AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE METZ

CENTRE DES SCIENCES
DE L'ENVIRONNEMENT

N° d'ENREGISTREMENT :

THESE

PRESENTEE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

MENTION PHARMACOGNOSIE

PAR

ALAIN ROLLAND

DOCTEUR EN PHARMACIE

UNIVERSITE DE METZ
BIBLIOTHEQUE

ETUDE PHARMACOLOGIQUE ET CONTRIBUTION A L'ETUDE BOTANIQUE ET CHIMIQUE D' ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 19880575
Cote S/Mz 88/25
Loc Magasin

SOUTENUE LE 10 JUIN 1988

EXAMINATEURS :

M. J. ATTKINSON , Professeur
M. J. FLEURENTIN , Maître de Conférence (directeur de thèse)
M. J. LEMOINE , Directeur Scientifique (Laboratoire DEBAT)
M. R. MISSLIN , Maître de Conférence
M. F. MORTIER , Professeur (Rapporteur)
M. J.M. PELT , Professeur (président du jury)
M. J.J. SERRANO , Professeur (Rapporteur)

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

ET

CONTRIBUTION A L'ETUDE BOTANIQUE ET CHIMIQUE D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM.

Je dédie ce travail

A ma mère,

Qu'elle voit dans ce travail l'aboutissement de tous les sacrifices qu'elle a consentis depuis de nombreuses années. En témoignage d'une profonde reconnaissance ;

A ma grand-mère,

En témoignage d'une profonde affection réciproque ;

A ma soeur Michèle,

Pour sa compréhension et son soutien ;

A mes amis sportifs, auprès de qui j'ai toujours trouvé un soutien moral et une insoupçonnable solidarité ;

A Francis et James, pour leur amitié de longue date ;

A tous mes amis.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Pharmacognosie du centre des Sciences de l'Environnement de l'Université de METZ. Il débute toute une série de travaux concernant la pharmacologie des plantes médicinales. Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail, je voudrais exprimer mes remerciements et toute ma gratitude envers toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur Jean-Marie PELT m'a fait l'honneur de présider le jury. Je voudrais ici lui exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude pour son aide, ses nombreux conseils, ses encouragements et pour la confiance qu'il m'a toujours témoigné tout au long de la réalisation de ce travail dont il est l'instigateur. Mon maître depuis plus de dix ans, car dès 1974, époque où je débutais mes études de pharmacie, il m'a donné goût à la botanique à la suite de différentes conférences et cours qu'il donnait à la Faculté et a su rapidement attiré mon attention pour la vie secrète des plantes. Puis à partir de 1983, époque où je cherchais à préparer mon doctorat de pharmacie, il m'a accepté, avec une totale confiance et une grande amitié dans son laboratoire de Pharmacognosie au Cloître des Récollets, véritable paradis culturel où la philosophie s'harmonise avec la rigueur scientifique. Qu'il trouve ici l'assurance de mon profond attachement au service et à toute l'équipe qu'il a créée au centre des Sciences de l'Environnement.

Je mesure tout ce que je dois à Monsieur Jacques FLEURENTIN, Maître de Conférence à l'Université de METZ et assistant de Monsieur le Professeur Jean-Marie PELT. Il m'a fait bénéficier sans relâche depuis mon arrivée au laboratoire de sa compétence, de son esprit critique et d'entreprise. Il m'a encouragé, après mon doctorat de pharmacie à continuer la recherche scientifique. Toujours disponible, il a accepté de guider la rédaction de ce mémoire. Son dynamisme et sa compétence est un exemple pour nous tous. Qu'il trouve ici mon immense reconnaissance et ma sincère gratitude.

Monsieur le Professeur François MORTIER a montré une grande disponibilité tout au long de ce travail pour me faire bénéficier de sa compétence et de sa très grande expérience. A tout moment j'ai pu avoir accès à son laboratoire pour réàliser les chromatographies sur couche mince. Qu'il me soit permis ici de lui exprimer mes plus vifs remerciements.

Je suis également très reconnaissant à Monsieur René MISSLIN qui m'a réservé un accueil spontané et chaleureux dans son laboratoire de Psychophysiologie de STRASBOURG, pour m'avoir initié aux problèmes du comportement de la souris et l'analyse des résultats. Sa rigueur scientifique, ses conseils, ses critiques et ses encouragements qu'il a toujours bien voulu m'apporter tout au long de mon travail m'ont procuré une grande admiration. Je suis heureux qu'il siège dans ce jury.

Il m'est très agréable d'adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur ATTKINSON pour avoir accepté de juger ce travail et qui a toujours montré une grande amabilité à nous recevoir dans son laboratoire de Pharmacodynamie pour nous conseiller, nous permettre de réaliser des expériences ou nous prêter à plusieurs reprises des appareils indispensables à la continuité de ce travail.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur Jean-Jacques SERRANO pour avoir trouvé un intérêt à juger mon travail et pour avoir accepté d'être l'un des rapporteurs.

Je remercie Monsieur J. LEMOINE, Directeur Scientifique des Laboratoires DEBAT, pour avoir accepté de juger mon travail et pour avoir porté un intérêt à Eschscholzia californica Cham. et avec qui nous devrions entreprendre une collaboration future, qui pourrait aboutir au développement de cette plante dans le secteur pharmaceutique. Je suis heureux qu'il siège dans ce jury.

Je voudrais que tous les maillons qui ont assuré la continuité de la chaîne que représente cette thèse soit assurés de mes plus vifs remerciements et de ma plus grande reconnaissance.

Je remercie :

Monsieur Chafique YOUNOS, Professeur de Botanique afghan pour sa constante amabilité à mon égard et pour m'avoir conseillé e apporté toutes les critiques nécessaires à la réalisation et à la rédaction de la partie botanique. Qu'il soit assuré de ma gratitude, de mon admiration et de mon amitié.

Monsieur Jean-Pierre MUYARD, qui a participé à la mise en oeuvre de ce travail.

Monsieur Michel JOYEUX, médecin et étudiant au Laboratoire de Pharmacognosie qui m'a aidé pour l'étude de la toxicité de l'extrait d'Eschscholzia californica Cham.

Monsieur VALCK, Directeur du Jardin Botanique de VILLERS-LES-NANCY, qui m'a toujours permis d'accéder à la bibliothèque afin d'y trouver les flores qui m'ont été nécessaires pour la taxinomie de l'espèce.

Monsieur Rémi VILLAGI, photographe publicitaire, qui a apporté sa contribution par une compétence et un dévouement de tout instant, pour la coloration de cette thèse.

Marie-Claire LANHERS, collaboratrice au laboratoire de Pharmacognosie pour sa compétence et sa rigueur scientifique dans la réalisation de différents tests comportementaux.

Joséphine BERNABE, pour le sérieux et la compétence avec lesquels elle a mis au point la technique in vitro de l'affinité des extraits de plante pour les récepteurs aux benzodiazépines.

Rachid SOULIMANI, pour avoir réalisé les tests antihistaminiques dans le cadre de son DEA.

Claudine RAST, Véronique THARREAU, Sophie et Jean-Pierre et tous les collègues du laboratoire pour leur participation au festidieux photocopiage de plusieurs exemplaires du manuscrit, et pour leur sympathie quotidienne, indispensable à la vie au laboratoire.

Je remercie Francine KLEIN pour sa participation à la dactylographie de la partie botanique.

Je voudrais adresser mes plus vifs remerciements à Isabelle DRUM pour l'assiduité avec laquelle elle a assuré la dactylographie du manuscrit. Qu'elle sache combien j'ai apprécié l'esprit qui l'anime au sein de notre équipe et qu'elle en reçoive ici toute ma reconnaissance.

Jean-Paul HALADYN, pour ses dons de graphiste.

Hassan HADI, pour son aide à la réalisation des chromatographies sur couche mince.

Monsieur Charles GROSSE pour son amabilité, ses compétences et son dévouement avec lesquels il nous a conçu différents appareils.

Monsieur Paul LEHR et Jean Marie KELLER du Laboratoire de Biologie moléculaire du développement de la Faculté des Sciences de Nancy, pour la réalisation de la microscopie électronique.

Jean-Claude BLOCK, Paule VASSEUR, Jean-François FERARD, Paul LEHR, tous mes collègues et tout le personnel du Centre des Sciences de l'Environnement pour leur collaboration, leurs conseils, leur amabilité et leur soutien.

Il y a éclatement du réel en de multiples facettes. La nature est une matière première que l'on domine. On veut du fonctionnel. On n'écoute plus les signes de la nature, ses enseignements. On en oublie que la machine humaine, le récepteur, est très compliquée, on ignore ce que fait la molécule.

Nous devrions nous méfier de l'esprit trop analytique, poursuit le conférencier, comprendre que la nature est cohérente, qu'il y

a un lien de vie entre l'homme et les plantes, qui ont une chimie complémentaire de la nôtre et dont nous ne pouvons pas nous passer.

Ainsi débouchons-nous sur des « thérapeutiques douces », moins agressives, moins toxiques, complémentaires de ce que sont nos métabolismes, orientées vers la symbiose des molécules.

Ce mouvement de recherche est puissant. Dans vingt ans, sans doute, nous aurons renouvelé notre thérapeutique, du moins pour tous les troubles de notre vie moderne ; nous conserverons la « thérapeutique héroïque » pour les grands accidents.

Professeur Jean-Marie PELT,
Congrès de la Baule, 11 mai 1976

Les malades graves sont heureusement minorité. Pour eux peut se justifier l'emploi de produits agressifs et dangereux. Le tout est de savoir, en engageant sa responsabilité, peser « le pour et le contre », quitte à risquer des effets secondaires plus ou moins douloureux pour empêcher de mourir.

Mais pour les autres, les patraques habituels, les chroniques (même quand ils n'ont pas encore dix ans), ceux qui, n'ayant jamais rien de grave, ne sont jamais en forme, la Nature reste encore, et sans doute pour longtemps, le plus perfectionné de tous les grands laboratoires du Monde.

Affirmer que l'Aromathérapie et la Phytothérapie guérissent à tous les coups *l'ensemble des syndromes qui s'abattent journellement sur notre humanité, serait sans doute présomptueux. Aussi me suis-je toujours gardé de le prétendre.*

Mais que l'usage bien compris et patient de ces traitements améliore *— peu ou prou certes selon les cas mais* toujours *— la presque totalité de nos misères, il ne saurait depuis longtemps être question d'en douter.*

Docteur Jean VALNET,
Aromathérapie ; Traitement des maladies par les essences des plantes,
Le Livre de Poche, 1979

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

GENERALITES SUR LE GENRE ESCHSCHOLZIA 6

I PAPAVERACEAE 7

I.1. DESCRIPTION

I.2. IMPORTANCE ECONOMIQUE DE PAPAVERACEAE 9

II LE GENRE ESCHSCHOLZIA 10

II.1. PLACE DU GENRE ESCHSCHOLZIA DANS LA SYSTEMATIQUE DE LA FAMILLE DES PAPAVERACEAE

II.2. DESCRIPTION 12

II.3. TAXONOMIE DU GENRE ESCHSCHOLZIA

3.1. Index Kewensis 13

3.2. Différentes espèces du genre Eschscholzia répertoriées dans la flore de Californie (MUNZ, 1959) et la flore des états du Pacifique (ABRAMS, 1944)

3.2.1. Systématique du genre Eschscholzia (ABRAMS, 1944) 14

3.2.2. Description des espèces du genre Eschscholzia selon la flore des états du Pacifique (ABRAMS, 1944) 15

ETUDE D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BOTANIQUE 31

I HISTORIQUE 32

II DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE 33

III DESCRIPTION 35

IV DIFFERENCIATION EN DEUX SOUS-ESPECES 44

V ESSAIS BOTANIQUES 46

V.1. MATIERES PREMIERES

V.2. OBTENTION DES COUPES HISTOLOGIQUES 46

2.1. TECHNIQUES DE COLORATION

2.2. OBSERVATION DES COUPES 47

2.2.1. Coupe d'une tige d'E. californica Cham. 48

2.2.2. Coupe d'une feuille d'E. californica Cham. 50

2.2.3. Coupe d'une racine d'E. californica Cham. 51

V.3. PREPARATION, COLORATION ET OBSERVATION DE LA POUDRE DES PARTIES AERIENNES D'E. CALIFORNICA Cham. 52

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CHIMIQUE

I COMPOSITION CHIMIQUE D'E. CALIFORNICA CHAM. 56

I.1. LA PLANTE ENTIERE

1.1. Les alcaloïdes

1.1.1. Groupe de la pavine 57

1.1.2. Groupe de la protopine 59

1.1.3. Groupe du N, benzophénanthridine 61

1.1.4. Groupe de l'aporphine 63

1.1.5. Groupe de la benzyltétrahydroisoquinoléine 65

1.1.6. Groupe de la protoberbérine 67

1.2. Constituants courants 69

I.2. REPARTITION DES DIFFERENTES SUBSTANCES CHIMIQUES DANS LA PLANTE 70

2.1. Les alcaloïdes

2.2. Les dérivés cyanogénétiques 72

II METHODES D'EXTRACTION ET DE SEPARATION DES ALCALOIDES 73

II.1. EXTRACTION DES ALCALOIDES TOTAUX

II.2. METHODE D'EXTRACTION ET DE SEPARATION DES ALCALOIDES (Maschi, 1983) 74

2.1. Méthode d'extraction et de séparation de Gertig (1964)

2.2. Méthode d'extraction, de séparation et d'identification de Slavik (1960, 1966, 1970) 75

2.3. Comportement chromatographique sur couche mince des alcaloïdes d'E. californica

2.4. Méthode de séparation par chromatographie liquide haute pression 77

TROISIEME PARTIE

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

SECTION A - INDICATIONS THERAPEUTIQUES TRADITIONNELLES ET ETUDES PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURES

1. INDICATIONS THERAPEUTIQUES TRADITIONNELLES ET UTILISATION ACTUELLE 82

1.1. INDICATIONS THERAPEUTIQUES TRADITIONNELLES

1.2. UTILISATIONS ACTUELLES ET FORMES PHARMACEUTIQUES

2. ETUDES PHARMACOLOGIQUE, TOXICOLOGIQUE ET CLINIQUE DANS LA BIBLIOGRAPHIE 84

2.1. ETUDE D'E. CALIFORNICA T.M. SUR LE COMPORTEMENT HABITUEL DE LA SOURIS 85

2.2. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE QUELQUES ALCALOIDES D'E. CALIFORNICA 86

