 3	48± 4	637± 64
	5	4	31± 3	48± 4	656± 53
placebo			41± 2	81± 9	215± 47
<u>E.cannabiniunum</u> (E84-4)	1		40± 1	68± 5	199± 12
	5		34± 2	65± 5	177± 28

Différence statistiquement significative par rapport au placebo(test "t") : p≤ 0,001 ***

C.3.3 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. VIS-A-VIS D'UNE INTOXICATION AU CCl₄ D'HEPATOCYTES ISOLES DE RAT

C.3.3.1 MATERIEL ET METHODES

a) Animaux

Rats mâles pesant de 200 à 350 g nourris et abreuvés ad libitum.

b) Matériel et méthodes sont décrits au chapitre C.3.2.1 étudiant l'éventuel effet cytotoxique de l'extrait aqueux d'E. cannabinum. La technique consiste à utiliser des suspensions d'hépatocytes de rat. Les marqueurs hépatiques choisis pour estimer l'hépatoprotection de l'extrait aqueux au travers de la fuite enzymatique sont les suivants : lactate déshydrogénase (LDH), alanine-amino-transférase (ALAT) et aspartate-amino-transférase (ASAT). Les dosages enzymatiques sont effectués 60 minutes après incubation.

c) extrait aqueux

Le lyophilisat E84-3 est dissous extemporanément dans le MEM de Eagle et ajouté au milieu de suspension sous un volume de 20 μ l apportant la concentration finale voulue exprimée en mg de plante sèche/ml de suspension d'hépatocytes.

Les doses de 0, 25, 2,50 et 25 mg/ml sont ajoutées simultanément au CCl₄.

d) toxique

Le CCl₄ (Prolabo) 2mM est solubilisé dans le DMSO 5% v/v

C.3.3.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES

Les taux des ASAT, ALAT et LDH sont exprimés en mU.I./ml x 10⁶ cellules. Les taux de MAD sont exprimés en mmôles/10⁶ cellules.

Les pourcentages de protection par rapport aux lots "placebo" intoxiqués sont calculés selon la formule suivante, où les valeurs moyennes des ALAT des lots intoxiqués sont retranchées des valeurs moyennes des ALAT des lots traités :

$$\left\{ \frac{(\text{ALATtraités} - \text{ALATcontrôle}) - (\text{ALATplacebo} - \text{ALATcontrôle})}{[\text{ALATplacebo} - \text{ALATcontrôle}]} \right\} \times 100$$

Après avoir testé l'homogénéité des variances par le test de Cochran, les lots témoins intoxiqués sont comparés aux lots traités par une analyse de variance et un test "t" de Student.

C.3.3.3 RESULTATS

Les résultats sont présentés dans le tableau 30 et à la figure 38.

Lorsque l'extrait de plante est ajouté simultanément au CCl_4 2 mM, la dose de 0,25 mg/ml n'empêche pas la fuite enzymatique des ALAT, ASAT et LDH. Par contre, la dose de 2,5 mg/ml diminue significativement la fuite de ces 3 enzymes par rapport au témoin intoxiqué. A la dose de 25 mg/ml, l'extrait aqueux augmente significativement la fuite des ALAT et des LDH, en présence de CCl_4 .

TABEAU 30 : INFLUENCE D'UN AJOUT SIMULTANE D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum SUR LA FUIITE ENZYMATIQUE, DURANT 30 MINUTES (ALAT, ASAT, LDH), INDUITE PAR LE CCl₄ 2mM, SUR DES HEPATOCYTES ISOLES DE RAT

TRAITEMENT	CCl ₄ mM	NOMBRE D'ESSAIS	FUIITE ENZYMATIQUE		ET % DE PROTECTION			
			ALAT	%	ASAT	%	LDH	%
CONTROLE	0	5	49± 6		85± 25		651± 135	
PLACEBO INTOXIQUE	2	5	76± 9		310± 63		1237± 98	
<u>E.cannabinum</u> 0,25 mg/ml	2	5	97± 26	-43%	328± 1100	-8%	1565± 415	-56%
CONTROLE	0	3	68± 7		110± 17		722± 83	
PLACEBO INTOXIQUE	2	3	135± 12		455± 25		1548± 148	
<u>E.cannabinum</u> 2,5 mg/ml	2	3	99± 10**	+54%	296± 34**	+46%	112± 102**	+52%
CONTROLE	0	3	91± 8		133± 6		677± 62	
PLACEBO INTOXIQUE	2	3	161± 22		401± 2		1377± 208	
<u>E.cannabinum</u> 25 mg/ml	2	3	210± 14**	-70%	465± 39	-24%	1738± 149**	-52%

Différence statistiquement significative par rapport au témoin intoxiqué (test "t") : ** p ≤ 0,01

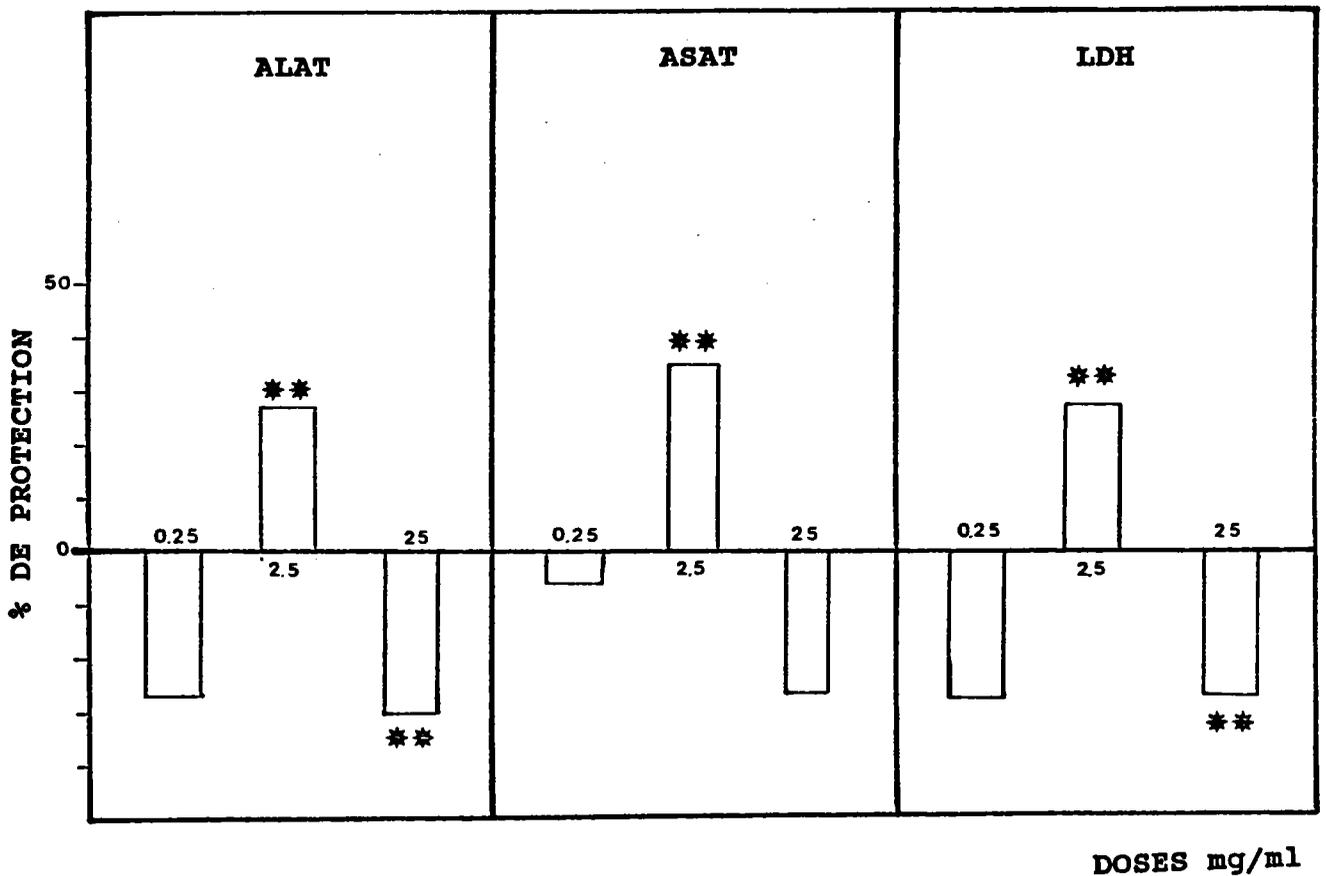


FIGURE 38 : ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE D'UN AJOUT D'E.cannabinum SIMULTANEMENT A UNE INTOXICATION AU CCl₄ SUR LA FUIITE D'ALAT, D'ASAT ET DE LDH PENDANT 30 MINUTES DANS LE MODELE HEPATOCYTES ISOLES DE RAT

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" : ** p<0,01

C.3.4 RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTILIPOPEROXYDANTE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. IN VITRO VIS-A-VIS D'UNE INTOXICATION EXPERIMENTALE AU TERBUTYLHYDROPEROXYDE (t-BOOH)

C.3.4.1 PROTOCOLE

La technique d'isolement des hépatocytes utilisée et la préparation de l'extrait aqueux (E84-4) sont décrits au chapitre C.3.2.2.

L'extrait aqueux d'E.cannabinum (E84-4) est ajouté simultanément au t-BOOH aux doses de 0,125, 0,250, 0,500 et 1mg/ml.

Le t-BOOH (Sigma) 0,2mM est solubilisé dans le DMSO 0.5%v/v.

Les déterminations biochimiques du taux d'ASAT et de LDH relargués dans le milieu sont dosées comme aux chapitres C.3.2 et C.3.3.

Pour le dosage de la MAD 2 ml d'acide trichloracétique (Prolabo) à 10% sont ajoutés à 1 ml de suspensions d'hépatocytes et laissés 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation (500xg; 5 min), 2 ml d'acide thiobarbiturique à 1% sont ajoutés à 2 ml de surnageant et laissés au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans la glace, la lecture se fait au spectrophotomètre à 535 nm.

C.3.4.2 RESULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau 31. L'extrait aqueux aux doses de 0, 125, 0,250, 0,500 et 1 mg/ml, ajouté simultanément au t-BOOH 0,2 mM diminue légèrement mais non significativement le taux de MAD et la fuite des LDH et des ASAT.

TABLEAU 31 : INFULENCE D'UN AJOUT SIMULTANE AU t-BOOH D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum SUR L'AUGMENTATION DU TAUX DE MAD ET SUR LA FUITE ENZYMATIQUE (LDH ET ASAT) SUR DES HEPATOCYTES ISOLES DE RAT

TRAITEMENT	NOMBRE D'ESSAIS	MAD	FUITE ENZYMATIQUE mUI/ (10 ⁶ cellulesxml)	
		nmôles/10 ⁶ cellules	LDH	ASAT
DMSO 0,5%	3	0,16± 0,06	183± 13	64± 21
Ter-BOOH 0,2 mM	3	2,77± 0,24	762± 90	152± 32
+ <u>E.cannabinum</u> 0,125 mg/ml	3	2,56± 0,31	754± 30	151± 6
0,250 mg/ml	3	2,33± 0,22	736± 112	155± 15
0,5 mg/ml	3	2,23± 0,22	738± 119	142± 22
1 mg/ml	3	2,61± 0,18	813± 165	148± 2

C.3.5 RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTIRADICALAIRE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L.

C.3.5.1 PROTOCOLE

Dosage des antioxydants totaux par le diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) :

*Le DPPH (Sigma, S^c Louis, U.S.A.) est dissous dans le méthanol de telle manière que la lecture de cette solution au spectrophotomètre à 517 nm ait une densité optique de 0,5 ce qui correspond environ à une solution à 2mg/100 ml.

*L'extrait aqueux (lot E84-4) est testé à 0,125 et 0,250 mg/ml d'eau distillée. Un extrait aqueux de plante antihépatotoxique étudiée au laboratoire, Rosmarinus officinalis, aux mêmes doses, est présenté comme témoin positif car présentant une activité antiradicalaire. Un extrait de Poa species (Graminées) est choisi comme témoin négatif car cette espèce n'a présenté aucune propriété pharmacologique et toxicologique particulière au cours des différentes expérimentations réalisées dans notre laboratoire. Enfin, un dosage de contrôle est effectué sur de l'eau distillée (blanc témoin).

*Un ml et demi de cette solution d'extrait végétal est ajoutée à 3 ml de solution de DPPH et l'ensemble est laissé 5 minutes en contact. Quatre ml de toluène (Prolabo, Fr.) sont ajoutés. Après une forte agitation, la solution est centrifugée à 500xg pendant 3 minutes et la densité optique du surnageant est mesurée à 517nm. La lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon 810 (Kontron, RFA).

Les résultats sont exprimés en % d'extinction de la D0 par rapport au blanc témoin.

C.3.5.2 RESULTATS

Doses	0, 250 mg/ml	0,125 mg/ml
<u>E.cannabinum</u>	16%	9%
<u>Poa sp.</u>	5%	2%
<u>Rosmarinus.officinalis</u>	84%	65%

Aucune activité antiradicalaire de l'extrait aqueux à 0,125 et 0,250 mg/ml n'a été mise en évidence par le test du DPPH. L'extrait de Poa sp. reste sans effet et la plante testée, R.officinalis, présente une forte activité.

C.3.6 RECHERCHE D'UNE INFLUENCE DE L'EUPATORIOPICRINE (EUPP) VIS-VIS DE L'INTOXICATION AU CCl₄ CHEZ LA SOURIS

Il nous a paru intéressant de rechercher une éventuelle activité antihépatotoxique de l'EUPP pour plusieurs raisons :

*cette molécule est en concentration non négligeable dans la plante (1% des parties aériennes sèches)

*elle a déjà été retenue comme faisant partie des molécules pouvant éventuellement participer à l'effet cholérétique de l'extrait aqueux

*elle possède un pouvoir pharmacologique important puisqu'elle est cytostatique et antitumorale.

La dose antitumorale utilisée chez la souris in vivo est de 20 mg/kg (Woerdenbag et coll., 1987a, 1987b et 1988). Une étude du solvant a été réalisée et l'éthanol à 10% dans NaCl 0,9% est actuellement préféré à tout autre (Woerdenbag, comm.pers.).

Le choix du modèle d'intoxication expérimentale chez la souris pour tester l'EUPP se justifie par la faible variabilité de l'intoxication reflétée par les taux d'ALAT plasmatiques, contrairement à celle constatée chez le rat. D'autre part ce test nous est apparu facile à mettre en oeuvre et peu coûteux.

La dose d'EUPP choisie pour rechercher un effet antihépatotoxique a été déterminée à partir de la littérature et de la caractérisation de l'extrait aqueux d'E.cannabinum en CCM : environ 1% de la plante sèche. La dose antihépatotoxique (et cholérétique) de 500 mg/kg de poids corporel contient ainsi 5 mg d'EUPP/kg.

C.3.6.1 PROTOCOLE

Le protocole est exactement celui décrit au chapitre C.2.3 1.

*Dans un premier temps, l'inocuité du solvant a été testée sur des lots de 3 souris recevant de l'éthanol à 10% dans le NaCl 0,9%, 30 minutes avant le CCl₄ à 0,07% (0,1ml/10g dans l'huile d'olive).

*Après avoir dissous l'EUPP dans l'éthanol à 97°, la solution saline physiologique est ajoutée de manière à injecter aux animaux, en I.P. sous 0,1ml/10g, la dose de 5 mg/kg 30 minutes avant le CCl₄.

TABLEAU 32 : INFLUENCE D'UN PRETRAITEMENT D'EUPATORIOPICRINE (EUPP) 30 MINUTES AVANT INTOXICATION AU CCl₄ SUR LE TAUX D'ALAT PLASMATIQUES CHEZ LA SOURIS

TRAITEMENT	CCl₄ %	NOMBRE D'ANIMAUX	ALAT U.I./1 24H
CONTROLE: Ethanol 10%	0	3	26 (25-27)
PLACEBO : NaCl 0,9%	0,07	3	180 (89-357)***
PLACEBO : Ethanol 10%	0,07	3	117 (44-311)***
CONTROLE : Ethanol 10%	0	10	16 (14-19)
PLACEBO : Ethanol 10%	0,07	10	232 (194-278)***
EUPP 5mg/kg	0,07	10	206 (172-244)***

Différence statistiquement significative par rapport au contrôle : *** $p \leq 0,001$

Un lot de contrôle recevait l'éthanol à 10% sous le même volume 30 minutes avant l'huile d'olive
Un lot "placebo" recevait le solvant 30 minutes avant le CCl_4 0,07%.
Cette expérience a été menée sur des lots de 10 souris.

C.3.6.2 RESULTATS

Les résultats sont exprimés et analysés statistiquement comme au chapitre C.2.3.2 lors de la mise au point de ce test.

Les résultats sont présentés au tableau 32.

Aucune toxicité éventuelle ni aucune potentialisation de l'hépatotoxicité du CCl_4 n'ont été constatées avec l'éthanol à 10%.

Aucune protection n'a été obtenue avec l'EUPP 5mg/kg lorsque celle-ci était injectée 30 minutes avant le CCl_4 .

C.4 ANALYSE DES RESULTATS

Sur hépatocytes isolés de rat, seule la dose de 25 mg/ml de suspension cellulaire s'est révélée cytotoxique en provoquant une fuite enzymatique d'ALAT, ASAT et LDH. Cette dose correspond à une solution saturée en lyophilisat et la force ionique exercée par cette solution est sans doute à l'origine d'un effet de plasmolyse des cellules baignant dans un milieu fortement hypertonique.

Les résultats obtenus sur hépatocytes isolés de rat vis-à-vis du CCl₄ sont venus confirmer les résultats in vivo: à doses non cytotoxiques, l'extrait aqueux ajouté simultanément et 30 minutes avant le CCl₄ diminue la fuite des 3 marqueurs enzymatiques ALAT, ASAT et LDH.

Les doses qui se sont révélées efficaces sont 1,25 et 5 mg/ml.

Les recherches d'une activité protectrice vis-à-vis du t-BOOH, par mesure de la MAD (reflet de la LPO) et d'une activité antiradicalaire par le test du DPPH se sont révélées négatives aux doses de 0,25 à 1 mg/ml. Cependant les doses choisies dans les 2 derniers essais étaient peut-être insuffisantes puisque la dose de 0,25 mg/ml était inefficace sur la fuite enzymatique induite par le CCl₄. Cependant le choix de ces doses a été déterminé à partir de résultats obtenus sur un extrait végétal efficace à ces doses.

Cela vient conforter les résultats obtenus sur l'ensemble des autres tests, à savoir un effet cytoprotecteur aux stades terminaux de l'intoxication conduisant à la nécrose, et une absence d'activité sur la LPO.

L'EUPP, à la dose contenue dans l'extrait aqueux n'a présenté aucune activité antihépatoprotectrice vis-à-vis de l'intoxication au CCl₄ chez la souris.

Nous n'avons pas jugé utile d'augmenter la concentration au risque d'approcher des doses cytostatiques, ni de la diminuer car dans ce cas la dose serait inférieure à celle contenue dans l'extrait aqueux qui présente des propriétés antihépatotoxiques. Cette expérience aura permis d'éliminer la possibilité d'une action antihépatotoxique des lactones sesquiterpéniques d'E.cannabinum et de s'assurer de l'absence de toxicité hépatique de cette molécule en quantité non négligeable dans la plante. En effet, si l'EUPP n'a pas diminué le taux d'ALAT plasmatiques chez la souris intoxiquée, elle ne l'a pas augmenté.

Wordenbag et coll. (1988) ayant constaté une baisse du glutathion hépatique à la dose de 20 mg/kg, l'éventualité d'un effet potentialisateur du CCl₄ pouvait même être envisagée. Or il n'en est rien.

C.5 DISCUSSION

L'étude du potentiel hépatoprotecteur de l'extrait aqueux d'E.cannabinum a été d'abord recherché *in vivo* sur un modèle utilisant un toxique hépatique, le CCl_4 , chez le rongeur. Les résultats encourageants nous ont alors conduit à adopter le même principe expérimental *in vitro* sur hépatocytes isolés de rat. Les test *in vivo*, bien que présentant l'avantage de prendre en considération l'ensemble de l'organisme et de s'approcher d'une pathologie humaine (l'hépatite, la cirrhose, la stéatose) ont deux inconvénients d'ordre pratique :

* ils sont coûteux car ils utilisent beaucoup d'animaux. Il est indispensable d'avoir à chaque test un lot de témoins intoxiqués car l'intensité de l'intoxication au CCl_4 est très variable d'une expérience à l'autre pour des raisons qui nous sont inconnues mais qui pourraient être de nature chronobiologique.

* un test nécessite 3 jours et ne peut se faire que sur un petit nombre d'animaux compte tenu des impératifs d'organisation expérimentale (respect des temps d'injection, de prélèvement, de dosage enzymatique).

Hikino (1984) recommande de développer, pour toutes ces raisons, le modèle *in vitro* sur culture primaire d'hépatocytes de rat. La technique permet un screening large de nombreuses substances naturelles et d'extraits végétaux à potentialité hépatotoxique. Il demeure néanmoins qu'une cellule isolée de son organe et de son organisme réagit différemment d'une cellule baignant dans son environnement physiologique. Cette réserve est d'autant plus importante que le produit testé est un extrait aqueux de plante renfermant une grande quantité de molécules. Le sang circulant, la fixation de certaines molécules aux protéines, la dégradation ou le métabolisme rapide de certaines substances, les phénomènes hormonaux locaux et cérébraux, les relations subtiles entre divers organes (foie-intestins...) ne sont pas prises en considération *in vitro*. Par ailleurs, un toxique aura un devenir différent selon qu'il sera injecté à un organisme entier (injections I.P., I.M., I.V. et *per os*) ou qu'il sera mis directement en contact avec une cellule isolée.

Les tests *in vivo* chez le rat ont été reproduits chez la souris. Les essais chez la souris présentent l'avantage d'être réalisés à un moindre coût; d'autre part, l'élevage et les manipulations sont plus aisés. Ces essais peuvent être effectués sur un plus grand nombre d'animaux par lot. Le seul désagrément réside dans la faible quantité de sang disponible ne permettant pas de nombreux dosages.

Contrairement à Hikino (1984) nous avons pu apprécier la faible variation de l'intoxication au CCl₄ et la très bonne reproductibilité des résultats. Pour toutes ces raisons, ce test in vivo paraît fortement recommandé pour la recherches de principes antihépatotoxiques d'origine naturelle.

Nous avons rapidement limité nos estimations de la protection in vivo vis-à-vis du toxique aux seules ALAT, plus sensibles que les ASAT. Leur élévation reflète un processus de cytolyse ou de nécrose mais également une augmentation de la perméabilité membranaire (Périssoud, 1981). Pour les recherches d'activité antihépatotoxiques de substances naturelles, tous les auteurs s'accordent d'ailleurs sur l'utilisation de ce dosage prioritaire.

Les autres dosages (bilirubine, protéines, tryglycérides) n'ayant pas révélé de protection particulière ont été abandonnés par la suite. Pour les test in vitro, les 3 marqueurs enzymatiques ALAT, ASAT et LDH ont été choisis. Il est admis que la fuite de ces enzymes est régulée par la perméabilité membranaire et par leur localisation mais leurs poids moléculaires ne sont pas corrélés avec leurs relargages : ALAT (110000) et LDH (140000) sont plus facilement libérées que les ASAT (95000) (Manabe et coll., 1987).

C.5.1 ETUDE COMPARATIVE DES EXTRAITS VEGETAUX ET DES SUBSTANCES NATURELLES ANTIHEPATOTOXIQUES RETENUES DANS LA LITTERATURE

Ces 5 dernières années, la recherche de substances naturelles à activité antihépatotoxique s'est fortement développée et plusieurs équipes de chercheurs en ont fait leur spécialité. Les travaux encourageants effectués sur la silymarine et le cyanidanol-3 depuis 10 ans ont suscité ces travaux. C'est ainsi que l'équipe japonaise de Kiso et Hikino a adopté les cultures primaires d'hépatocytes de rat pour réaliser un screening large parmi les plantes de la pharmacopée orientale (Hikino, 1984, Yang et coll., 1987).

Deux tableaux ont été représentés pour l'analyse bibliographique : les tableaux 33 (a,b,c) représentent les plantes et les principes actifs antihépatotoxiques, les tableaux 34 (a,b,c) reprennent, pour les principes actifs et les extraits végétaux testés, les remarques intéressantes faites par les auteurs.

L'analyse de ces tableaux appelle divers commentaires.

1) La liste des plantes antihépatotoxiques laisse apparaître une grande variété de familles et la majorité des espèces étudiées n'appartient pas à la pharmacopée européenne. Ceci tient sans doute au fait que de telles recherches ne sont pas entreprises en Europe.

TABLEAU 33a : PLANTES ET PRINCIPES ACTIFS ANTIHEPATOTOXIQUES VIS-A-VIS DU CCl₄

COMPOSES CHIMIQUES	PLANTE	BIBLIOGRAPHIE	
phénols	thymol, eugenol, menthols, gingerol	<u>Curcuma longa</u> (Zingiberaceae) <u>Zingiber officinalis</u> (")	Manabe <u>et coll.</u> , 1987
	coumarines	dimethylesculetine	<u>Artemisia longa</u> (Asteraceae)
silymarine		<u>Silybum marianum</u> (")	Wagner, 1980 Hikino <u>et coll.</u> , 1984c
américanine A		<u>Phytollaca americana</u>	Wagner, 1980
schizantérine		<u>Schizandra chinensis</u> (Magnoliaceae)	Tien Tung, 1977 Liu et Lesca, 1982 Hikino <u>et coll.</u> , 1984b Hikino <u>et coll.</u> , 1979
HUILES ESSENTIELLES	desoxypodophyllotoxine	<u>Thujiopsis dolobrata</u> (Cupressaceae)	Kiso <u>et coll.</u> , 1983a Hikino <u>et coll.</u> , 1979
	androgropholide <u>coll.</u> , 1986	<u>Baecka frutescens</u> (Myrtaceae)	Xiang <u>et coll</u> dans Handa <u>et coll.</u> , 1986
		<u>Andrographis paniculata</u> (Acanthaceae)	dans Handa <u>et</u>
papyriogenine A,B,C glycyrrizine atractylon		<u>Dianthus superbus</u> (Cariophyllaceae)	Hikino <u>et coll.</u> , 1984d
		<u>Tetrepanax papyrifera</u> (Araliaceae)	Hikino <u>et coll.</u> , 1984a
		<u>Glycyrrhiza glabra</u> (Leguminosae)	"
		<u>Atractylodes macrocephala</u> (Asteraceae)	Kiso <u>et coll.</u> , 1983b
caroténoïdes		<u>Atractylodes lanceae</u>	
		<u>Coclospermum tinctorium</u> (Cochlospermaceae)	Diallo <u>et coll.</u> , 1987

TABLEAU 33b (SUITE) : PLANTES ET PRINCIPES ACTIFS ANTIHEPATOTOXIQUES VIS-A-VIS DU CCl₄

COMPOSES CHIMIQUES	PLANTES	BIBLIOGRAPHIE
picroside	<u>Picrorrhiza kurroa</u> (Scrophulariaceae)	Kloss <u>et coll.</u> dans Handa <u>et coll.</u> , 1986
aucubine	<u>Plantago asiatica</u> (")	Yung <u>et coll.</u> , dans Handa <u>et coll.</u> , 1986
dianoside	<u>Dianthus superbus</u> (Caryophyllaceae)	Hikino <u>et coll.</u> , 1984d
gingeroside	<u>Panax ginseng</u> (Araliaceae)	Hahn dans Handa <u>et coll.</u> , 1986
cyanidanol-3	non spécifique	Périssoud et Weibel, 1980 Fraga <u>et coll.</u> , 1987
isobutrine	<u>Butea monosperma</u> (Fabaceae)	Wagner <u>et coll.</u> , 1986a
lutéoline	<u>Eclipta alba</u> (Asteraceae)	Wagner <u>et coll.</u> , 1986b
acide caféique	<u>Cynara scolymus</u> (Asteraceae)	dans Wagner, 1980
acide chlorogénique	(+ cynarine)	Adzet <u>et coll.</u> , 1987
"	<u>Artemisia princeps</u>	Kimura <u>et coll.</u> , 1985
"	<u>Artemisia montana</u>	
"	<u>Artemisia capillaris</u>	
curcuminoïde	<u>Curcuma longa</u> (Zingiberaceae)	Hikino <u>et coll.</u> , 1985a
acide p-coumarique		
acide gallique	<u>Cochlospermum tinctorium</u>	Diallo <u>et coll.</u> , 1987
acide ellagique		
résérpine	<u>Rauwolfia</u> sp. (Apocynaceae)	Clover dans Handa <u>et coll.</u> , 1986

TABLEAU 33c (SUITE) : PLANTES ET PRINCIPES ACTIFS ANTIHEPATOTOXIQUES VIS-A-VIS DU CCl₄

EXTRAITS VEGETAUX	PLANTES	BIBLIOGRAPHIE
extrait aqueux	<u>Geranium thunbergii</u> (Geraniaceae)	Kimura <u>et coll.</u> , 1984
	<u>Cochlospermum tinctorium</u>	Diallo <u>et coll.</u> , 1987
	<u>Mori albae</u> (Moraceae)	Sakai <u>et coll.</u> , 1987
	<u>Alpinia katsumadai</u> (Zingiberaceae)	
	<u>Dolichoris</u> sp. (Leguminosae)	
extrait éthanolique	<u>Cochlospermum tinctorium</u>	Diallo <u>et coll.</u> , 1987
extrait méthanolique	<u>Cochlospermum tinctorium</u>	"
	<u>Thujopsis dolabrata</u>	Hikino <u>et coll.</u> , 1979
extrait butanolique	<u>Butea monosperma</u>	Wagner <u>et coll.</u> , 1985
extrait hexane	<u>Phyllanthus niruri</u> (Euphorbiaceae)	Kodakandla <u>et coll.</u> , 1985
extrait eau/acétone	<u>Artemisia</u> sp.	Kimura <u>et coll.</u> , 1985
	<u>Geranium thunbergii</u>	Kimura <u>et coll.</u> , 1984
	<u>Wedelia calandulacea</u>	Wagner <u>et coll.</u> , 1986
	<u>Eclipta alba</u>	

TABLEAU 34a : REMARQUES SUR L'ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE D'EXTRAITS VEGETAUX ET DE PRINCIPES ACTIFS DES TABLEAUX 28 (a,b,c)

PRINCIPES ACTIFS	MODELE EXPERIMENTAL	REMARQUES SUR L'ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE
thymol eugénol menthol	hépatocytes isolés mesure de la tension de surface et de la t° de transition de phase du DPPC	diminuent la fuite des ALAT, ASAT ,LDH; lipophiles; stabilisateurs membranaires; faibles concentrations, lysent les membranes à hautes concentrations
gingérol	CPH	effet cytoprotecteur vis-à-vis de la fuite des ALAT en fonction de la longueur des chaînes linéaires
diméthylesculétine	CPH <u>in vivo</u> chez la souris	augmente la fuite des ALAT sur cellules saines mais la diminue sur cellules intoxiquées; les extraits d' <u>Artemisia</u> ont un effet cytotoxique variable suivant l'époque de récolte; la présence d'un groupe hydroxyl en C ₇ augmente l'efficacité, la méthylation de ce groupe la diminue
silymarine	CPH <u>in vivo</u> chez le rat	stimule la synthèse des protéines et du gluthation hépatiques; stabilisateur membranaire; C'est un mélange de 3 isomères dont la silybine est la plus active
américanine	-	transformée en un flavolignan, la silybine; même propriété que le silymarine; éliminée par glucuroconjugaison à 80% dans la bile et réabsorbée par les intestins

CPH : culture primaire d'hépatocytes, DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine; les principes actifs sont généralement testés en CPH à 1 mg/ml

TABLEAU 34b (SUITE)

PRINCIPES ACTIFS	MODELE EXPERIMENTAL	REMARQUES SUR L'ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE
schizandrine	CPH	inhibe l'hydroxylation microsomale hépatique; le groupe méthylénedioxy- du squelette cyclo-octane intervient dans l'activité; les extraits de <u>S. chinensis</u> sont anticytotoxiques vis-à-vis de la galactosamine, peu avec le CCl ₄
papyriogénine	CPH	les glycosides sont inactifs; l'oxydation du groupe hydroxyl en C ₃ augmente l'activité, la méthylation du groupe la diminue; activité anti-inflammatoire
glycyrrizine	CPH	<u>per os</u> , hydrolysée par la glucuronidase, er acide glycyrrétinique encore plus actif
atractylon β-eudesmol linéol	CPH	exerceraient leur activité après dégradation métabolique <u>in vivo</u> ; les extraits d' <u>Atractylodes</u> ont un effet anticytotoxique très variable selon les récoltes
desoxypodophyllotoxine	CPH	inhibe la mitose et la synthèse protéique
cyanidanol-3	foie <u>in situ</u> , hépatocytes isolés <u>in vivo</u> chez le rat	diminue la chimioluminescence du foie produite par le CCl ₄ ; comme d'autres flavonoïdes, plus efficace que les polyphénols vis-à-vis du ter-BOOH; hydrosoluble donc intéressant pour protéger les acides nucléiques, aminés, les protéines de la LPO; antinérotique
acide caféique acide chlorogénique	hépatocytes isolés <u>in vivo</u> chez le rat <u>in vivo</u> chez le rat	Adzet <u>et coll.</u> trouvent une activité anticytotoxique pour la cynarine, pas pour les acides caféique, chorogénique Kimura <u>et coll.</u> trouvent una activité anticytotoxique et antilipoperoxydante pour l'acide caféique et chlorogénique à 50 mg/kg

TABLEAU 34c (SUITE) : REMARQUE SUR L'ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE DE CERTAINS EXTRAITS VEGETAUX ET PRINCIPES ACTIFS DES TABLEAUX 33 (a,b,c)

EXTRAITS VEGETAUX	MODELES EXPERIMENTAUX	REMARQUES SUR L'ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE
extraits aqueux :	CPH	
<u>Cochlospermum tinctorium</u>		dose anticytotoxique efficace = 10 mg/ml
<u>Gingiber thunbergii</u>	<u>in vivo</u> chez le rat hyperlipidémique	" 3 g/kg
extraits éthanolique :		
<u>Cochlospermum tinctorium</u>	CPH	" 8 mg/ml
extrait méthanolique :		
<u>Thujopsis dolobrata</u>	<u>in vivo</u> chez la souris	" 5 g/ml
<u>Cochlospermum tinctorium</u>	CPH	" 6 mg/ml
extrait hexane :		
<u>Phyllanthus niruri</u>	CPH	" 28 mg/ml
extrait eau/acétone :		
<u>Artemisia sp.</u>	CPH	" 1,4 à 2,5 mg/ml
<u>Geranium thunbergii</u>	<u>in vivo</u> chez le rat hyperlipidémique	" 2 g/kg
<u>Eclipta alba</u>	CPH	" 1 mg/ml
extrait ethylacétate :		
<u>Wedelia calendulacea</u>	CPH	883 mg/ml

CPH : culture primaire d'hépatocytes; les doses sont exprimées en mg ou g de plantes sèches par kg de poids corporel ou par ml de suspension d'hépatocytes.

2) Les principes actifs appartiennent à des classes chimiques variées mais certaines d'entre elles sont mieux représentées : lignanes, terpénoïdes (di-, tri- et sesqui-terpénoïdes) glycosides, flavonoïdes et polyphénols.

3) La teneur en principes actifs pourrait dépendre du lieu et de la saison de récolte.

4) Il a pu être démontré que certains principes actifs n'étaient pas actifs par eux-mêmes mais nécessitaient une métabolisation in vivo en aglycones, par hydrolyse.

5) Pour beaucoup de ces principes actifs, la recherche s'est limitée à l'activité anticytotoxique par dosage des ALAT. Cependant quelques-uns ont fait l'objet d'une étude plus approfondie, permettant de corrélérer l'activité anticytotoxique à d'autres propriétés :

* le thymol, l'eugénol et le menthol ont une activité corrélée à un effet stabilisateur membranaire. La désoxypodophyllotoxine est anticytotoxique et inhibe la mitose et la synthèse protéique; elle agit en injection simultanée au toxique mais pas 3 heures après.

* la (+)-catéchine agit à divers stades de la biotransformation du CCl_4 puisqu'elle est antilipoperoxydante et possède un effet stabilisateur membranaire.

* la silymarine est anticytotoxique, stimule la synthèse des protéines et du glutathion hépatique et possède les propriétés de stabilisateur membranaire. L'activité anticytotoxique des acides caféique, chlorogénique in vitro a été retrouvée in vivo.

* Les doses exprimées en mg ou g de plantes sèches, utilisées in vivo et in vitro sont toujours très importantes (3 à 5 g/ kg in vivo et de 1 à 883 g/ml in vitro). Les doses d'extraits aqueux d'E.cannabinum utilisées pour obtenir un effet anticytotoxique sont sans commune mesure : 0,250 à 1g/kg in vivo et de 1 à 5 mg/ml in vitro. D'ailleurs les auteurs ne mentionnent aucune étude toxicologique si ce n'est Kiso et coll. (1984) remarquant une augmentation de la fuite des ALAT chez les hépatocytes sains exposés à la diméthylesculétine 1mg/ml et la quercétine de 0,1 à 1 mg/ml. Les phénols exacerbent la toxicité du CCl_4 en augmentant la fuite des ALAT, ALAT et LDH à hautes concentrations mais sont stabilisateurs membranaires aux doses qui diminuent la fuite enzymatique (Manabe et coll., 1987).

* les ajouts des principes actifs et des extraits végétaux sont toujours simultanés au toxique.

* tous les "screenings" portant sur cultures primaires d'hépatocytes ont été entrepris avec le CCl_4 et la galactosamine. Or il est fréquent de constater que de

nombreux produits anticytotoxiques vis-à-vis du CCl₄ sont inactifs vis-à-vis de la galactosamine ou inversement. La galactosamine est un toxique provoquant des lésions hépatotoxiques proches des hépatites virales humaines comprenant des effets cytotoxiques liés à la déplétion en nucléotides uridiniques et une participation à des phénomènes immunologiques (Schiessel *et coll.*, 1984). Sa spécificité d'action différente du CCl₄ explique les différences de réaction d'un même produit, d'autant plus que celui-ci agit aux stades précoces et spécifiques de CCl₄, le stade de la nécrose étant plus général.

C.5.2 ETUDE COMPARATIVE DES DIVERSES MOLECULES DE SYNTHÈSE A PROPRIETES ANTINECROTIQUES

Le tableau 35 regroupe les molécules de synthèse à propriété antinérotique sélectionnées dans la littérature selon 3 critères :

- * les recherches sont récentes et se poursuivent actuellement.
- * les molécules sont utilisées en clinique humaine.
- * ce sont des antinérotiques "vrais" c'est-à-dire qu'ils sont inefficaces sur la biotransformation du toxique et la LPO.

Peu de mécanismes d'action sont vraiment connus. Il ressort néanmoins 2 principaux types d'action :

*inhibition de la phospholipase membranaire et protection de la dégradation des phospholipides membranaires et de l'homéostasie calcique.

*stimulation de la synthèse protéique, de la régénération hépatique.

C.5.3 APPROCHE DU MECANISME CYTOPROTECTEUR DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L VIS-A-VIS DU CCl₄

L'extrait végétal agirait au stade ultime du processus toxique, la nécrose. Il n'empêche pas la bioactivation du CCl₄ ni la LPO consécutive.

Il a été démontré que l'EUPP, lactone sesquiterpénique en concentration importante dans la plante (1% des parties aériennes sèches) ne présentait pas d'activité antihépatotoxique à la dose rencontrée dans l'extrait aqueux.

TABLEAU 35 : MOLECULES DE SYNTHÈSE ACTUELLES ANTINECROTIQUES ET MECANISMES D'ACTION

MOLECULES	MECANISME D'ACTION	BIBLIOGRAPHIE
dexaméthasone	anti-inflammatoire non stéroïdien, protège l'homéostasie calcique et la dégradation des phospholipides en inhibant la phospholipase-Ca ⁺⁺ dépendante par induction d'une antiphospholipase lipomoduline	Schiessel <u>et coll.</u> , 1984
trifluoropérazine imipramine	inhibent la calmoduline et par là même les phospholipases empêchant la dégradation des phospholipides membranaires actifs 6 à 10 heures après le toxique; néanmoins ils bloquent les ionophores calciques et par conséquent diminuent la synthèse d'ADN régulée par le Ca ⁺⁺ affectant la régénération cellulaire	De Ferreyra <u>et coll.</u> , 1986 Fernandez <u>et coll.</u> , 1986 Tsukamoto <u>et coll.</u> , 1987
cystéine méthionine	stimulent la synthèse protéique, la régénération hépatique; actifs 30 minutes avant et jusqu'à 6 heures après intoxication; inefficaces sur la LPO, la glucose-6-phosphatase; utilisés dans le traitement de l'alcoolisme	Orego <u>et coll.</u> , 1976 De Ferreyra <u>et coll.</u> , 1983 Mac Donald <u>et coll.</u> , 1986 Liebers, 1985
malolitate	n'empêche pas la bioactivation du CCl ₄ mais est antinecrotique et antifibrotique; intéressant dans le traitement de l'alcoolisme	Siegers <u>et coll.</u> , 1986
choline	utilisée dans le traitement de l'alcoolisme depuis longtemps; prévient la stéatose et la fibrose	Liebers <u>et coll.</u> , 1985

La recherche d'une éventuelle activité antihépatotoxique de l'EUPP se justifiait au regard de ses propriétés pharmacologiques importantes. Elle sont pourtant contradictoires car allant à l'encontre d'une éventuelle activité antinécrótique : elle est cytostatique et antitumorale en se liant spécifiquement avec des groupements électrophiles des protéines, enzymes, nucléotides; elle est inhibitrice de la synthèse protéique, réduit le taux de glutathion hépatique à dose antitumorale. Néanmoins cette recherche aura permis de constater qu'à la teneur contenue dans la plante et dans l'extrait aqueux, l'EUPP n'exacerbait pas la toxicité hépatique du au CCl_4 . Par ailleurs, il a été démontré que l'eupatolide était anti-inflammatoire et, si cette propriété est corrélée avec une activité inhibitrice des phospholipases A_2 , une participation à l'activité antinécrótique ne doit pas être exclue.

Sa composition chimique fait apparaître d'autres composés susceptibles de posséder une activité antihépatotoxique :

* diterpènes dérivés de clérodane.

* triterpènes (acétate de dammaradiényle).

* flavonoïdes comme le rutoside, l'hyperoside, la quercétine, l'astragaline, l'acide p-coumarique, l'acide ferulique, l'isoquercétine et le kaempférol-3-rhamnoside. Certains sont susceptibles d'inhiber le cytochrome P_{450} (Vernet et Siess, 1986), de posséder un pouvoir antilipoperoxydant (Torell et coll., 1986) ou antiradicalaire vis-à-vis du DPPH (héspéridine > kaempférol > rutine > quercétine (Pincemail et coll., 1985). Ils peuvent posséder des propriétés anti-inflammatoires et antiallergiques et une activité sur la phospholipase A_2 (PLA_2) n'est pas exclue.

* acides-phénols comme les acides caféique, chlorogénique et isochlorogénique. La littérature rapporte leurs activités antilipoperoxydante (Kimura et coll., 1985) et anti-inflammatoire (Koshihara et coll., 1984, Twahashi et coll., 1986).

* polysaccharides anti-inflammatoires (Vollmar et coll., 1986).

* choline utilisée depuis longtemps comme antinécrótique dans le traitement de l'alcoolisme. C'est un agent lipotrope donneur de groupements $-\text{CH}_3$ qui intervient au niveau de la synthèse des phospholipides, comme la bétaine commercialisée aussi pour les mêmes usages.

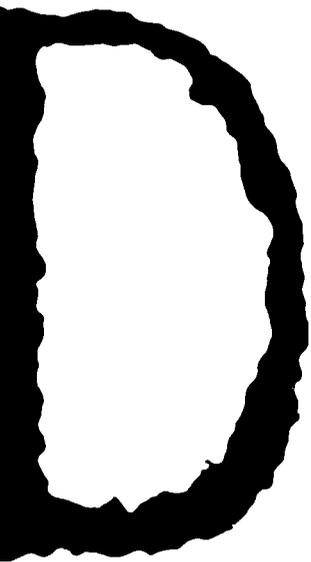
Ainsi certaines molécules présentes dans l'extrait sont potentiellement capables d'agir sur la LPO comme les acides-phénols et les flavonoïdes, soit sur la nécrose cellulaire comme certaines lactones, les polysaccharides, les flavonoïdes ou la choline. En effet, une propriété anti-inflammatoire peut très bien être envisagée comme une

inhibition des PLA₂ localisée sur le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique et contrôlant la production des icosanoïdes.

Or un effet précoce du CCl₄, sur les PLA₂ est actuellement envisagé (Lepage et coll., 1988, Glende et coll., 1986). L'activation des PLA₂-Ca⁺⁺-dépendante, par augmentation du flux calcique, active la dégradation des phospholipides et engendre une perte d'intégrité de la membrane. Ce phénomène est connu pour être responsable des dommages cellulaires causés par l'ischémie, l'œdème cérébral, le choc toxique et la dégranulation des éosinophiles.

Cette notion d'effet précoce explique beaucoup de résultats jusqu'alors obscurs : tous les inhibiteurs du cytochrome P₄₅₀ et de LPO sont inactifs sur les effets précoces du CCl₄ par exemple.

Il paraît alors fort plausible que certains principes actifs de l'extrait aqueux d'E.cannabinum puissent intervenir sur les effets précoces du CCl₄ : ceci se défend d'autant mieux qu'un antinéocrotique agit au niveau de la membrane plasmique comme stabilisateur membranaire ou comme inhibiteur des PLA₂ et que plusieurs composés contenus dans la plante possèderaient ces propriétés.



*Propriétés diurétiques
d'E. cannabinum L.*

En médecine traditionnelle, cholérétiques et diurétiques sont souvent associés. Outre l'effet solvant dû à l'ingestion d'une infusion ou d'une décoction, l'effet diurétique des plantes a souvent été imputé aux dérivés xanthiques ou aux sels de potassium en quantité non négligeable. En fait, si les premiers sont effectivement diurétiques, ils ont été abandonnés depuis longtemps du fait de leur toxicité; quant aux seconds, leur hypothétique effet est pourtant sans fondement d'un point de vue strictement physiologique.

La bibliographie concernant les diurétiques d'origine naturelle est pauvre voire inexistante si ce n'est quelques rares publications faisant simplement le constat d'un effet diurétique de tel ou tel extrait végétal sans recherche du principes actifs incriminés et de son mécanisme d'action. Citons pour exemple Juniperus communis et Rosmarinus officinalis (Giachetti et coll., 1981), Ononis spinosa (Rebuelta et coll., 1981), Viola odorata (Rebuelta et coll., 1983b), Sambucus ebulus (Petkov et Markovska, 1981), Sambucus nigra (Rebuelta et coll., 1983a). Seul l'effet diurétique fortement marqué de l'extrait butanolique de Cynara scolymus a pu être attribué au mélange d'acides-alcools et d'acide hydroxyméthylacrylique (Mortier, 1972).

Le rapprochement chimiotaxinomique de E.cannabinum avec d'autres Asteraceae à réputation cholérétique et diurétique, tels que la chicorée, l'artichaut, le pissenlit, la piloseille et la grande bardane, nous a conduit à chercher si l'extrait aqueux d'E.cannabinum avait aussi un effet diurétique, bien que cette propriété soit secondaire et moins citée que son usage dans les maladies du foie. L'utilisation de la plante comme diurétique est mentionné par Avicenne en arabe ancienne. Cette propriété se retrouve mentionnée à plusieurs titres dans la pharmacopée traditionnelle française : la racine était employée pour lutter contre l'oedème, l'hydropisie et l'hypertension, une décoction suivie d'une infusion de 15 g de feuilles fraîches dans 200 ml d'eau était recommandée par Leclerc comme diurétique (Fournier (1948). Les médecines traditionnelles indienne (Chopra, 1956; Nadkarni, 1927), cyprïote (Arnold, 1985) et allemande (Thoms dans Malingré, 1971) citent aussi cette propriété.

D.1 RAPPEL SUR LA PHARMACOLOGIE DU REIN ET DES DIURETIQUES (Schwartz et coll. dans Giroud et coll., 1978)

Le rein possède une fonction d'excrétion comportant d'abord la filtration glomérulaire, puis des modifications du filtrat par différents processus tubulaires. Cette fonction est évaluée par la clairance qui correspond à la quantité de plasma épuré par le rein en un temps donné.

D.1.1 TRANSFERT DES PRINCIPAUX PARAMETRES URINAIRES

Les glomérules laissent passer un simple filtrat plasmatique mais l'urine définitive est toute différente tant en volume qu'en composition. Le tableau 36 regroupe, pour les principaux paramètres urinaires dont le glomérule assure la filtration totale, la concentration plasmatique (qui est donc la même dans le filtrat glomérulaire) et les pourcentages réabsorbés dans les tubules et excrétés dans les urines.

TABLEAU 36 : teneur des principaux constituants urinaires dans le plasma et les urines chez l'homme (d'après Wright, 1973)

Constituant	Concentration plasmatique (g/l)	%excrétés dans les urines	% réabsorbés dans les tubules
Glucose	1	1	99
HCO ₃ ⁻	1,5	0,03	99,7
Na ⁺	3,3	1	99
K ⁺	0,17	7,5	92,5
Cl ⁻	3,6	1,5	98,5
Phosphate(en P)	0,03	23,5	76,5
Ca ⁺⁺	0,10	1,2	98,8
Urée	0,3	58,8	41,2
HSO ₄ ⁻ (en S)	0,02	79,4	20,6

* **Sodium** : 65% du sodium filtré sont réabsorbés au niveau du tube proximal par un transfert actif; 25% sont réabsorbés dans le segment large de la branche ascendante de l'anse de Henlé par un transport passif; 10% sont réabsorbés dans le tube distal et le tube collecteur par un transfert actif régulé entre autre par l'aldostérone.

* **Potassium** : la plus grande partie est réabsorbée au niveau du tube proximal et accessoirement au niveau de l'anse de Henlé; il existe une sécrétion active dans la partie terminale du tube distal et la partie initiale du tube collecteur; cette sécrétion est d'autant plus grande que l'apport potassique et sodique est grand et qu'il existe une hypersecrétion d'aldostérone.

* **Magnesium** : 30% du magnésium de l'organisme sont éliminés dans les urines; 80% sont filtrés par le glomérule et les 20% restants sont liés à l'albumine qui ne franchit pas la barrière rénale et reste dans la plasma; 15 à 30% sont réabsorbés dans le tube proximal, 60% dans la branche ascendante de l'anse de Henlé et 2 à 5% dans le tube distal; le reste est excrété dans les urines (Bellorin-Font et coll., 1984).

* **Urée** : la réabsorption est variable , environ 40% en cas de d'apport hydrique, environ 80% en cas de restriction hydrique.

* **Calcium** : 65% du calcium filtré sont réabsorbés dans le tube proximal, 25% par la branche ascendante de l'anse de Henlé et 9% le sont activement dans le tube distal et le tube collecteur; seulement 1% du calcium filtré est excrété dans les urines.

* **Acide urique** : 98% de l'acide urique sont réabsorbés au niveau du tube proximal puis 8% de la quantité filtrée sont sécrétées.

* **Phosphore** : 90% du phosphore filtré sont réabsorbés par le tube proximal.

* **Le glucose** est réabsorbé activement au niveau du tube proximal; chez l'individu sain, il n'y a pas de glucosurie.

* **Les acides aminés et les protéines** sont presque totalement réabsorbés au niveau du tube proximal. L'albumine par exemple n'est pas excrétée dans les urines.

D.1.2 CONCENTRATION ET DILUTION DES URINES

Le maintien d'une pression osmotique normale dans les liquides extracellulaires est nécessaire à la survie de l'organisme . Ce maintien assuré par le rein, est sous la dépendance de systèmes hormonaux (hormone anti-diurétique et aldostérone). Quand la concentration en substances osmotiques (osmolalité exprimée en mosmôles par kg d'eau) des urines est supérieure à celle du plasma, les urines sont hypertoniques. Quand elle est inférieure, les urines sont hypotoniques. Quand elle est égale, les urines sont isotoniques.

L'eau éliminée dans les urines est formée de deux composantes:

* **l'eau liée** qui contient des substances osmotiques à une concentration identique au plasma (mesurée par la clearance osmolaire C_{osm}).

* **l'eau libre** qui ne contient pas de substances osmotiques (mesurée par la clearance de l'eau libre C_{H_2O}).

Quand les urines sont hypotoniques, l'excrétion d'eau libre est positive, quand elles sont hypertoniques, l'excrétion d'eau libre est négative.

C'est au niveau du tube proximal que 70% de l'eau filtrée sont réabsorbés passivement, proportionnellement aux substances osmotiques. Dilution et concentration se produisent en aval de ce tube. Au niveau de l'anse de Henlé est créé un gradient osmotique cortico-papillaire grâce à un système de contre courant.

Si V est le volume urinaire par unité de temps, U_{osm} et S_{osm} l'osmolarité en mosm/l de l'urine et du sérum :

$$V = C_{osm} + C_{H_2O} = (U_{osm} \times V) / S_{osm} + C_{H_2O}$$

Enfin, il existe deux mécanismes de **régulation hormonale** :

Le premier assurant la réabsorption d'eau au niveau du tube contourné distal et des canaux collecteurs : c'est l'hormone antidiurétique (ADH), sécrétée par l'hypophyse. L'injection d'une solution hypertonique (NaCl, saccharose, Na_2SO_4) stimule l'ADH par la mise en jeu d'osmorécepteurs.

L'ingestion de boisson abondante induit une polyurie par inhibition de la sécrétion d'ADH secondaire à l'hypotonie du plasma.

Le second assure la modulation de l'excrétion sodique en fonction des besoins hydroélectrolytiques de l'organisme : c'est l'aldostérone, hormone corticosurrénalienne dont la synthèse est régulée par le système rénine-angiotensine stimulé par la volémie. L'aldostérone agit au niveau du tube contourné distal en favorisant l'échange d'ions Na^+ du liquide tubulaire contre des ions K^+ et H^+ .

D.1.3 LES DIFFERENTS DIURETIQUES (Imbs et coll., 1986)

Un diurétique est une substance qui augmente le volume des urines. L'eau et l'éthanol sont diurétiques mais ils ne modifient pas la natriurèse. En fait les médicaments diurétiques sont des natriurétiques ou plus généralement des salidiurétiques. La plupart des diurétiques n'agissent que sur un segment limité du néphron. Ils sont prescrits avant tout dans deux situations : l'œdème et l'hypertension artérielle.

La figure 39 représente les sites d'action des principaux diurétiques dont la classification est présentée au tableau 37.

D.1.4 LES DIFFERENTS MODELES EXPERIMENTAUX

Il existe divers modèles d'étude des diurétiques chez le rat in vivo mais tous se déroulent sur quelques heures, en modèles aigus :

Le composé testé peut être dissous dans de l'eau distillée, administré per os sous 20 à 25ml/kg (Andreani et coll., 1987; Rebuelta et coll., 1981, Rebuelta et coll., 1983a et 1983b, Miragoli et Ferrini, 1986) ou dans une solution saline

TABLEAU 37 : PROFIL PHARMACOLOGIQUE DES PRINCIPAUX DIURETIQUES

SITE D'ACTION	CLASSE DE DIURETIQUES	MODE D'ACTION	DELAI ET PUISSANCE
branche ascendante de l'anse de Henlé	furosémide acide étacrynique	inhibiteurs des mécanismes de dilution et concentration, urine hypotonique, hypokaliémie chlorurèse > natriurèse > kaliurèse calciurie et magnésurie faible $Cl^-/Na^+ \geq 1$, pH acide	15 mn <u>per os</u> puissants et brefs
segment de dilution de la branche ascendante	thiazidiques	inhibiteurs des mécanismes de dilution, urine hypertonique, hypokaliémie et hypocalciurie, natriurèse = chlorurèse = kaliurèse $Cl^-/Na^+ \geq 1$, pH variable	12 heures <u>per os</u> modérée
tube distal	spironolactone	anti-aldostérone,	très modérée aux doses
	triamtérène	inhibe l'entrée de Na^+ par un canal sodique	usuelles
	amiloride	interfère avec un 2 ^{ème} système de transport sodique Na^+/H^+ $Cl^-/Na^+ \leq 1$, pH alcalin	
tube proximal	acétazolamide	inhibe l'anhydrase carbonique	(peu utilisé)
	osmotiques (mannitol...)	toute molécule osmotiquement active a tendance à rester dans la lumière tubulaire après filtration glomérulaire	immédiat

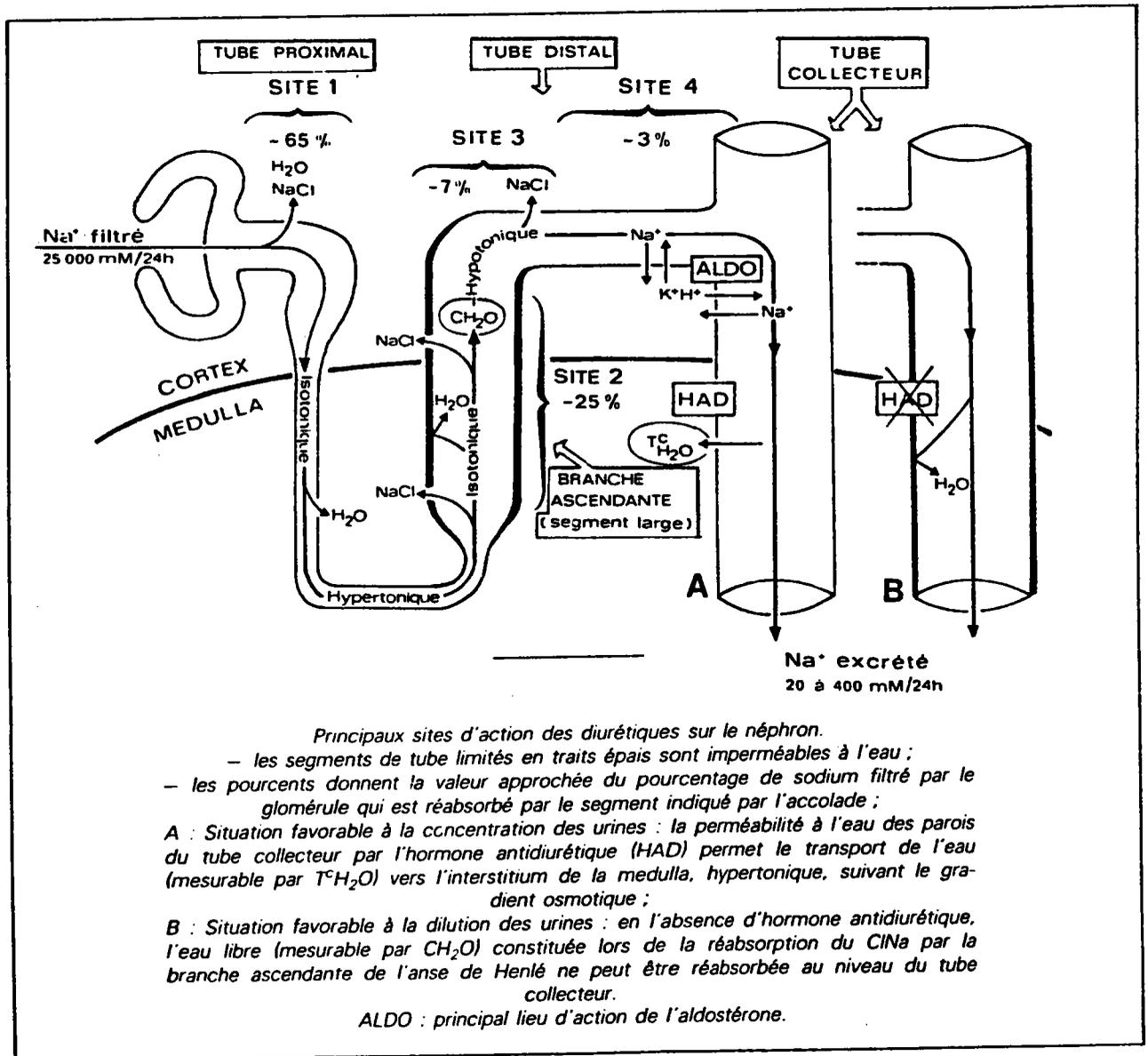


FIGURE 39 : PRINCIPAUX SITES D'ACTION DES DIURETIQUES SUR LE NEPHRON (Imbs et coll., 1986)

normale sous 40 ml/kg (Kau et coll., 1987). Il peut être administré par voie I.P. 20 minutes après une solution hypotonique à 0,45% (50 ml/kg) en I.P. (Petkov et coll., 1981). Le produit peut être injecté par voie sous-cutanée et l'animal reçoit 100 ml/kg d'eau distillée per os (Guiol et coll., 1984).