2.1. Propriétés pharmacologiques de l'allocryptopine

2.2. Propriétés pharmacologiques de la protopine 87

2.3. Propriétés physiologiques de la chélidonine 88

2.4. Proprietés physiologiques de la sanguinarine 91

2.5. Action physiologique de la glaucine 92

2.3. ETUDE TOXICOLOGIQUE D'E. CALIFORNICA T.M. 92

3.1. Toxicité aiguë

3.2. Toxicité chronique 94

2.4. ETUDE CLINIQUE D'E. CALIFORNICA 96

SECTION B - ETUDE PHARMACOLOGIQUE : TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I - RECHERCHE DES PROPRIETES PSYCHOTROPES D'E. CALIFORNICA

1. LES EXTRAITS ET LES ANIMAUX 103

1.1. CHOIX ET PREPARATION DES EXTRAITS UTILISES

1.1. Extrait d'E. californica

1.2. Extrait de Poa sp. 104

1.2. LES ANIMAUX : CONDITIONS D'ELEVAGE ET D'EXPERIMENTATION 107

2.1. Les espèces utilisées

2.2. Conditions d'élevage

2.3. La nourriture 108

2. TOXICITE AIGUE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA PAR VOIE I.P. CHEZ LA SOURIS ET EVALUATION DE LA DOSE LETHALE 50 110

2.1. PROTOCOLE OPERATOIRE ET RESULTATS

2.2. DISCUSSION

3. PROPRIETES SEDATIVES ET ANXIOLYTIQUES D'E. CALIFORNICA 113

3.1. PROPRIETES SEDATIVES

1.1. L'activité locomotrice

1.2. Matériel et méthodes 114

- L'activi-test

- Test d'exploration du milieu nouveau 116

- Test de l'actographe 118

1.3. Résultats 120

- L'activi-test

- Test d'exploration du milieu nouveau 124

- Test de l'actographe 129

1.4. Discussion 131

3.2. PROPRIETES ANXIOLYTIQUES 133

2.1. Introduction : l'anxiolyse

2.2. Matériel et méthodes 135

- Test de l'escalier

- Test de l'enceinte claire/obscure 137

- Test de l'open-field modifié 139

2.3. Résultats 141

- Test de l'escalier

- Test de l'enceinte claire/obscure 143

- test de l'open-field modifié

2.4. Discussion 147

3.3. EFFET DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA SUR LA POTENTIALISATION ET SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL BARBITURIQUE 148

3.1. Introduction 149

3.2. Problèmes méthodologiques 152

3.3. Matériel et méthodes 153

- Mise au point et validation du protocole

- Potentialisation de l'hypnose induite par le pentobarbital sodique 154

- Effet d'un prétraitement d'E. californica 6 jours, 3 jours, 1 jour, 30 minutes sur le temps d'endormissement et le temps de sommeil induit par le pentobarbital 155

- Effet du nébulisat d'E. californica sur l'hypnose induite par le pentobarbital 155

- Effet inducteur du sommeil du nébulisat d'E. californica 156

3.4. Résultats 157

3.5. Discussion 165

4. RECHERCHE D'UN EFFET NEUROLEPTIQUE 168

4.1. RECHERCHE D'UN EFFET CATALEPTIQUE ET HYPOTHERMIQUE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA 169

1.1. Matériel et méthodes

1.2. Résultats 171

4.2. RECHERCHE D'UNE INTERACTION D'E. CALIFORNICA AVEC L'AMPHETAMINE 174

2.1. Introduction

2.2. Matériel et méthodes 175

2.3. Résultats 178

4.3. DISCUSSION 183

5. RECHERCHE D'UN EFFET ANTIDEPRESSEUR 185

5.1. RECHERCHE D'UNE INFLUENCE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA SUR L'HYPOTHERMIE, LE PTOSIS ET L'AKINESIE INDUITE PAR LA RESERPINE

1.1. Introduction

1.2. Matériel et méthodes 186

1.3. Résultats 187

5.2. RECHERCHE DE L'INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR L'HYPOTHERMIE, LA SALIVATION ET LES TREMBLEMENTS INDUITS PAR L'OXOTREMORINE 189

2.1. Introduction

2.2. Matériel et méthodes 190

2.3. Résultats 191

5.3. DISCUSSION 193

6. RECHERCHE D'UN EFFET D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE SPONTANEE DE L'ILEON DE COBAYE : EFFET POTENTIALISATEUR OU INHIBITEUR DE LA CONTRACTION INDUITE PAR L'HISTAMINE 195

6.1. INTRODUCTION : RAPPEL DE PHYSIOLOGIE

6.2. MATERIEL ET METHODES 196

6.3. RESULTATS 200

3.1. Etude de l'effet dose de l'histamine et de l'antagonisme par le dexchlorphéniramine

3.2. Influence d'E. californica sur la contraction induite par l'histamine sur l'iléon de cobaye 202

6.4. DISCUSSION

7. RECHERCHE D'UN EFFET ANALGESIQUE D'E. CALIFORNICA 205

7.1. INTRODUCTION : RAPPEL PHARMACOLOGIQUE

7.2. MATERIEL ET METHODES 209

2.1. Test du writhing

2.2. Test de la plaque chauffante 210

7.3. RESULTATS

3.1. Test du writhing

3.2. Test de la plaque chauffante 212

7.4. DISCUSSION 214

8. RECHERCHE DE PROPRIETES "BENZODIAZEPINES LIKE" 217

8.1. INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LES CONVULSIONS INDUITE PAR LE CARDIAZOLE

1.1. Matériel et méthodes

1.2. Résultats et discussion 219

8.2. INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LE TONUS MUSCULAIRE ET SUR LES REFLEXES D'EQUILIBRATION 220

2.1. Appareillage et protocole expérimental

- Test de la traction

- Test du Rota-Rod 221

2.2. Résultats 222

2.3. Discussion

8.3. EFFET D'E. CALIFORNICA (NEBULISAT) SUR LA TEMPERATURE CORPORELLE DES SOURIS ET DES RATS 224

3.1. Matériel et méthodes

3.2. Résultats 225

8.4. INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LE SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE 228

4.1. Effet d'E. californica sur le rythme cardiaque de la souris

8.5. INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LA PRESSION ARTERIELLE 232

CHAPITRE II - ETUDE IN VIVO ET IN VITRO DE L'AFFINITE D'E. CALIFORNICA POUR LES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES

1. RAPPELS DE LA PHARMACOLOGIE DES BENZODIAZEPINES 238

1.1. SITES RECEPTEURS ET MODE D'ACTION DES BENZODIAZEPINES

1.2. BENZODIAZEPINES ET LIGANDS ENDOGENES 243

1.3. LIGANDS DES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES 245

2. ETUDE IN VIVO : RECHERCHE DE L'INFLUENCE D'UN ANTAGONISTE DES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES VIS A VIS DES PROPRIETES SEDATIVES ET ANXIOLYTIQUES D'E. CALIFORNICA 246

2.1. PROTOCOLE OPERATOIRE 247

2.2. RESULTATS ET DISCUSSION 248

2.1. Antagonisme des effets sédatifs d'E. californica et du midazolam dans le test de l'open-field par le RO 15-1788

2.2. Antagonisme des effets anxiolytiques d'E. californica par le RO 15-1788 251

3. ETUDE IN VITRO DE L'AFFINITE D'E. CALIFORNICA SUR LES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES 253

3.1. PROTOCOLE OPERATOIRE 254

1.1. Isolement des synaptosomes

1.2. Détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale 263

1.3. Etude in vitro de la liaison sur les récepteurs aux benzodiazépines : détermination du binding total (BT), du binding spécifique (BS) et du binding non spécifique (BNS) 265

1.4. Etude du déplacement du flunitrazépam tritié avec une benzodiazépine de référence 267

1.5. Etude de l'influence d'E. californica sur les sites récepteurs benzodiazépiniques 269

3.2. RESULTATS 271

2.1. Contrôle de la fraction synaptosomale

2.2. Dosage des protéines de la fraction B 276

2.3. Détermination du binding total (BT), du binding spécifique (BS) et du binding non-spécifique (BNS) 279

2.4. Evaluation de l'affinité de l'extrait aqueux RT 1095 d'E. californica sur les sites récepteurs aux benzodiazépines des membranes synaptosomales de cerveau de rat 284

4. DISCUSSION 288

CHAPITRE III - ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA ADMINISTRE PAR VOIE ORALE

1. INTRODUCTION 291

2. ETUDE CHEZ LA SOURIS 292

2.1. INFLUENCE DE DIFFERENTS SOLVANTS SUR L'ACTIVITE PER OS D'E. CALIFORNICA 292

1.1. Matériel et méthodes

1.2. Résultats 295

1.3. Discussion 301

2.2. ETUDE DE L'EFFET DU LABRAFIL M 1944 C SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D'E. CALIFORNICA PAR VOIE ORALE 305

2.1. Le labrafil

2.2. Matériel et méthodes 306

2.3. Résultats 308

2.4. Discussion 313

3. EFFET D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE ET ET MANIPULATOIRE CHEZ LE RAT EN BOITE DE SKINNER 314

3.1. MATERIEL ET METHODES

3.2. RESULTATS 316

3.3. DISCUSSION 318

4. EFFET D'E. CALIFORNICA ADMINISTRE PAR VOIE RECTALE SUR LA DUREE DU SOMMEIL NARCOTIQUE 319

4.1. MATERIEL ET METHODES

4.2. RESULTATS

CHAPITRE IV - MISE AU POINT D'UN PROCEDE D'EXTRACTION ET D'UNE FORME GALENIQUE ET ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'UN EXTRAIT INDUSTRIEL PILOTE

1. MISE AU POINT D'UNE FORME GALENIQUE 325

1.1. INFLUENCE DE DIFFERENTES PREPARATIONS DES EXTRAITS SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE

1.1. Préparation des extraits

1.2. Contrôle pharmacologique de l'activité des extraits

1.2. INFLUENCE DE L'ORIGINE DES SEMENCES D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE 330

2.1. Culture, récolte et extraction

2.2. Contrôle pharmacologique des extraits 331

1.3. INFLUENCE DE LA MATURITE DES DROGUES SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D'E. CALIFORNICA 333

3.1. Extraction

3.2. Contrôle pharmacologique des extraits 334

2. ETUDE D'UNE PREPARATION INDUSTRIELLE PILOTE RT 1095 337

2.1. ETUDE DE LA TOXICITE

1.1. Toxicité aiguë

1.2. Cytotoxicité 339

2.2. ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'UNE PREPARATION INDUSTRIELLE : LE RT 1095 343

2.1. Matériel et méthodes

2.2. Résultats 344

- Propriétés sédatives et anxiolytiques

- Effet de l'extrait RT 1095 et du clorazépate dipotassique sur l'induction du sommeil des souris traitées par une dose unique infra-hypnotique de pentobarbital 350

2.3. Discussion 352

CHAPITRE V - PROFILS CHIMIQUES, SEPARATION ET ANALYSE PHARMACOLOGIQUE D'EXTRAITS ET DE RESIDUS D'EXTRACTION

1. LES EXTRAITS 358

2. RECHERCHE DES COMPOSES TOXIQUES : LA SANGUINARINE ET LES DERIVES CYANOGENETIQUES

2.1. RECHERCHE DE LA SANGUINARINE 358

1.1. Matériel et méthodes

1.2. Résultats 360

2.2. RECHERCHE DE DERIVES CYANOGENETIQUES 362

2.1. Matériel et méthodes

2.2. Résultats

2.3. Discussion

3. RECHERCHE DE DIFFERENTS GROUPES CHIMIQUES 363

3.1. RECHERCHE DE SUBSTANCES REDUCTRICES

1.1. Matériel et méthodes

1.2. Résultats 364

3.2. RECHERCHE DE SELS MINERAUX 366

2.1. Matériel et méthodes

2.2. Résultats et discussion

3.3. RECHERCHE DE SUBSTANCES ORGANIQUES 368

3.1. Recherche de tannins

3.2. Recherche des alcaloïdes par chromatographie sur couche mince (C.C.M.) 372

3.3. Recherche de flavonosides par chromatographie sur couche mince (C.C.M.) 374

3.4. Recherche d'acides organiques par chromatographie sur couche mince (C.C.M.) 376

3.5. Recherche d'acides aminés libres 379

3.6. Recherche de saponosides 390

3.4. CONCLUSION 391

4. RECHERCHE DE LA FRACTION ACTIVE 392

4.1. FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (C.C.M.) 392

1.1. Matériel et méthodes

1.2. Résultats 393

4.2. EFFET DU TOTUM ALCALOIDIQUE SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS DANS DIFFERENTS TESTS PHARMACOLOGIQUES 396

2.1. Matériel et méthodes

2.2. Résultats et discussion 401

4.3. EFFET DU RESIDU D'EXTRACTION DES ALCALOIDES (RE1) SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS INTRODUITE DANS LE TEST DE L'OPEN-FIELD ET DANS L'ACTIVIMETRE ET SUR LA POTENTIALISATION DU SOMMEIL

3.1. Matériel et méthodes

3.2. Résultats et discussion 402

4.4. EFFET DES ACIDES AMINES SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS INTRODUITE DANS LE TEST DE LA PREFERENCE NEOTIQUE 404

4.1. Extraction des acides aminés

4.2. Le test pharmacologique 405

4.5. EFFETS DES EXTRAITS ET DES RESIDUS SOLIDES OBTENUS PAR EXTRACTION A PARTIR DU RESIDU SOLIDE RE1 AVEC 3 SOLVANTS DE POLARITE DECROISSANTE 407

5.1. Matériel et méthode

5.2. Résultats et discussion

CONCLUSION 410

BIBLIOGRAPHIE 423

ANNEXES 442

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Ce travail s'inscrit dans le cadre des recherches menées au laboratoire de Biologie Végétale et de Pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement visant à matérialiser les propriétés pharmacologiques de plantes réputées actives. Après plusieurs séries de recherche consacrée à des espèces à propriétés hépatorénales et diurétiques, Eschscholzia californica Cham. était la première espèce réputée sédative à faire l'objet d'investigations pharmacologiques exhaustives.