L'urine excrétée durant les 4 à 8 heures suivantes est ensuite collectée et les principaux paramètres urinaires sont mesurés (Na^+ et K^+).

L'animal peut subir une cathétérisation des uretères puis être placé en cage à métabolisme et recevoir le produit testé par voie I.V. (Hammarlund et Paalzow, 1985).

Pour étudier l'effet diurétique de l'extrait aqueux d'E.cannabinum, nous avons utilisé deux modèles in vivo, chez le rat :

* **Un modèle chronique**, par ingestion orale quotidienne d'extrait aqueux d'E.cannabinum, à dose thérapeutique traditionnelle et active sur les précédents tests (cholérèse, hépatoprotection). Ce modèle est le plus proche de l'utilisation traditionnelle. L'expérimentation, menée sur au moins quinze jours, comprend, outre la mesure du volume urinaire quotidien, un bilan ionique urinaire à la fin du traitement.

* **Un modèle aigu**, par mesure de l'élimination d'une surcharge hypotonique. L'extrait aqueux d'E.cannabinum est administrée à dose unique dans une surcharge hypotonique. Cette technique est employée par Kau et coll. (1987) chez le rat mais la solution hypotonique et le produit testé sont administrés par voie orale et les différents paramètres urinaires sont suivis pendant 6 heures. Elle est utilisée aussi par Petkov et Markoska (1981) pour l'étude d'extrait végétaux, mais le produit testé est administré préalablement en I.P. et l'animal reçoit ensuite la surcharge hypotonique en I.P.

Nous avons choisi la voie intrapéritonéale pour des raisons pratiques de méthodologie et par conséquent avoir une assimilation rapide du produit testé : les gavages per os demandent un certain temps et il fallait pouvoir suivre la cinétique du volume urinaire excrété. Dans ces conditions, l'administration I.P. est toujours choisie pour mettre en évidence un effet pharmacologique. L'extrait a été dissous directement dans la surcharge de manière à éviter une nouvelle manipulation de l'animal.

Le furoséide a été choisi comme diurétique de référence afin de comparer l'intensité de l'action d'E.cannabinum à celle d'un produit de synthèse. C'est un diurétique de l'anse de Henlé inhibant la réabsorption de NaCl dans la branche ascendante de l'anse de Henlé. En fait les ions Cl^- sont réabsorbés consécutivement au Na^+ et la présence d'ions K^+ est indispensable dans la lumière du tube, mettant ainsi en jeu un système de cotransport $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$. Ce transport existe aussi dans les érythrocytes, le côlon, la trachée, la cornée, les ascites d'Erlisch et les cellules tumorales. Il

est lié à la protéine de Thamm-Horsfall, glycoprotéine rénale épithéliale située dans la membrane cellulaire de la branche ascendante de l'anse de Henlé, possédant des sites de fixation pour les ions Na^+ , K^+ et Cl^- (Graven et coll., 1984).

Dans la lumière du tube, le furosémide bloque ce cotransport, inhibant par voie de conséquence la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, K^+ et Cl^- étant passivement distribués de chaque côté de la cellule (Greger et Schlatter, 1983).

En administration chronique à forte dose, il diminue le taux de Mg^{++} dans le plasma et les os, le taux de K^+ dans le plasma, les muscles du squelette mais la concentration en K^+ reste stable dans le myocarde où seule une augmentation de Ca^{++} apparaît (Borgrevink et coll., 1987).

La dose choisie ici correspond à celle utilisée par Andreani et coll. (1987) chez le rat pour induire une salidiurèse.

Une solution de nitrate de potassium a été testée de manière à vérifier un éventuel effet diurétique des sels de potassium (souvent sous forme de nitrates) contenus dans de nombreuses plantes comme Cynara scolymus, une autre Asteraceae aux propriétés proches d'E.cannabinum.

Le volume urinaire est suivi durant 24 heures après injection de la surcharge et les paramètres biologiques et sériques les plus importants sont mesurés: débit et concentration en Na^+ , K^+ et Cl^- et clairance osmolaire.

D.2 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. EN ADMINISTRATION CHRONIQUE SUR LA DIURESE ET LE BILAN IONIQUE DE L'URINE CHEZ LE RAT

D.2.1 MATERIEL ET METHODES

Des rats mâles Sprague Dawley (Iffa Credo, L'Arbresle, Fr.) d'un poids de 250 à 300 g, sont répartis en cage à métabolisme permettant le recueil séparé des urines et des fèces.

L'extrait aqueux d'E.cannabinum L. (500 mg/kg) est incorporé à la ration alimentaire journalière de 20g (Extra Labo, Provins, Fr.).

Les témoins reçoivent de l'eau distillée dans les mêmes conditions. Les animaux sont abreuvés ad libitum. Sur les urines filtrées, recueillies toutes les 24 heures, le pH (pHmètre protatest 653) et les volumes urinaires (volumétrie) sont mesurés.

Après centrifugation (300xg; 5mn), le filtrat est congelé en tubes plastiques. Les concentrations en Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} , urée et créatinine sont déterminées en fin d'expérience, par un auto-analyseur (Technikon, SMA 6). La concentration en Mg^{++} est mesurée par spectrophotométrie de flamme (Perkin-Elmer, 305B)

* **Expérience 1** : Les volumes, pH et concentrations urinaires d'un lot de 5 rats traités et d'un lot de 4 rats témoins sont suivis pendant 23 jours.

* **Expérience 2** : les volumes et les pH urinaires d'un lot de 5 rats traités et d'un lot de 5 rats témoins sont suivis pendant 20 jours.

D.2.2 EXPRESSION DES RESULTATS

Les moyennes journalières des flux urinaires (ml/100g), des pH, des concentrations urinaires en Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{++} , urée, créatinine (mmôl/ 100g) et Ca^{++} (môl/ 100g) des lots traités sont comparées aux moyennes des lots témoins par un test non paramétrique, compte tenu des fluctuations journalières, le test des signes (C.E.A., 1978). Sur les figures, les moyennes et les erreurs standards sont représentés.

D.2.3 RESULTATS

* **Expérience 1** : Les résultats sont réunis dans les tableaux 37,38 et 39 et les figures 40 à 48.

TABLEAU 37 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg SUR LA DIURESE CHEZ LE RAT

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	VOLUME URINAIRE ml/ 100g/ 24 H ET % DE VARIATION					
		7 JOURS	%	14 JOURS	%	21 JOURS	%
EXP.1 placebo	4	2,35± 1,87		2,34± 1,51		2,58± 1,57	
<u>E.cannabinum</u>	5	3,14± 1,88	+35%*	3,07± 1,71	+31%*	2,85± 1,61	+10%*
EXP.2 placebo	5	4,13± 1,38		3,85± 1,44		4,24± 1,65	
<u>E.cannabinum</u>	5	5,54± 2, 43	+34%*	5,23± 2,37	+36%*	5,53± 2,34	+30%*

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" (test des signes) :* p< 0,05

TABLEAU 38 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg SUR LE pH URINAIRE CHEZ LE RAT

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	pH URINAIRE		
		7 JOURS	14 JOURS	21 JOURS
EXP.1 placebo	4	8,2± 1,7	9,2± 0,2	9,4± 0;04
	<u>E.cannabinum</u> 5	8,7± 0,6	9,3± 0,1	9,4± 0,1
EXP.2 placebo	5	8,8± 0,3	8,9± 0,4	8,8± 0,4
	<u>E.cannabinum</u> 5	8,8± 0,2	8,9± 0,4	8,8± 0,4

TABLEAU 39 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg PENDANT 14 JOURS SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'URINE CHEZ LE RAT (EXP.1)

PARAMETRES	CONCENTRATIONS URINAIRES / 100g / 24 H ET % DE VARIATION		
	PLACEBO(N=4)	E.cannabinum(N=5)	%
Na ⁺ (mmôles)	0,410± 0,087	0,505± 0,102	+23%*
K ⁺ (mmôles)	0,527± 0,151	0,701± 0,163	+33%*
Cl ⁻ (mmôles)	0,478± 0,650	0,559± 0,120	+17%*
Mg ⁺⁺ (nmôles)	4,5± 1,20	5,87± 1,52	+30%*
Ca ⁺⁺ (μmôles)	2,01± 0,92	1,94 0,55	-3,4%
urée (mmôles)	1,25± 0,38	1,79± 0,39	+43%*
créatinine (μmôles)	13± 3	1,7± 4	+ 31%*

Différences statistiquement significatives par rapport au lot "placebo" (test des signes):
* p ≤ 0,05

Placebo : ———

E.cannabinum 500mg/kg: - - -

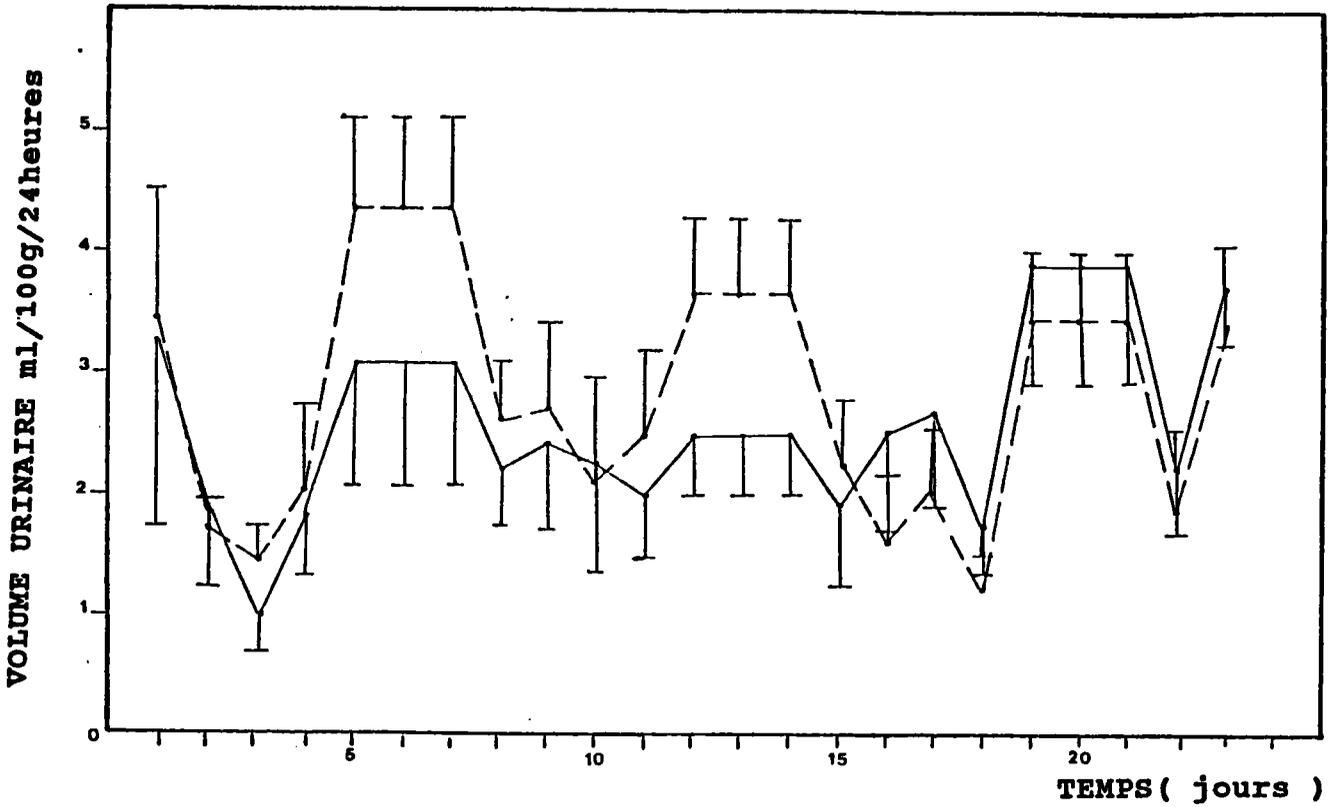


FIGURE 40 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg/24 heures PENDANT 21 JOURS SUR LE VOLUME URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.1)

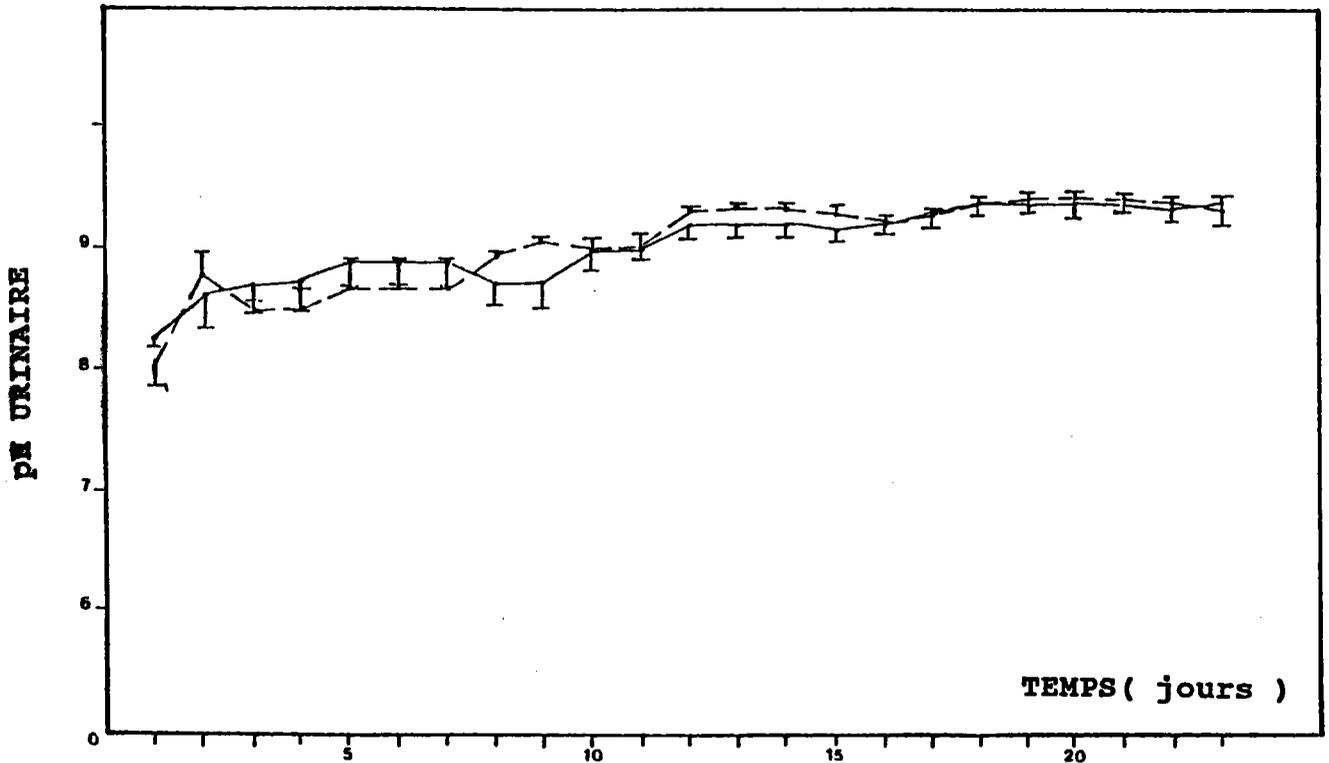


FIGURE 41 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'E.cannabinum 500 mg/kg/24heures PENDANT 21 JOURS SUR LE pH URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.1)

Placebo ———
E.cannabinum 500mg/kg — — —

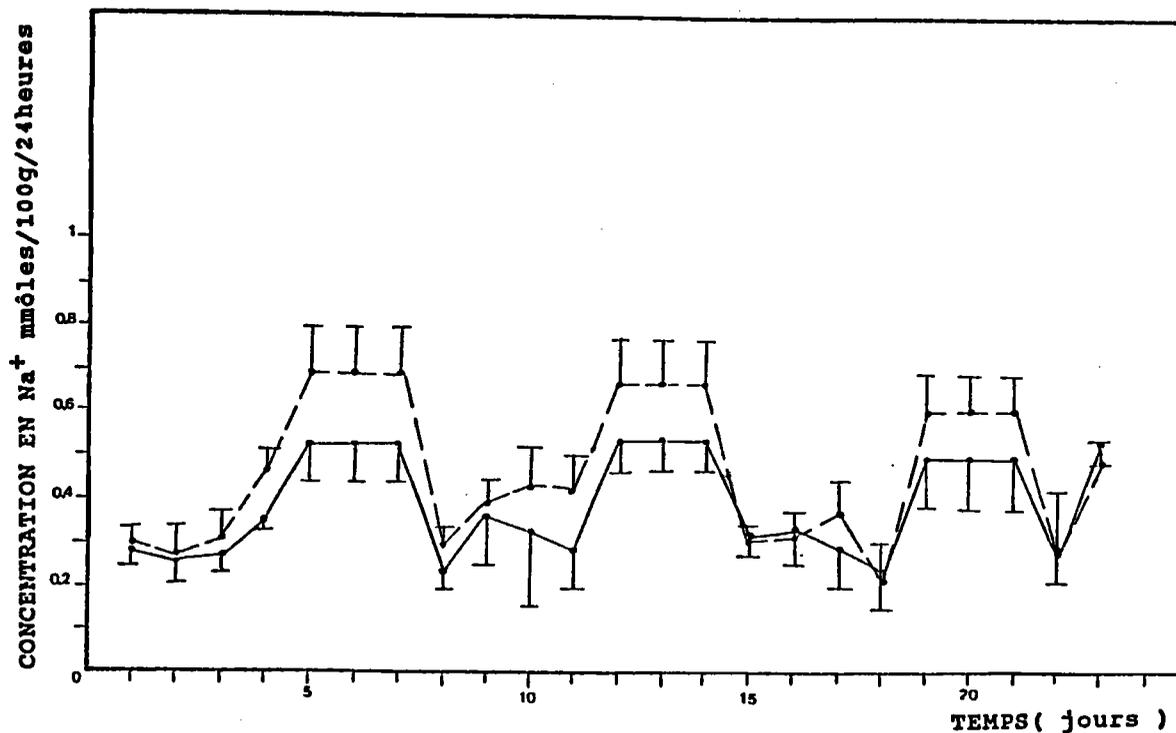


FIGURE 42 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg/24 heures PENDANT 21 JOURS SUR LE TAUX DE SODIUM URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.1)

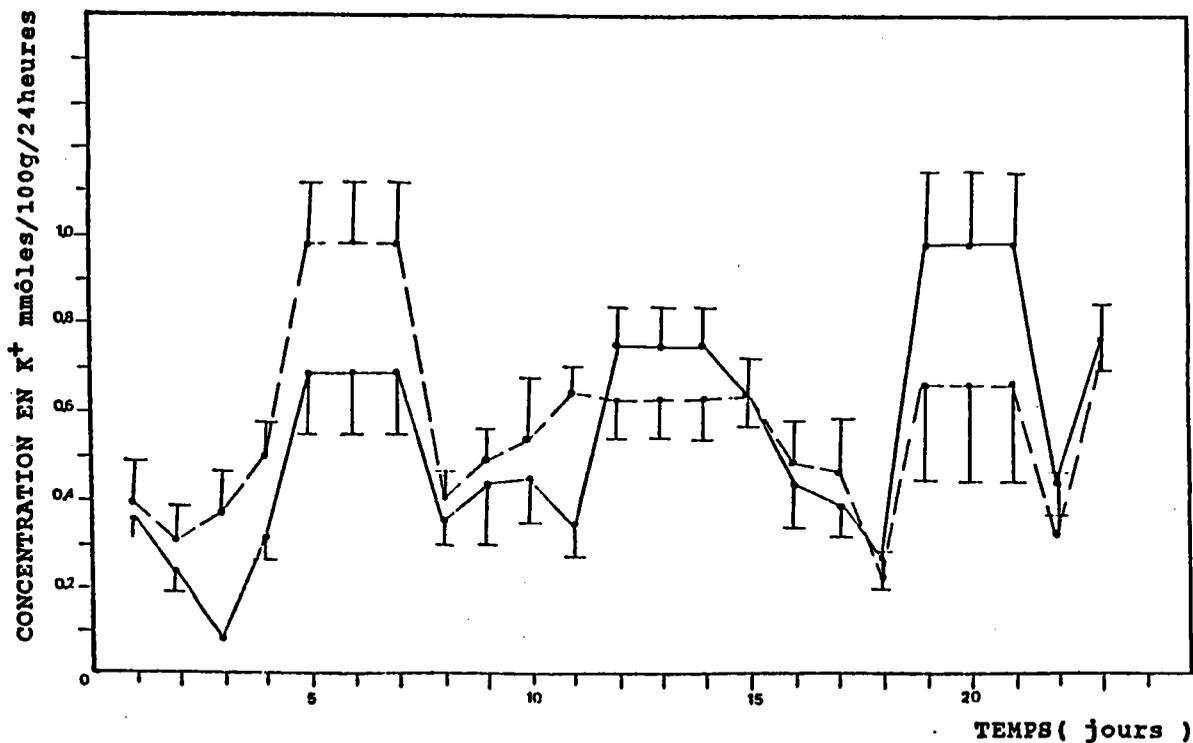


FIGURE 43 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'E.cannabinum 500 mg/kg/24heures PENDANT 21 JOURS SUR LE TAUX DE POTASSIUM URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.1)

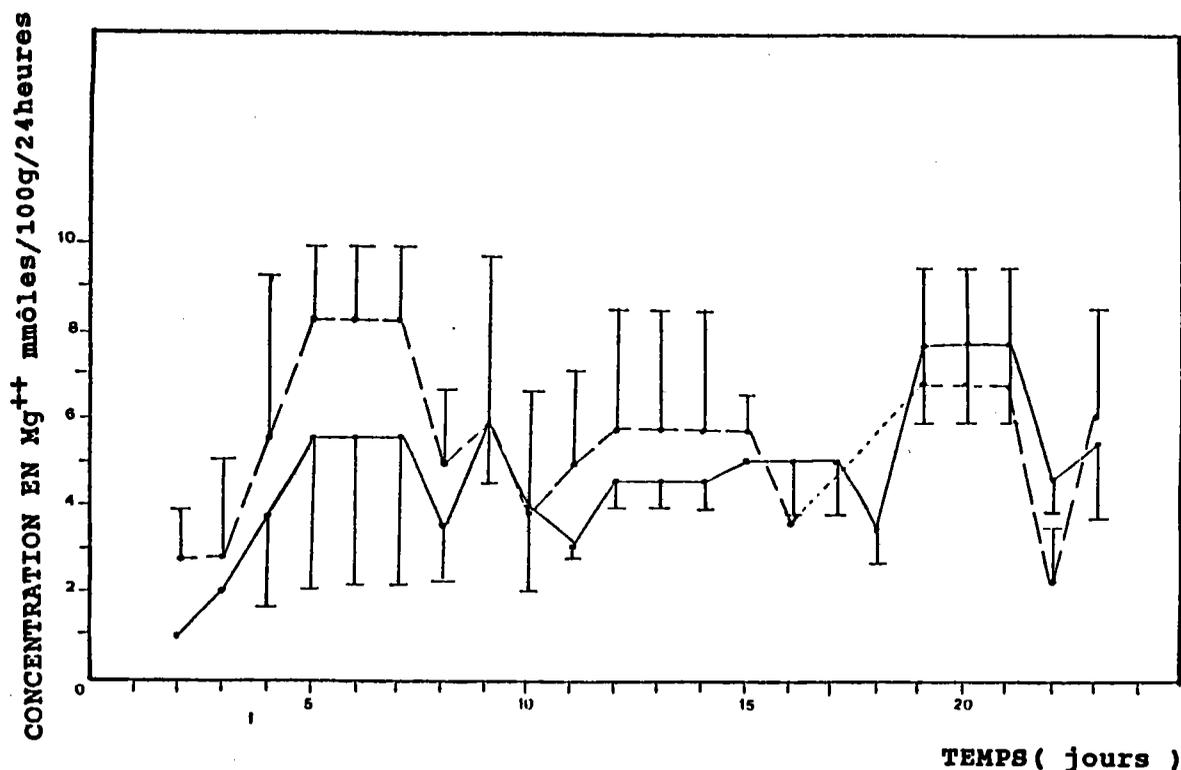


FIGURE 44 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg/24 heures PENDANT 21 JOURS SUR LE TAUX DE MAGNESIUM URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.1)

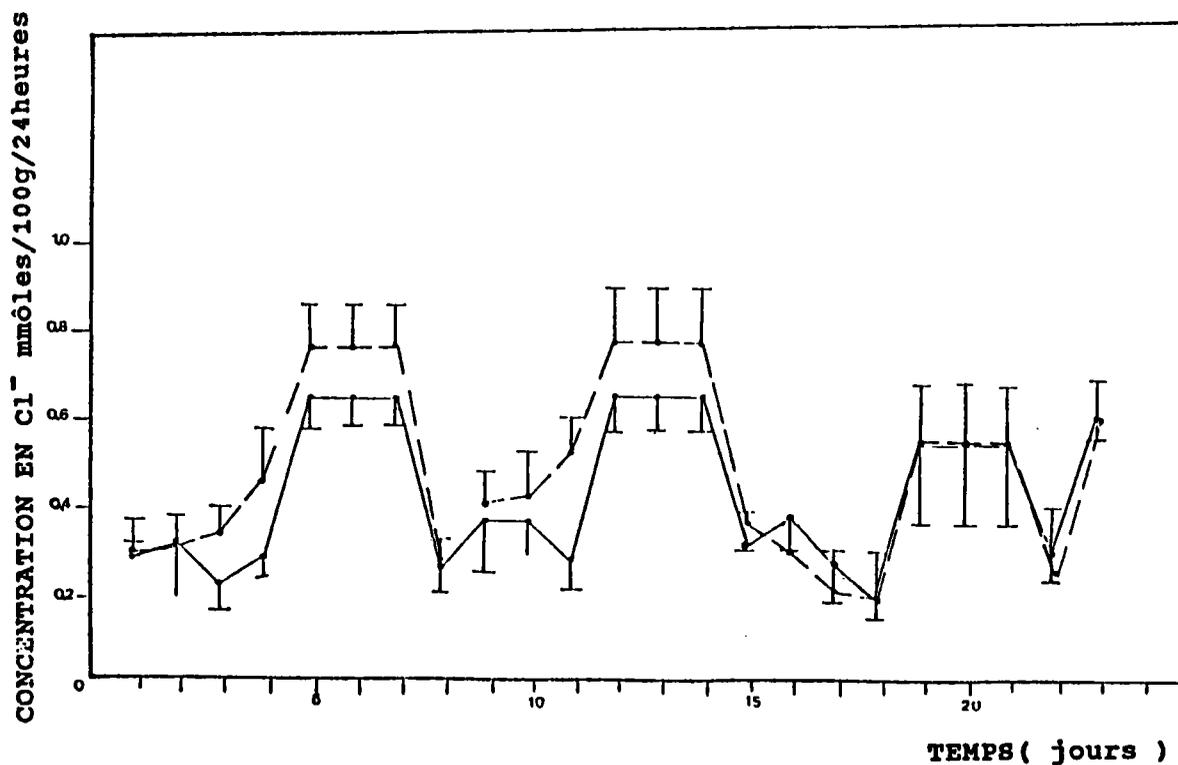
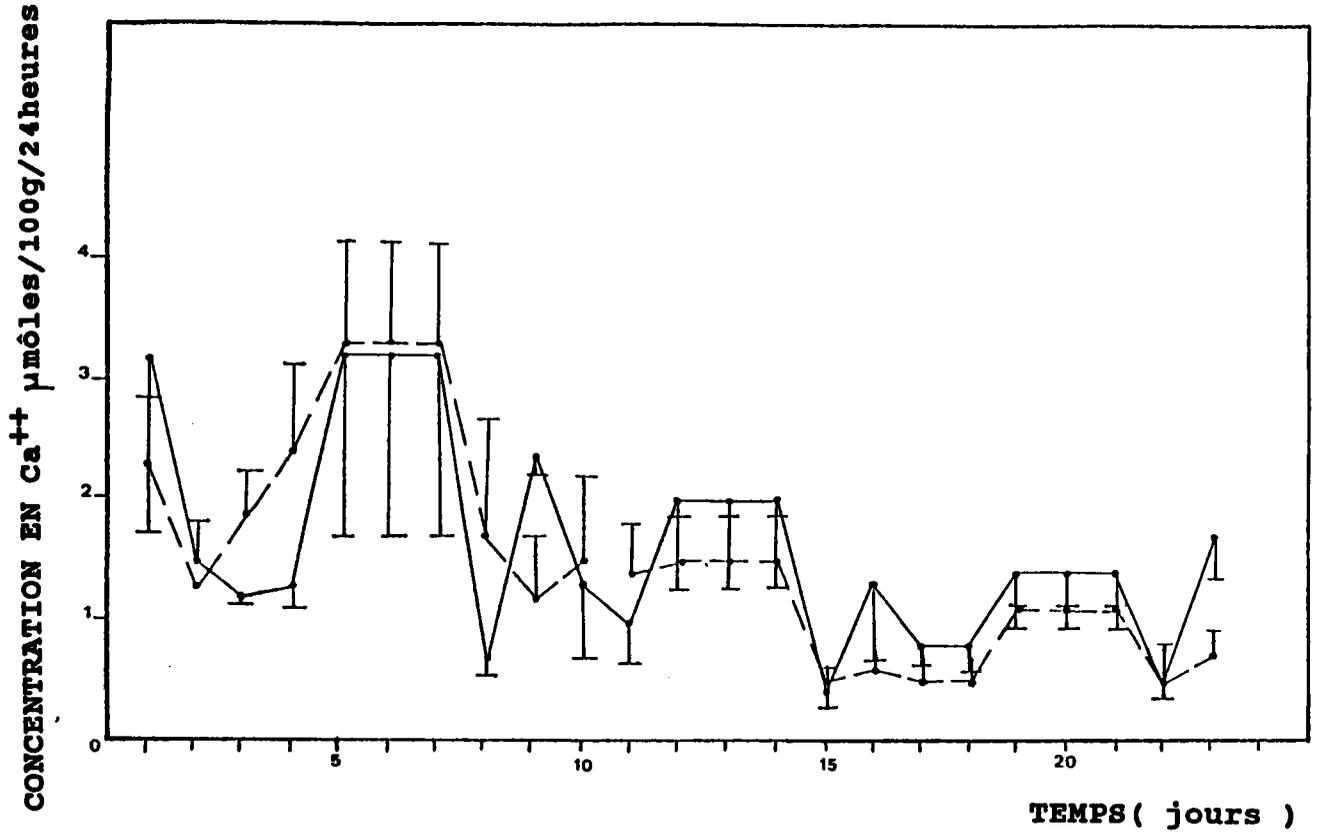


FIGURE 45 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'E.cannabinum 500 mg/kg/24heures PENDANT 21 JOURS SUR LE TAUX DE CHLORURES URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.1)

Placebo: —
E.cannabinum 500mg/kg: — —



Placebo: —
E.cannabinum 500mg/kg: - - -

FIGURE 46 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg/24 heures PENDANT 21 JOURS SUR LE TAUX DE CALCIUM URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.1)

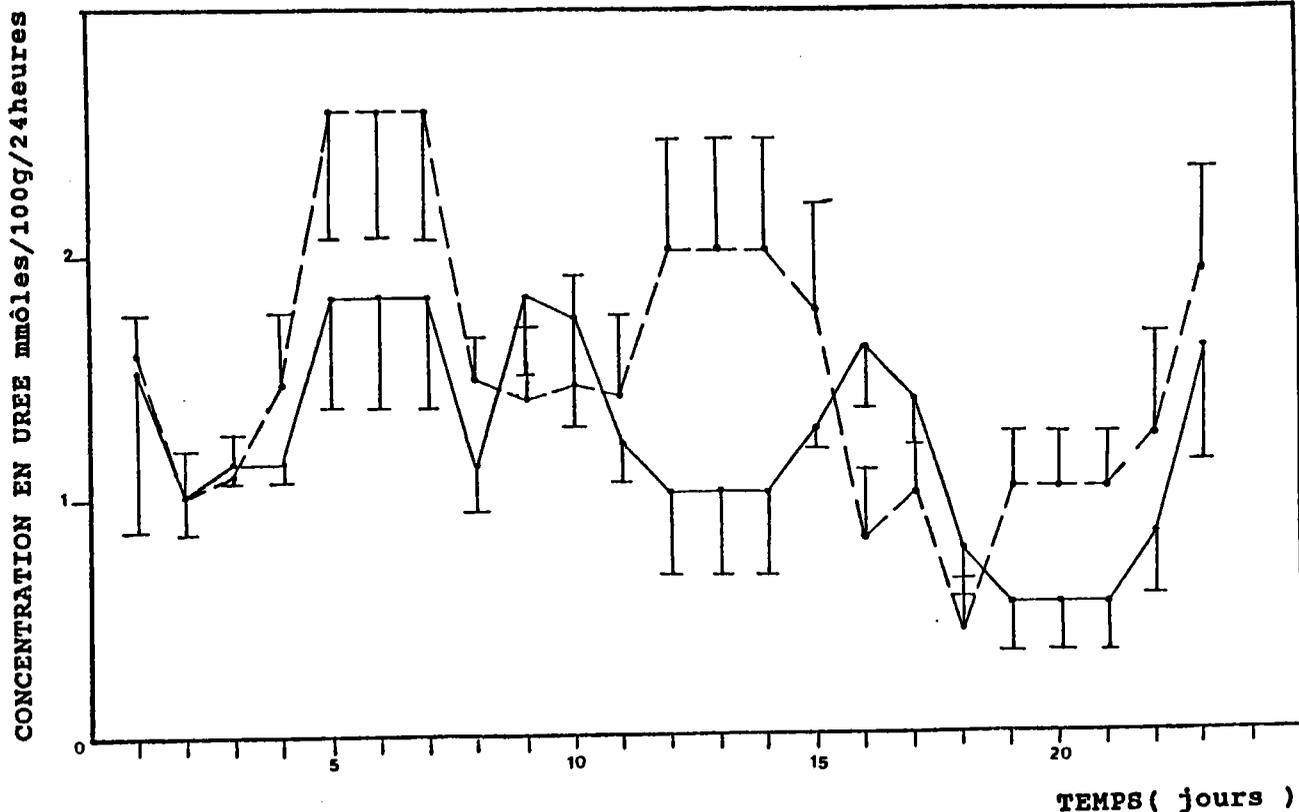


FIGURE 47 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg/24 heures PENDANT 21 JOURS SUR LE TAUX D'UREE CHEZ LE RAT (EXP.1)

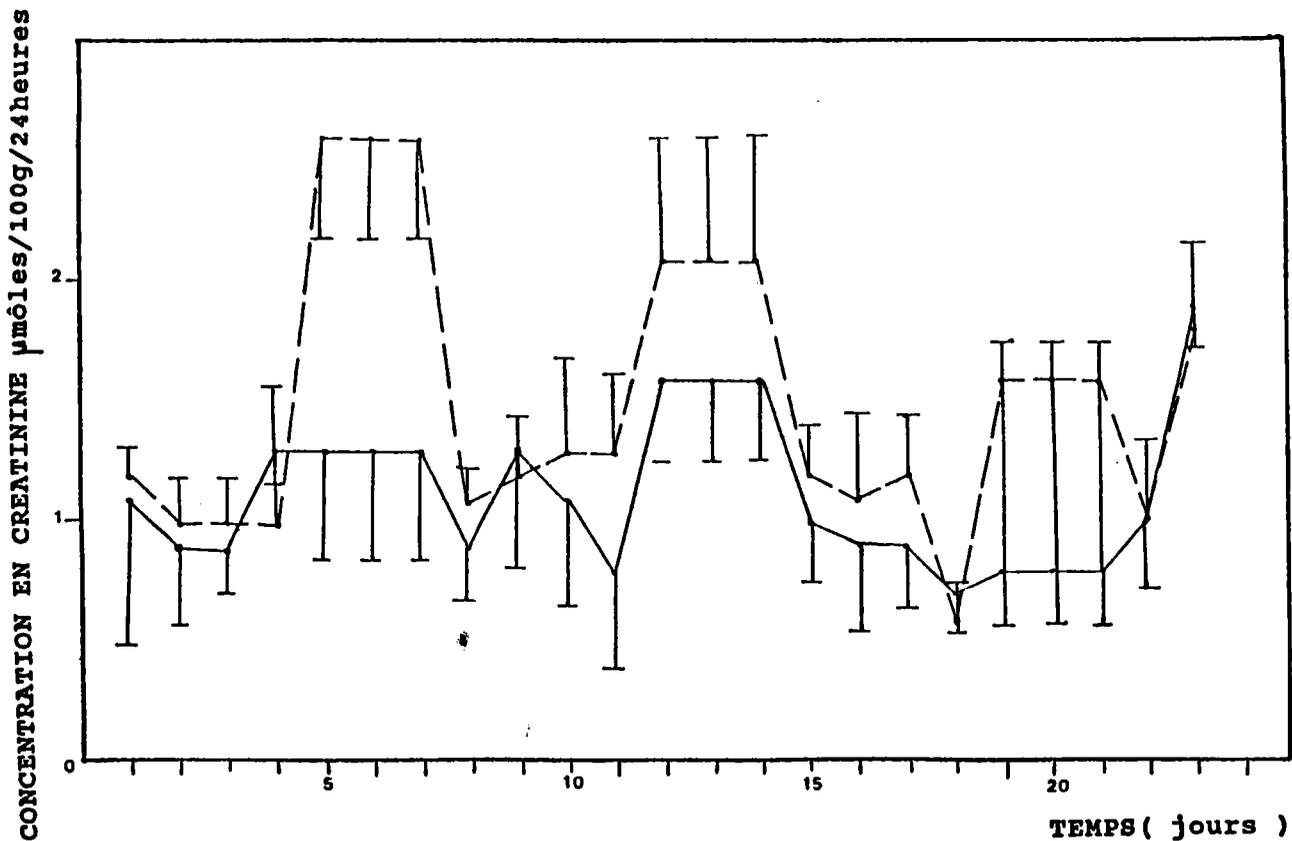


FIGURE 48 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'E.cannabinum 500 mg/kg/24heures PENDANT 21 JOURS SUR LE TAUX DE CREATININE CHEZ LE RAT (EXP.1)

Placebo: —
E.cannabinum 500mg/kg: — —

L'extrait aqueux d'E.cannabinum induit une diurèse significative moyenne de 31% sur 14 jours. Au-delà (21 jours) l'effet diurétique disparaît. Les variations de concentrations urinaires en Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{++} , urée et créatinine sont corrélées aux variations de la diurèse sur 14 jours et les différences sont toujours significatives entre lots traités et lots témoins. Seul l'ion Ca^{++} ne présente pas de variation significative (-3,4%) sur 14 jours. De plus, diurèse et concentrations ioniques suivent des fluctuations cycliques hebdomadaires.

* **Expérience 2** : l'extrait d'E.cannabinum induit une diurèse significative sur 20 jours (figure 49, tableau 37).

Dans les deux expériences, le pH ne présente pas de variations entre lots témoins et lots traités (tableau 38, figures 41 et 50).

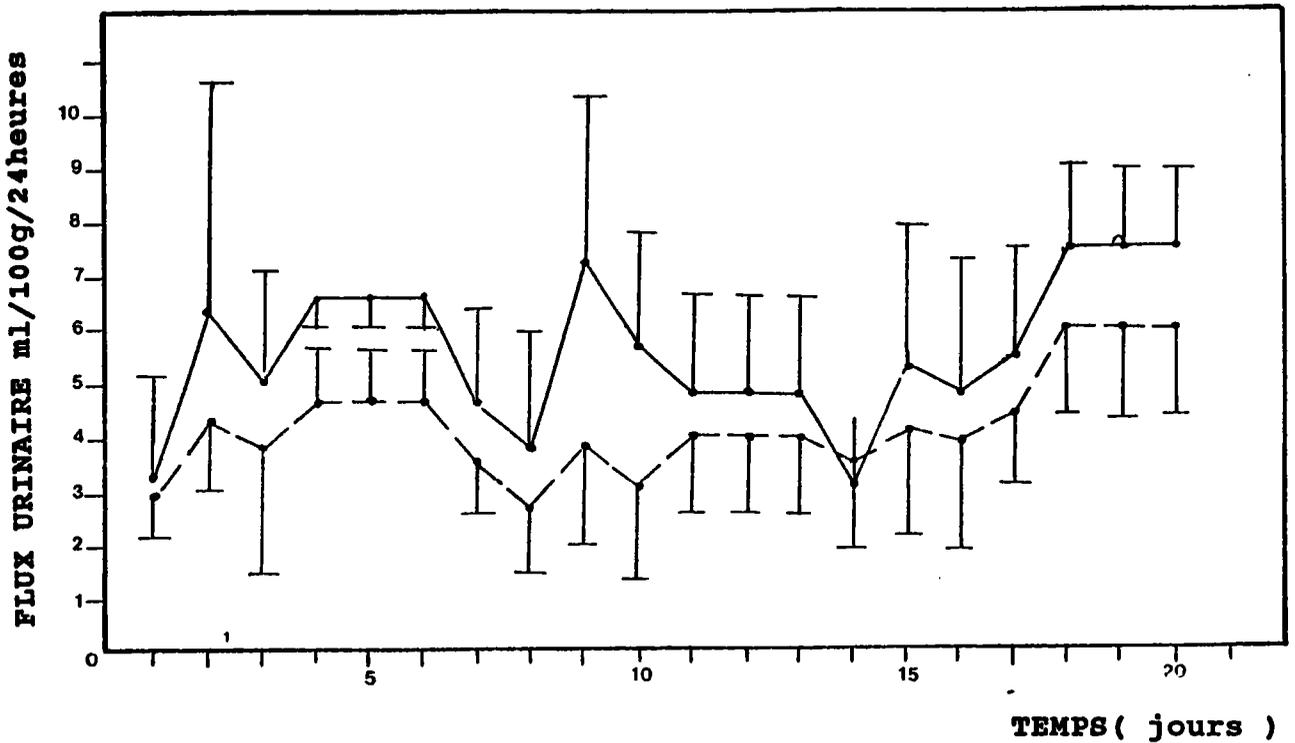


FIGURE 49 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AQUEUX D'E.cannabinum 500 mg/kg/24 heures PENDANT 21 JOURS SUR LE VOLUME URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.2)

Placebo: - - -

E.cannabinum 500mg/kg: —

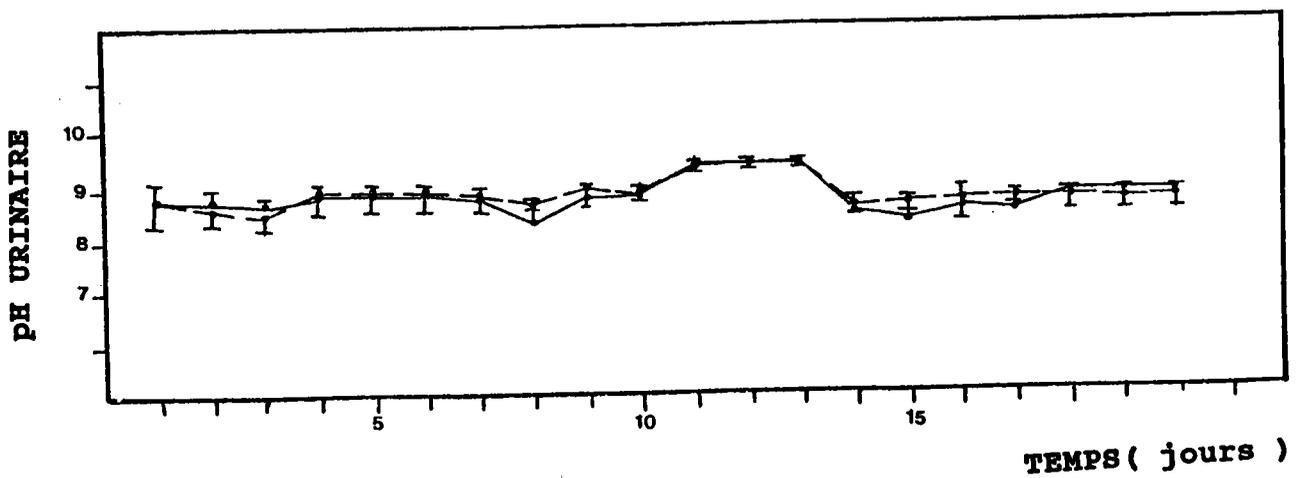


FIGURE 50 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'E.cannabinum 500 mg/kg/24heures PENDANT 21 JOURS SUR LE pH URINAIRE CHEZ LE RAT (EXP.2)

D.3 INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum L. SUR LA DIURESE AQUEUSE ET LA VITESSE D'EXCRETION URINAIRE CHEZ LE RAT EN SURCHARGE HYDRIQUE

Afin de confirmer l'activité de l'extrait aqueux d'E.cannabinum à 500 mg/kg/24 heures pendant 14 jours, nous avons utilisé la méthode consistant à administrer aux rats, placés en cage à métabolisme, une surcharge hydrique hypotonique dans laquelle sont dissous l'extrait ou le furosémide 10 mg/kg ou la solution de KNO_3 1,75 meq/l (0,087 mEq/ Kg). Cette dose a été choisie en fonction du taux de KNO_3 contenu dans un extrait de plante diurétique étudiée au laboratoire (Beaux, communication personnelle).

D.3.1.MATERIEL ET METHODES

Des rats mâles Sprague-Dawley (Iffa Credo, L'Arbresle, Fr.) de 310 à 400 g sont répartis en cages à métabolisme. Après une période d'adaptation où ils sont nourris et abreuvés ad libitum, ils sont mis au jeûne total durant les 24 heures de l'expérience. A t=0, la surcharge hydrique hypotonique de NaCl 0,45% est administrée aux rats sous un volume de 5 ml/100 g de poids corporel par voie I.P. Les produits testés sont dissous dans la surcharge :

EXPERIENCE	TEMOIN NaCl 0,45%	TRAITES
1	N=10	N= 10 (<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg, E83)
2	N=5	N= 10 (<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg, E84-4)
3	N=10	N= 10 (Furosémide 10 mg/kg)
4	N=5	N= 5 (KNO_3 1,75 mEq/l)

Les volumes urinaires cumulés sont relevés toutes les heures pendant 8 heures puis 24 heures après l'injection.

Dans les expériences 2 et 4, un prélèvement sanguin est effectué 24 heures après l'injection par le sinus veineux sous anesthésie légère à la Kétamine 100 mg/kg (Ketalar, Parke Davis, Fr.) par voie I.M.

*** Dosage ionique sur les urines et les sérums:**

Sodium et potassium sont dosés simultanément à l'aide d'un photomètre de flamme (Il, Italie) en utilisant un étalon interne de lithium. Une solution à 100 mEq de Na^+ et de 100 mEq de K^+ (50 l) dans la solution de lithium 15 mEq (qsp 10 ml) sert d'étalon.

Les chlorures sont dosés par une méthode volumétrique mercurimétrique en présence de diphényl- carbazone utilisé comme révélateur.

Une gamme étalon NaCl 50, 100, 200 mmôl/l est préparée. Le dosage en burette a lieu comme suit:

	ETALON	URINE
eau distillée	0,9 ml	0,9 ml
échantillon	-	0,1 ml
étalon	0,1 ml	-
acide nitrique diluée	4 gouttes	4 gouttes
diphénylcarbazone (0,5 ml dans l'éthanol)	10 gouttes	10 gouttes

Après virage de l'indicateur au violet, le calcul de la concentration en chlorure en mmôl/l se fait comme suit:

$$(\text{ml de nitrate mercurique/ ml de l'étalon NaCl}) / 100$$

Le pH est mesuré à l'aide d'un pHmètre (Schott-Gerate, RFA).

L'osmolarité est mesurée à l'aide d'un osmomètre (Biolyon, Fr.).

D.3.2 EXPRESSION DES RESULTATS ET STATISTIQUES

Tous les résultats sont exprimés en moyennes et erreurs standards.

* Les volumes urinaires cumulés des lots traités, exprimés en ml/100g de poids corporel, sont comparés, après contrôle de l'homogénéité des variances, aux lots témoins par le test "t" de Student.

* Les vitesses d'élimination sont évaluées par détermination graphique du temps d'élimination de 50% et 100% de la surcharge hydrique hypotonique (TE50 et TE100).

* Les concentrations (mmôl/l), les débits (mmô/l) ioniques et les pH urinaires sont analysés, après vérification de l'homogénéité des variances, par le test "t".

* La clairance est calculée comme suit

Uosm= osmolarité des urines en mosm/ml

Sosm= osmolarité du sérum en mosm/ml

V= volume urinaire en ml/100g

C= concentration osmolaire urinaire en mosm/ml

D= débit osmolaire urinaire en mosm/100g

$D(0-24h) = [V(0-8h) \cdot Uosm(0-8h)] + [V(8-24h) \cdot Uosm(8-24h)]$

$C(0-24h) = D(0-24h) / V(0-24h)$

Clairance osmolaire = $V(0-24h) \cdot [Uosm(0-24h) / Sosm(0-24h)]$

D.3.3 RESULTATS

a) Volumes urinaires (tableau 40):

* Exp.1 et 2 (figures 51 et 52) : l'extrait aqueux d'E.cannabinum (lot E.83) à 500 mg/kg présente un effet diurétique dans l'expérience 1, de 5 heures à 8 heures après l'injection de la surcharge hydrique hypotonique (30%) et 24 heures après (22%). Dans l'expérience 2, l'extrait d'E.cannabinum (E 84-4) est significativement diurétique de 4 heures à 8 heures après (50%)

* Exp.3 (figure 53): le furosémide à la dose de 10 mg/kg montre un effet diurétique significativement important les 8 premières heures (219% 2 heures après l'injection de la surcharge, 30% 8 heures après).

* Exp.4 (figure 54): le KNO_3 à 1,75 mEq/l ne modifie pas le volume urinaire par rapport au placebo.

b) Temps d'élimination de la surcharge hydrique (tableau 40 et figures 55a et 55b)

La vitesse d'élimination de 50% de la surcharge hydrique hypotonique est maximale avec le furosémide (75% par rapport au groupe "placebo") et encore importante avec E.cannabinum (27% dans l'expérience 1 et 46% dans l'expérience 2).

La vitesse d'élimination de 100% de la surcharge est presque aussi importante avec le furosémide (75% par rapport au groupe "placebo") qu'avec l'extrait aqueux d'E.cannabinum dans l'expérience 1 (71%). Par contre L'extrait est moins efficace dans l'expérience 2 (+32%).

c) Paramètres biologiques urinaires (tableau 41 à 44, figures 56 et 57):

TABLEAU 40 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum, DE FUROSEMIDE ET D'UNE SOLUTION DE KNO_3 SUR LA VITESSE D'ELIMINATION D'UNE SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE (5 ml/100g) CHEZ LE RAT

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	TEMPS D'ELIMINATION		VOLUME URINAIRE ml/100g	
		TE50%	TE100%	8H	24H
EXP.1					
Placebo	10	3h45mn	19h30mn	4,0± 0,8	5,4± 0,8
<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg(E-83)	10	2h45mn	7h00mn	5,2±1,1*	6,6± 1,1**
EXP.2					
Placebo	5	6h00mn	30h00mn	2,8±1,1	4,5± 1,5
<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg(E84-4)	10	3h15mn	20h30mn	4,2± 0,3**	5,3± 0,4
EXP.3					
Placebo	10	2h00mn	14h45mn	4,1±0,3	5,6± 0,2
Furoséide 10mg/kg	10	0h30mn	3h45mn	5,8± 0,4***	6,4± 0,0,2
EXP.3					
Placebo	5	3h45mn	14h30mn	4,4± 1,2	6,0± 1,3
KNO_3 1,75mEq	5	3h30mn	14h00mn	4,3± 1,4	5,7± 1,6

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo"(test "t") : * $p \leq 0,05$

TABEAU 41 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum, DE FUROSEMIDE ET D'UNE SOLUTION DE KNO₃ SUR LES CONCENTRATIONS IONIQUES URINAIRES CHEZ LE RAT, 8 HEURES APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	CONCENTRATIONS URINAIRES mmôles/l		
		Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
EXP.2 placebo	5	21,3± 2,7	39± 5,2	72± 8,4
E.cannabinum 500 mg/kg	10	50,8± 4,6***	45,9± 3,2*	90,2± 5,2
EXP.3 placebo	10	53,2± 6,6	52,5± 3,6	75,1± 4,9
furosemide 10 mg/kg	10	66,1± 4,1	34,1± 2,8***	76,9± 6,6
EXP.4 placebo	5	32± 4,0	38,5± 4,0	32,6± 3,5
KNO ₃ 1,75 mEq	5	39,6± 5,8	40,5± 8,6	38,1± 7,5

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" (test "t") : * p≤ 0,05. *** p≤ 0,001

TABLEAU 42 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum, DE FUROSEMIDE ET D'UNE SOLUTION DE KNO_3 SUR LES CONCENTRATIONS IONIQUES URINAIRES CHEZ LE RAT, 24 HEURES APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	CONCENTRATIONS URINAIRES mmôles/l		
		Na+	K+	Cl-
EXP.2 placebo	5	62,6± 8,8	55,9± 5,3	95,± 7,5
<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg	10	60,7± 4,3	57,9± 3,2	95,6± 4,5
EXP.3 placebo	10	72± 4,3	68,8± 4,4	79,3± 3,6
furosémide 10 mg/kg	10	67,6± 4,1	53,6± 3,2*	80,2± 3,8
EXP.4 placebo	5	37,8± 3,1	45,7± 3,8	37,4± 3,3
KNO_3 1,75 mEq	5	50,8± 5,2	48,6± 7,2	47,0± 4,9

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" (test "t") : * $p \leq 0,05$

TABLEAU 43 : INFLUENCE D'UN EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum, DE FUROSEMIDE ET D'UNE SOLUTION DE KNO₃ SUR LE DEBIT IONIQUE URINAIRE CHEZ LE RAT, 8 HEURES APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	DEBITS URINAIRES 10 ³ mmôles/100g			
		Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺ /K ⁺
EXP.2 placebo	5	58± 1	88± 3	202± 64	0,57± 0,17
E.cannabinum 500 mg/kg	10	217± 21***	193± 7***	380± 22 ***	1,12± 0,16*
EXP.3 placebo	10	215± 29	209± 13	297± 25	1,03± 0,12
furosémide 10 mg/kg	10	367± 22***	184± 12	468± 25***	1,99± 0,10***
EXP.4 placebo	5	143± 33	163± 19	149± 30	0,85± 0,15
KNO ₃ 1,75 mEq	5	170± 47	158± 35	171± 41	1,07± 0,15

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo" (test "t"): * p< 0,05
 ** p< 0,01
 *** p< 0,001

TABLEAU 44 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum, DE FUROSEMIDE ET D'UNE SOLUTION DE KNO₃ SUR LE DEBIT IONIQUE URINAIRE CHEZ LE RAT, 24 HEURES APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	DEBIT URINAIRE 10 ³ mmôles/100g			
		Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺ /K ⁺
EXP.2 placebo	5	262± 33	267± 41	427± 73	1,05± 0,16
<u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg	10	322± 25	301± 34	427± 73	1,18± 0,1
EXP.3 placebo	10	417± 36	397± 34	455± 27	1,05± 0,5
furosémide 10 mg/kg	10	430± 27	340± 23	510± 25	1,28± 0,1
EXP.4 placebo	5	227± 32	265± 15	226± 32	0,84± 0,1
KNO ₃ 1,75 mEq	5	282± 38	264± 35	261± 36	1,1± 0,13

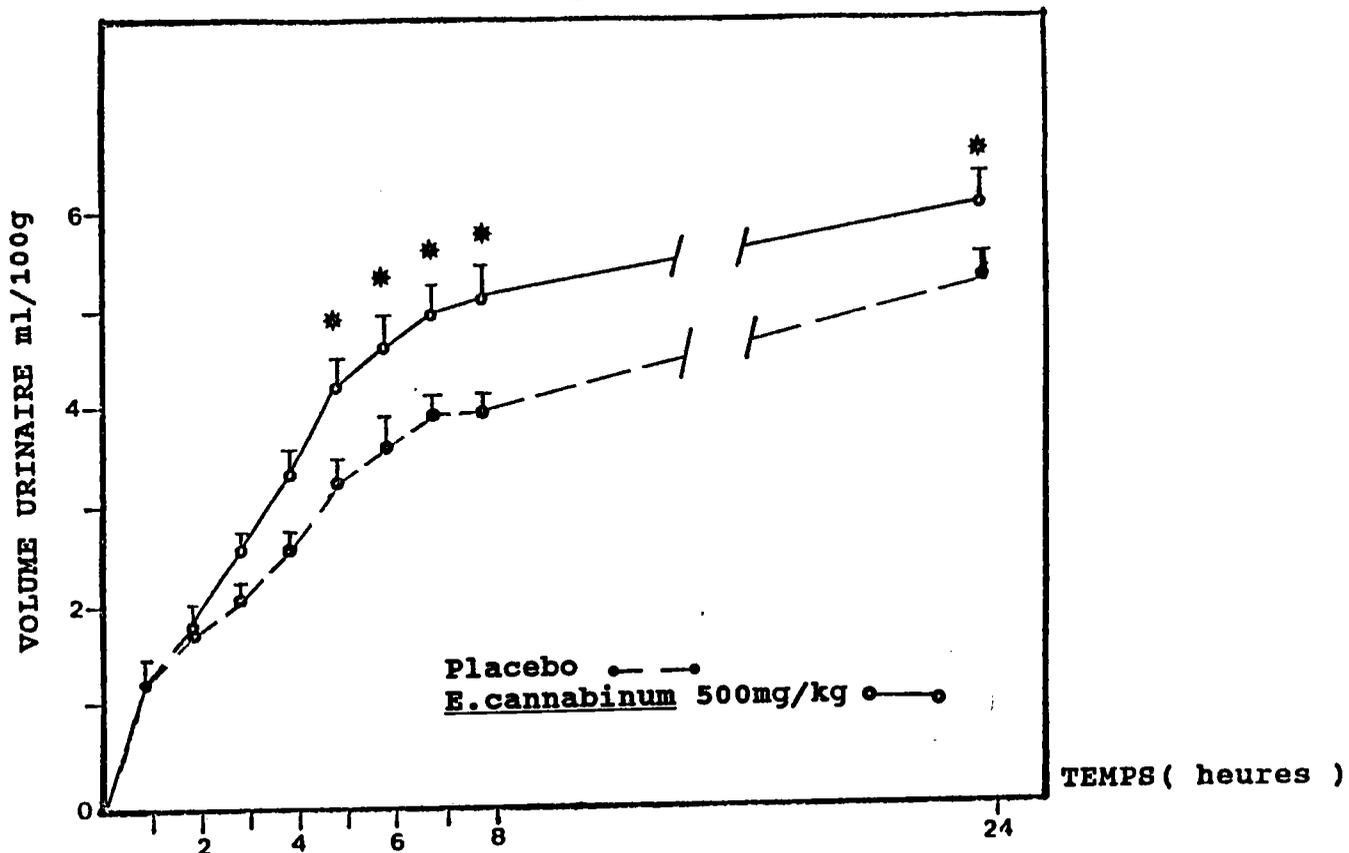


FIGURE 51 : INFLUENCE D'E.cannabinum 500 mg/kg SUR LE VOLUME URINAIRE CHEZ LE RAT EN SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE (EXP.1)

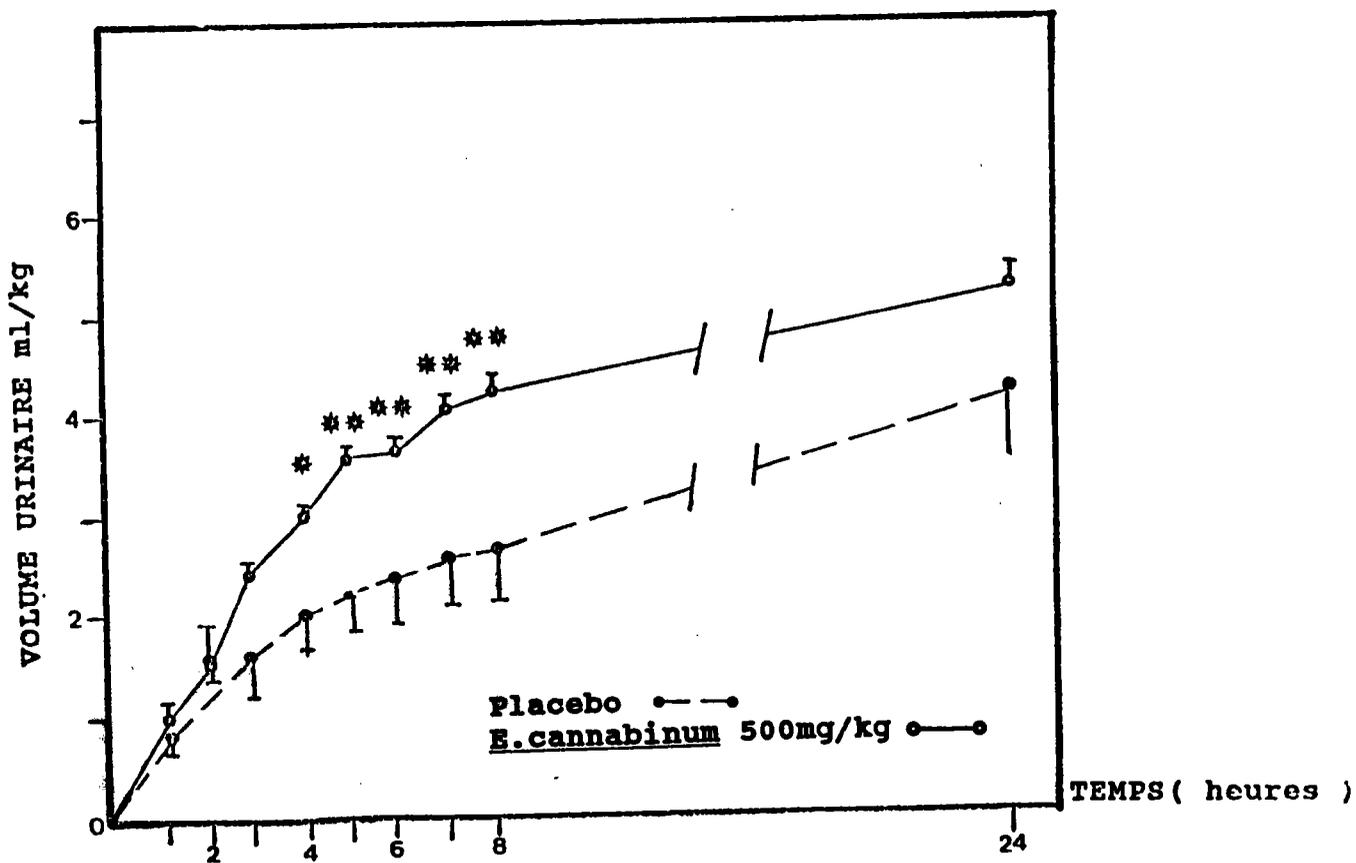


FIGURE 51 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'E.cannabinum 500 mg/kg SUR LE VOLUME URINAIRE CHEZ LE RAT EN SURCHARGE HYDRIQUE URINAIRE (EXP.2)

Huit heures après injection de la surcharge, la solution de KNO_3 (1,75 mEq) ne modifie pas les concentrations et les débits urinaires en Na^+ , K^+ et Cl^- par rapport au groupe "placebo".