Cette espèce est en effet indiquée dans les usages traditionnels des populations autochtones de Californie ; elle a été utilisée en thérapeutique, d'abord aux Etats-Unis, depuis une trentaine d'années environ, puis a gagné l'Europe par l'Allemagne d'abord et elle est aujourd'hui couramment prescrite en phytothérapie.

Cette extension des utilisations thérapeutiques n'était cependant justifiée que par l'expérience clinique des utilisateurs, sans qu'aucune étude pharmacologique n'ait jamais été entreprise sur des extraits totaux de cette Papavéracée.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat avec un laboratoire pharmaceutique ; les essais pharmacologiques étant réalisés dans un premier temps à partir d'un extrait déjà commercialisé, puis dans un deuxième temps à partir de l'extrait industriel pilote que nous avons mis au point.

Le développement systématique de tests pharmacologiques in vitro et in vivo sur un extrait total nous paraît être une approche nouvelle et nécessaire pour des plantes récemment introduites, ou en voie d'introduction, en phytothérapie. Faute en effet de pouvoir d'emblée expliquer la totalité des actions pharmacologiques constatées, encore faut-il d'abord les objectiver, les confirmer et les préciser avec certes l'espoir de les relier, dans un deuxième temps, à la composition chimique de l'espèce.

C'est cet esprit qui nous a guidé dans notre travail, sachant parfaitement qu'il exigerait, pour être complet, des développements ultérieurs dans le domaine de la chimie analytique ; mais cela débordait largement l'objectif que nous nous sommes tracés. Visant à affiner avec un maximum de précision les propriétés pharmacologiques d'un extrait total d'Eschscholzia californica Cham.

Eschscholzia californica Cham. est une espèce typiquement californienne appartenant à la famille Papaveraceae. Les parties aériennes sont utilisées traditionnellement par les autochtones californiens comme sédatif et calmant des maux de dents et de ventre.

L'industrie pharmaceutique l'emploie déjà depuis plusieurs années sous la forme de teinture mère et de nébulisat comme neuro-sédatif pour améliorer les troubles du sommeil. Cependant, aucune preuve scientifique n'a été apportée pour confirmer cette indication.

Le but de nos travaux est donc de rechercher l'existence à partir d'extraits d'E. californica Cham. d'une activité pharmacologique de type sédatif et par conséquent d'affirmer ou d'infirmer les indications thérapeutiques de la tradition au moyen des techniques pharmacodynamiques modernes.

L'étude botanique du genre et de l'espèce a fait l'objet de quelques travaux de synthèse. Notre contribution, dans ce domaine, a donc été dans un premier temps de faire la synthèse des travaux existants afin de situer le genre Eschscholzia au sein de la taxonomie végétale, puis, dans un deuxième temps, nous avons étudié et décrit chacun des organes de l'espèce E. californica Cham., enfin dans un troisième temps nous avons réalisé des coupes histologiques des parties aériennes et de la racine et nous avons identifié les éléments caractéristiques de la poudre des parties aériennes.

Les travaux d'identification chimique sont dans l'ensemble exclusivement consacrés aux alcaloïdes et notre contribution ici s'est limitée dans un premier temps à la synthèse des travaux bibliographiques et à la caractérisation des principaux groupes chimiques à l'aide de techniques analytiques courantes (réaction d'identification, chromatographie sur couche mince : C.C.M.). La finalité ici est de définir des profils chimiques types des différentes matières premières ou extraits réalisés, conformément aux exigences des pouvoirs publics et, par conséquent, de l'industrie pharmaceutique.

Dans un deuxième temps, nous avons fractionné les extraits présentant une activité pharmacologique afin d'isoler une fraction active.

La majeure partie de ce travail a été consacrée à une étude pharmacologique afin de confirmer les effets sédatifs traditionnels puis de préciser le profil pharmacologique et enfin le mode d'action d'E. californica Cham.

L'étude pharmacologique a débuté par l'étude toxicologique en traitement aigu d'un extrait hydro-alcoolique du commerce, puis par des études in vivo chez l'animal par voie intra-péritonéale : étude du comportement, influence sur le sommeil barbiturique, recherche d'un effet neuroleptique, d'un effet antidépresseur, d'un effet anti-histaminique et d'un effet antalgique. Par des études in vitro, nous avons essayé de mettre au point une technique de binding permettant la mise en évidence de l'affinité d'extraits végétaux pour les sites récepteurs aux benzodiazépines.

Des études complémentaires ont ensuite été effectuées après administration des substances par voie orale.

Lorsque les propriétés pharmacologiques d'un extrait d'E. californica et le profil pharmacodynamique ont été définis, nous avons, en collaboration avec l'industrie et les agriculteurs, mis au point les techniques de culture et de récolte puis un extrait industriel pilote. Les critères de choix ont été déterminés en menant en parallèle l'activité pharmacologique des différentes préparations. Dans ces conditions, nous avons vérifié les caractéristiques pharmacologiques de cet extrait industriel pilote.

Enfin dans une dernière étape, du fait qu'E. californica Cham. renferme des principes dominants, à savoir les alcaloïdes, nous avons recherché à savoir si ces substances où l'un de ses précurseurs métaboliques étaient le support de l'activité.

Notre intention première n'était pas de réaliser une étude chimique complète mais simplement de vérifier si l'activité pharmacologique était liée aux alcaloides totaux ou aux acides aminés libres.

La finalité de ce travail est donc double : vérifier les indications traditionnelles et les utilisations actuelles et déterminer le profil chimique d'E. californica Cham., afin de mettre à la disposition de la santé un extrait présentant toutes les garanties.

L'originalité de ce travail a consisté à privilégier l'activité pharmacologique et à l'associer aux investigations chimiques et galéniques.

Nous pensons avoir défini les limites des techniques in vitro appliquées aux extraits végétaux lors des recherches du site d'action d'E. californica Cham.

Une autre originalité de ce travail consiste en une collaboration étroite entre notre laboratoire, l'industrie pharmaceutique et les producteurs. Cette nouvelle approche dans l'étude des plantes nous a permis de mettre E. californica Cham. en culture dans le département de l'Aude et nous a permis de mettre au point un extrait industriel pilote atoxique et présentant une activité pharmacologique proche de celle du nébulisat. Cet extrait doit permettre la conception d'un médicament, ce qui était l'un de nos objectifs en débutant ce travail.

Ce travail est le premier consacré à une plante à propriétés psychotropes dans notre laboratoire, mais il présente une continuité des travaux précédents (cholérétique, diurétique) dans le mode d'approche des plantes dites "douces" qui consiste à mener l'étude à partir d'un totum.

GENERALITES SUR LE GENRE

ESCHSCHOLZIA

I - PAPAVERACEAE : (BAILLON, 1876 ; FEDDE, 1909 ; ABRAMS, 1944 ; METCALF, 1950) ; MUNZ, 1959, ;, CRONQUIST, 1960 ; PARIS, 1967).

I.1. DESCRIPTION

Cette famille appartient à l'ordre des Papaverales et au sous ordre des Rhoedales, on y trouve presque exclusivement que des plantes herbacées.

La famille comprend plus de 20 genres et 700 espèces qui se développent dans les régions tempérées, subtropicales et dans les régions de montagne des zones tropicales de l'hémisphère austral. Cette famille ne renferme jamais d'espèces aquatiques.

Les fleurs sont hermaphrodites, régulières, à deux sépales formant un calice caduque à quatre pétales disposés en deux verticiles de deux pépales. Les fleurs sont en cymes ou isolées, elles sont typiquement dimères à l'exception de certaines espèces américaines qui peuvent être trimère comme dans le genre Argémone. Les fleurs sont dites hypogynes du fait de l'insertion de l'ensemble des pièces florales sous l'ovaire, directement sur le pédoncule, quelquefois un peu périgynes (Eschscholzia).

Les feuilles sont alternes, non stipulées, parfois opposées au sommet, simples ou composées, avec une nervure principale bien marquée d'où divergent les nervures secondaires. La plupart des espèces renferment des lacitifères produisant un latex plus ou moins dense, blanchâtre, jaune ou incolore. Ce latex est une émulsion complexe, de polyterpènes assez souvent riches en alcaloïdes.

L'androcée est formée d'étamines libres entre elles, généralement nombreuses et à déhiscence longitudinale. Cependant, chez les espèces les plus évoluées, il est possible de ne retrouver que quatre étamines. Ce nombre important d'étamines résulte de la division (par n dédoublements) de pièces staminales situées en nombre fixe et se présentant en deux verticilles.

Le pistil de forme très variable, est toujours composé de deux carpelles et plus, réunis par les bords et formant un ovaire unique, uniloculaire à placentation pariétal, pluri ovulé, prolongés souvent en fausses cloisons. Insérés en grand nombre aux parois de la loge ovarienne, les

ovules sont anatropes. Les carpelles sont nombreux à l'origine, mais sont réduits à deux chez les espèces les plus évoluées (Chelidonium, Sanguinaria, Glaucium).

Chez les espèces primitives, un sillon plus ou moins profond délimite les carpelles, les placentas sont hypertrophiés et l'ensemble ayant l'aspect d'un ovaire plurilobulaire indique que la soudure des pièces du gynecée s'est réalisée, au début de l'évolution de Rhoedales, entre les carpelles encore pratiquement refermés sur eux-mêmes.

Chez les pavots (Papaver), les sillons disparaissent et les carpelles sont typiquement "ouverts", les placentas se réduisent en des lames portant les ovules.

Dans les genres Chelidonium, Sanguinaria et Glaucium, où il n'y a plus que deux carpelles, les placentas sont réduits et portent de chaque côté deux rangées d'ovules.

Dans quelques cas particuliers comme dans le genre Eschscholzia, l'ovaire est bicarpellé, plus ou moins infère et la capsule s'ouvre par des fentes sur la ligne de suture des placentas.

Les stigmates sessiles, persistants, au nombre de deux ou plus sont disposés en rayons soudés sur un nectar au dessus de l'ovaire.

Les fruits sont le plus souvent des capsules, sèches, globuleuses, divisées intérieurement par de fausses cloisons, en loges multiples, la déhiscence se réalise par des pores situés au-dessous des stigmates (capsule poricide); plus rarement, le fruit est une capsule allongée, siliciforme, (Chelidonum, Glaucium), biloculaire, dehiscente en deux ou quatre valves qui s'ouvrent, soit de haut en bas (Glaucium), soit de bas en haut. Très rarement, le fruit est charnu, indéhiscent (Sanguinaria).

Les graines sont nombreuses, petites, généralement ovoïdes ou réniformes (Glaucium, Papaver), simples, ou munies d'une crête ou strophiole.

Il existe une étroite affinité entre Papaveraceae et les familles appartenant à l'ordre des Ranales (moins

évoluées) qui les précèdent dans la classification et celles qui suivent (Brassicaceae, Fumariaceae).

Avec dans l'ordre des Ranales, la famille des Papaveraceae a gardé un nombre important d'étamines, un gynécée à tendance apocarpique.

Les caractères les plus constants communs à toutes les Papaveraceae sont les suivants : Perianthe double à pièces indépendantes; sépales au nombre de deux ou trois ; pétales en nombre double ou multiple de celui des sépales ; fleurs hypogynes à étamines en nombre très grand et indéfini, anthères à déhiscence longitudinale ; carpelles nombreux réunis par les bords, formant un ovaire unique, uniloculaire ; à placentation pariétale ; pluri ovulés possédant des ovules anatropes et des graines albuminées à embryon petit ; feuilles alternes non stipulées.

I.2. IMPORTANCE ECONOMIQUE DE PAPAVERACEAE

L'intérêt économique de ces plantes repose sur deux faits principaux.

D'une part, par leur grande variété de fleurs et la coloration de leurs pétales ; un grand nombre d'espèces des genres Papaver, Glaucium, Sanguinaria, Agrimone et Eschscholzia sont cultivées comme plantes d'ornementation.

D'autre part, certaines espèces sont cultivées pour leur teneur importante en huile alimentaire retirée de la graine (huile d'oeuillette de Papaver somniferum L. var. nigrum L.) ou de leur teneur en principes actifs (opium obtenu par incision des capsules Papaver Somniferum L. var. album L.).

II - LE GENRE ESCHSCHOLZIA

II.1. PLACE DU GENRE ESCHSCHOLZIA DANS LA SYSTEMATIQUE DE LA FAMILLE DES PAPAVERACEAE

La clé de détermination du genre Eschsholzia et sa position systématique parmi les genres de la famille des Papaveraceae rencontrés dans le Nord Ouest des Etats Unis d'après l'ouvrage de ABRAMS L. (1944) peut être résumée comme ci-dessous :

* feuilles principalement opposées ou en verticille et entières

** Etamines nombreuses ; 9 à 18 carpelles, pétales caduques tardivement

Platystemon

** 6 à 12 étamines ; 3 carpelles, rarement 4 unis en 3 loges, les pétales sont précocement caduques

Meconella

* feuilles alternes, dentées ou lobées à l'exception de Canbya et Dondromecon

** plantes de grande taille, type arbuste au moins à la base

*** fleurs blanches, très larges, feuilles lobées, silique ovoïde

Romneya

*** fleurs jaunes, feuilles entières, silique linéaire

Dendromecon

** plantes herbacées

*** Periante et étamines fixées sur le rebord du réceptacle, les sépales sont unis en un calice

Eschscholzia

*** Periante et étamines strictement hypogyne, sépales non unis en un calice

**** étamines nombreuses

***** Silique à 2 loges, bicarpellées, linéaires et déhiscente sur toute la longueur

Glaucium

***** Silique à 1 loge, composée de différents carpelles ovoïdes

- herbe non épineuses, silique déhiscente au moyen de petites ouvertures

  - ovaire et capsule sont caractérisés par un cylindre terminé par des stigmates globuleux et petits

Meconopsis

  - ovaire et capsule recouverts par un disque de rayon stigmatic plat et sessil

Papaver

- Herbe épineuse ou poilue ; les capsules s'ouvrent par déhiscence à l'apex par 4 ou 6 valves

  - plantes plus ou moins épineuses

Argemone

  - plantes plus ou moins poilues

Arctomecon

**** étamines en nombre de 6 à 9 ; plantes annuelles

Canbya

II.2. DESCRIPTION

Le genre Eschscholzia ne renferme que des plantes herbacées annuelles ou vivaces de couleur glauque et dont la cuticule est lisse. Les laticifères contiennent le plus souvent un latex incolore. Les feuilles sont découpées, glauques et les fleurs sont orange ou jaune. Le réceptacle est élargi et légèrement concave formant un entonnoir autour de la base du pistil.