Le furosémide 10 mg/kg augmente le débit en ions Na^+ et Cl^- mais n'en modifie pas leurs concentrations urinaires. Par contre la concentration en ions K^+ dans les urines est diminuée alors que son débit n'est pas modifié.

L'extrait aqueux d'E.cannabinum 500 mg/kg augmente les débits en ions Na^+ , K^+ et Cl^- et les concentrations en Na^+ et Cl^- .

Les rapports Na^+/K^+ n'augmentent significativement que 8 heures après l'injection de la surcharge, pour l'extrait aqueux et pour le furosémide.

d) Paramètres biologiques sériques (tableau 45) :

Les dosages n'ont pas été effectués dans les expériences 3 (furosémide) et 4 (KNO_3). Aucune des concentrations sériques en Na^+ , K^+ et Cl^- n'a été modifiée 24 heures après la surcharge hydrique dans l'expérience 2 (E.cannabinum).

e) pH urinaires (tableau 46):

Aucun traitement (E.cannabinum, furosémide et KNO_3) n'a modifié le pH urinaire 8 heures après la surcharge hydrique.

f) Clairance osmolaire (tableau 47):

8 heures après l'injection de la surcharge, le débit osmolaire est augmenté dans les urines mais la concentration ne varie pas. Vingt-quatre heures après l'injection, aucun des paramètres n'est modifié (débit, concentration, clairance osmolaire et clairance de l'eau libre).

TABLEAU 48 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum SUR LES CONCENTRATIONS IONIQUES SÉRIQUES CHEZ LE RAT, 24 HEURES APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	CONCENTRATIONS SÉRIQUES mmôles/l			
		Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺ /K ⁺
EXP.2 placebo	5	151,8± 3,5	4,2± 0,5	119± 2,3	36,4± 1
E.cannabinum 500 mg/kg	10	157,5± 4,2	4,4± 0,2	122± 0,9	38,1± 0,8

TABEAU 46 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum, DE FUROSEMIDE ET D'UNE SOLUTION DE KNO₃ SUR LE pH URINAIRE CHEZ LE RAT APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE

TRAITEMENT	NOMBRE D'ANIMAUX	pH URINAIRE	
		0H-8H	8H-24H
EXP.1 placebo <u>E.cannabinum</u> 500 mg/kg	5	8,78± 0,08	9,12± 0,10
	10	8,15± 0,21	8,97± 0,07
EXP.3 placebo furosemide 10mg/kg	10	8,33± 0,10	7,82± 0,24
	10	8,41± 0,11	7,63± 0,34
EXP.4 placebo KNO ₃ 1,75 mEq	5	9,05± 0,05	-
	5	9,02± 0,11	-

TABLEAU 47 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'EXTRAIT AQUEUX D'E.cannabinum SUR LE DEBIT ET LA CONCENTRATION OSMOLAIRES, LA CLEARANCE OSMOLAIRE ET LA CLEARANCE DE L'EAU LIBRE URINAIRE CHEZ LE RAT APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE

TRAITEMENTS	NOMBRE D'ANIMAUX	DEBITS		CONCENTRATION		Cosm	CH ₂ O
		mosmôles/100g		10 ⁻³ mosmôles/100g			
		0-8H	0-24H	0-8H	0-24H	0-24H	0-24H
EXP.2 placebo	5	1,15± 0,17	2,88± 0,4	42± 4	64± 9	9,77± 1,48	5,29± 0,8
<u>E.cannabinum</u>	10	1,94± 0;09***	3,58± 0,26	46± 2	67± 12	12,04± 0,87	6,77± 0,79

Différence statistiquement significative par rapport au lot "placebo (test "t") : *** p ≤ 0,001

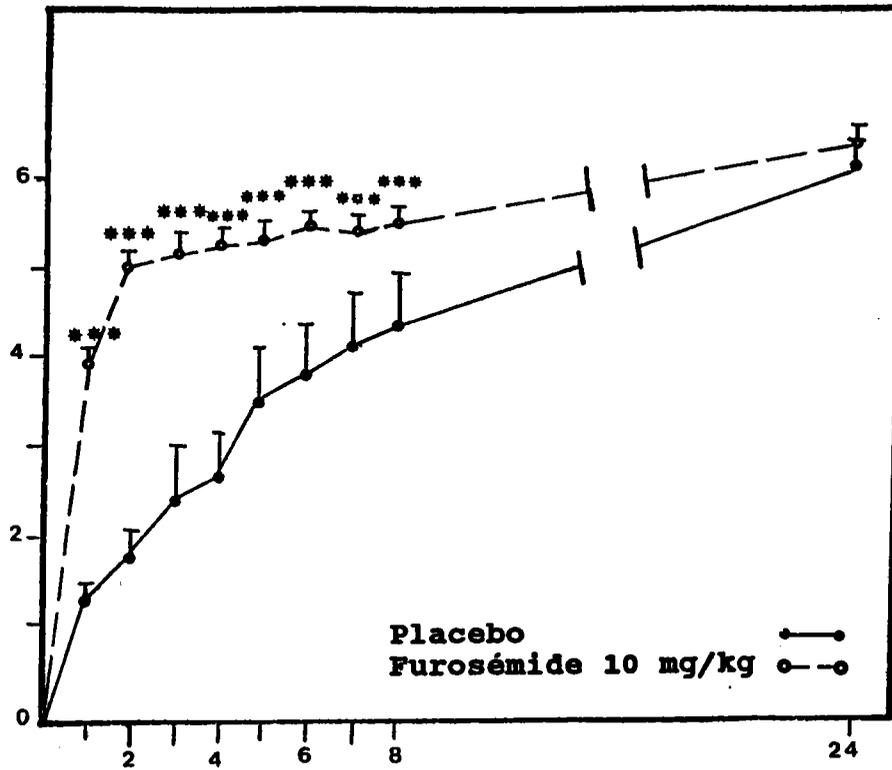


FIGURE 53 : INFLUENCE DE FUROSEMIDE 10 mg/kg SUR LE VOLUME URINAIRE CHEZ LE RAT EN SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE (EXP.3)

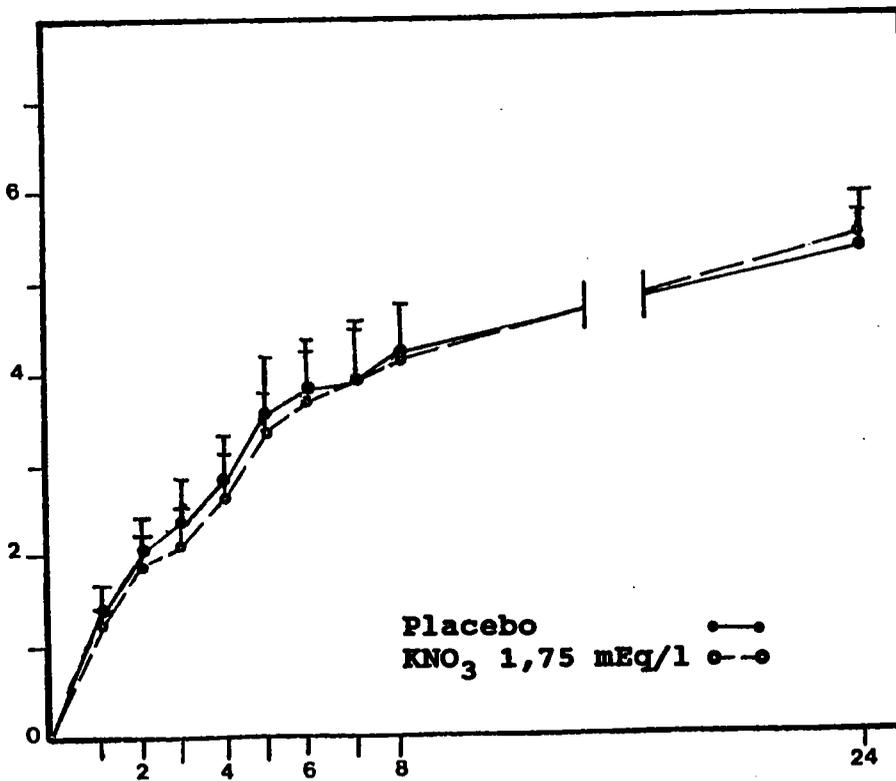


FIGURE 54 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT DE KNO₃ SUR LE VOLUME URINAIRE CHEZ LE RAT EN SURCHARGE HYDRIQUE URINAIRE (EXP.4)

Placebo 
E.cannabinum 500 mg/kg(EXP.2) 
Furosémide 10 mg/kg(EXP.3) 
 KNO_3 (EXP.4) 

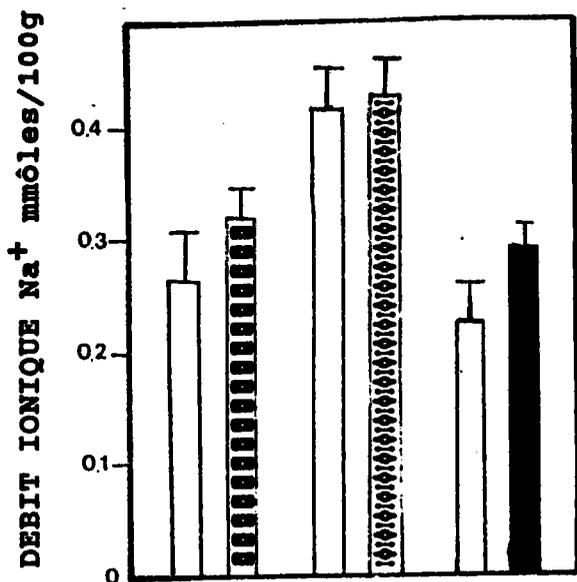


FIGURE 57a

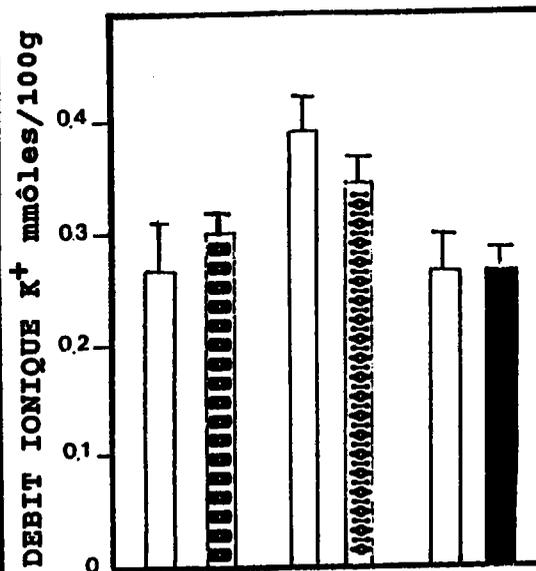


FIGURE 57b

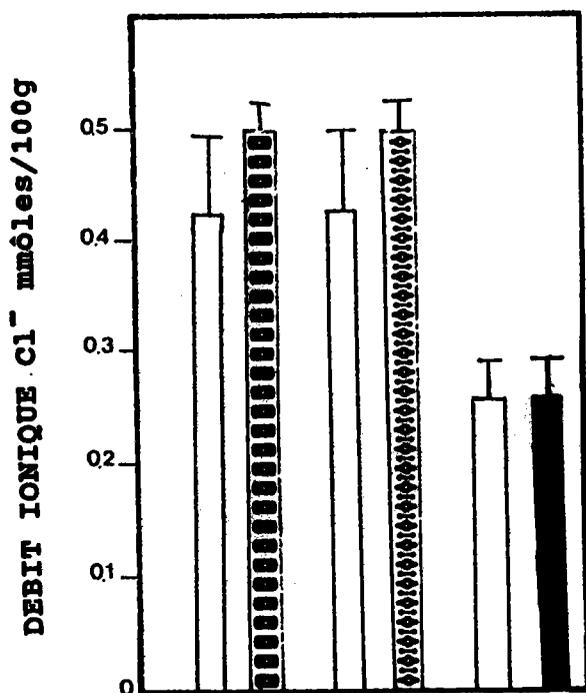


FIGURE 57c

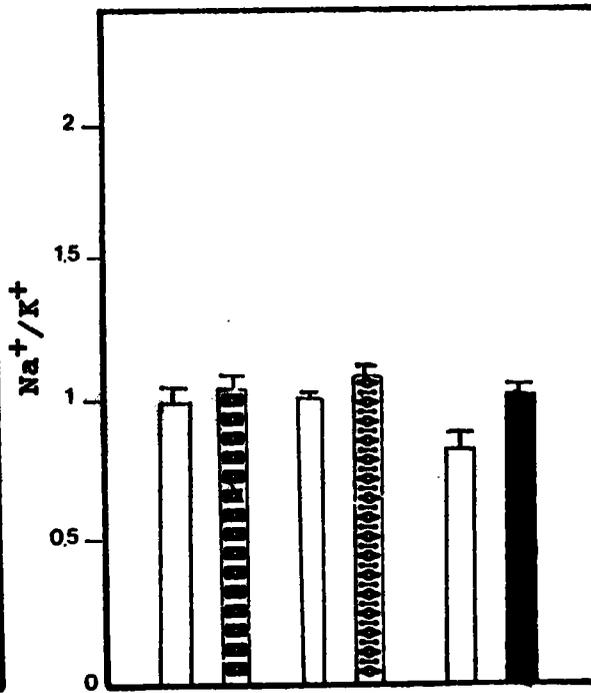


FIGURE 57d

FIGURES 57 a,b,c,d : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'E.cannabinum 500 mg/kg(EXP.1 ET EXP.2), DE FUROSEMIDE (EXP.3) ET DE KNO_3 (EXP.4) SUR LES DEBITS URINAIRES DE Na⁺(57a), K⁺(57b), Cl⁻ (57c) ET SUR LE RAPPORT Na⁺/K⁺(57d) 24 HEURES APRES SURCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE CHEZ LE RAT

Placebo



E.cannabinum 500 mg/kg (EXP.2)



Furoséide 10 mg/kg (EXP.3)



KNO_3 (EXP.4)

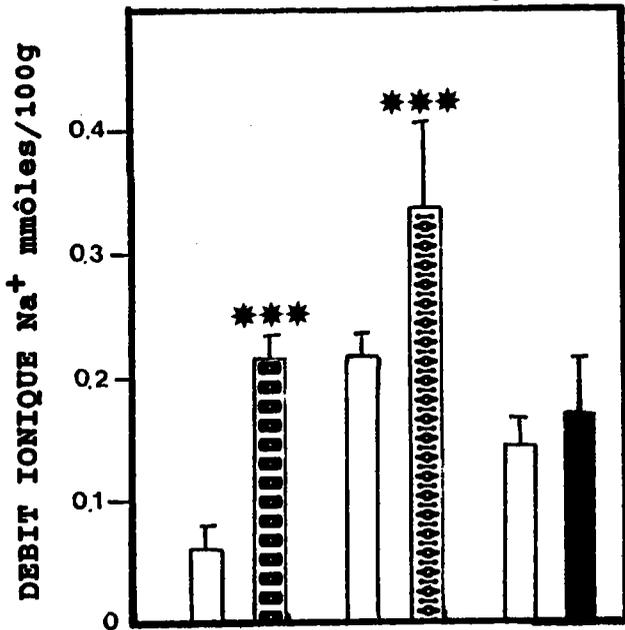


FIGURE 56a

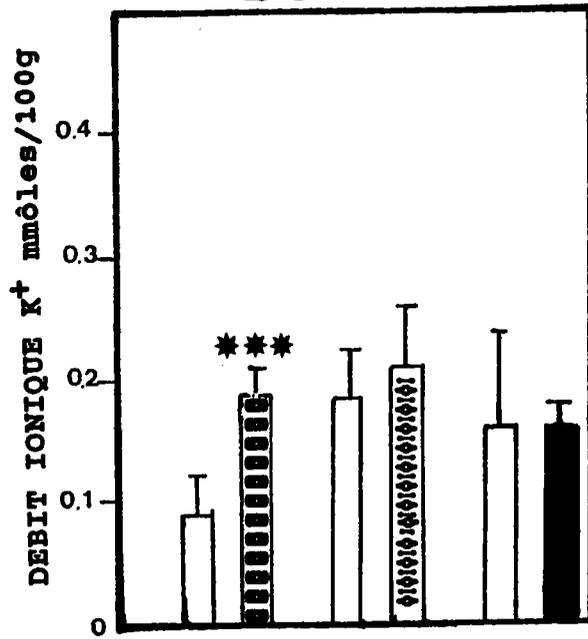


FIGURE 56b

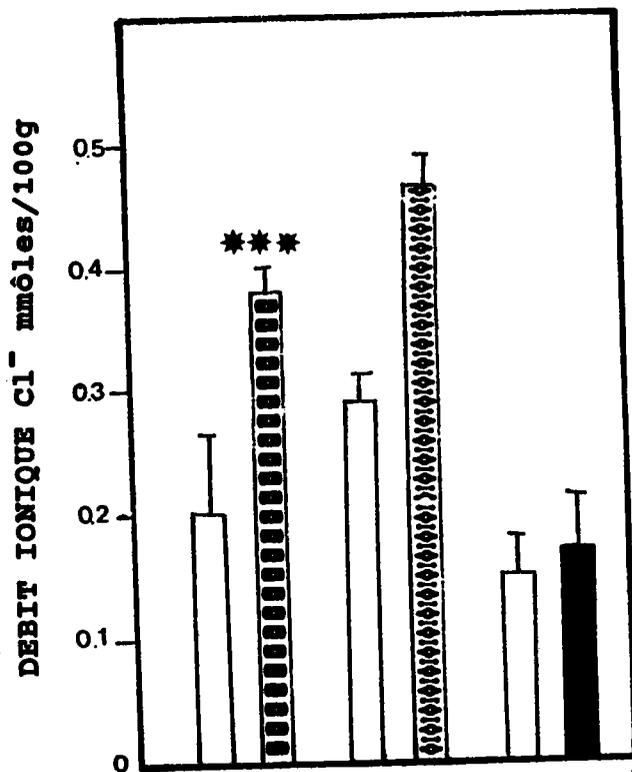


FIGURE 56c

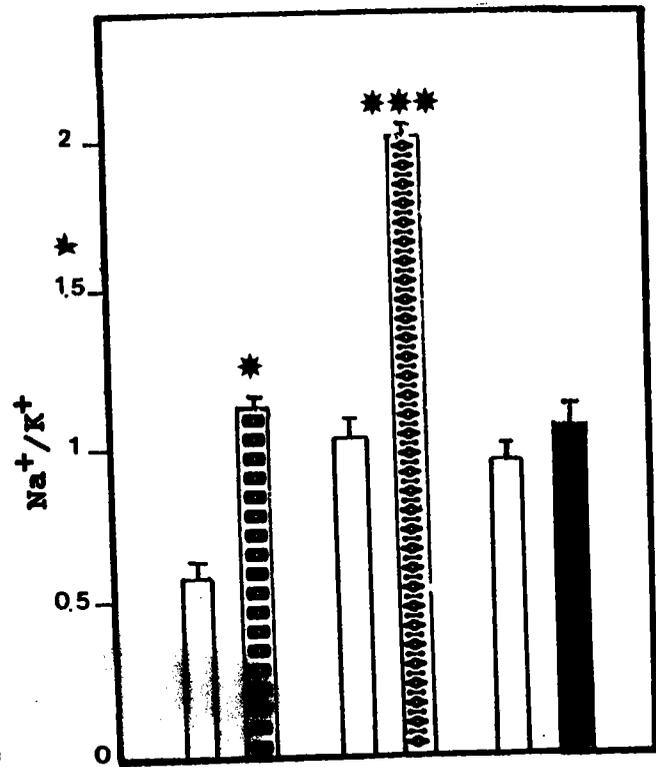


FIGURE 56d

FIGURES 56 a,b,c,d : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT D'*E.cannabinum* 500 mg/kg (EXP.1 ET EXP.2), DE FUROSEIMIDE (EXP.3) ET DE KNO_3 (EXP.4) SUR LES DEBITS URINAIRES DE Na^+ (56a), K^+ (56b), Cl^- (56c) ET SUR LE RAPPORT Na^+/K^+ (56d) 8 HEURES APRES SUCHARGE HYDRIQUE HYPOTONIQUE CHEZ LE RAT

D.4 ANALYSES DES RESULTATS ET DISCUSSION

D.4.1 MODELE CHRONIQUE

L'activité diurétique de l'extrait aqueux d'E.cannabinum a été étudiée en traitement chronique par injection orale sur 14 et 21 jours et en traitement aigu par injection I.P. simultanément à une surcharge hydrique hypotonique.

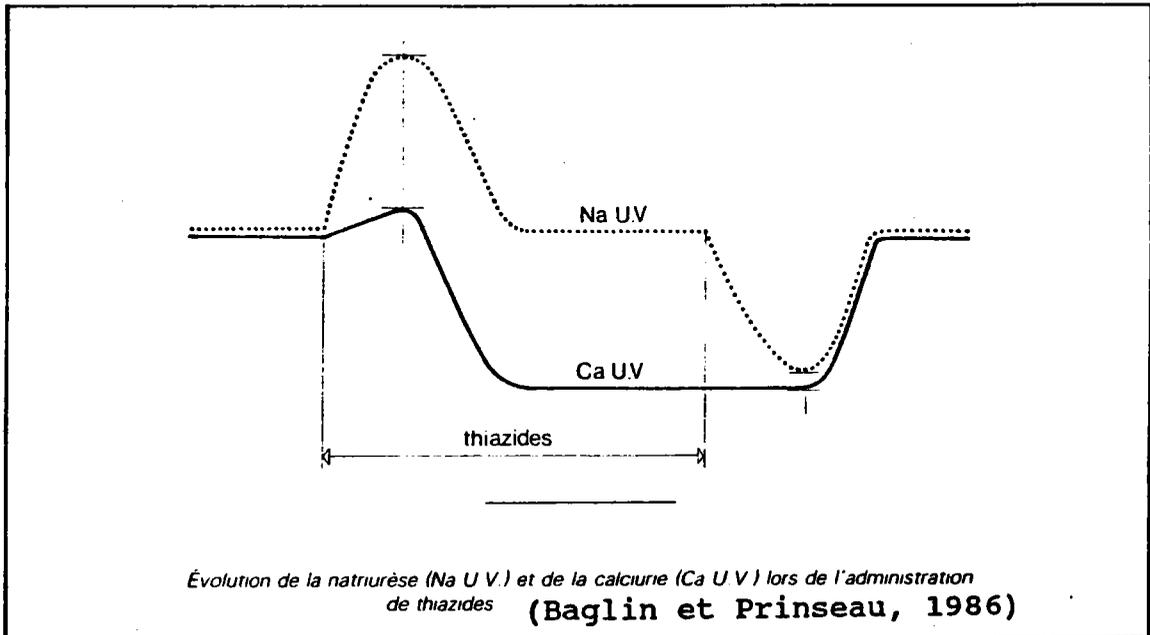
Ingéré quotidiennement à la dose de 500 mg/kg, l'extrait aqueux (lot E 83) est diurétique pendant 14 jours . Au-delà, il y a un phénomène de régulation bien connu en néphrologie, l'hypovolémie entraînant au bout de quelques semaines de traitement diurétique une baisse de filtration glomérulaire, expliquant que le lot traité urine à nouveau comme le lot "placebo".

Les principaux paramètres urinaires augmentant conjointement, nous pouvons conclure à une diurèse sans modification profonde de bilan ionique .L'analyse de la teneur en ions Na^+ et K^+ a révélé des quantités faibles (respectivement 13 Eq et 2 Eq par 100g de poids corporel et par jour).La prise normale de Na^+ chez le rat Sprague-Dawley est 63 Eq/g/jour et le surplus est excrété (Brensilver et coll., 1984).La teneur ionique de l'extrait aqueux ingéré quotidiennement n'explique donc pas l'augmentation de l'excrétion sodique et potassique. Seul l'ion Ca^{++} n'a pas présenté une augmentation de débit urinaire. Le pH urinaire n'a pas été modifié.

L'absence d'hypercalciurie chez les traités (-3,4% par rapport au lot "placebo") s'explique par une réabsorption dans la partie distale du néphron.

Normalement natriurèse et calciurèse évoluent conjointement (Baglin et Prinseau, 1986). Tout se passe comme si l'extrait aqueux agissait comme un diurétique thiazidique qui diminue la réabsorption du Na^+ à ce niveau, dans le segment cortical de dilution, la réabsorption du Ca^{++} n'étant pas modifiée ou étant augmentée. Ainsi, avec le chlorothiazide et l'hydrochlorothiazide, en début de traitement, la natriurèse augmente et la calciurie ne s'élève que peu ou pas. Après quelques jours, une hypocalciurie apparaît sauf si une compensation sodée permet de maintenir la natriurèse à un niveau élevé (Baglin et Prinseau, 1986).

Le schéma suivant résume cette action des thiazidiques:



Les conséquences d'une hypocalciurie sont mal connues et paraissent en tout cas d'importance secondaire lors des traitements thiazidiques. Une minéralisation osseuse peut apparaître à la longue. En fait il n'y a presque jamais d'hémoconcentration sauf en cas de traitement concomitant à la vitamine D ou d'hyperthyroïdisme. Par contre, cet aspect des thiazidiques a conduit à leur utilisation dans la prévention des lithiases calciques, maladies fonctionnelles faisant intervenir le volume et le pH urinaire, la calciurie, l'oxalurie et l'existence de facteurs inhibant la cristallisation (métaux à l'état de traces, pyrophosphate) ou solubilisant l'oxalate de calcium (citrate, ion magnésium) (Danielson, 1985). En outre les thiazidiques diminueraient l'oxalurie et augmenteraient la magnésurie ainsi que le Zn^{++} urinaire.

Bien sûr avant d'utiliser un thiazidique dans le traitement des lithiases calciques urinaires, il importe de rechercher une anomalie métabolique due à une alimentation particulière (eau de boisson riche en Ca^{++} , produits laitiers, apport sodé excessif) ou à une hyperuricurie

Ainsi l'extrait aqueux, en agissant dans le sens des diurétiques thiazidiques aurait l'avantage de posséder un effet bénéfique sur les lithiases calciques urinaires.

Les diurétiques thiazidiques possèdent un effet secondaire bien connu qui est l'hyperuricémie. Ici, la diurèse provoquée par l'extrait végétal n'a pas modifié le débit urique puisque la concentration d'urée augmente avec le volume urinaire.

Enfin, il n'est pas sans intérêt de noter qu'il semble exister une relation entre la rétention du calcium rénal et une activité antihypertensive (Massry, 1984).

Ce modèle chronique utilisé ici n'est pas habituellement employé dans l'étude des diurétiques de synthèse ou d'origine naturelle, sans doute à cause de la contrainte matérielle qu'il représente, ceci excluant une comparaison intéressante avec la bibliographie. L'extrait aqueux d'E.cannabinum peut cependant être comparé aux extraits d'Anisotes trisulcus et de Pulicaria dysenterica, deux plantes de la pharmacopée yéménite à réputation antilithiasique et diurétique, obtenus par lixiviation dans l'éthanol et étudiés selon ce protocole (Fleurentin, 1983) : ces 2 extraits, administrés en même temps à 100 mg/kg chacun, ont augmenté le flux urinaire de 40% sur 14 jours et ont provoqué aussi une légère baisse de l'élimination du Ca^{++} ainsi qu'une augmentation du pH urinaire. L'effet diurétique obtenu est du même ordre de grandeur que celui obtenu avec E.cannabinum. Malheureusement, la composition chimique de ces extraits n'est pas connue mais il est intéressant de constater que leur utilisation traditionnelle a été confirmée expérimentalement non seulement comme diurétiques mais comme antilithiasiques.