A l'état jeune, deux sépales sont insérés sur le réceptacle formant un manchon pointu. A la floraison les sépales sont rejettés à l'extérieur par l'expansion des pétales au nombre de 4, rarement 6 ou 8.
La corolle est constituée par deux verticilles de deux pétales périgynes, on y trouve rarement plus de 4 pétales.
Les étamines sont nombreuses avec un filet court et des antères linéaires à déhiscence longitudinale.
L'ovaire est cylindrique, à une seule loge avec deux placentas, les stigmates sont divisés en 4 à 6 lobes linéaux divergents.
La capsule est allongée et présente 10 nervures. La déhiscence s'effectue à la base de la capsule et les deux carpelles se séparent alors du placenta. Il s'agit d'une silique.

Les graines sont globuleuses, réticulées et rugueuses. Elles sont caractérisées du fait de leur structure morphologique et participent ainsi à la systématique et à la reconnaissence de beaucoup d'espèces d'Eschscholzia.

Ainsi le genre Eschscholzia diffèrent des autres genres de la famille Papaveraceae par quelques caractères particuliers. Le réceptacle est légèrement concave et non convexe ; le calice est formé de deux sépales soudés et non libres ; les pétales et les étamines sont périgynes et non hypogynes.

II.3. - TAXONOMIE DU GENRE ESCHSCHOLZIA

Le genre Eschscholzia est apparu très tardivement. C'est en 1792 qu'un botaniste américain (Menzies) a découvert une plante sans pouvoir l'identifier, ni lui donner un nom. (Greene 1905). Cette espèce a été répertoriée dans différents herbiers comme appartenant à un nouveau genre proche de Chelidonium. Il a fallu attendre 1816 pour que le botaniste

CHAMISSO décrive une espèce semblable à San Francisco et publie à Berlin, sous le nom d'Eschscholzia, cette espèce appartenant à la famille des Papaveraceae,en l'honneur d'un compagnon d'expédition : le botaniste russe : Eschscholz, et c'est en 1938 qu'une première flore mentionne ce genre et le décrit (Torrey and Gray Flora).

II.3.1. Index Kewensis

Jusqu'à la fin du XIXème siècle, des botanistes de terrain (Linctley, Chamisso, Douglass, Greene, Bentham, Eastwood) ont identifié et décrit de nombreuses espèces d'Eschscholzia. C'est ainsi que nous avons pu relever 112 espèces d'Eschscholzia dans l'index Kewensis (Tome II supplément 3, supplément 11) ; (cf. annexe 1).

Chacune des 112 espèces d'Eschscholzia a été décrite par Greene (1905) et par Fedde (1909) qui ont utilisé les publications des botanistes, auteurs de chaque espèce. Il est surprenant de constater que ces deux systématiques diffèrent l'une de l'autre.

Green (1905) a remarqué que le nombre des espèces du genre Eschscholzia relevé est important car certaines espèces sont synonymes, mais trouvées à des endroits différents par des auteurs différents. La plante a donc gardé le nom d'espèce de sa première identification par manque de comparaison et de classification reconnue.

II.3.2. Différentes espèces du genre Eschscholzia répertoriées dans la flore de Californie (MUNZ, 1959) et la flore des Etats du Pacifique (ABRAMS, 1944).

Ces différentes flores ne mentionnent plus que douze espèces d'Eschscholzia dont Eschscholzia californica Cham. représente l'espèce typique.

Parmi ces différentes espèces seulement sept d'entre elles sont décrites dans les deux flores. La position systématique de ces espèces et leur clé de détermination au sein du genre Eschscholzia sont présentées ci-dessous.

II.3 - 2.1 : Systématique du genre Eschscholzia (ABRAMS, 1944)

Selon la communication de CHAIRMAN et coll., 1983. et conformément à la nomenclature internationale, nous avons jugé bon de commencer les noms de l'espèce par une lettre minuscule.

* Réceptacle avec deux rebords, le rebord interne est redressé et hyalin, le rebord externe est étalé. Les graines sont réticulées, les cotylédons ont deux fissures vivace ou parfois annuel

E. californica

* Réceptacle avec seulement un rebord redressé hyalin, le rebord externe est absent ou rudimentaire, les cotyledons sont entiers, les plantes sont annuelles.

** Les tiges sont feuillées ou parfois nues, les graines sont réticulées ou parfois presque lisses.

*** Les herbes sont glabres.

**** Les pétales de 10 à 25 mm de long

les feuilles ne sont pas visiblement glauques, les tiges sont classiquement nues

E. caespitosa

les feuilles sont manifestement glauques, les tiges sont feuillus

E. elegans

**** Les pétales de 3 à 5 mm de long

E. minutiflora

*** Les herbes sont recouverts de poils courts et incurvés

E. lemmonii

** Les tiges sont nues ; les graines ne sont pas réticulées mais profondément creusées

*** Les feuilles présentent de courtes divisions mais nombreuses, les graines sont moins profondément creusées

E. glyptosperma

*** Les feuilles présentent quelques divisions et sont allongées, les graines sont profondément creusées

E. lobii

Si les graines du genre Papaver ont une structure très constante celles du genre Eschscholzia présentent de larges variations. La surface des graines est formée de facettes composées de cellules tubulaires entourées par des arêtes constituées elles-mêmes par des allides allongées radialement ; la disposition des arêtes par rapport aux cellules tabulaires varie selon les espèces d'Eschscholzia et défini leur spécificité qui facilite la détermination et la diagnose des espèces de ce genre. Aussi pour chacune de ces espèces nous donnons une brève description du point de vue botanique et nous précisons la distribution topographique de l'espèce grâce aux ouvrages de Munz (1959) et Greene (1905).

II. 3 - 2.2 : Description des espèces du genre Eschscholzia selon la flore des Etats du Pacifique (ABRAMS, 1944)

3 - 2.2.1 - Eschscholzia caespitosa (Benth.) (photo 1) - Eschscholzia en touffe (fig. 1)

Synonyme : Eschscholzia tenuifolia Benth.
Eschscholzia rhombipetale Greene.

Cette espèce se rencontre sur les contreforts des montagnes et dans les vallées au-dessus de zones du Sonora, dans toutes les étendues côtières ainsi que sur les contreforts de la Sierra Nevada et dans tout le nord de la Californie.

Les tiges de 10 à 20 cm de haut, sont couramment cylindriques.

Les feuilles sont très découpées en de nombreuses divisions étroites. Elles sont glabres (sans poils et sans duvet) et parfois glauques (de couleur vert pâle). Elles constituent une touffe à la base des tiges.

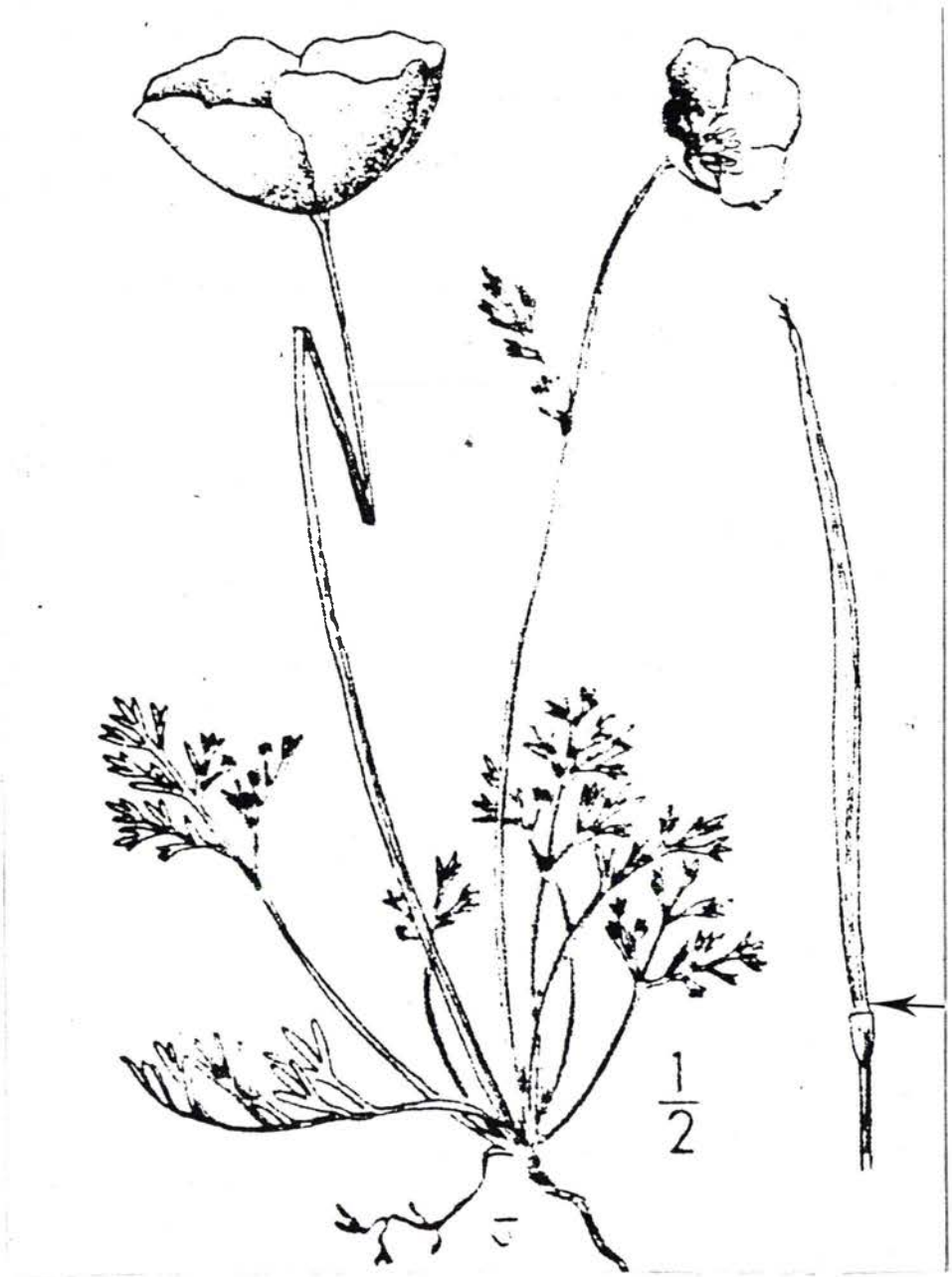
Le réceptacle est étroitement turbiniforme sans rebord externe étalé.

Le calice est hélicoïdal et apiculé.

Les pétales sont généralement jaune et d'une longueur de 10 à 20 cm.

Les graines sont réticulées ou souvent lisses, plus longues que larges et présentent un apex aigu (photo 1).

La floraison a lieu d'Avril à Mai.



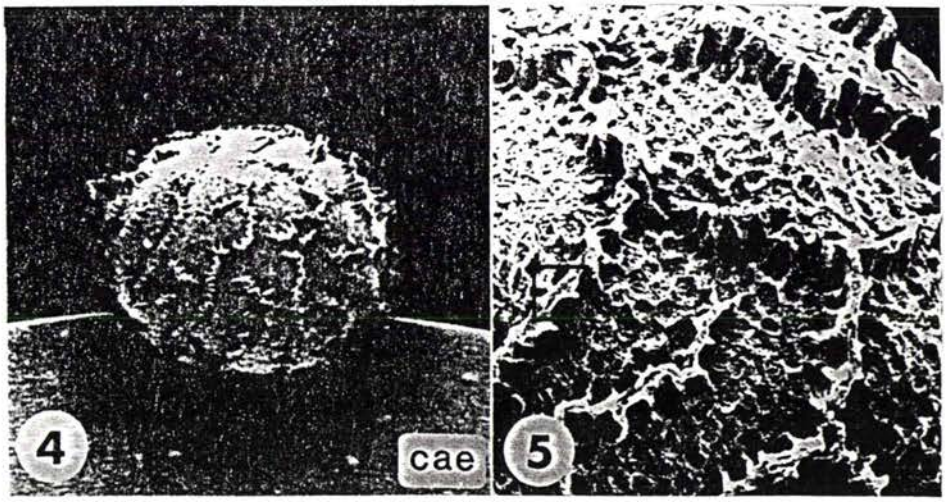


PHOTO 1: Eschscholzia caespitosa Benth

4 : Structure de la graine

5 : Ultra structure de la graine

} en microspie à balayage selon CLARK (1978)

Cette espèce présente la variété hypécoïdes constituée par des tiges feuillues, de taille légèrement plus grande (10 à 40 cm) élancées et plus moins divisées.

II.3 - 2.2.2 : Eschscholzia elegans green (photo 2) Eschscholzia d'Islande

Synonymes : Eschscholzia ramosa Greene (1885)
Eschscholzia wrigleyana Millsp. et Nutt. (1923).

Cette espèce se rencontre au nord du désert du Sonora, dans les îles anglonormandes, de Santa Rosa à San Clemente, en Californie,, en Guadeloupe, en Islande et Basse Californie.

Eschscholzia elegans Greene est une plante annuelle avec des tiges solides et feuillues dont les ramifications débutent au-dessus de la base. Elle est glabre et atteint 20 à 40 cm de haut.

Les feuilles, amples sont très finement découpées, glauques et glabres ou légèrement rugueuses.

Le réceptacle est largement tubiniforme sans rebord externe étalé.

Le calice est ovoïde, arrondi ou obtu à l'apex avec un très court apicule.

Les pétales, généralement jaunes, présentent souvent une base orange. Ils sont de petite taille et mesure de 1 à 2 cm.

Les graines sont réticulées portant de petits tubercules (photo 2).

La floraison a lieu de Mars à Juin.



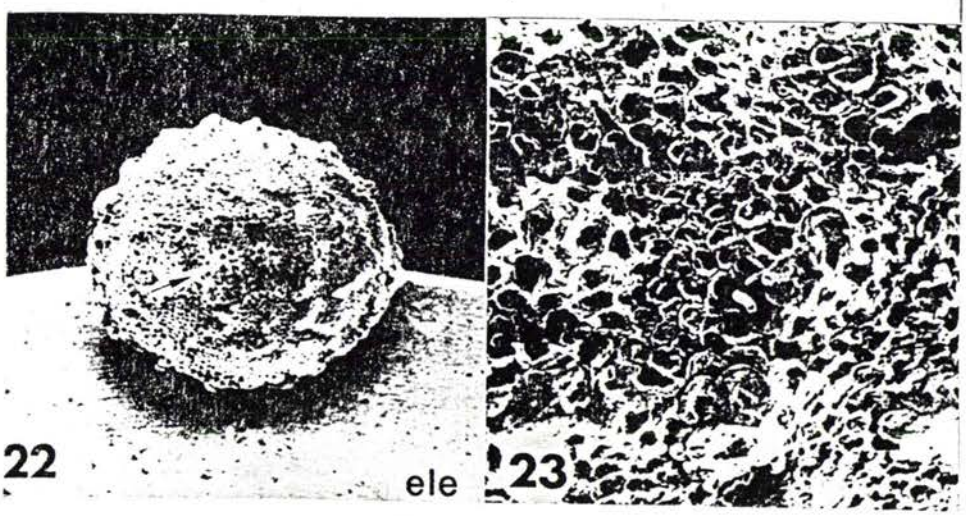


PHOTO 2: Eschscholzia elegans Green
22 : Structure de la graine
23 : Ultra structure de la graine

En microscopie à balayage selon Clark (1978).

II.3 - 2.2.3 : Eschscholzia minutiflora S. Watts (photo 3). Pavot des pigmées.

Synonyme : Eschscholzia modesta Greene (1888).

Cette espèce se développe sur les pentes et dans les plaines désertiques de part et d'autre du Sonora, dans les environs de Washee (Nevada) et de l'Ingo (Californie).

Toutefois des groupes isolés peuvent être rencontrés du Nord-Ouest du Nevada à l'Arizona et au Sud de l'Utah.

La localisation typique étant située du Nord-Ouest du Nevada à l'Arizona et au Sud de l'Utah.

Eschscholzia minutiflora S. Wats est une plante annuelle, glabre ou rarement recouvert de duvet. Les tiges sont feuillues, de 10 à 30 cm de haut.

Les feuilles sont découpées grossièrement, les divisions sont linéaires allongées.

Les fleurs sont éparpillées le long des tiges feuillues.

Les pétales sont jaunes et mesurent de 3 à 6 mm de long.

Le réceptacle à plan circulaire est dépourvu de rebord externe étalé.

Les graines sont globuleuses et rétractées (photo 3).

La variété darwinensis (1898) a été répertoriée par M.E. JONES (1898). Cette même variété ayant été dénommé parishii par Greene (1885)

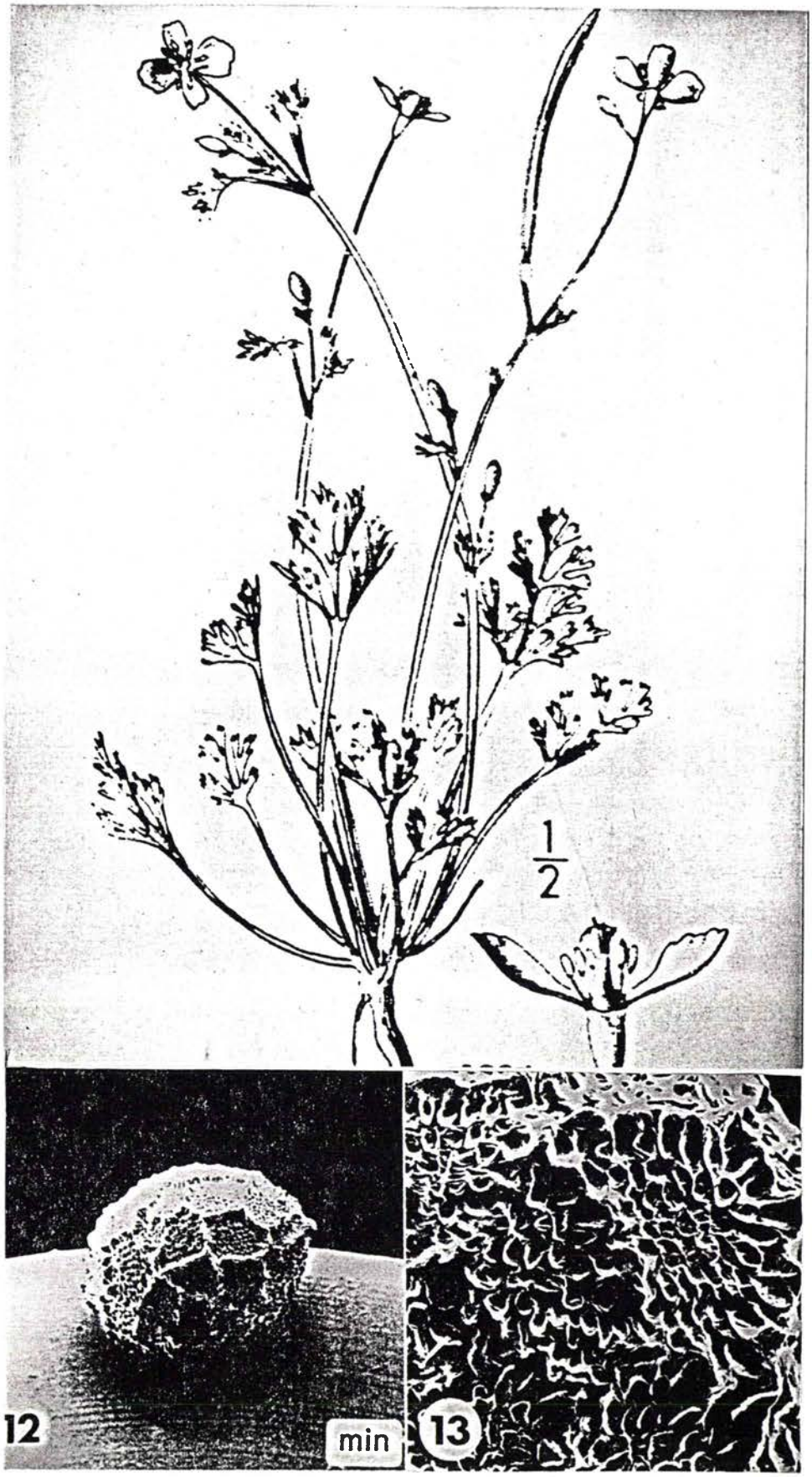


PHOTO 3 : Eschscholzia minutiflora S. Watts
12 : Structure de la graine
13 : Ultra structure de la graine
} en microscopie à balayage selon Clark(1978).

La variété Darwinensis ressemble beaucoup à l'espèce typique mais les pétales sont plus grands (8 à 12 mm). Elle se développe dans les montagnes de Panamint au sud du désert du Colorado (Californie).

II.3 - 2.2.4 : Eschscholzia lemmonii Green (photo 4). Eschscholzia de Lemmon

Synonyme : Eschscholzia urceolata, East W (1903).
Eschscholzia delitexens Fedde (1909).

Cette espèce se développe sur les collines et les plaines sèches du Nord de la zone du Sonora ; dans les zones côtières de Californie de la région de San Benito à la région de San Luis Obispo, et au pied des collines de la Sierra Nevada.

Eschscholzia lemmonii Greene est une espèce annuelle avec de courts poils courbés et des tiges feuillues, ascendantes de 15 à 30 cm de long.

Les feuilles sont finements découpées et recouvertes de duvet.

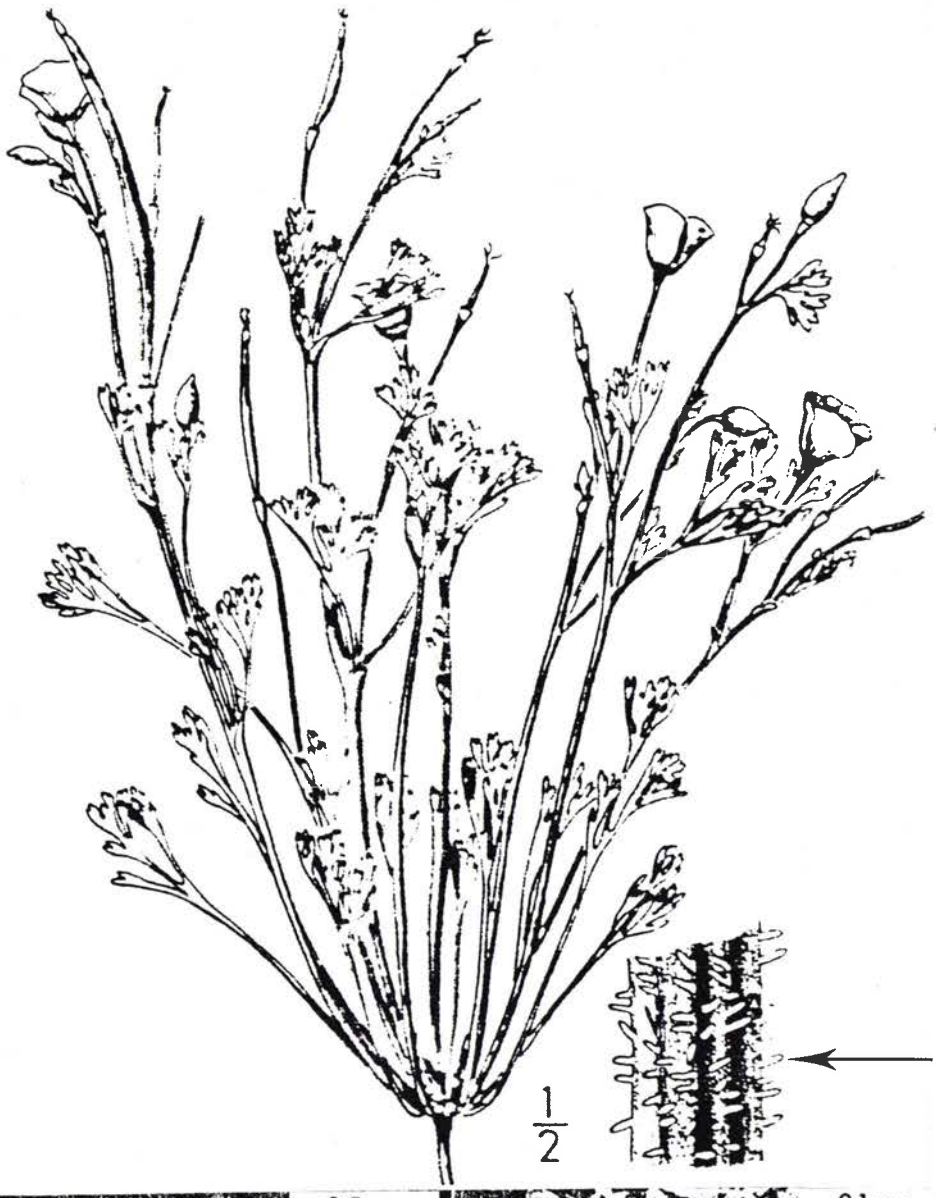
Le réceptacle est plan, légèrement concave.

Le calice est recouvert d'un duvet dense et blanc.

Les pétales sont oranges ou jaunes de 15 à 25 mm de long.

La silique mesure de 3 à 6 cm de long et les graines sont réticulées (photo 4).

La floraison a lieu d'Avril à Juin.



Structure de la tige .

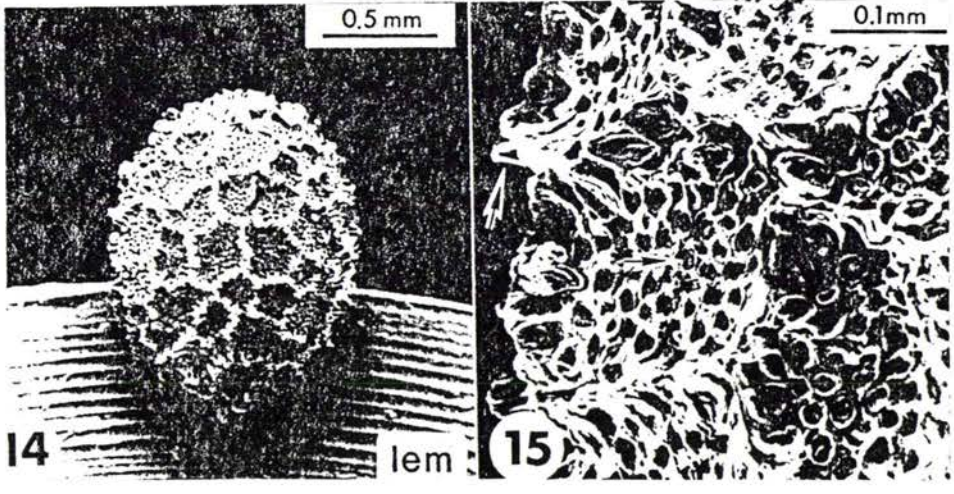


PHOTO 4 : Eschscholzia lemmonii Greene

14 : Structure de la graine

en microscopie à balayage selon Clark

II.3 - 2.2.5 : Eschscholzia glyptosperma Greene (photo 5). Pavot du Mojave.

Synonyme : Eschscholzia paupercula Greene (1905).

Eschscholzia glyptosperma Greene se développe à flanc de coteau, en-dessous de la région du Sonora. Les zones typiques où l'on peut rencontrer cette espèce sont le désert du Mojave, la Californie et toute les régions qui s'étendent de l'est au sud de l'Utah.

Eschscholzia glyptosperma Greene est une plante annuelle constituée par de nombreuses tiges effilées entourées à la base par une touffe de feuilles denses. Cette espèce peut atteindre une taille de 10 à 20 cm de haut.

Les feuilles glauques et glabres sont finement découpées en de courtes divisions nombreuses et linéaires.

Le réceptacle est circulaire avec absence de rebord externe étalé.