D.4.2 MODELE AIGU

Dans le modèle utilisant l'injection I.P. de l'extrait simultanément à une surcharge hydrique hypotonique, la diurèse a été stimulée. Il apparaît que le lot E84-4 agit plus rapidement que le lot E 83 sur l'élimination de 50% de la surcharge mais l'élimination totale est plus rapide avec E-83 qu'avec E84-4. Cependant ce n'est pas forcément une variation de la composition chimique de l'extrait qui est en cause mais les animaux eux-mêmes car les expériences n'ont pas été menées conjointement avec un même lot d'animaux. Or des variations importantes de la vitesse d'élimination de la surcharge hypotonique ont été observées tout au long de l'année dans les lots "placebo" constitués d'animaux provenant pourtant du même élevage, de même âge et de même poids (Beaux, communication personnelle).

D'autres caractéristiques de l'effet diurétique d'E.cannabinum peuvent être dégagées de l'analyse des résultats :

- 1) l'effet salidiurétique est important comme en témoigne l'augmentation significative des concentrations urinaires en Na^+ et K^+ à 8 heures.
- 2) l'effet salidiurétique est persistant comme le montre l'élévation encore importante bien que non significative des débits urinaires en Na^+ , K^+ et Cl^- à 24 heures, valeurs redevenues normales alors dans le lot traité au furosémide.

Le furosémide à 10 mg/kg présente une diurèse très élevée les deux premières heures puis se stabilise par la suite.

L'action de ce produit de synthèse est rapide, importante et brève.

Par contre si les débits urinaires en Na^+ et Cl^- se sont élevés 8 heures après la surcharge, le débit urinaire en K^+ a baissé alors que ce diurétique de l'anse possède normalement l'inconvénient d'être hypokaliémiant : 219% d'augmentation du débit en K^+ avec l'extrait aqueux contre une diminution de 88% pour le lot traité au furosémide. D'ailleurs le débit en Na^+ 8 heures après l'administration de la surcharge a augmenté moins que dans le lot traité avec l'extrait de plante proportionnellement au placebo : 374% d'augmentation du débit en Na^+ pour l'extrait contre 171% pour le furosémide. Cependant le fait que les expériences n'aient pas été faites au même moment donc avec les même animaux rend le commentaire délicat. A titre comparatif, les travaux d'Andreani et coll. (1987) peuvent être cités : chez le rat en surcharge aqueuse per os (25 ml/kg), le furosémide 10 mg/kg induit une augmentation très importante du débit en Na^+ (+758%) et moindre en K^+ (268%) 3 heures après injection mais ces débits reviennent aux valeurs normales comme la diurèse d'ailleurs, 6 heures après. Les travaux de Nakamura et coll. (1988) sur le rat laissent aussi apparaître une très forte natriurèse pendant une à deux heures après une injection I.V. de furosémide 10 mg/kg. Ces auteurs comparent l'effet du furosémide à celui d'un diurétique thiazidique (trichlorothiazide) et constatent dans les mêmes conditions une natriurèse moins forte mais plus persistante dans le temps. Enfin, ils comparent les résultats obtenus avec diverses espèces et remarquent qu'il existe de grandes différences d'une espèce à l'autre; l'intensité de la natriurèse sous furosémide diminue dans l'ordre suivant : chien < souris < singe < rat. Cette différence entre espèces peut expliquer nos résultats chez le rat. La voie d'injection et la dose aussi sont différentes des exemples rencontrés dans la littérature et peuvent avoir une importance non négligeable sur les effets du furosémide. En fait, avec le furosémide, la natriurèse et la chlorurèse sont plus importantes que la kaliurèse (voir tableau 37 des principaux diurétiques).

Le nitrate de potassium à 1,75 mEq/l soit 0,087 mEq/Kg, dose moindre que celle contenue dans l'extrait (0,26 mEq / 500 mg de plante sèche / Kg de poids corporel) n'a pas modifié la diurèse et le vitesse d'élimination de la surcharge ce qui n'est pas surprenant car même un pouvoir osmotique diurétique aurait du mal à s'expliquer à des doses de cet ordre de grandeur. Un apport de K^+ est directement régulé par l'aldostérone qui stimule son excrétion au niveau du tube distal : son élimination est alors augmentée mais elle n'entraînera pas une élimination d'eau plus grande. Si les sels de potassium devaient agir par leur pouvoir osmotique, il faudrait alors une solution de l'ordre d'une centaine de mosmôles. La bibliographie imputant l'action diurétique d'extraits aqueux à leur teneur en sels de potassium est obsolète car aucune diurèse tant pharmacologique qu'osmotique ne semble pouvoir être attribuée aux sels de potassium.

Enfin, si le débit osmolaire dans les urines 8 heures après la surcharge a augmenté consécutivement à l'augmentation des ions Na^+ , K^+ et Cl^- dans le lot traité avec la plante, la clearance osmolaire et la clearance de l'eau libre n'ont pas été modifiées 24 heures après l'injection de la surcharge .

Ainsi l'extrait aqueux d'E.cannabinum se révèle être un diurétique intéressant : son pouvoir salidiurétique (natriurétique, chlorurétique et kaliurétique) l'emporte même sur son pouvoir d'élimination aqueuse; l'effet sans être aussi puissant que celui du furosémide n'en est pas moins persistant et s'apparente à la famille des diurétiques thiazidiques de par la baisse de l'élimination urinaire du Ca^{++} , favorable en cas de lithiase calcique. Il importe enfin de remarquer qu'aucune toxicité ni perte de poids n'a été observée chez les animaux dans les deux modèles. L'utilisation traditionnelle se voit là encore confirmée par des modèles expérimentaux, le modèle aigu, bien qu'artificiel se voyant conforté par le modèle chronique, plus proche de la posologie recommandée.

Quant à vouloir rechercher le ou les principes actifs, la tâche serait ardue du fait de l'absence de bibliographie suffisamment riche.

Les acides-alcools, l'acide hydroxyméthylacrylique obtenu par hydrolyse de l'eupatoriopicrine par exemple pourraient participer à l'effet diurétique (Mortier, 1972) mais il ne faut pas oublier la présence des acides-phénols et des autres lactones sesquiterpéniques car ceux-ci participent vraisemblablement au pouvoir cholérétique de l'extrait et cholérèse et diurèse semblent être souvent associées en phytothérapie, d'autant que nombreuses Asteraceae des régions tempérées possèdent ces deux propriétés associées. Enfin l'extrait aqueux renferme vraisemblablement de nombreux sucres qui seraient susceptibles de posséder un pouvoir osmotique mais ils n'expliquent pas le fort pouvoir salidiurétique observé.

CONCLUSION



CONCLUSION

Cette approche ethnopharmacologique d'E.cannabinum L., qui consistait à confirmer ou infirmer expérimentalement les données de la tradition thérapeutique traditionnelle dans le domaine hépato-rénal, s'est déroulée en trois temps :

1) L'étude bibliographique a permis de rendre compte d'une convergence d'utilisation de la plante dans la médecine savante ancienne et dans la médecine traditionnelle en Europe et en Inde, où cette plante est endémique. Son usage constant et unanime pour lutter contre les maladies de foie et ses propriétés diurétiques sont mentionnées suffisamment pour que l'on ait choisi de s'y intéresser au cours de notre étude. Son usage tomba en désuétude au vingtième siècle mais cette plante connaît un regain d'intérêt depuis une vingtaine d'années par le biais de la découverte, dans ses parties aériennes, de lactones sesquiterpéniques, cytostatiques et antitumorales comme de nombreuses espèces d'Eupatorium américaines.

* Outre une teneur non négligeable en lactones sesquiterpéniques, la plante renferme de nombreux terpènes (triterpènes et stéroïdes, diterpènes, monoterpènes, huile essentielle), des flavonoïdes, des alcaloïdes purrolizidiniques, des acides-phénols, des acides-alcools, des dérivés de benzopyranne et de benzofuranne et des sucres.

* Cette plante ne renferme pas de composés chimiques potentiellement toxiques mais plutôt pharmacologiquement intéressants.

2) La détermination du mode de préparation de l'extrait végétal a elle aussi été établie en fonction de l'usage traditionnel c'est-à-dire par décoction-macération. L'établissement de ce mode de préparation et sa caractérisation chimique ont permis de standardiser le produit testé.

L'extrait aqueux d'E.cannabinum révèle en chromatographie sur couches minces une lactone sesquiterpénique (eupatoriopicrine), des flavonoïdes (rutoside, hyperoside, quercétine), des acides-phénols (acides caféique et chlorogénique), un acide-alcool (acide malique) et un alcaloïde non identifié. Ce procédé d'identification est bien évidemment grossier mais il présente l'avantage de détecter rapidement, à moindre frais et donc dans un but de standardisation de qualité et de quantité, les composés chimiques les plus sûrement présents dans l'extrait.

3) L'étude pharmacologique a pu alors être entreprise, après constatation de l'absence de toxicité aiguë chez la souris.

Les propriétés hépatotropes de l'extrait aqueux d'E.cannabinum ont été confirmées au cours de l'étude de ses effets cholérétiques et antihépatotoxiques.

* Propriétés stimulantes du flux biliaire

** L'extrait aqueux d'E.cannabinum en injection intraveineuse stimule le flux biliaire chez le rat.

*** L'effet est fonction de la dose : l'activité est maximale à la dose de 250 mg de plante sèche/kg. A dose moindre, l'extrait perd rapidement son effet; à dose plus élevée, l'extrait reste cholérétique mais avec une efficacité moindre.

*** La dose de 250 mg/kg est du même ordre que celle recommandée dans la posologie traditionnelle lorsque la plante est prescrite en décoction ou en infusion.

*** L'effet est fonction du temps : son pouvoir cholérétique reste modéré mais persistant dans le temps à la différence du sel biliaire utilisé comme référence et dont l'effet est bref mais intense. Néanmoins, l'extrait aqueux à 250 mg/kg est plus cholérétique sur 150 minutes que le DHC à 10 mg/kg.

** Le flux biliaire stimulé est d'origine hépatocytaire comme l'a démontré la relation linéaire entre le flux biliaire et la clairance à l'érythritol. L'extrait aqueux stimule la fraction indépendante des acides biliaires.

** L'étude comparative avec les extraits totaux de plantes étudiées au laboratoire révèle le fort pouvoir cholérétique d'E.cannabinum pour une dose posologique faible. Par comparaison avec les extraits végétaux étudiés dans la littérature, une remarque identique concernant la dose peut être faite.

** L'approche de la relation structure/activité laisse supposer que l'extrait doit son effet cholérétique à la présence d'acides-phénols et de lactones sesquiterpènes riches en groupements acetoxy-.

* Propriétés antihépatotoxiques

** Un prétraitement de l'extrait aqueux injecté en I.V. aux doses de 500 à 1000 mg/kg est antihépatotoxique chez le rat sur un modèle expérimental d'hépatite induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) comme le démontre la diminution de la fuite des transaminases plasmatiques (ALAT).

*** Administré en pos-traitement 30 minutes après, l'extrait garde encore son activité.

*** Ce pouvoir est du même ordre que celui obtenu avec un hépatoprotecteur d'origine naturelle choisi comme référence, la silymarine extraite de Silybum marianum Gaertn.

*** Les doses actives sont du même ordre que celles de la posologie traditionnelle.

** Les propriétés antihépatotoxiques de l'extrait ont ensuite été étudiées in vivo chez la souris.

*** Nous avons, dans un premier temps, cherché à mettre au point un test de mesure du temps de sommeil barbiturique chez la souris intoxiquée au CCl_4 , de manière à rendre compte de l'éventuelle action antihépatotoxique de l'extrait aqueux, visualisé par une diminution du temps de sommeil, mais des problèmes méthodologiques sont apparus.

*** Le même modèle d'intoxication expérimentale au CCl_4 que celui étudié chez le rat a été adapté avec succès chez la souris et il a été obtenu une meilleure reproductibilité des résultats sur la fuite des ALAT.

*** L'extrait aqueux est antihépatotoxique vis-à-vis du CCl_4 lorsqu'il est injecté chez la souris en I.V. 30 minutes avant le toxique.

*** L'efficacité d'un post-traitement 30 minutes après chez le rat n'a pas été retrouvé chez la souris.

*** l'extrait est également efficace chez la souris aux doses de 500 à 1000 mg/kg. Au-dessous, l'extrait perd son activité. Il n'a pas été mis en évidence de relation dose/effet.

** L'approche du mécanisme d'action antihépatotoxique de l'extrait aqueux a été réalisée sur un modèle in vitro d'hépatocytes isolées de rat.

*** Les résultats obtenus in vivo chez le rat et la souris intoxiqués au CCl_4 ont été reproduits sur ce modèle pour lequel les doses de 1,25 à 5 mg/ml de suspension hépatocytaire sont efficaces.

*** Avec un toxique plus spécifique des processus de lipoperoxydation, le *terbutylhydroperoxyde*, il a pu être démontré l'incapacité de l'extrait à bloquer la lipoperoxydation par le dosage de la malonaldéhyde. L'extrait n'intervient pas au niveau de la lipoperoxydation.

*** Au moyen d'un test simple, il a pu être démontré l'inefficacité de l'extrait à inhiber le radical diphenylpicrylhydrazyl comparativement à un extrait de Rosmarinus officinalis actif étudié au laboratoire. L'extrait n'a pas de pouvoir antiradicalaire.

*** Il paraissait séduisant d'approcher le mécanisme d'action au travers d'un seul principe actif contenu dans la plante. Pourtant l'expérience prouve, notamment pour les plantes "douces" c'est-à-dire sans principe actif toxique en quantité importante, que l'activité pharmacologique rencontrée avec un "totum" se perd très souvent après fractionnement. L'eupatoriopicrine a été choisie pour plusieurs raisons : son originalité dans le règne végétal puisqu'elle ne se rencontre que dans quelques Asteraceae, sa quantité importante dans la plante et dans l'extrait et son activité pharmacologique déjà éprouvée (antitumorale). L'EUPP a été testée à la dose contenue dans 500 mg de plante sèche/kg, soit 5 mg d'EUPP/kg, sur le test de l'hépatite induite au CCl_4 chez la souris : aucune efficacité de ce composé n'a été observée à cette dose. Nous n'avons pas recherché d'activité des divers autres composés car aucun parmi eux ne présentait véritablement d'originalité. La littérature était déjà prolixe quant à l'activité antihépatotoxique de certains d'entre eux, les flavonoïdes et les acides-phénols par exemple.

** L'approche des mécanismes d'action qui gouvernent les propriétés antihépatotoxiques d'E.cannabinum nous ont conduit à préciser le site d'action de cet extrait végétal : il agit aux stades ultimes et non spécifiques de la biotransformation du toxique conduisant à la nécrose cellulaire. Cette activité antinécrotique pourrait être imputée à un effet inhibiteur des phospholipases A_2 membranaires ou à un effet stabilisateur membranaire : plusieurs composés contenus dans la plante comme les flavonoïdes et les polysaccharides sont potentiellement anti-inflammatoires.

** Une étude bibliographique comparative des propriétés antihépatotoxiques d'extraits végétaux et de substances naturelles a permis de constater un fois de plus que la dose d'E.cannabinum efficace est faible.

* Propriétés diurétiques

** Le modèle chronique où l'extrait était administré quotidiennement per os à 500 mg/kg a permis de constater un effet diurétique sans perturbations profondes du bilan ionique si ce n'est une rétention de calcium : cette caractéristique qui possède des avantages certains (action bénéfique sur les lithiases calciques) a permis de rapprocher l'effet diurétique de l'extrait de celui observé avec les diurétiques thiazidiques.

** L'étude du modèle aigu utilisant l'élimination d'une surcharge hydrique hypotonique a conduit à attribuer à l'extrait végétal, administré à la dose de 500 mg/kg, des propriétés salidiurétiques importantes. L'effet diurétique, sans être aussi puissant, est plus persistant dans le temps que le furosémidé, produit de synthèse choisi comme référence.

** La présence d'acides-alcools, d'acides-phénols, d'eupatoriopicrine peuvent expliquer cet effet diurétique mais

l'hypothèse d'une contribution des sels de potassium contenus dans les plantes réputées diurétiques a été éliminée.

Le choix de la voie d'injection de l'extrait s'est posé tout au long de cette étude. Il eût sans doute été préférable d'utiliser la voie per os, en respect de l'utilisation traditionnelle. Mais cette voie n'est pas toujours facile à utiliser compte tenu du stress et des blessures que peut provoquer l'administration d'une sonde gastrique dans l'oesophage de l'animal et du temps que nécessite ce gavage. Un "screening" pharmacologique est plus aisé à entreprendre par voie I.P. ou I.V. Par ailleurs l'extrapolation de l'appareil digestif de l'animal à l'homme est délicat et l'absence d'activité de l'extrait per os chez l'animal ne doit pas permettre de conclure à une absence d'efficacité par la même voie chez l'homme. Il eût été néanmoins intéressant de tester ce type de voie.

Ce travail aura permis de confirmer et d'approcher les mécanismes d'action gouvernant les propriétés hépatotropes et diurétiques, rencontrées dans la thérapeutique traditionnelle, d'un extrait aqueux total d'E.cannabinum, au moyen de techniques pharmacologiques modernes in vivo et in vitro :

* l'extrait est cholérétique et, en ce sens, joue le rôle d'un bon draineur hépatique. L'intérêt du pouvoir cholérétique des extraits végétaux a déjà été longuement débattu. Il ne faut pas perdre de vue que notre étude vient en marge de la pharmacologie classique mettant en jeu des réactions molécules-sites d'action. Nous avons utilisé ici des techniques classiques de pharmacologie pour tester un totum renfermant de nombreuses molécules. Dans ces conditions, il paraît vain de vouloir expliquer le mode d'action au risque de se perdre dans des hypothèses hasardeuses. Ce pouvoir cholérétique reste cependant intéressant car faisant partie, comme tous les diurétiques, laxatifs, sudorifiques et purgatifs de la phytothérapie, des "dépuratifs" ou "draineurs" assurant une élimination des toxines de l'organisme. Ainsi un cholérétique assure-t-il un drainage hépatique intéressant en cas de surcharge médicamenteuse par exemple. Nous pouvons donc évaluer le pouvoir cholérétique d'E.cannabinum, en terme d'épuration hépatique.

* il est antihépatotoxique en intervenant sur les événements conduisant à la nécrose cellulaire et cette propriété pourrait renforcer l'arsenal thérapeutique dans les affections hépatiques et dans l'alcoolisme. Cette propriété vient d'une part s'ajouter à la précédente pour justifier l'emploi de la plante dans les petites pathologies hépatiques tout comme le pissenlit, la boldo ou l'artichaut, mais ouvre aussi une perspective nouvelle de recherche.

* il est salidiurétique, sans perturber l'équilibre ionique, et son action rappelle celle des diurétiques thiazidiques. Il peut être utilisé en traitement chronique sans inconvénients. Là encore l'intérêt d'un diurétique "doux" est discutable. Les diurétiques chimiques sont utilisés en médecine contre l'œdème et l'hypertension. L'emploi d'extraits végétaux diurétiques se justifie en termes de draineurs de l'organisme pour des traitements de fond, l'urine comme la bile entraînant avec eux maints composés dont une mauvaise élimination aboutit à des intoxications.

L'étude des indications traditionnelles de la plante a révélé une autre convergence d'utilisation traditionnelle qui pourrait être explorée : ce sont les vertus cicatrisantes d'E.cannabinum vantées depuis la médecine savante arabe par Avicenne jusqu'au 19^{ème} siècle.

Les indications thérapeutiques tant dans la médecine savante (grecque, arabo-persane, indienne, européenne) que traditionnelle sont en fait bien souvent une médecine préventive où les remèdes essentiels consistent en dépuratifs et fortifiants, la notion d'état d'engorgement et de pureté étant constante .

Les "draineurs" de l'organisme, souvent prescrits en cures saisonnières au printemps et à l'automne et qui connaissent un regain d'intérêt parmi les phytothérapeutes ont à la fois une valeur préthérapeutique en préparant en quelque sorte le traitement étiologique et post-thérapeutique.

Ce travail qui s'inscrit dans les perspectives de l'ethnopharmacologie aura donc permis de confirmer les données de la tradition car E.cannabinum s'est montrée pharmacologiquement active aux doses et aux préparations (décoction, infusion) utilisées par la posologie traditionnelle.

En guise de conclusion, il était irrésistiblement plaisant de citer un morceau choisi d'un des maîtres de la phytothérapie en France au début de ce siècle :

"(...)les feuilles peuvent être avantageusement employées pour préparer des infusions qui, douées de propriétés diurétiques, diaphorétiques et très légèrement cholérétiques, méritent de figurer parmi les médicaments auxquels on donne le nom de dépuratifs : j'ai eu maintes fois l'occasion d'entretenir mes lecteurs de ce genre de drogue dont le vocable, si élastique, ne signifie pas grand'chose aux yeux du profanum vulgus, le palladium de la santé, le moyen le plus sûr de remédier aux vices du sang, d'assurer le bon équilibre de l'organisme en le débarrassant des impuretés, des humeurs peccantes qui encombrant et en gênent le fonctionnement normal: à vouloir les proscrire on risquerait de porter atteinte à des traditions séculaires et d'entraîner les malades à recourir aux drogues parfois nocives, souvent inutiles, toujours dispendieuses dont certains bienfaiteurs de l'humanité leur prônent les merveilleux effets à la quatrième page des journaux

En leur prescrivant l'infusion de feuilles d'Eupatoire qui agit à la fois en activant la sécrétion biliaire , en favorisant la diurèse, en provoquant de légères sudations, on peut être assuré d'abord de leur faire respecter le sage précepte primum non nocere, ensuite de ne pas les entraîner dans de folles dépenses, enfin de leur fournir un breuvage qui répond à la conception, si ancrée dans leur esprit, des bienfaits de la médication dépurative. Cette infusion s'obtient en faisant bouillir 2 ou 3 minutes, puis laissant infuser un quart d'heure dans 200 gr. d'eau 5 gr. de feuilles d'Eupatoire. Le liquide résultant de cette opération n'a rien de bien plaisant : pour le rendre plus potable on peut ajouter, après ébullition , un simple d'une agréable saveur, tel que l'introuvable anis vert ou le fenouil. Mais un moyen plus sûr, qui n'exige qu'un peu d'imagination et de diplomatie, est de raconter aux malades quel fut le glorieux passé de la plante dont on les engage à absorber l'apozème : je ne sache pas qu'il existe de patient assez irréductiblement attaché aux principes démocratiques pour boudier devant un remède qui fit les délices d'un monarque aussi puissant que MITHRIDATE EUPATOR, roi du Pont."

H. LECLERC, 1946.

TRAVAUX CITES



TRAVAUX CITES

- ABURADA M., TAKEDA S., SAKURAI M. and HARADA M., 1980, Pharmacological studies on gardenia fruit 5: mechanism of inhibitory effect of genipin on gastric secretion and its facilitory effect on bile secretion in rats, *J.Pharm.Dyn.*, 3, 423-433.
- ADZET T., CAMARASA J. and LAGUNA J.C., 1987, Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from Cynara scolymus against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes, *J.Nat.Prod.*, 50(4), 612-617.
- ADZET T., CAMARASA J., HERNANDEZ J.S. and LAGUNA J.C., 1987, Action of an artichoke extract against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats, *Acta Pharm.Jugosl.*, 37, 183-187.
- AGARWAL A.K. and MEHENDEALE H.M., 1984(a), CCl₄ induced alterations in Ca⁺⁺ homeostasis in chlordecone and phenobarbital pretreated animals, *Life Sci.*, 34, 141-148.
- AGARWAL A.K. and MEHENDEALE H.M., 1984(b), Excessive hepatotoxicity accumulation of intracellular Ca⁺⁺ in chlordecone potentiated CCl₄ toxicity, *Toxicol.*, 30, 17-24.
- AGUIAR K., 1985, Utilisation des hépatocytes fraîchement isolés pour l'étude des séries médicamenteuses, Thèse Sci., Univ. Nancy, Fr.
- AHMAD F.F., COWAN D.L. and SUN A.Y., 1987, Detection of free radicals formation in various tissues after acute CCl₄ administration in gerbil, *Life Sci.*, 41, 2469-2475.
- ANDREANI A., RAMBALDI M., MASCELLANI G. and RUGARLI P., 1987, Synthesis and diuretic activity of imidazo[2,1-b]thiazole acetohydrazone, *Eur.J.Med.Chem.*, 22, 19-22.
- ANZARI G.A.S., MOSLEN M. and REYNOLDS E.S., 1982; Evidence for in vivo covalent binding of CCl₃ derived from CCl₄ to cholesterol of rat liver, *Biochem.Pharmacol.*, 31(21), 3509-3510.
- ARNOLD N., 1985, Contribution à la connaissance ethnobotanique et médicinale de la flore de Chypre, Thèse Pharm., Univ. René Descartes, Paris, 1349-1351.
- ARVIS P.Y., 1985, Etude de l'effet hépatoprotecteur d'extrait végétaux sur hépatocytes isolés de rat, D.E.A. Toxicol., Univ. Metz, Fr., 48pp.
- BAER N., CHMIEL J., GNOJKOWSKI J. and KLIMAR D., 1983, The effect of sesquiterpene lactones, eupatoriopicrin and hydraxyisonobilin, on the glycolytic metabolism of human lymphocytes, *Intern.J.Clin.Pharmacol.Therap.Toxicol.*, 21(1), 41-46.

BAGLIN A. et PRINSEAUX J., 1986, Calcium et diurétiques, La Revue du Praticien, 36(55), 3263-3269.

BAPALAL VAIDYA, 1982, Some controversial drugs in indian medicine, Varanasi, Chaukhambha Orientalia, 181-182.

BAR N., 1962, Contribution à l'étude de la fonction biliaire en hypothermie (recherche sur le rat), Thèse Sci., Univ. Lille, Fr., 129pp.

BARNHARD J.L. and COMBES. B., 1978, Erythritol and mannitol clearance with taurocholate and secretin-induced choleresis, Am.J.Physiol., 234, E146-E156.

BEAUX D., 1984, Evaluation d'un modèle expérimental d'hépatotoxicité chez le rat par le dosage des triglycérides hépatiques et de la glutamate-pyruvate-transaminase serique, D.E.A. Toxicol. Univ. Metz, Fr., 65pp.

BELLAKHDAR J., HONDA G. and MIKLI W., 1982, Herb drugs and herbalists in the Magrhib, Ed.Institute for the study of languages and culture of Asia and Africa, Tokyo, 81.

BELLORIN-FONT E., WEISINGER J. and MARTINEZ V.P., 1984, Effects of diuretics on magnesium metabolism, In PUSCHETT J.B. : Diuretics Chemistry, Pharmacology and Clinical Application, Procceedings of the First International Conference on Diuretics, 1984, Miami Beach, Florida, U.S.A., Ed. : Elsevier Sc.Publishing.Inc., 174-181.

BERGER M. and SOZERI T., 1987, Rapid halogenated hydrocarbons toxicity in isolated hepatocytes is mediated by solvent effects, Toxicology, 45, 319-330.

BERGER M.L., BHATT H., COMBES B. and ESTABROOK R.W., 1986, CCl₄-induced toxicity in isolated hepatocytes : the importance of direct solvant injury, Hepatology, 6(1), 36-45.

BERRY M.N., 1976, The development of techniques for the preparation of hepatic parenchymal cell suspension-a history and rationale, In TAGER J.M., SOLING H.D. and WILLIAMSON : Use of isolated rat liver cells and kidney tubules in metabolic studies, Ed : North Holland Publishing Company, Amsterdam, 131-138.

BERRY N.M., 1974, High yield preparation of morphollogically intact isolated parenchymal cells from rat liver, Dans FLEISCHER S. and PACKER L. : Methodes Enzymology Biomembranes, 32, 625-632.

BERRY N.M. and PHILLIPS M.J., 1969, High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, J.Cell.Biol., 43, 506-520.

BEZANGER-BEAUQUESNE L., PINKAS M. and TORK M., 1983, Les plantes dans la thérapeutique moderne, Ed. : Maloine, Paris, 210.

BHATTACHARYA R.K. and FIROZI P.F., 1988, Effect of plant flavonoids on microsomes catalyzed reactions of aflatoxine B₁ leading to activation and DNA adduct formation, *Cancer lett.*, 39, 85-91.

BLOSCYK E., GEPPERT B. and DROZDZ B., 1978, Quantitative determination of sesquiterpene lactones in plant material by IR spectroscopy, *Planta Med.*, 34, 79-86.

BOECKER A., JAKUPOVIC J., BOHLMANN F., KING R.M. and ROBINSON H., 1986, Further heliangolides and guaianolides from E.altissimum. *Phytochemistry*, 25(7), 1669-1672.

BOGAERT J., 1973, Contribution à l'étude de l'acide hydroxyméthylacrylique et de divers acides organiques associés dans l'artichaut, Thèse pharm., Univ. Paris, 229pp.

BOGAERT J.P., MORTIER F., DELAVEAU P., JOUANY J.M. et PELT J.M., 1972, Intérêt des déterminations par voie enzymatique de certains acides alcools dans les drogues végétales, *Bull.Soc.Pharm.*, Nancy, 94, 11-16.

BOHLMANN F., SUWITA A., KING R. and ROBINSON H., 1980, Neue gaujanolide aus Eupatorium rotundifolium, *Phytochemistry*, 19, 1233-1234.

BOHLMANN F., ZDERO C., KING R.M. and ROBINSON H., 1984, Further germacranolides from Eupatorium serotinum, *Planta Med.*, 1, 76-77.

BONNIER G., 1934, Flore complète de France, Suisse et Belgique, Ed. : Orlhac, Paris, 64-65.

BORGREVIK P.C., HOLTEN T. and JYNGE P., 1987, Tissue electrolytes induced by high doses of diuretics in rats, *Pharmacol.Toxicol.*, 60, 77-80.

BOS R, HENDRIKS H., BRUINS H.P., SCHRIJPEMA J., KLOOSTERMAN J. and SIPMA G., 1984, The presence of some sesquiterpene lactones in E.cannabinum L, *Farm.Tijdschr.Belg.*, 61, 398.

BOULOS L., 1983, Medicinal plants of North Africa, Ed. : Reference Publications Inc., Algona, U.S.A., 64.

BOYER J.L., 1980, New concepts of mechanism of hepatocyte bile formation, *Physiol.Rev.*, 60(2), 303-326.

BOYER J.L., 1983, Tight junctions in normal and cholestatic liver: Does the paracellular pathway have functional significance?, *Hepathol.*, 3, 614-617.

BOYER J.L. and BLOOMER J.R., 1974, Canalicular bile secretion in man. Studies utilizing the biliary clearance of ¹⁴C mannitol, *J.Clin.Invest.*, 54, 773-781.