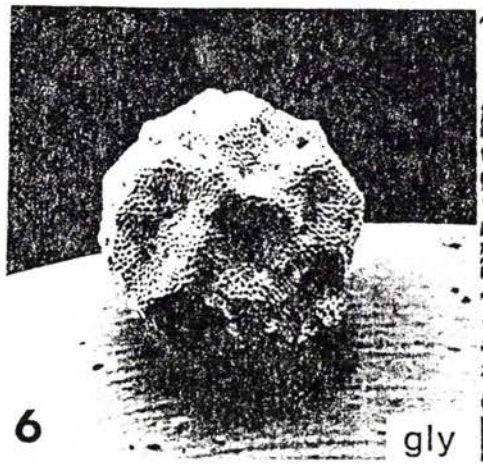
Le calice est ovoïde et lancéolé.

Les pétales sont presque exclusivement jaunes et ont une taille de 1 à 2 cm de long.

Les graines sont globuleuses et non striées (photo 5).

La floraison a lieu d'Avril à Mai.





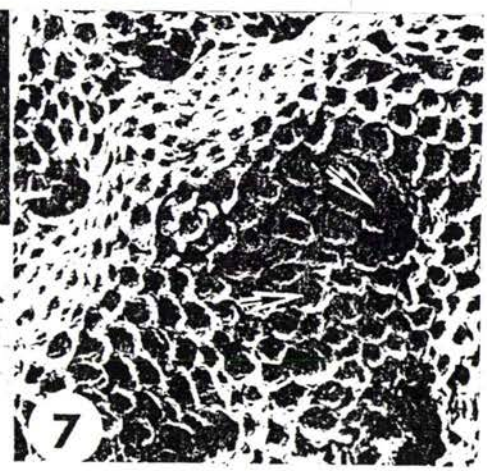


PHOTO 5 : Eschscholzia glyptosperma Greene

6 : Structure de la graine
7 : Ultra structure de la graine

} en microscopie balayage selon Clark(1978)

II.3 - 2.2.6 : Eschscholzia lobii Greene (photo 6)
Eschscholzia à graines granuleuses

Synonyme : Eschscholzia pulchella Greene (1905)
Eschscholzia graminea Fedde (1906).

Cette espèce se développe sur les flancs des coteaux et les plaines au Nord de la zone du Sonora. Elle se rencontre dans la vallée de Sacramento, sur le pourtour des étendues côtières, en Californie et au pied de la Sierra Nevada.

C'est une plante annuelle avec de nombreuses tiges effilées et dressées atteignant 1 à 3 cm de haut.

Les feuilles n'atteignent que la moitié de la plante formant une touffe à la base et sont découpées en quelques divisions allongées et presque linéaires.

Le réceptacle est circulaire.

Le calice est ovoïde.

Les pétales sont jaunes et ont une taille de 0,8 à 1,5 cm de long.

Les graines sont fortement granuleuses (photo 6).

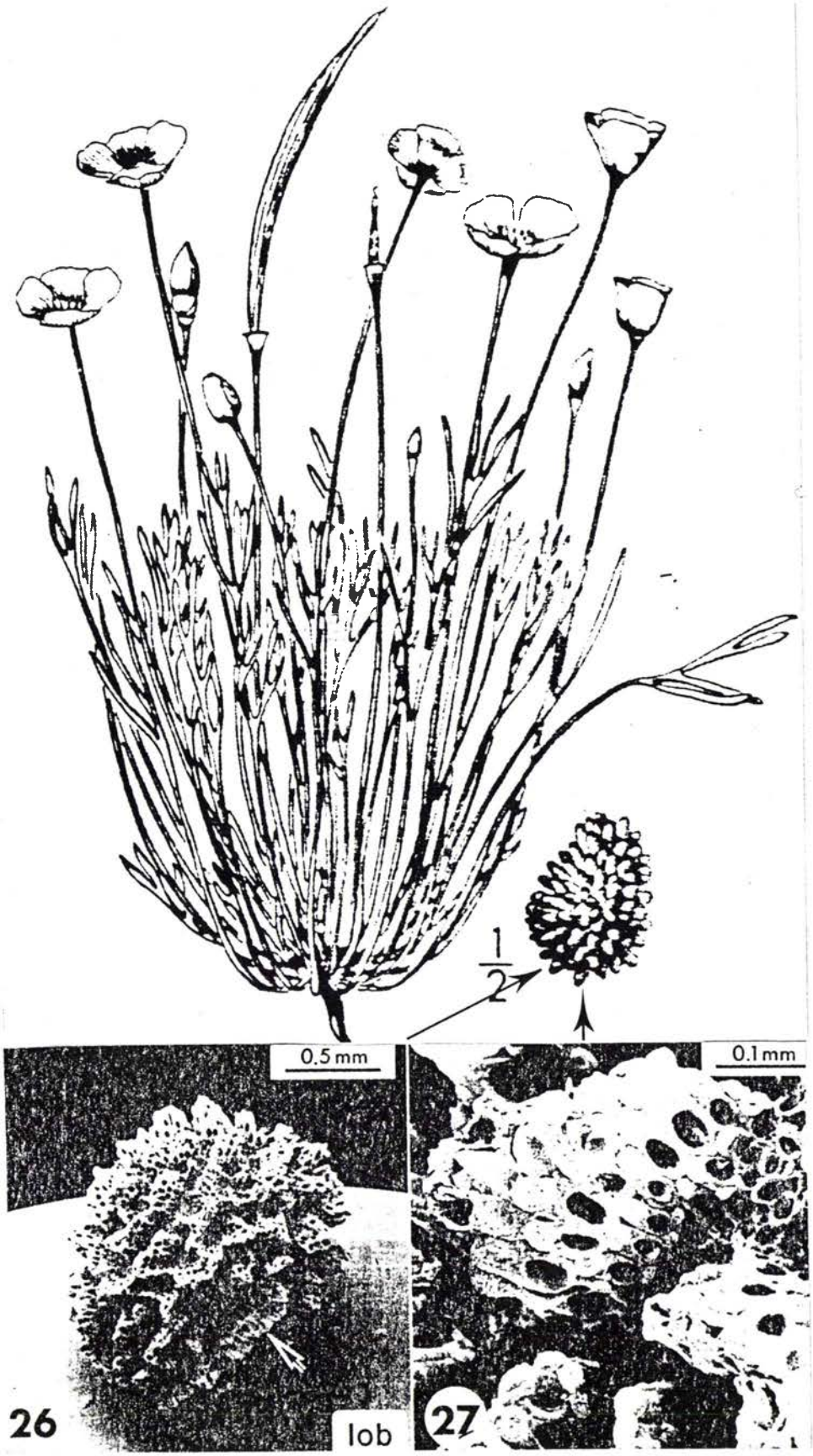


PHOTO 6 : Eschscholzia lobii Greene en microscopie à balayage selon CLARK (1978)

26 : Structure de la graine

27 : Ultrastructure de la graine

II.3-2.2.7. Eschscholzia californica Cham.
Pavot de Californie (photo 7)

L'essentiel de notre travail est consacré à cette espèce typique du genre Eschscholzia, aussi l'étude complète (botanique, chimique, pharmacologique) est rapportée dans la deuxième partie.



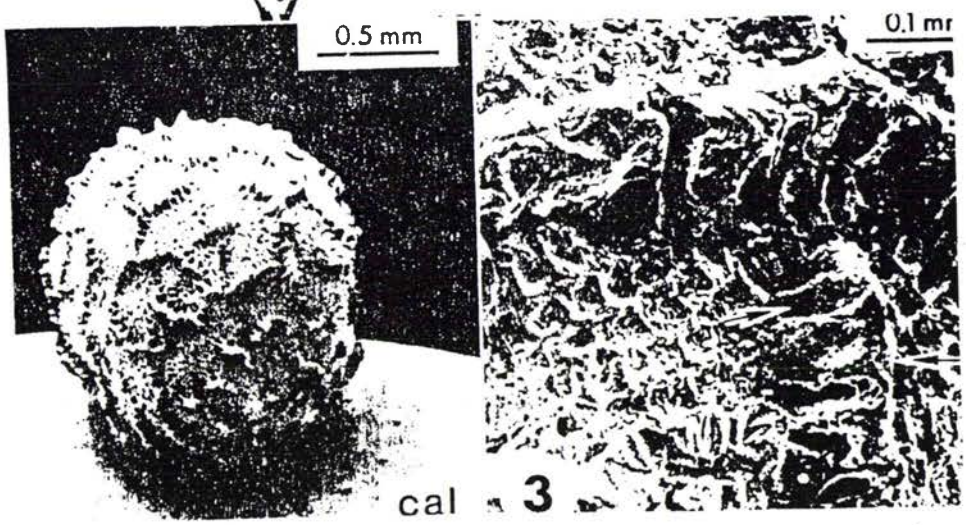


PHOTO 7 : Eschscholzia californica Chamisso

2 : Structure de la graine } en microscopie à balayage

3 : Ultrastructure de la graine } selon Clark (1978)

ETUDE D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAMISSO

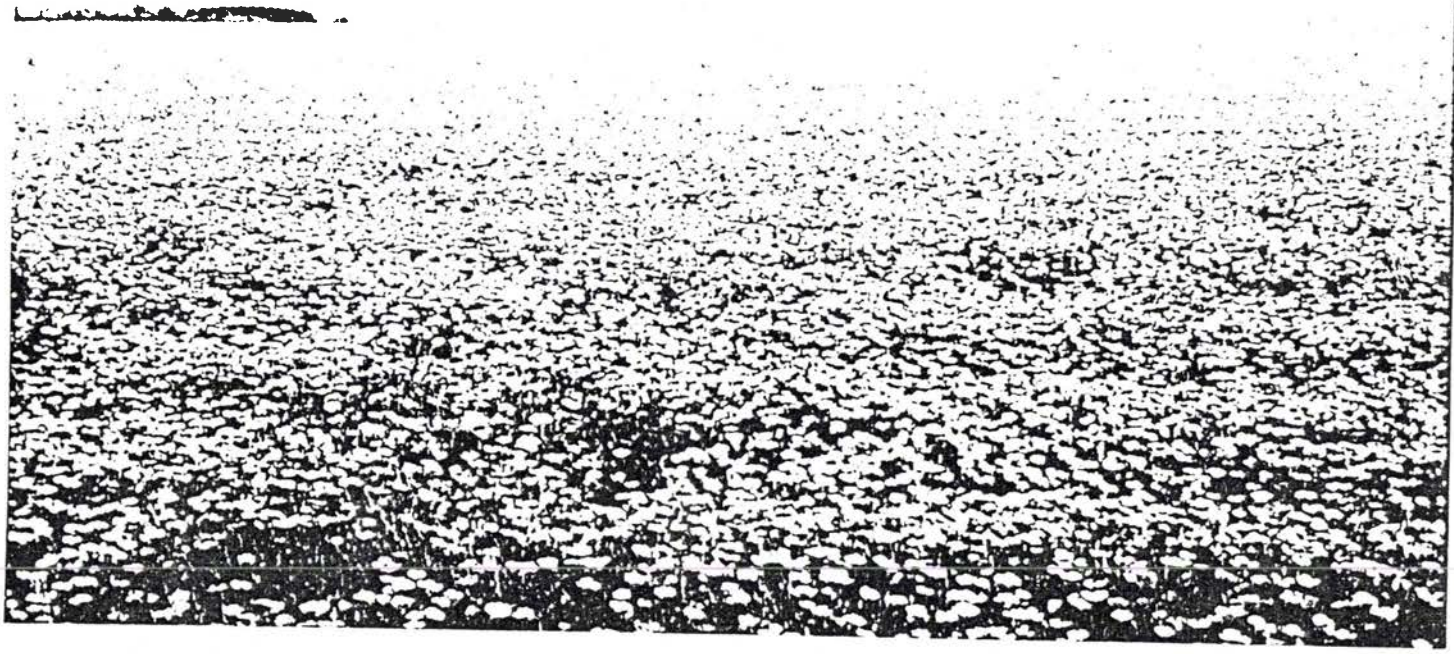


PHOTO 8 - CHAMP D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAMISSO (AUBE, SANOFI)

EXPLOITE POUR LA REALISATION ET L'ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX INDUSTRIEL PILOTE (Réf. : RT 1095)

P R E M I E R E P A R T I E

ETUDE BOTANIQUE



PHOTO 9 - ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAMISSO

I - HISTORIQUE

Eschscholzia californica Chamisso est typiquement originaire du sud californien et du nord Mexique comme la plupart des représentants du genre Eschscholzia.

Cette petite Papaveraceae a été découverte au XIXème siècle (1815-1818) par Eschscholtz J.F. (1793-1831) lors d'une expédition botanique russe dans le sud californien.

C'est à la suite de l'expédition qu'un des membres, l'écrivain allemand Chamisso (1781-1838) donna à cette espèce le nom d'Eschscholzia californica Chamisso en l'honneur de son compagnon de voyage.

Du fait de la coloration jaune d'or intense de ses pétales, Eschscholzia californica Cham. a été introduite en Europe comme plante ornementale malgré l'odeur désagréable que ces pétales dégagent.

Actuellement les colorations de la corolle diffèrent et s'étendent du blanc au jaune orangé en raison des différentes transformation horticole de l'espèce.

A cette plante ornementale, désormais fréquente dans les jardins européens, plusieurs noms vernaculaires ont été donnés.

Eschscholtzie (France)
Pavot de californie (France)
Globe du soleil (France)
California poppy (Angleterre)
Kalifornischer Mohn (Allemagne)
Pape verddi californea (Italie)
Anapola de California (Espagne)
Kaliforniya hashasi (Turquie)
Gound Papaver (Hollande)

Dans la littérature on rencontre diverses orthographes pour désigner cette plante : Eschsholtzia californica, Eschscholzia californica, Eschscholtzia california, Escholtzia californica, Escholzia california, Eschcholzia californica. Toutefois la règle internationale recommande l'orthographe suivante : Eschscholzia californica Chamisso (Abrams L., 1944).

II - DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE (fig. 1)

Eschscholzia californica Cham. se développe dans les dunes sablonneuses désertiques et escarpées, le long des côtes californiennes au bord ouest du désert du Mojave ; dans les plaines et vallées arides de la région du Sonoran et à la marge de la plupart des déserts.

Durant l'ère glaciaire, la plante s'étendait à travers tout le Mojave et l'Arizona. A la fin de cette ère, avec l'arrivée des climats chauds et secs dans ces régions, cette espèce a en partie disparu de l'Arizona et du Mojave pour s'installer dans des zones à climat tempéré (Clark 1978).

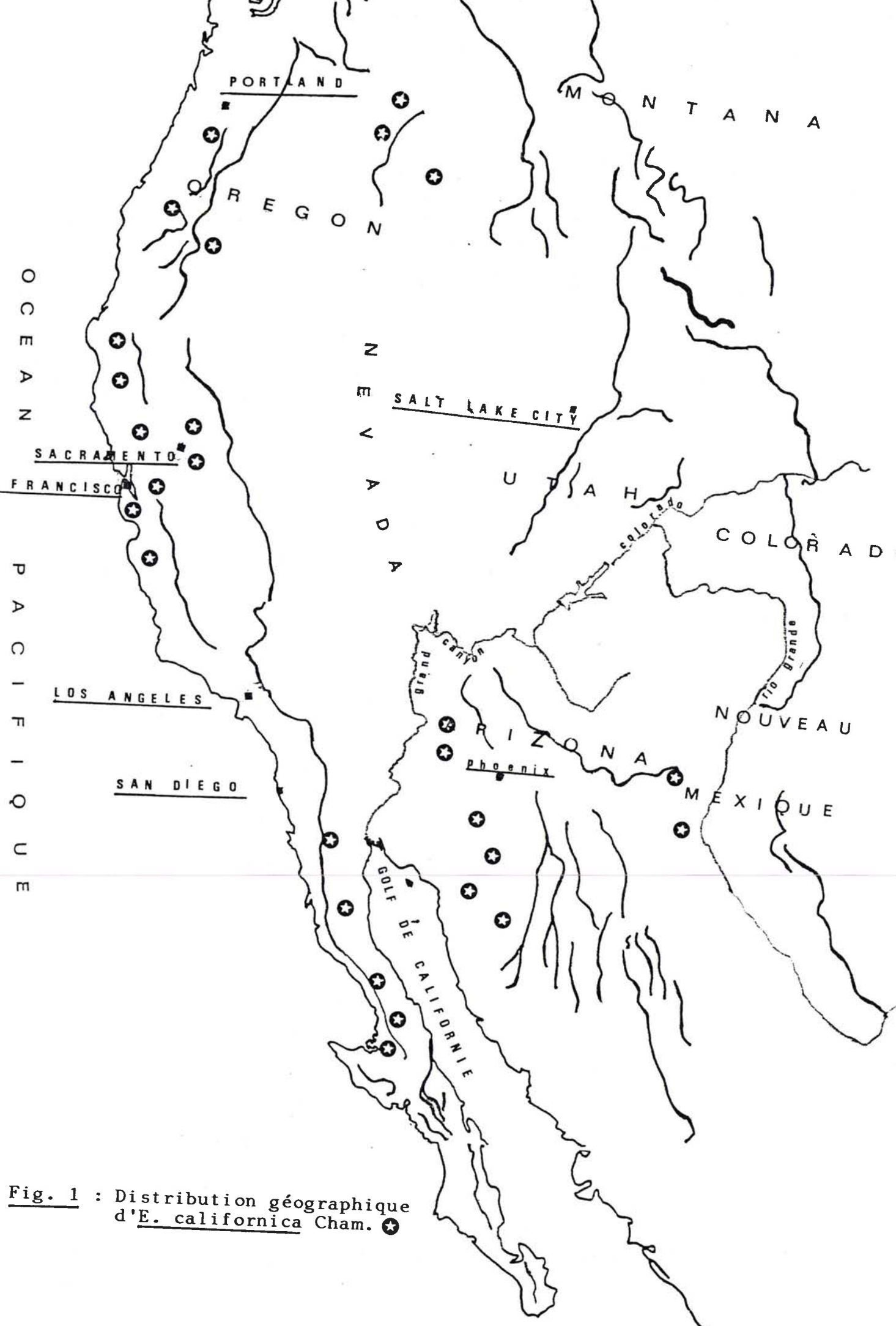


Fig. 1 : Distribution géographique d'E. californica Cham. ✪

III - DESCRIPTION

La description botanique de cette espèce est faite en faisant référence aux ouvrages de Greene C.L. (1905), Abrams L. (1944), Munz A. (1959) ; Baillon H. (1876) ; Engler A. (1891) ; Fedde F. (1909).

Eschscholzia californica Cham. est une plante herbacée annuelle, rarement bi-annuelle, ou vivace. Elle est glabre (sans poil, sans duvet) et glauquescente (de couleur vert pâle) à tige ascendante pouvant atteindre de 30 à 60 cm de haut (photo 10).

Les différentes parties sont parcourues par un latex hyalin, incolore, s'écoulant facilement après blessure de la plante.

La racine est profonde, renflée facilitant ainsi son implantation en zone aride (photo 10).

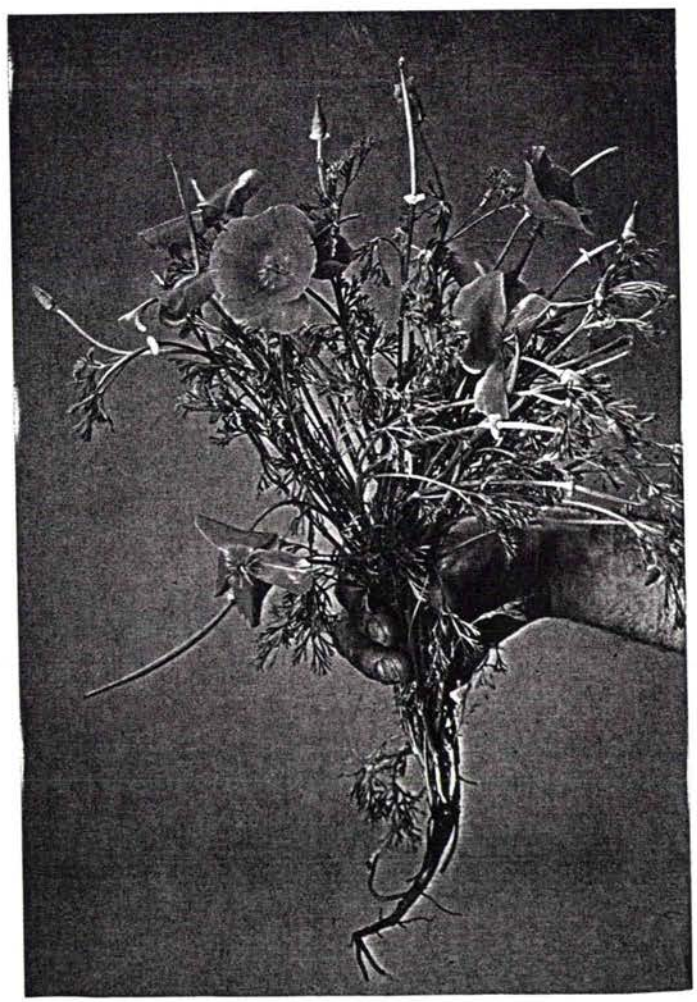


PHOTO 10 - ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM. (Aube)
ASPECT GENERAL

Les feuilles sont alternes, pétiolées, glauques et tripennatifides. Elles sont isolées et dépourvues de stipules, leur limbe se subdivise très finement en segments linéaires (fig. 2)..

La tige est glabre, molle, de couleur glauque et présente des divisions linéaires. Elle laisse apparaître de légères cannelures longitudinales mais sa section est régulière. Une fleur terminale de couleur jaune orangée à jaune d'or, se développe au sommet de chacune d'entre elles.

Les fleurs sont régulières, hermaphrodites et elles sont toujours en position terminale et opposifoliées avec de longs pedicelles et un réceptacle concave (fig. 2 et photo 11).

Le calice est variable dans sa taille et sa forme, il mesure de 1 à 4 cm. Il est périgyne et de forme conique, composé de deux sépales soudés, caduques verts clairs et opposés.

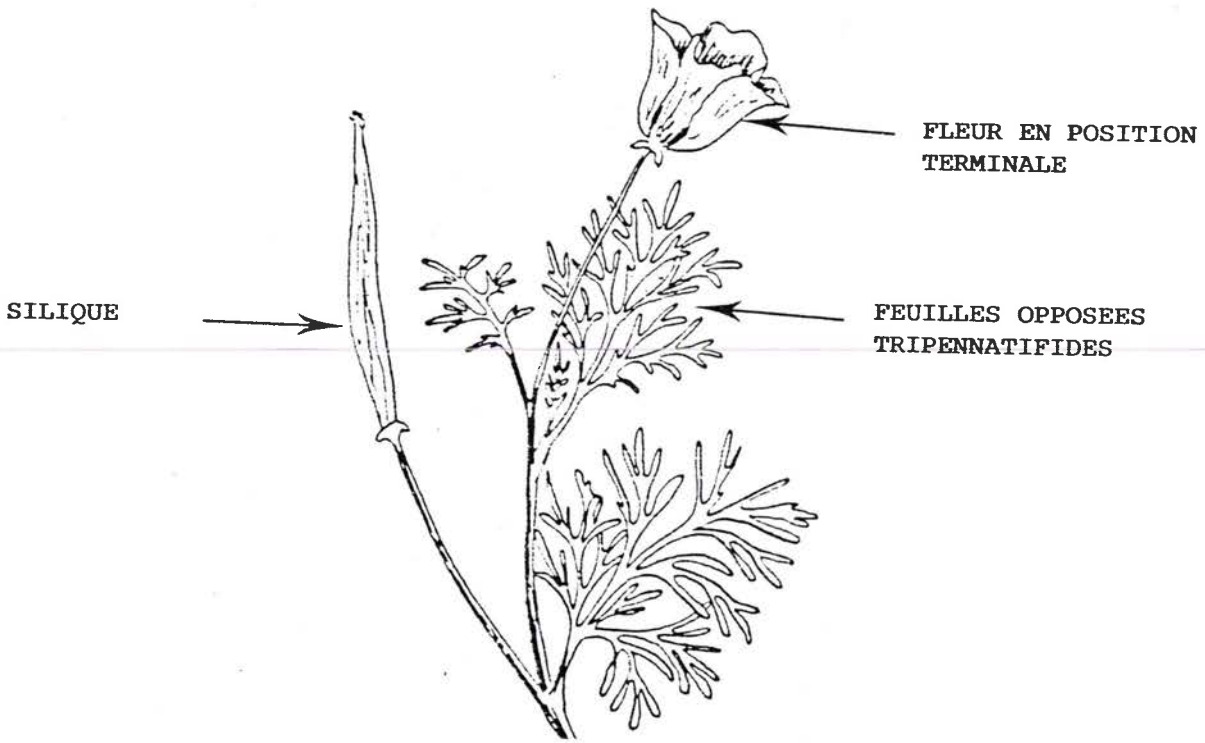


Fig. 2 - ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM, d'après BEZANGER BEAUQUESNE, 1980

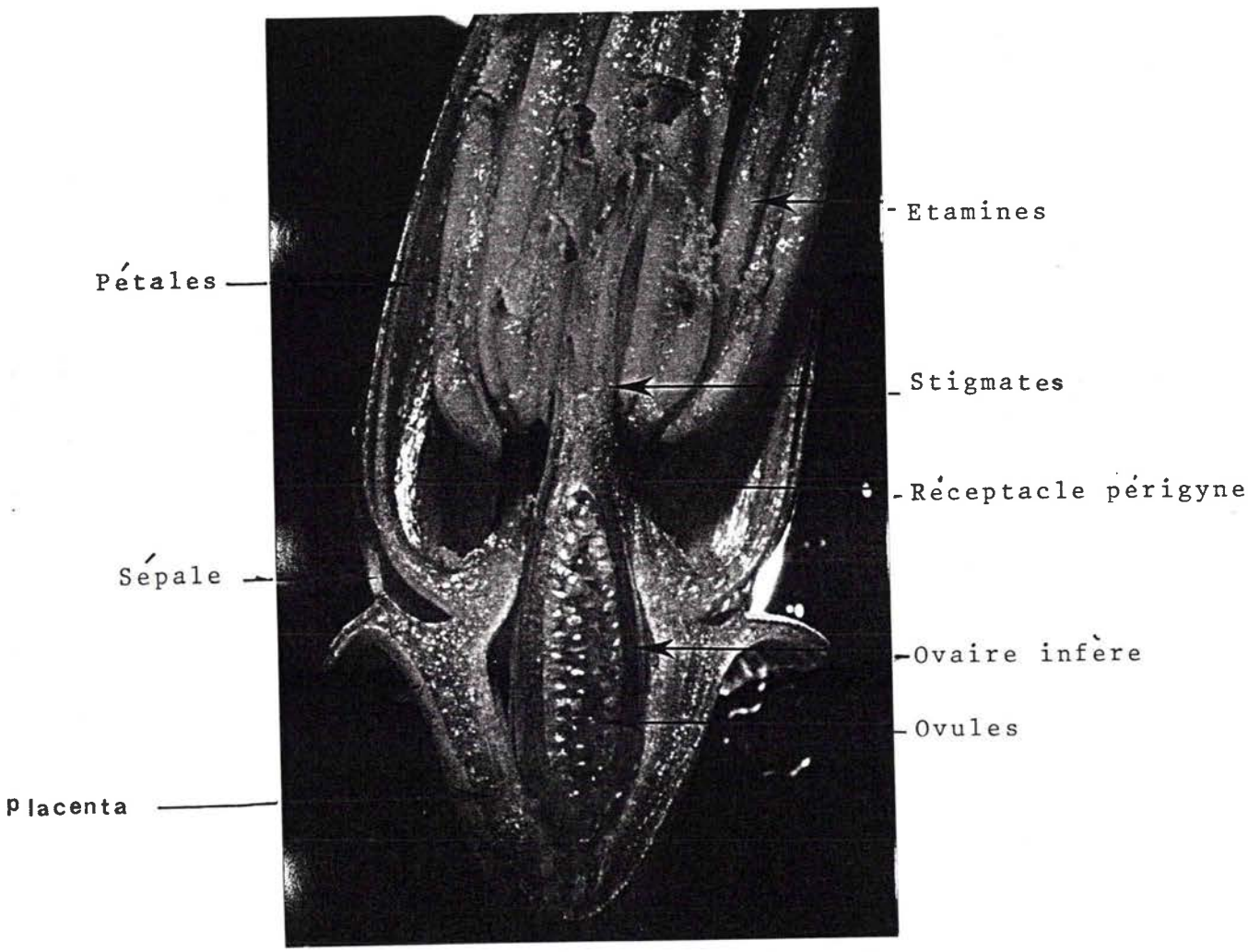


PHOTO 11 - COUPE D'UN BOUTON FLORAL D'E. CALIFORNICA Cham.