BRABEC M.J., OWENS J.B., KENEL M., SORSCHER D. and CORNISH H.H., 1982, Modification of methanol potentiation of CCl₄ toxicity in rats by chloremphenicol and salicylate, Drug Chem.Toxicol., 5(2), 143-154.

BRACKE M.E., CASTRONOVO V., VAN CANVENBERGE R.M.L., COUPMAN P., VAKAERT L., PAWEL STROJNY Jr., FOIDART J.M. and MAREEL M.M., 1987, The anti-invasive flavonoid (+)-catechin binds to laminin and abrogates the effect of laminin on cell morphology and adhesion, Exp.Cell.Res., 173, 193-205.

BRAUER R.W., LEONG G.F. and HOLLOWAY R.J., 1954, Mechanism of bile secretion. Effect of perfusion pressure and temperature on bile flow and bile secretion pressure, Am.J.Physiol., 177, 103-112.

BRENSILVER J.M., DANIELS F.H., LEFAVOUR G.S., MALSEPTIC D.M., LORCH J.A., PONTE M.L. and CORTELL S., 1985, Effects of variation in dietary sodium intake on sodium excretion in mature rats, Kidney Internat., 27, 497-502.

BRETEAU M., BOURIN M. and BIZIERE K., 1978, Pharmacologie des diurétiques, Diurétiques, 28(51), 3971-3983.

BRIDGES J.W., 1981, The use of hepatocytes in toxicological investigations, Testing for toxicology, 125-143.

BUTLER W.M., MALING A.M., HORNING M.G. and BRODIE B.B., 1961, The direct determination of liver triglycerides, J.Lip.Res., 2(1), 95-96.

CAGEN S.Z. and KLAASSEN C.D., 1979, Hepatotoxicity of CCl₄ in developing rats, Toxicol.Appl.Pharmacol., 50, 347-354.

CALSADA J., 1980, Relation ship between glycolysis and proliferation of L1210 cells in vitro of a new pharmacological effector RA-233, Biochem.Pharmacol., 29, 2690.

CAREY M.C., 1982, The enterohepatic circulation, In ARIAS I.M., POPPER H., SCHACHTER D. and SHAFRITZ D.A.: The liver, biology and pathobiology, Ed. : Raven Press, New-York, 429-465.

CHABROL E., CHARONNA R., MAXIMIN M., WAITZ R. et PORIN J., 1934, L'action cholérétique des Composées, C.R.Soc.Biol., 108, 1100-1102.

CHALMERS A.H., CULVENOR C.C.J. and SMITH L.W., 1965, Characterisation of pyrrolizidine alkaloids, J.Chromatog., 20, 270-277.

CHAN R.I.M., SAN R.H.C. and STIH H.F., 1986, Mechanism of inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine induced mutagenesis by phenolic compounds, Cancer Lett., 31, 27-34.

CHOPRA R.N., CHOPRA I.C. and WARMA B.S., 1969, Supplement to glossary of indian medicinal plants, Ed. : Council of Scientific and Industrial Reseach, New Dehli, Inde, 28, 119pp.

CHOPRA R.N., NAYAR S.L. and CHOPRA I.C., 1956, Glossary of indian medicinal plants, Ed. : Council of scientific and industrial research, New-Delhi, 112-113.

CONNORS H.D., THURMAN R.G., GALIZI M.D. and MASON R.P., 1986, The formation of a novel free radical metabolite from CCl_4 in the perfused rat liver and *in vivo*, J.Biol.Chem., 261(10), 4542-4548.

CORBIC M., 1986, Que reste-t-il de la fraction indépendante des acides biliaries dans la sécrétion biliaire?, Gastroenterol.Clin.Biol., 10, 741-743.

CORCORAN G.B. and WONG B.K., 1986, Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine *in vivo* : studies with N-acetyl-D-cysteine in mice, J.Pharmacol.Exp.Ther., 238(1), 54-61.

CRONQUIST A., 1981, An integrated system of classification of flowering plants, Ed.Columbia University press, New-York, 1020-1028.

C.E.A., 1978, Statistique appliquée à l'exploitation des mesures, Ed. Masson, Paris, 412pp.

DANIELAK R., POPOWSKA E. and BORKOWSK B., 1973, The preparation of vegetable products containing isofraxidin, silibin and Glaucium alkaloids and evaluation of their choleric actions, Pol.J.Pharmacol.Pharm., 25, 271-283.

DANIELSON Bo. G., 1985, Renal stones-Current viewpoints on etiology and management, Scand.J.Urol.Nephrol., 19, 1-5.

DANIELSSON H. and SJOVALL J., 1975, Bile acid metabolism, Anal.Rev.Biochem., 44, 233-253.

DAVRAINVILLE F., FLEURENTIN J., MORTIER J., YOUNOS C. et PELT J.M., 1988, Recherche d'une activité hépatorénale d'extraits de Laserpitium latifolium L. chez le rat, Pl. Méd. Phytothér., 23(4), 323-333.

DE FERREYRA E.C., BRENACCHI A.S. and CASTRO J.A., 1986, Increased glutathion(GSH) content in livers of control and carbon tetrachloride poisoned rats treated with the anticalmodulin drug trifluoroperazine (TFP), Res.Com.Chem.Pathol.Pharmacol., 53(3), 399-402.

DE FERREYRA E.C., DE FENOS O.M. and CASTROS J.A., 1983, Tryptophan potentiation of the rate cystein preventive effects in carbon tetrachlride-induces necrosis, Res.Com.Chem.Pathol.Pharmacol., 40(3), 515-518.

- DE FERREYRA E.C., DE FENOS O.M., BERNACCHI A.S., CASTRO C.R. and CASTO J.A., 1977, Treatment of CCl₄-induced liver necrosis with chemical compounds, Toxicol. Appl. Pharmacol., 42, 513-521.**
- DEBY C., MAGOTTEAUX G. and BACQ Z.H., 1970, Relation entre acides gras essentiels et totaux des antioxydants tissulaires chez la souris, C.R.Soc.Biol., 162(2), 2675-2681.**
- DELANGHE J.E., DELVOSALLE L., DUVIGNEAUD J., LAMBINON J. et VAN DEN BERGHEN C., 1983, Nouvelle flore de la Belgique, du Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines, Ed.: Patrimoine du jardin botanique national de Belgique, Meix, 603-615.**
- DIALLO B., VAN HAELEN M., KISO Y. and HIROSHI H., 1987, Antihepatotoxic actions of Cochlospermum tinctorium rhizomes, J.Ethnopharmacol., 20, 239-243.**
- DIANZANI M.U., 1982, Biochemical effects of sature and insaturated aldehydes, In MAC BRIEN D.C. and SLATER T.F.: Free radical, lipid peroxidation and cancer, Ed. : Academic Press Inc., Londres, 129-158.**
- DOBBERSTEIN R.H., TIN-WA M.O., FONG H.H.S., CRANE F.A. and FARNSWORTH N.R., 1977, Flavonoids constituents from E.altissimum L, J.Pharm.Sci., 66(4), 600-602.**
- DOLEJS L. and HEROUT V., 1962, On terpene 165: Constitution of eupatoriopicrin germacranolide from E.cannabinum L, Coll.Czechoslov.Chem.Comm., 27, 2654-2661.**
- DORVAULT, 1875, L'officine ou répertoire général de pharmacie pratique, 480, Ed : inconnu.**
- DROZDZ B. and BIALEK-GRYGIEL G., 1971, Sesquiterpene lactones, 5: Composition of the lactone fraction of leaves and inflorescence of E.cannabinum L, Dissert.Pharm.Pharmacol., 23(5), 537-540.**
- DROZDZ B., GRABARCZYK H., SAMEK Z., HOLUB M., HEROUT V. and SORM F., 1972, On terpenes 215: Sesquiterpenic lactones from E.cannabinum L. Revision of the structure of eupatoriopicrin, Coll.Czechoslov.Chem.Comm., 37, 1546-1554.**
- ERLINGER S., 1982(a), Bile flow, In ARIAS I.M., POPPER M., SCHACHTER D. and SHAFRITZ D.A.: The liver biology and pathobiology, Ed. : Raven Press, New-York, 407-427.**
- ERLINGER S., 1982(b), Biliary physiology and disease, In ARIAS I.M., FRENKEL M. and WILSON B.H.P.: The liver annual 2, Ed. Excerpta Medica, Amsterdam, 305-330.**
- ESCUBEDO R., CAMARA J. and ADZET T., 1986, Action of caffeic acid in rat and vas deferens, I.R.C.S.Med.Sci., 14, 1196-1197;**

FARYS M.W. and REED D.J., 1985, Mechanism of chemical induced toxicity. 2. Role of extracellular calcium, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 79, 296-306.

FERNANDEZ G., VILLARRUEL M.C., DE FERREYRA E.C., DE FENOS O.M. and CASTRO J.A., 1986, Imipramine prevention of CCl₄ induced liver necrosis at late states of the intoxication process, *J.Appl.Toxicol.*, 6(6), 413-418.

FERRARO G., MARTINO V., BORRAJO G. and COUSSIO J.D., 1987, 5, 7,3',4' - tetrahydroxy - 6 - methoxyflavone from E.subhastatum, *Phytochemistry*, 26(11), 3092-3093.

FLEURENTIN J., 1983, Répertoire des pharmacopées traditionnelles du Yémen et étude pharmacologique de deux espèces à propriétés hépatorenales: Crepis ruepellii et Anisotes trisulcus, Thèse Pharm., Univ. Metz, 689pp.

FONTAINE L., GRAND M., MOLHO D., CHABERT J. and BOSCHETTI E., 1968, Activité cholérétique et spasmolytique, pharmacologie générale de la méthyl 4 ombelliférone, *Thérapie*, 23, 51-62.

FORKER E.L., HICKLIN T. and SORNSON H., 1982, The clearance of mannitol and erythritol in rat bile, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 126, 115-119.

FOURNIER P., 1948, Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France,2, Ed.Lechevalier, Paris, 130-133.

FRACASSO M.E., LEONE R. and BERTI T., 1980, Biochemical changes in isolated perfused liver from rats intoxicated with CCl₄ or fed with steatogenous diet, *Pharmacol.Res.Comm.*, 12(4), 295-305.

FRAGA C.G., MARTIN O.V.S., FERRARO G.E., COUSSIO J.P. and BOVERIS O., 1987, Flavonoids as antioxydants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence, *Biochem.Pharmacol.*, 36(5), 712-720.

GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L. et DEVRAUX G., 1961, Ressources médicinales de la flore française, Ed. Vigot Frères, 2, 1326-1328.

GEISSMANN T.A. and ATALA S., 1971, Distribution of eupatoriopicrin in Compositae, *Phytochemistry*, 10, 1075-1077.

GIACHETTI D., FRATIGLIONI P. and TADDEI I., 1981, Attività diuretica dell'olio essenziale di Rosmarinus officinalis L. e di Juniperus L. Esperienze nel ratto. Atti del Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacognosia, Messina, Lavori dell'Institutodi Farmacognosia dell'Università di Messina, suppl. 13, 77-85.

GLEND E.A., CHOLIPARAMBIL J.R. and PUSHPENDRAN K., 1986, Activation of phospholipase A₂ by carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 35(19), 3301-3307.

GOEL M.R., SHARMA M.A. and STHOS S.J., 1988, Induction of lipid peroxydation by hexachlorohexane, dieldrin, TCCD, carbone tetrachloride and hexachlorobenzène in rats , Environ.Contam.Toxicol., 40, 225-262.

GONZALEZ A.G., BARRERA J.B., YANES FERNANDEZ A.C.Y., ROSA S. F.E. and DOMINGUEZ X.A., 1985, Eudesmane sesquiterpene from Eupatorium quadrangulare, Phytochemistry, 24(8), 1847-1848.

GRAFF J., 1983, Canalicular bile salt dependant bile formation : concepts and clues from electrolytes transport in rat, Am.J.Physiol., 244, G233-G246.

GRAVELA E., ALBANO E., DIANZANI M.U., POLI G. and SLATER T.F., 1979, Effect of CCl₄ on isolated rat hepatocytes: inhibition of protein and lipoprotein secretion, Biochem.J., 178, 509-512.

GREGER R. and SCHLATTER E., 1983, Cellular mechanism of the action of loop diuretics on the thick ascending limb of Henle's loop, Klin.Wochenschr., 61, 1019-1027.

GREVEN J., KÖLLING B., BRONEWSKI-SCHWARZER B.V., JUNKER M., NEFFGEN B. and NILIUS R., 1984, Evidence for a role of the Tamm-Horsfall protein in the tubular action of furosemide-like loop diuretic, In PUSCHETT J.B. : Diuretics Chemistry, Pharmacology and Clinical Application, Proceedings of the First International Conference on Diuretics, 1984, Miami Beach, Florida, U.S.A., Ed : Elsevier Sc.Publishing.Inc., 203-214.

GUIBOURT C. et PLANCHAN G., 1975, Histoire naturelle des drogues simples, 3, Ed. : Librairie Valières J.B. et fils, Paris, 62-68.

GUINOCHET M. et DE VILLMORIN R., 1982, Flore de France, 4, Ed. : C.N.R.S., Paris, 1393.

GUIOL C., MONTASTRUC J.L. and MONTASTRUC P., 1984, Naloxone reduces diuretics responses induced by water alcohol or congenital lack of vasopressin in rats, Br.J.Pharmacol., 81, 085-090.

HACKETT A.M., 1986, The metabolism of flavonoids compounds in mammals, In CODYS V., MIDDLETON E. and HARBORNE J.B.: Plant flavonoids in biology and medecine, Ed. : Alan R. Liss Inc., New-York, 177-194.

HACKETT A.M., SHAW I.C. and GRIFFITHS L.A., 1984, The prevention by (+)-cyanidanol-3 of hepatitis induced changes in the disposition of imipramine in the rat, Biochem.Pharmacol., 33(14), 2179-2184.

HALL I.H., LEE K.H. and EIGEBALLY S.A., 1978, Antitumor agents, 27: Effects of helenalin on anaerobic and aerobic metabolism of Erlisch ascites cells, J.Pharm.Sci., 67(4), 552-554.

HALL I.H., LEE K.H., STARNES C.O. and MURAOKA O., 1980a, Antihyperlipidemic activity of activity of sesquiterpene lactones and related compounds, J.Pharm.Sci., 69(6), 694-697.

HALL I.H., LEE K.H., STARNES C.O., SUMIDA Y.R., WU R.Y., WADDELL T.G., COCHRAN J.W. and GERHART K.G., 1979, Antiinflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds, J.pharm.Sci., 68(5), 537-542.

HALL. I.H., STARNES E.D., LEE K.H. and WADDELL T.G., 1980b, Mode of action of sesquiterpene lactones as antiinflammatory agents, J.Pharm.Sci., 69(5), 537-543.

HAMMARLUND M. and PAALZOW L.K., 1985, Acute tolerance development to the diuretic effect of furosemide in the rat, Biopharm.Drug Dispos., 6, 9-21.

HANDA S.S., SHARMA A. and CHAKKABORTI K.K., 1986, Natural products and plant as liver protecting drugs, Fitotherapia, 57(5), 307-351.

HAVSTEEN B., 1983, Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, Biochem.pharmacol., 32(7), 1141-1148.

HEATH D.F., 1967, Normal or log-normal: Appropriate distributions, Nature, 213, 1159-1160.

HEGNAUER R., 1977, The chemistry of the Compositae, In HEYWOOD V.H., HARBORNE J.B. and TURNER B.L.: The biology and chemistry of the Compositae, 1, Ed. : Academic Press Inc., Londres, 283-335.

HENDRIKS H., BALRAADJSING W., HUIZING H.J. and BRUINS A.P., 1987, Investigation into the presence of pyrrolizidine alkaloids in E.cannabinum by means of positive and negative ion chemical ioizations GC-MS, Planta Med., 53(5), 395-408.

HENDRIKS H., BOS R. and BRUINS A.P., 1985, Analysis of the essential oil of E.cannabinum by combined gas chromatography-mass spectrometry using electron impact and negative ion chemical ionization, Planta Med., , 541-542.

HENDRIKS H., MALINGRE TH.M. and ELEMA E.T., 1983, Pyrrolizidine alkaloids, flavonoids and volatile compounds in the genus Eupatorium, Pharm.Weekb.Scient.Ed., 5, 281-285.

HERZ W. and KULANTHIAVEL P., 1982, Sesquiterpene lactones of Eupatorium scrabidium, Phytochemistry, 21(10), 2475-2479.

HERZ W. and SHARMA R.P., 1976, Sesquiterpene lactones of E.hyssopifolium, a germacranolide with an unusual lipid ester side chain, J.Org.Chem., 41(6), 1015-1020.

HERZ W., DE GROOTE R., MURARI R. and KUMAR N., 1979, Sesquiterpene lactones of E.serotinum, J.Org.Chem., 44(15), 2784-2788.

HERZ W., GOVINDAN S.V. and KUMAR N., 1981, Sesquiterpene lactones and other constituents of E.lancifolium and E.semiseratum, *Phytochemistry*, 20(6), 1343-1347.

HERZ W., KALYANARAMAN P.S., RAMAKRISHNAM G. and BLOUNT J.F., 1977, Sesquiterpene lactones of E.perfoliatum L, *J.Org.Chem.*, 42(13), 2264-2271.

HERZ W., KULANTHIAVEL P., SUBRAMANIAN P.S., CULVENOR C.C.J. and EDGAR J.A., 1981, Alkaloids of Conoclinium coelestrinum (L) D.C., E.compositifolium Walt. and E.altissimum L. Isolation of crystalline intermedine from C.coelestrinum, *Experientia*, 37, 683.

HERZ W., KUMAR N. and BLOUNT J.F., 1980, A thiol derivative ester side chain in a sesquiterpene lactone from E.mikanioides. Absolute configuration of deacetyleupaserrin and its congeners, *J.Org.Chem.*, 45(3), 488-493.

HERZ W., MURARI R. and GOVINDAN S.V., 1979, Sesquiterpene lactones of E.anomalum and E.mohrii, *Phytochemistry*, 18, 1337-1341.

HEYWOOD V.H. and HARBONE J.B., 1977, An overture to the Compositae, In HEYWOOD V.H., HARBORNE J.B. and TURNER B.L.: *The biology and chemistry of the Compositae*, 1, Ed.: Academic Press Inc., Londres, 1-17.

HIKINO, 1987. HIKINO H., KISO Y., AMAGAYA S. and OGIHARA Y., 1984a, Antihepatotoxic actions of papyriogenins and papyriosides, triterpenoids of Tetrapanax papyriferum, *J.Pharmacol.*, 12, 231-235.

HIKINO H., 1984, Antihepatotoxic principles in oriental medicinal plants. Natural products and drug development, In Alfred Benson Symposium 20, Ed.: Krosgaard-Larsen P., Brogger Christensen S. and Kofod H., Munksgaard, Copenhagen, 374-389.

HIKINO H., KISO N., HAMADA Y., SHIOIRI T., AIYAMA R., ITOKAWA H., KIUCHI F. and SANKAWA U., 1985a, Antihepatotoxic actions of gingerols and diarylheptanoids, *J.Etnopharmacol.*, 14, 31-39.

HIKINO H., KISO Y., AMAGAYA S. and OGIHARA Y., 1984a, Antihepatotoxic actions of papyriogenins and papyriosides, triterpenoids of Tetrapanax papyriferum leaves, *J.Etnopharmacol.*, 12, 231-235.

HIKINO H., KISO Y., HATANO T., YOSHIDA T. and OKUDA T., 1985b, Antihepatotoxicity of tannins, *J.Etnopharmacol.*, 14, 19-29.

HIKINO H., KISO Y., PAGUSHI H. and IKEYA Y., 1984b, Antihepatotoxic actions of lignoids from Schizandra chinensis, *Planta Med.*, 50(3), 213-218.

HIKINO H., KISO Y., WAGNER H. and FIEBIG M., 1984c, Antihepatotoxic action of flavolignans from S.marianum fruits, Planta Med., 3(50), 248-250.

HIKINO H., OHSAWA T., KISO Y. and OSHIMA Y., 1984, Analgesic and antihepatotoxic actions of dianosides, triterpenoid saponins of Dianthus superbus var. longicalycinus herbs, Plant Med., 50, 353-355.

HIKINO H., SUGAI T., HASHIMOTO I., TERASAKI S. and HIKINO I., 1979, Liver protective principles of Thujopsis dolobrata leaves, Planta Med., 36, 156-163.

HINES J., PEEK R.L. and DAKES B.D., 1954, The kinetic of the base catalized deuterium exchange of chloroform in aqueous solution, J. Ann. Chem. Soc., 76, 827-829.

HIRONO I., 1986, Carcinogenicity of plant constituents: pyrrolizidine alkaloids, flavonoids and brackenfern, In CODYS V., MIDDLETON E. and HARBORNE J.B.: Plant flavonoids in biology and medicine, Ed. : Alan R. Liss Inc., New-York, 45-53.

HLADON B. and CHODERA A., 1975, Sesquiterpene lactones, 17. Cytotoxic and pharmacological activity, Archiv. Immunol. Therap. Experiment., 23, 857-865.

HLADON B., BOBKIEWICZ T. and DROZDZ B., 1977, Sesquiterpene lactones, 19. Preliminary studies on the mode of action. Inhibition of synthesis of tumor cell protein and RNA, Archiv. Immunol. Therap. Experiment., 25, 243-251.

HLADON B., DROZDZ B., GRABARCZYK H., BOBKIEWICZ T. and OLSZEWSKI J., 1975(a), Sesquiterpene lactones, 13. Cytotoxic activity of eupatolide and eupatoriopocrine on human and animal malignant cells in tissue culture in vitro, Pol. J. Pharmacol. Pharm., 27, 429-438.

HLADON B., DROZDZ B., HOLUB M. and BOBKIEWICZ T., 1975(b), Sesquiterpene lactones, 16. In vitro studies on cytotoxic properties of sesquiterpene lactones in tissue culture of human and malignant cells, Archiv. Immunol. Therap. Experiment., 23, 845-855.

HOEFLER C., FLEURENTIN J., MORTIER F., PELT J.M. and GUILLEMAIN J., 1987, Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of Rosmarinus officinalis in rats, J. Ethnopharmacol., 19, 133-143.

HOOKE J.D., 1973, The flora of India, 3, Ed. : Jayyed press, Ballimaran, Delhi, 243-244.

HOTTINGER S. and PREISIG R., 1980, Dual inhibitory effect of somatostatin on canalicular and ductular bile salt-independent bile formation, Gastroenterol., 79, 1109.,

- HOWARD R.B., CHRISTENSEN A.K., GIBBS F.A. and PESCH L.A., 1967, The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver, *J.Cell.Biol.*, 36, 675-684.
- IMBS J.L., SCHMIDT M., GIESEN-CROUSE E.M., WELSCH M., 1986, Pharmacologie des diurétiques, *La Revue du Praticien*, 36(55), 3223-3236.
- IOANNIDES C., HALL D.E., MULDER D.E., STEELE C.M., SPICKETT J., DELAFORGE M and PARKE D.V., 1983, A comparison of the protective effects of N-acetyl-cysteine and S-carboxymethylcysteine against paracetamol-induced hepatotoxicity, *Toxicol.*, 28, 313-321.
- IVIME Y. and COOK W.R., 1956, A textbook of theoretical botany, Ed. : Longmans S. and Mac Lean R.C., Londres, 2, 1958.
- IWAHASHI H., NEGOR Y., MORISHITA H. and KIDO R., 1986, Inhibition by chlorogenic acid of haematin-catalysed retinoic acid 5,6-epoxidation, *Biochem.J.*, 239, 641-646.
- JAKUPOVIC J., SUN H., BOHLMANN F. and KING R.M., 1987, Further sesquiterpene lactones from E.altissimum, *Planta Med.*, 1, 1-20.
- JENDRASSIK L. and GROF P., 1938, Vereinfachte Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins, *Biochem.Z.*, 297, 81-89.
- JERZMANOWSKA Z., 1951, Euparin, the constituent of E.cannabinum and some derivatives, *Polska Akad.Umiej.*, *Prace Kom.Farm.*, *Dissert.Pharm.*, 3, 165-182.
- JONADET M., MEUNIER M.T., WILLIE F., BASTIDE J.P. et MALMAISON J.L., 1986, Flavonoïdes extraits de Ribes nigrum L. et d'Alchemilla vulgaris L, *J.Pharmacol.*, 17(1), 21-27.
- JOYEUX M., 1986, Etude d'extrait végétaux sur la malonaldehyde et le glutathion après intoxication d'hépatocytes isolés de rat, *D.E.A. Toxicol.*, Univ. Metz, Fr., 44pp.
- KAPLOWITZ N., AW T.K., SIMON F.R. and STOLZ A., 1986, Effects of phenolic constituents from the Mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelets, *Ann.Int.Med.*, 104(6), 826-839.
- KAU S.T., KEDDIE J.R. and ANDREWS D., 1984, A method for screening diuretic agents in the rat, *J.Pharmacol.Meth.*, 11, 67-75.
- KAU S.T., HOWE B.B., LI J.T.Y., SMITH L.H., KEDDIE J.R., BARLOW J.J., GILES R.E. and GOLDBERG M.E., 1987, ICI 147-798 : A novel diuretic agent with β -adrenoreceptor blocking activity, *J.Pharmacol.Exp.Therap.*, 242(3),

KIMURA Y., OKUDA H., NOMURA T., FUKAI T. and ARICHI S., 1986, Effects of phenolic constituents from the Mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelets, *J.Nat.Prod.*, 49(4), 639-644.

KIMURA Y., OKUDA.H., OKUDA T., HATANO T., AGATA I. and ARICHI S., 1984, Studies on the activities of the tannins and related compounds from medicinal plants and drugs, 7. Effect of leaves of Artemisia species and caffeic and chlorogenic acid on lipid metabolism injury in rats fed peroxidized oil, *Chem.Pharm.Bull.*, 33(5), 2028-2034.

KING R.M. et ROBINSON H., 1970, Eupatorium, a composite genus of arcto-tertiary ditribution, *Taxon*, 19, 769-744.

KIRKPATRIKS.R.B., BREEN M.D., HAGEY L.R., HOFMANN A.F. and TEPHLY T.R., 1988, Effect of side effect lenght on bile acid conjugation : Glucuronidation, sulfation and CoEnzyme A formation of Nor-bile acids and their natural C₂₄ homologs by humans and rat liver fractions, *Hepatology*, 8(2), 353-357.

KISO Y., TOKHIN and HIKINO H., 1983, Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes, *Planta Med.*, 49, 222-225.

KISO Y., TOKHIN M. and HIKINO H., 1983, Antihepatotoxic principles of Atractylodes rhizomes, *J.Nat.Prod.*, 15, 651-654.

KISO Y., TOKHIN M., HIKINO H., HATTORI M., SAKAMOTO T. and NAMBA T., 1984, Mechanism of antihepatotoxic activity of Glycyrrhizin, 1: Effect on free radical generation and lipoperoxidation, *Planta Med.*, , 298-302.

KLAASEN C.D. and WATKIN J.B., 1984, Mechanisms fo bile formation, hepatic uptake and biliary excretion *Pharmacol.Rev.*, 36(1), 2-44.

KLAASSEN C.D., LEONE R. and BERTI T., 1969, Comparison of the biochemical alterations elicited in liver from rats treated with CCl₄, CCl₃, 1-1-2 trichloroethane and 1-1 trichloromethané, *Biochem.Pharmacol.*, 18, 2019-2027.

KLIMEK D., CHMIEL J. and BAER W., 1981, The effect of sesquiterpene lactones on the synthesis of nucleic acid in culture of human lymphocytes stimulated by phytohemaglutinine, *Archiv.Immunol.Therap.Experiment.*, 29, 195-203.

KODAKANDLA S.K.V., SINH B., THAKUR R.S., HUSAIN A., KISO Y. and HIKINO H., 1985, Antihepatotoxic principles of Phyllanthus niruri herbs, *J.Etnopharmacol.*, 14, 41-44.

KOKATE C.K., RAO R.E. and VARMA K.C.V., 1971, Pharmacological studies on the essential oil of E.triplinerve Vahl, *The Flavour Industry*, March, 177-180.

KONIG B. and DUSTMANN J.H., 1985, The caffeoylics as a new family of natural antiviral compounds, *Naturwissenschaften*, 72, 659-661.

KORSRUD G.O., KUIPER-GOODMAN T., HASSELAGER E., GRICE H.C. and MAC LAUGHAN J.M., 1976, Effect of dietary protein level on carbon tetrachloride induced liver damage in rats, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 37, 1-12.

KOSHIHARA Y., NEICHT T., MURUTA S., LAO A., FUJIMOTO Y. and TATSUNO R.S., 1984, *Biochim.Biophys.Acta*, 792, 92-97.

KOVACK J.B., AMES M.M., POWIS G., MOERTEL G.G., HAHN R. and CREAGAN E.T., 1979, Toxicity and pharmacokinetics of a pyrrolizidine alkaloids indicine N-oxyde in humans, *Canc.Res.*, 39, 4540-4544.

KUPCHAN S.M., HEMINGWAY J.C., CASSADY J.M., KNOX. J.R., MAC PHAIL A.T. and SIM A., 1967, The isolation and structural elucidation of eupatorin acetate, a novel guaianolide tumor inhibitor from E.rotundifolium, *J.Amer.chem.Soc.*, 89(2), 465-466.

KUPCHAN S.M., KNOX J.R. and UDAYAMURTHY M.J., 1965, Tumor inhibitors, 8: Eupatorin, new cytotoxic flavone from E.semiserratum, *J.Pharm.Sci.*, 54(6), 929-930.

KUPCHAN S.M., SIGEL C.W., HEMINGWAY R.J., KNOX J.R. and UDAYAMURTHY M.S., 1968, Tumor inhibitors, 33. Cytotoxic flavones from Eupatorium species, *Tetrahedron*, 25, 1603-1615.

KUPCHAN S.M., SIGEL C.W., KNOX J.R. and UDAYAMURTHY M.S., 1968, Tumors inhibitors, 36. Eupatin and eupatoretin, two cytotoxic flavonols from E.semiserratum, *J.Org.Chem.*, 34(5), 1460-1461.

KUREBAYASHI N. and OGAWA Y., 1986, Characterisation of increased Ca^{++} efflux by quercetin from the sarcoplasmic reticulum in frog skinned skeletal muscles fibres, *J.Muscl.Res.Cell Motil.*, 7, 142-150.

KYRIAKIDIS S.M., SOTIROUDIS T.G. and EVANGELOPOULOS A.E., 1986, Interaction of flavonoids with rabbit muscle phosphorylase kinase, *Biochim.Biophys.Acta*, 871, 121-129.

LAMB R.G., MAC CUE S.B., TAYLOR D.R. and MAC CUFFIN M.A., 1984, The role of phospholipid metabolism in bromobenzene and CCl_4 dependant hepatocytes injury, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 75, 510-520.

LANNERS M.C., BERTRAND I., FLEURENTIN J., LEHR P. and PELT J.M., 1986, Influence of Anisotes trisulcus and Crepis ruepellii extracts on bile site formation in the rat, *Arzneim.Forsch./Drug.Res.*, 5(1), 826-829.

LE MAOUT et DECAISNE., 1876, *Traité général de botanique descriptive et analytique*. Ed. : Didot Frères et C^{ie}, Paris, 154.

- LECLERC L., 1877-1883, Traité des simples, Eds.: Imprimerie Nationale, Paris, 3(26), 1-2.**
- LECLERC H., 1973, Précis de phytothérapie, Ed. Masson et Cie, Paris, 12.**
- LEE K.H., HUANG H.C., HUANG E.S. and FURUKAWA H., 1972, Antitumor agents, 2. Eupatolide, a new cytotoxic principle of E. formosanum Hay, J.Pharm.Sci., 61(4), 629-631.**
- LEE K.H., KIMURA T., OKAMOTO M. and COWHERD C.M., 1976, The structure and stereochemistry of eupahyssopin, a new antitumor germacranolide from E.hyssopifolium, Tetrahedron Letters, 14, 1051-1054.**
- LEE K.H., KIMURA T., HARUNA M., MAC PHAIL A.T., ONAN K.D. and HUANG H.G., 1977, Structure and stereochemistry of eupiformosanin, a new antileukemic and antisarcoma germacranolide from E.formosanum, Phytochemistry, 16, 1068-1070.**
- LEPAGE R.N., CHEESEMAN K.H., OSMAN N. and SLATER T.F., 1988, Lipid peroxidation in purified plasma membrane fractions of rat liver in relation to the hepatotoxicity of CCl₄, Cell. Biochem. and Function, 6, 87-99.**
- LEVY G. and BRABEC M.J., 1984, Binding of CCl₄ metabolites to rat hepatic mitochondrial DNA, Toxicol.Lett., 22, 229-234.**
- LEWIS M.H., BAKER A.L. and MOOSA A.R., 1982, Effect of somatostatin on determination of bile flow in unanesthetized dogs, Ann.Surg., 195, 97-103.**
- LIEBER C.S., 1985, Treatment of alcoholic liver injury, Int.J.Clin.Pharm.Res., 5(6), 369-380.**
- LIETTI A., 1977, Choleric and cholesterol lowering properties of two Artichoke extract, Fitoterapia, 48, 153-158.**
- LIEVRE H. et GUILLOT B., 1985, Défense et illustration du drainage. Intérêt de Chrysantellum, Extrait des Cahiers de Biothérapie, 87, Travail commun des Laboratoires IPHYM/Santane et du CEIA.**
- LINDSTROM T.D. and ANDERS M.W., 1977, Effect of cycloheximide and actinomycine D on CCl₄ hepatotoxicity, Toxicol.Appl.Pharmacol., 42, 167-173.**
- LIU K.T. and LESCA P., 1982, Pharmacological properties of dibenzo a,c cyclooctene derivatives isolated from Fructus schizandrae chinensis. 1: interaction with rat liver cytochrome P₄₅₀ and inhibition of xenobiotic metabolism and mutagenicity, Chem.Biol.Interact., 39, 307-314.**
- LOCOCK R.A., BEAL J.L. and DUSKOTCH R.W., 1966, Alkaloids constituents of E. serotinum. Lloydia, 29(3), 201-205.**

- MAC DONALD J.R., GANDOLFI A.J. and SIPES I.G., 1986,** Amelioration of CCl_4 induced hepatic necrosis by post toxicant treatment with cystamine, *Toxicology*, 39, 136-148.
- MAC GREGOR J.T., 1986,** Genetic toxicology of the dietary flavonoids, In CODYS V., MIDDLETON E. and HARBORNE J.B.: *Plant flavonoids in biology and medicine*, Ed. : Alan R. Liss Inc., New-York, 33-43.
- MALDAUS G., 1933,** *Lehrbuch der biologischen Heilmittel*, Ed. Thieme verlag, Leipzig, 1310-1314.
- MALINGRE Th.M., 1971,** *Eupatorium cannabinum* L., een oud geneeskruid met nieuwe perspectieven, *Pharm.Weekb.*, 106, 738-744.
- MANABE A., NAKAYAMA S. and SAKAMOTO K., 1987,** Effects of essentials oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes, *Japan J. Pharmacol.*, 44, 77-84.
- MASSRY S.G., 1984,** Effect of diuretic on calcium metabolism, In PUSCHETT J.B. : *Diuretics Chemistry, Pharmacology and Clinical Application, Proceedings of the First International Conference on Diuretics*, 1984, Miami Beach, Florida, U.S.A., Ed. : Elsevier Sci.Publishing.Inc., 182-184.
- MATHISEN O. and RAEDER M., 1983,** Role of sodium bicarbonate and plasma osmolality in biliary secretion, *Scan.J.Gastroenterol.*, 18, 825-832.
- MATSUBARA T., GLENDE E.A., WALLER J.R.L. and LOWREY K., 1983,** CCl_4 induced hepatotoxicity in rats: evidence for difference susceptibilities of rat liver lobes, *Japan J.Pharmacol.*, 33, 453-445.
- MAVIER P., PREAUX A.M., DELCHIER J.C., BEAUCHANT M. et DHUMEAUX D.K, 1983,** Comparaison des effets de la cimétidine et de la ranitidine in vivo et in vitro sur le système enzymatique microsomal hépatique chez le rat, *Gastroenterol.Clin.Biol.*, 7, 244-250.
- MEIKLE R.D., 1985,** *Flora of Cyprus*, 2, Ed. : The Bentham-Moxon Trusu, Royal Botanic Gardens, 866-867.
- METWALLY A.M. and EKIJUBA E.C., 1981,** Methoxylated flavonols and flavonones from *Eupatorium cannabinum* L., *Planta Med.*, 42, 403-405.
- MIRAGOLI G. and FERRINI R, 1982,** Effect of ibopamine on diuresis in conscious rats in normal and experimentally altered conditions, *Arzneim.Fosch./Drug Res.*, 36(1), 2a, 318-322.

- MIRANDA C.L., HENDERSON M.C., SCHMITZ J.A. and BUHLER D.R., 1983, Protective role of dietary butylated hydroxyanisole against chemical-induced acute liver damage in mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 69, 73-80.
- MOORE L., 1983, Enhanced hepatotoxicity and inhibition of liver endoplasmic reticulum calcium pump by CCl_4 in rats fed a thiamine deficient diet, *Life Sci.*, 32, 741-745.
- MORGAN M. Y., 1986, Hepatoprotective agents in alcoholic liver disease, *Acta.Med.Scand.*, suppl.703, 225-233.
- MORI H., TANAKA T., SHIMA H., KUNIYASU T. and TAKASHI M., 1986, Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenicity in large intestine and liver hamsters, *Canc.Lett.*, 30, 49-54.
- MORTIER F., 1972, De l'intérêt thérapeutique de certains acides organiques aliphatiques, constituants de diverses drogues à réputation hépatothorénales et en particulier de Cynara scolymus, Thèse Pharm., Univ. Nancy, Fr., 200pp.
- NADKARNI K.M., 1927, The indian materia medica, Ed. : Nadkarni K.M., Bombay, 346.
- NAKAMURA M., SHIMIZU T., MIYATA K. and KAWABATA T., 1988, Diuretic effects of a novel uricosuric antihypertensive S-8666 in rats, mice, monkeys and dogs : Comparison with furosemide and trichloromethiazide, *Drug Dev.Res.*, 12, 41-51.
- NASR C., 1984, D.E.A. de Chimie Appliquée, Univ. Sci., Strasbourg, Fr., 3.
- NASR C., 1987, Etude chimique de substances originales du Ginkgo biloba L. (ginkgoacées) dérivés flavoniques(hétérosides- esters) et quinoléiques carboxyliques essais pharmacologiques préliminaires, Thèse Sci. Univ. Louis Pasteur.
- NEU R., 1957, *Naturwissenschaften*, 44, 181-182.
- NEWBERNE P.M., 1986, Assesment of the hepatotoxic and carcinogenicity potentials of chemicals, In FILLASTRE J.P. : *Hepatotoxicity of drugs*, Ed : Les éditions INSERM, Publication de l'Université de Rouen, , 75-125.
- NIEHAUS W.G. and SAMUELSON B., 1968, Formation of malonaldehyde from phospholipids arachidonate during microsomal lipoperoxidation, *Env.J.Biochem.*, 6, 126-130.
- NIESC NIESCHULZ O. and SCHMERSHAL P., 1968, Über chole Wirkstoffe aus Artemisia arbroratum L, *Arzneim.Forsch.*, 18, 1330-1336.
- OGAWA S., HIRAYAMA T., TOKUDA M., HIRAI K. and FUKUI S., 1986, The effect of quercetine, a mutagenicity-enhancing agent on the metabolism of 2 acetylaminofluorene, *Mut.Res.*, 162, 179-186.

OHNISHI I.K., MISHIMA A. and OKUDA K., 1982, Immunofluorescence of phenobarbital inducible cytochrome P₄₅₀ in the hepatic lobule of normal and phenobarbital treated rats, *Hepatology*, 2(6), 849-855.

OKOLICSANYI L., LIRUSSI F., STRAZZABOSCO M., JEMMOLO M., ORLANDO R., NASSUATO G., MURACA M. and CREPALDI G.L., 1986, The effect of drugs on bile flow and composition. An overview, *Drugs*, 31, 430-448.

OKUDA H., SORRENTINO D., ALPINI G., TAVALONI N., JONES M.J.T., JANE M., KIANG C.L. and BERK P.D., 1988, Bile acid secretion of pool size during phenobarbital induced hypercholeresis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 187, 202-208.

ORREGO H., CARMICHAEL F.J., PHILLIPS M.J., KALANT H. and KHANNA J., 1976, Protection by propylthiouracil against tetrachloride-induced liver damage, *Gastroenterol.*, 71, 821-826.

ORRENIUS S., SARAH A.J., BELLOMO G., THOR H., JONES D.P. and SMITH M., 1983, Relation of calcium compartmentation in the hepatocyte - a critical role of glutathione, In Larson A. et coll. : Functions of Glutathione : biochemical, physiological, toxicological and clinical aspect, Ed. : Raven Press, New-York, 261-269.

OSWIECIMSKA M. and SENDRA J., 1972, Eupatorium cannabinum L., part 1: Search for biologically active fraction, *Dissert.pharm.Pharmacol.*, 24(5), 475-483.

PACKER J.E., SLATER T.F. and WILSON R.L., 1978, Reaction of the carbon tetrachloride related free radical CCl₃O[•] with amino acids : pulse radiolysis evidence, *Life Sci.*, 23, 2617-2620.

PAGANI F. and ROMUSSI G., 1967, Sui costituenti dell'Eupatorium cannabinum L. var. syriacum (Jacq.), *Il Farmaco*, Ed.Pr., 22(12), 771-785.

PAPPAS N.J., WISECARVER J.L. and BECKER S., 1984, Effect of cycloheximide on increased aspartate aminotransferase in CCl₄ hepatotoxicity, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 14(1), 40-46.

PARIS R.R. and MOYSE H., 1971, Matière médicale, 3, Ed. : Masson et C^{1e}, Paris, 370.

PEDERSEN E., 1975, Echinatine and supinine: pyrrolizidine alkaloids from E.cannabinum, *Phytochemistry*, 14, 2087-2088.

PERISSOUD D., 1981, Mise au point d'une méthode biologique par la sélection de molécules hépatotropes du groupe des flavonoïdes, Ph.D Univ. Lausanne, Suisse, 234pp.

PERISSOUD D. and WEIBEL I., 1980, Protective effect of (+)-cyanidanol-3 in acute liver injury galactosamine or carbone tandrachloride in the rat, Naunym.Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 312, 285-291.

PERISSOUD D. et TESTA B., 1986, Inhibiting or potentiating effects of flavonoids on CCl₄ induced toxicity in isolated rat hepatocytes, *Arzneim.Forsch./Drug Res.*, 36(2), 1249-1253.

PETKOV V. et MARKOVSKA V., 1981, L'effet diurétique de Sambucus ebulus L, *Pl.Med.Phytothér.*, 15(3), 172-182.

PINCEMAIL J., DEBY C., LION Y., BRAQUET P., HANS P., DRIEU K. and GOUTIER R., 1985, Role of flavonoids in lipoperoxidation and radical reactions, 7th Ungarian Bioflavonoids Symposium, 16-18 Fby, Szeged, Hongrie.

POPPER H., 1982, Hepatocellular degeneration and death, In **ARIAS I.M., POPPER H., SCHACHTER D. and SHAFRITZ D.A.**: The liver biology and pathobiology, Ed. : Raven Press, New-York, 213-241.

PRYOR W.A., 1976, Free Radicals in Biology, Ed. : Pryor W.A., New-York.

QUIJANO L., MALANGO F. and RIOS T., 1970, The structure of eupalin and eupatolin. Two new flavonol rhamnosides isolated from Eupatorium ligustrum D.C, *Tetrahedron*, 26, 2851-2859.

REBUELTA M., SAN ROMAN L. and G.-SERRANILLOS M., 1981, Etude de l'effet diurétique de différentes préparations de l'Ononis spinosa L, *Pl.Méd.Phytothér.*, 15(2), 99-108.

REBUELTA M., VIVAS J.M., SAN ROMAN L. and G.-SERRANILLOS M., 1983a, Etude de l'effet diurétique de différentes préparations de feuilles de Sambucus nigra L, *Plant.Medic.Phytothér.*, 17(3), 173-181.

REBUELTA M., VIVAS J.M., SAN ROMAN L., G-SERRANILLOS M., 1983b, Etude de l'effet diurétique de différentes préparations des feuilles de Viola odorata L, *Plant.Medic.Phytothér.*, 17(4), 215-221.

RECKNAGEL R.O. and GHOSHAL H.K., 1966, Lipoperoxidation as a vector in CCl₄ hepatotoxicity, *Lab.Invest.*, 15, 132-148.

RECKNAGEL R.O., GLENDE E.A., WALLER J.R.L. and LOWREY K., 1982, Lipid peroxydation: biochemistry, measurement and significance in liver cell injury, In **Plaa G.L. and Hewitt W.R.**: Toxicology of the liver, Ed. : Raven Press, New-York, 231-235.

RENAUD H.P.J. and COLIN G.S., 1934, Glossaire de la matière médicale marocaine, Ed. : Librairie orientaliste Paul Geuthner, Paris, 184-185.

RENE E., DANZINGER R.F. and HOFMANN A.F., 1983, Pharmacologic effect of somatostatin on bile formation in the dog. Enhanced ductular reabsorption as a major mechanism of anticholeresis, *Gastroenterol.*, 84, 120-129.

REYNOLDS E.S., TREINEN R.J., FARRISH H.H. and MOSLEN M.T., 1984, Metabolism of CCl_4 to exhaled, excreted and bound metabolites, *Biochem.Pharmacol.*, 33(21), 3363-3374.

REYNOLDS E.S., TREINEN R.J., FARRISH H.H. and MOSLEN M.T., 1984, Metabolism of CCl_4 to exhaled, excreted and bound metabolites, *Biochem.Pharmacol.*, 33(21), 3363-3374.

RICCI G.L. and FEVERY J., 1981, Cholestatic action of somatostatin in the rat: Effect on the different fractions of bile secretion, *Gastroenterol.*, 81, 552-562.

ROBINSON H. and KING R.M., 1977, Eupatoriae-systematic review, In HEYWOOD V.H., HARBORNE J.B. and TURNER B.L. : The biology and chemistry of the Compositae, 1, Ed. : Academic Press Inc., Londres, 437-483.

RODRIGUEZ E., TOWERS G.H.N. and MITCHELL J.C., 1976, Biological activities of sesquiterpene lactones, *Phytochemistry*, 15, 1573-1580.

ROLLAND A., 1984, Standardisation des différents paramètres influents sur le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique chez la souris Swiss, D.E.A Toxicol., Univ. Metz, Fr., 49pp.

ROLLAND A., 1988, Contribution à l'étude botanique et pharmacologique d'Escholtzia californica Cham, Thèse Sci., Univ. Metz, Fr., 425pp.

ROSEN G.M. and RAUCKMAN E.J., 1982, CCl_4 induced lipidperoxydation: a spin trapping study, *Toxicol.Lett.*, 10, 337-344.

ROSSI M, RICKLES L.F. and HALPIN W.A., 1986, The crystal and molecular structure of quercetin, a biologically active and naturally occurring flavonoids, *Bioorg.Chem.*, 14, 55-59.

RUSH G.L., GORSKI J.R., RIPPLE M.G., SOWINSKI J., BUGLESKIP. and HEWITT W.R., 1985, Organic hydroperoxides-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 78, 473-483.

RUSH G.L., YODIS L.A. and ALBERTS D., 1986, Protection of rat hepatocytes from ter-butyl hydroperoxide-induced injury by catechol, *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 84, 607-616.

SAKAI K., YAMANE T., SAITOH Y., IKAWA C. and NISHIATA T., 1987, Effect of water extracts of crude drugs in decreasing blood ethanol concentrations in rats, *Chem.Pharm.Bull.*, 35(11), 4597-4604.

- SAMUEL L.T. and EIK-NES K.B., 1968, Metabolism of steroid hormones, In Greenberg D.M., Ed. : Academic Press, New-York, 2, 169-220.**
- SARMA (P.V.), 1969, Dravyaguna Vijnana, Varanasi, Chowkhamba Vidyabhawan, 2, 2^{ème} édition, 701-703 (en Hindi).**
- SCHETTLER G. and NUSSEL E., 1975, Arbeitsmed.Sozialmed.Praventivmed., 10, 25.**
- SCHIESSEL C., FURTHOVE C. and KEPPLER D., 1984, ⁴⁵Calcium uptake during the transition from reversible to irreversible liver induced by D-Galactosamine in vivo, Hepatology, 4(5), 855-861.**
- SCHWARTZ J., IMBS J.L. and BLOCH R., 1978, Diurétiques, In GIROUD J.P., MATHE G. et MEYNIEL G.: Pharmacologie clinique, 1, Ed. : Expansion Scientifique Française, Paris, 561-583.**
- SEGLEN P.O., 1976, Preparation of isolated rat liver cells, In Methods in cell biology, 13, 4, 29-83.**
- SHAH G.M. and BHATTACHARYA R.K., 1986, Modulation by plant flavonoids and related phenolics of microsome catalyzed adduct between benzo- -pyrene and DNA, Chem.Biol.Interact., 59, 1-15.**
- SHARMA R.C., GUPTA S.K. and ARORA R.B., 1973, Structure activity relationship of some organic hydroxyacids with reference to their choleric activity, Ind.J.Exp.Biol., 11, 572-573.**
- SIEGERS C.P., PAULI V., KORD G. and YOUNES M., 1986, Hepatoprotection by malolitate against CCl₄-alcohol-induced liver fibrosis, Agents and Action, 18(5/6), 600-603.**
- SIEGERS C.P., VOLPEL M., SCHEEL G. and YOUNES M., 1982, Effect of dithiocarb and catechin against CCl₄-alcohol-induced fibrosis, Agents and actions, 12(5), 743-748.**
- SIPES I.G., KIRSHNA G. and GILLETTE J.R., 1977, Bioactivation of CCl₄ and bromotrichloromethane role of cytochrome P₄₅₀, Life Sci., 20, 1541- 1548.**
- SLATER T.F., 1978, Biochemical studies of liver injury, In SLATER T.F.: Biochemical mechanisms of liver injury, Ed. : Academic Press Inc., Londres, 1-44.**
- SLATER T.F. and SAWYER B.C., 1971, The stimulation effects of CCl₄ on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro, Biochem.J., 123, 815-821.**
- SUFFNESS M. and DOUROS J., 1982, Current status of the NCI plant and animal product program, J.Nat.Prod., 45(1), 1-14.**
- KODAKANDLA S.K.V., SINH B., THAKUR R.S., HUSAIN A., KISO Y. and HIKINO H., 1985, Antihepatotoxic principles of Phyllanthus niruri herbs, J.Etnopharmacol., 14, 41-44.**

TABARY A.M., 1986, Utilisation traditionnelle et profil pharmacologique de Carlina acaulis L, Thèse Pharm., Univ. Nancy, Fr., 61pp.

TRAIGER G.J. and BRUCKNER J.V., 1976, The participation in 2-butanol induced potentiation of CCl_4 hepatotoxicity, J.Pharmacol.Exp.Ther., 196(2), 741-745.

TAKAHASHI T., ICHIMURA T. and MURAE T., 1979, Hiyodorilactone D, E, F, new cytotoxic sesquiterpene lactones from E.sachalinense Makino, Chem.Pharm.Bull., 27, 2539-2543.

TAKEDA S. and ABURADA M., 1981, The choleric mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds, J.Pharm.Dyn., 4, 724-734.

TAKEDA S., YUAS K., ENDO T. and ABURADA M., 1980, Pharmacological studies on iridoid compounds. 2. Relationship between structures and choleric action of iridoids compounds, J.Pharm.dyn., 3, 485-492.

TALAPATRA S.K., BHAR D.S. and TALAPATRA B., 1974, Dammaradienyl acetate and taraxasterol from E.cannabinum mass spectrometric. Study of dammaradienyl acetate and its derivatives, Aus.J.Chem., 27, 1137-1142.

TANAYAMA S. and KANAI Y., 1977, Studies on increase bile formation produced by polyoxybenzenes in rat, Jap.J.Pharmacol., 27, 71-78.

TATEOKA Y., KIMURA T., WATANABE K., YAMAMOTO I. and HO I.K., 1987, Potentiation of barbiturate-induced substituted derivatives of phenobarbital, amobarbital and thiopental in mice, Chem.Pharm.Bull., 35(2), 778-794.

TESCHKE R., VIEKE W. and GOLDREMANN L., 1983, CCl_4 levels and serum activities of liver enzymes following acute CCl_4 intoxication, Toxicol.Lett., 17, 175-180.

TIEN TUNG P., KUII-FANG H., KENG-TAO L., LING-YUN C., CHEN-HUA C. and CHEN-YU S., 1977, Protective action of Schizandrin B on hepatic injury in mice, Chinese Med.J., 3(3), 173-180.

TOMASI A., ALBAND E., LOTT K.A.K. and SLATER T.F., 1980, Spin trapping of free radical products of CCl_4 activation using pulse radiolysis and high energy radiation exposure, F.E.B.S. Lett., 122, 303-306.

TOREL J., CILLARD J. and CILLARD P., 1986, Antioxydant activity of flavonoids and reactivity with peroxyradical, Phytochemistry, 25(2), 383-385.

TSUKAMOTO I., KOJO S., 1987, Effect of calcium channel blockers and trifluoroperazine on rat liver regeneration, European J.Pharmacol., 144, 159-162.

TUTIN G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M. and WEBB D.H., 1976, *Flora Europea*, 4, Ed.: Cambridge University Press, Cambridge, 103-109.

VALENZUELA A., LAGOS C. and SCHMIDT K., 1985, Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol in the rat, *Biochem.Pharmacol.*, 34(12), 2209-2212.

VELES SALAS F., 1982, *Plantas medicinales de Venezuela*, Ed : VELES BOZA F., Instituto de capacitacion agricola, Caracas, 153, 144pp.

VERNET A. and SIESS M.H., 1986, Comparison of the effect of various flavonoids on ethoxycoumarin deethylase activity of rat intestinal and hepatic microsomes, *Fd.Chem.Toxic.*, 24(8), 857-861.

VOGEL G., 1977, Natural substances with effect on the liver, In WAGNER H. and WOLFF P.: *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological and therapeutical activity*, Ed. : Springer Verlag, Berlin, 265-247.

VOLLMAR A., SCHAEFER W. and WAGNER H., 1986, Immunologically active polysaccharides of E.cannabinum and E.perfoliatum, *Phytochemistry*, 25(2), 337-381.

VON DIPPE P., ANANTHANARYANAN M., DRAIN P. and LEVY D., 1986, Purification and reconstitution of the bile acid transport system from hepatocytes sinusoidal plasma membrane, *Biochem.Biophys.Acta*, 862, 352-360.

WAGNER H., 1980, Plant constituents with antihepatotoxic activity, In BEAL J.R. and REINHARD E.: *Natural products as medicinal agents*, Ed. : Hippokrates Verlag, Stuttgart, 217-242.

WAGNER H., BLADT S. and ZGAINSKI E.M., 1984, *Plant drug analysis*, Ed. Springer Verlag, Berlin, RFA, 182.

WAGNER H., GEYER B., KISO H. and RAO G., 1986, Coumestans as the main active principle of the drug Eclipta alba and Wedelia calendulacea, *Planta Med.*, , 77-79.

WAGNER V.H., PROKSCH A., RIESS-MAURER I., VOLLMAR A., ODENTHAL S., STUPPNER H., JURCIC K., LETURDA M. and FANG T.N., 1985, Immunstimulierend wirkende polysaccharide (heteroglykane) aus hoheren pflanzen, *Arzneim.Forsch.Drug Res.*, 35(11), 7, 1069-1075.

WAROT D., ADVENIER C., ETEVENON P. and BOISSIER J.R., 1979, *Hypnotiques*, In GIROUD J.P., MATHE G. et MEYNIEL G. : *Pharmacologie clinique : Base de la thérapeutique.*, Ed : Expansion scientifique française, Paris, 2, 1607.

WASSEL G., EL-MENSHAWI B., SAEED A., MAHRAN G. and MERZABAN I., 1987, Screening of selected plants for pyrrolizidine alkaloids and antitumor activity, *Pharmazie*, 42(H10), 709.

WEICHSELBAUM T.E., 1946, Amer.J.Clin.Path., 16, 40.

WEISSHAAR D. et coll., 1975, Med.Welt., 26, 387.

WILLIAMS D.E. and PRIESTLY B.G., 1973, Evaluation of prophylactic efficacy of silymarine in CCl₄-induced hepatotoxicity, Res.Com.Chem.Pathol., 6(1), 185-194.

WOERDENBAG H.J., 1986, Eupatorium cannabinum L., a review emphasizing the sesquiterpene lactones and their biological activity, Pharm.Weekb.Scient.Ed., 8, 245-251.

WOERDENBAG H.J., LEMSTRA W., HANDRIKS H., MALINGRE Th.M. and KONINGS A.W.T., 1987a, Investigation of the antitumor action of eupatoriopicrine against the Lewis lung tumor, Planta Med., 53(4), 318-322.

WOERDENBAG H.J., MALINGRE Th.M., LEMSTRA W. and KONINGS W.T., 1988, Reduced levels of glutathione in liver tumour tissue of mouse after administration of eupatoriopicrine, Phytotherapy Res., 2(2), 80-84.

WOERDENBAG H.J., MALINGRE Th.M., LEMSTRA W. and KONINGS W.T., 1987b, Cytostatic activity of eupatoriopicrine in fibrosarcoma bearing mice, Phytother.Res., 1(2), 76-79.

WOERDENBAG H.J., MEIJER C., MULDER N.H., DE VRIES M.C.E., HENDRIKS H. and MALINGRE Th.M., 1986, Evaluation of the in vitro cytotoxicity of some sesquiterpene lactones on a human lung carcinoma cell line using the fast green dye exclusion assay, Planta Med., 2, 112-114.

WOOD A.W., HUANG M.T., CHANG R.L., NEWMARK H.L., LEHR R.E., YAGI H., JERINA D.M. and CONNEY A.H., 1982, Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polyphenolic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols : exceptionnal activity of ellagic acid, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79, 5513-5517.

WOOD A.W., SMITH S.S., CHANG R.L., HUANG M.T. and CONNEY A.H., 1986, Effects of flavonoids on the metabolism of xenobiotics, In CODYS V., MIDDLETON E. and HARBORNE J.B.: Plant flavonoids in biology and medicine, Ed. : Alan R. Liss Inc., New-York, 195-210.

WRIGHT S., 1973, Physiologie appliquée à la médecine, 12ème édition, 223, Ed. : Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 606pp.

WROBLESKI F. and LADUE I.S., 1956, Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 91, 569.

YAMAHARA J., KIMURA H., KOBAYASHI M., OKAMOTO T., SAWADA T., FUJIMURA H. and CHISAKA T., 1985(c), Cholagogic action and characteristics of -terpineol - -O glucopyranoside, a new monoterpenoid glucoside, Chem.Pharm.Bull., 33(4), 1669-1675.

YAMAHARA J., KOBAYASHI M., MIKI K., KOZUKA M., SAWADA T. and FUJIMURA H., 1985(b), Cholagogic and antiulcer effect of Saussureae radix and its active components, Chem.Pharm.Bull., 33(3), 1285-1288.

YAMAHARA J., KOBAYASHI M., SAIKI Y., SAWADA T. and FUJIMURA H., 1983, Biologically active principles of crude drugs, Pharmacological evaluation of cholagogue substances in clove and its properties, J.Pharm.Dyn., 6, 281-286.

YAMAHARA J., MIKI K., CHISAKA T., SAWADA T., FUJIMURA H., TOMIMATSU T., NAKANO K. and NOHARA T., 1985(a), Cholagogic effect of ginger and its active constituents, J.Etnopharmacol., 13, 217-225.

YAMAHARA J., MIKI K., SAWADA T., FUJIMURA H. and KONISHI T., 1985(d), Biologically active principles of crude drugs. Cholagogic substances in Menthae herba, Shoyakugaku Zasshi, 39(1), 93-98.

YANG L.L., YEN K.Y., KISO Y. and HIKINO H., 1987, Antihepatotoxic actions of Formosan plant drugs, J.Etnopharmacol., 19, 103-110.

YOUNES M. and SIEGERS C.P., 1984, Interrelation between lipid peroxydation and other hepatotoxic events, Biochem.Pharmacol., 33(13), 2001-2003.

YOUNES M., ALBRECHT M. and SIEGERS C.P., 1983, Interrelation between lipid peroxidation and lysosomal enzyme release in the presence of CCl₄, cumene hydroperoxyde or thioacetamide, Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol., 33(13), 2001-2003.

ZDERO G. and BOHLMANN F., 1987, Eupatoriopicrin 19-O linoleate and other constituents from E.cannabinum, Planta Med., 2, 169-172,