Au début du développement de la fleur, le calice enveloppe le bouton floral (photo 11). A l'épanouissement, la base du bouton se déchire, et il se forme un capuchon qui est repoussé par la croissance des pétales. Le calice est en préfloraison valvaire.

Les pétales, au nombre de quatre, sont en forme d'éventail et ont une taille variant de 4 à 8 cm, ils sont intensément colorés (jaune à orange). Ils sont libres, sessiles, disposés en deux verticilles de deux pétales chacun. La préfloraison est de type chiffonée (photo 12).

Le réceptacle concave déborde sous les pétales formant un épais rebord circulaire vert.

La coloration des pétales est souvent irrégulière. Elle est plus intense à la base et se dégrade à l'approche du bord supérieur.



PHOTO 12 - FLEUR D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA Cham. (Aube)

De jour, les 4 pétales sont étalés (photo 10 et 12), à la tombée de la nuit ils s'enroulent sur eux-mêmes enfermant ainsi les étamines pour les protéger, et se présentent alors sous la forme d'un cornet dressé (photo 13). Cette disposition particulière permet également la protection du pollen contre l'humidité.

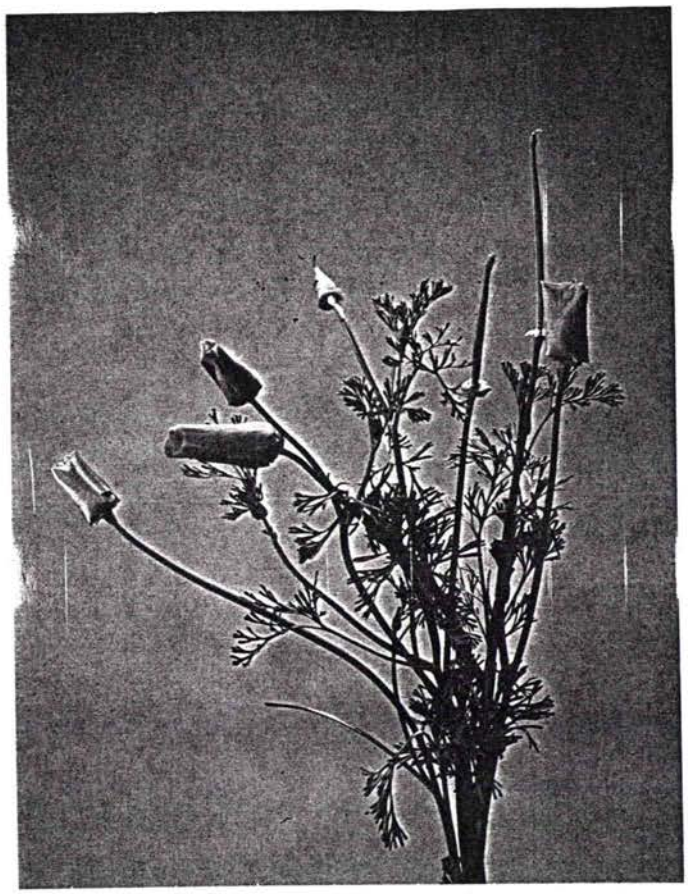


PHOTO 13 - E. CALIFORNICA Cham. (Aube)
FLEURS REFERMEES SUR ELLES-MEMES LA NUIT

L'androcée est constituée par de nombreuses étamines, libres et périgynes (photo 11 et 12).

Le nombre des étamines est indéfini mais toujours supérieur à douze (photo 11 et 12).

Clarck (1978) a pu répertorier de 13 à 47 étamines chez Eschscholtzia californica Cham., provenant de la multiplication des deux verticilles dimères.

L'ovaire est libre, bicarpellé et en grande partie infère (photo 11).

Les deux carpelles sont soudés par leurs bords en un ovaire uniloculaire muni de deux placentas pariétaux multiovulés disposés transversalement ou obliquement sur plusieurs rangées (photo 11 et 14).

Le style possède quatre à huit branches dont deux représentent la continuité des placentas, il est court et surmonté du stigmate divisé en quatre lobes fertiles (photo 11).

L'ovule est anatrope (structure inversée) (fig. 3).

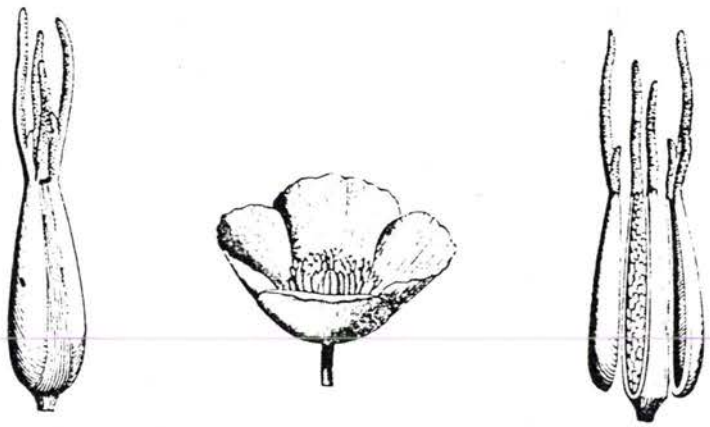
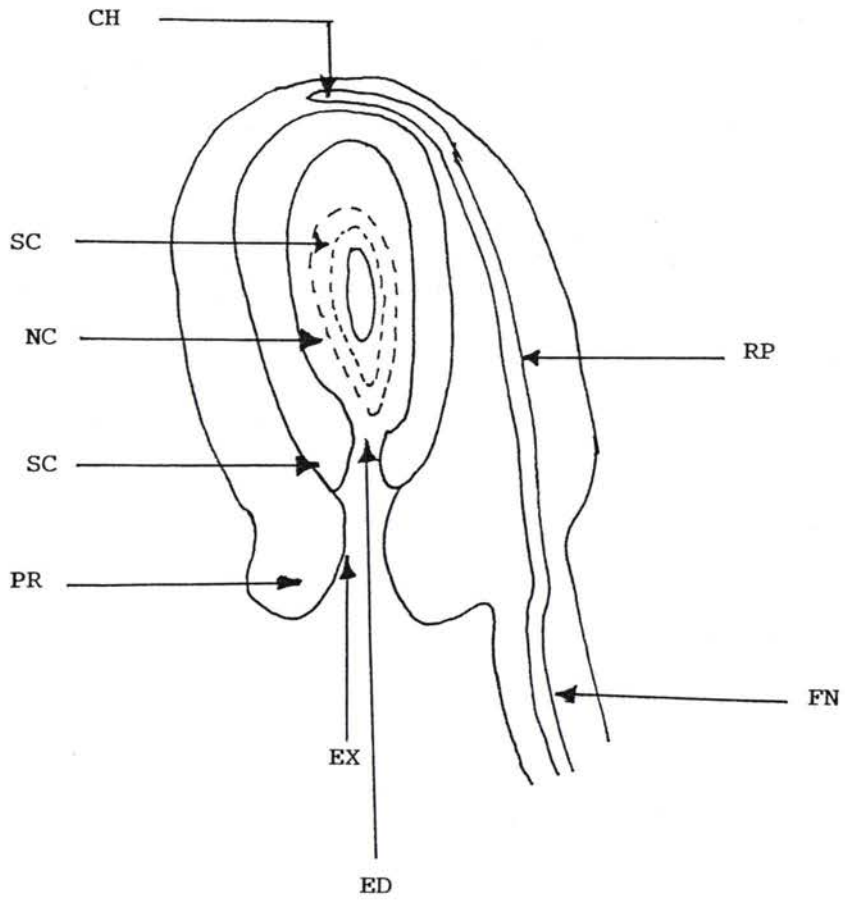


PHOTO 14 - OVAIRE D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA Cham. selon Baillon 1876



PR : PRIMAIRE
SC : SECONDAIRE
EX : EXOSTOME
ED : ENDOSTOME
NC : NUCELLE
SE : SAC EMBRYONNAIRE
FN : FUNICULE
FV : FAISCEAU VASCULAIRE
CH : CHALAZE
RP : RAPHE

Fig. 3 - STRUCTURE DE L'OVULE ANATROPE D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA CHAM, EN COUPE LONGITUDINALE

Le développement de l'ovule anatrope se fait de manière à renverser la direction première du nucelle, ainsi chez Eschscholzia californica Cham. l'ovule dirige d'abord son sommet (nc) du côté opposé au funicule (fn). Déjà dans cet état à peu près naissant on peut reconnaître que l'ensemble de l'ovule tend à s'infléchir, l'un de ses côtés devenant sensiblement plus développé que l'autre.

Cette croissance inégale devenant de plus en plus prononcée, il en résulte une ouverture des téguments (ed) situé en bas, tant à côté du funicule (fn) alors que la chalaze (ch) est transportée tout en haut en un point diamétralement opposé à celui qu'il occupait auparavant.

La graine (photo 2) est de forme globuleuse. Elle montre une multitude de facettes présentant de petites crêtes sur leur pourtour.

La floraison a lieu de février à septembre.

La formule et le diagramme florale sont représentés dans le schéma suivant :

(2S + (2 + 2) P + (2 m) E + 2 C

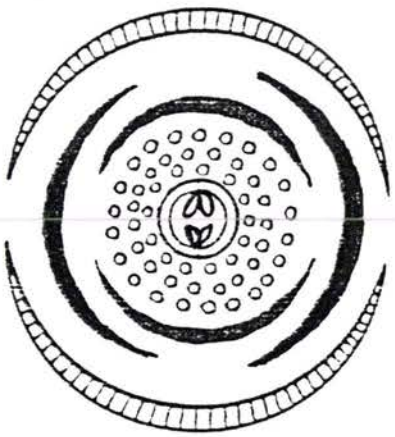


Fig. 4 : Formule et diagramme florale d'Eschscholzia californica Cham.

Deux variétés d'Eschscholzia californica Cham. ont été proposées (Abrams L. 1944 ; Munz A. 1959).

E. californica Cham. var crocaea Benth.

C'est une espèce vivace possédant une racine en pivot très puissante. Les plantes âgées ont souvent une ramification en couronne. Cette variété est caractérisée par une grande variation saisonnière dans la taille et la couleur.

E. californica Cham. var crocaea Benth. se localise en grande partie dans les zones du Sonora, la rivière Columbia et la zone s'étendant de Washington au nord de la basse Californie.

Selon Munz A. (1959), cette variété pourrait correspondre à l'espèce découverte par Benth : E. Douglasii Benth. (index Kewensis).

E. californica Cham. var peninsularis Greene

C'est une plante annuelle, plus élancée que la plante type, possédant parfois une racine pivotante charnue.

Les fleurs sont identiques à celles de la variété crocea.

E. californica Cham. var peninsularis Greene se localise sur les flancs de coteaux, sur les sols sablonneux de la vallée de San Joaquim et dans la zone de la basse Californie.

Cette variété selon Munz A. (1959) pourrait correspondre à E. arvensis var diulatata Green (index Kewensis).

IV - DIFFERENCIATION EN DEUX SOUS-ESPECES

On rencontre fréquemment dans la littérature l'espèce annuelle Eschscholzia mexicana Greene (Clark 1978) qui est proche de l'espèce Eschsholzia californica Cham.. Si Greene (1905), l'auteur de cette espèce l'a toujours considérée comme distincte de l'espèce E. californica, de nouveaux botanistes (Martin 1941, Cook 1962, Benson 1976) montrent que ces deux espèces présentent de grandes similitudes botaniques et peuvent ne pas être différenciées.

Contrairement à E. californica Cham., E. mexicana Greene ne diffère que par l'existence de cotylédons entiers et non bifides, et par un développement strictement annuel (Clark 1978). Ainsi les caractères morphologiques de ces deux espèces présentent de grandes similitudes et selon des études génétiques de Clark (1974) E. mexicana Greene peut être considérée comme une sous espèce d'E. californica Cham.. Il y aurait eu une dissociation de ces deux sous espèces à la fin de l'ère glaciaire avec l'apparition de climats plus chauds et plus secs. Eschscholzia californica se présente donc sous forme de deux sous espèces se différenciant principalement par leur localisation écologique.

Eschscholzia californica Cham. sp californica Cham.
Sous-espèce que l'on trouve dans des zones géographiques variées, en particulier, la marge des déserts du Sonoran, les dunes côtières de haute et de basse Californie, la plupart des forêts californiennes, les dunes et les vallées arides du Mojave, de l'Arizona et du Nouveau Mexique.

Eschscholzia californica Cham. sp mexicana Greene
Sous-espèce que l'on rencontre au coeur du désert de Sonora.

Avant l'ère glaciaire E. californica Cham. sp californica Greene pouvait se rencontrer dans tout l'ouest des Etats-Unis mais le développement des zones désertiques comme le Sonora lui a été néfaste et a favoriser sa disparition ; mais cette espèce a su se transformer en une espèce plus adaptée à ces conditions écologiques : E. californica Cham. sp mexicana Greene.

Les tolérances climatiques de chacune des espèces ont été relevées (fig. 5, Clark C. 1978) et l'on peut constater que E. californica Cham. sp mexicana Greene exige des conditions strictes à savoir un climat chaud et sec, E. californica Cham. sp californica Greene peut se développer dans des conditions climatiques plus variées. Cependant la fig. 5 montre également que ces deux sous espèces peuvent coexister en bordure de certains déserts.

Parmi les 112 espèces répertoriées par Greene (1905), Fedde (1909) et dans l'Index Kewensis ; plus de 50 d'entre elles peuvent être, selon Greene (Greene, 1905), considérées comme appartenant soit à la sous-espèce E. californica Cham. sp californica Greene, soit à la sous-espèce E. californica Cham. sp mexicana Greene, suite à des recherches à la fois sur le terrain et en laboratoire.

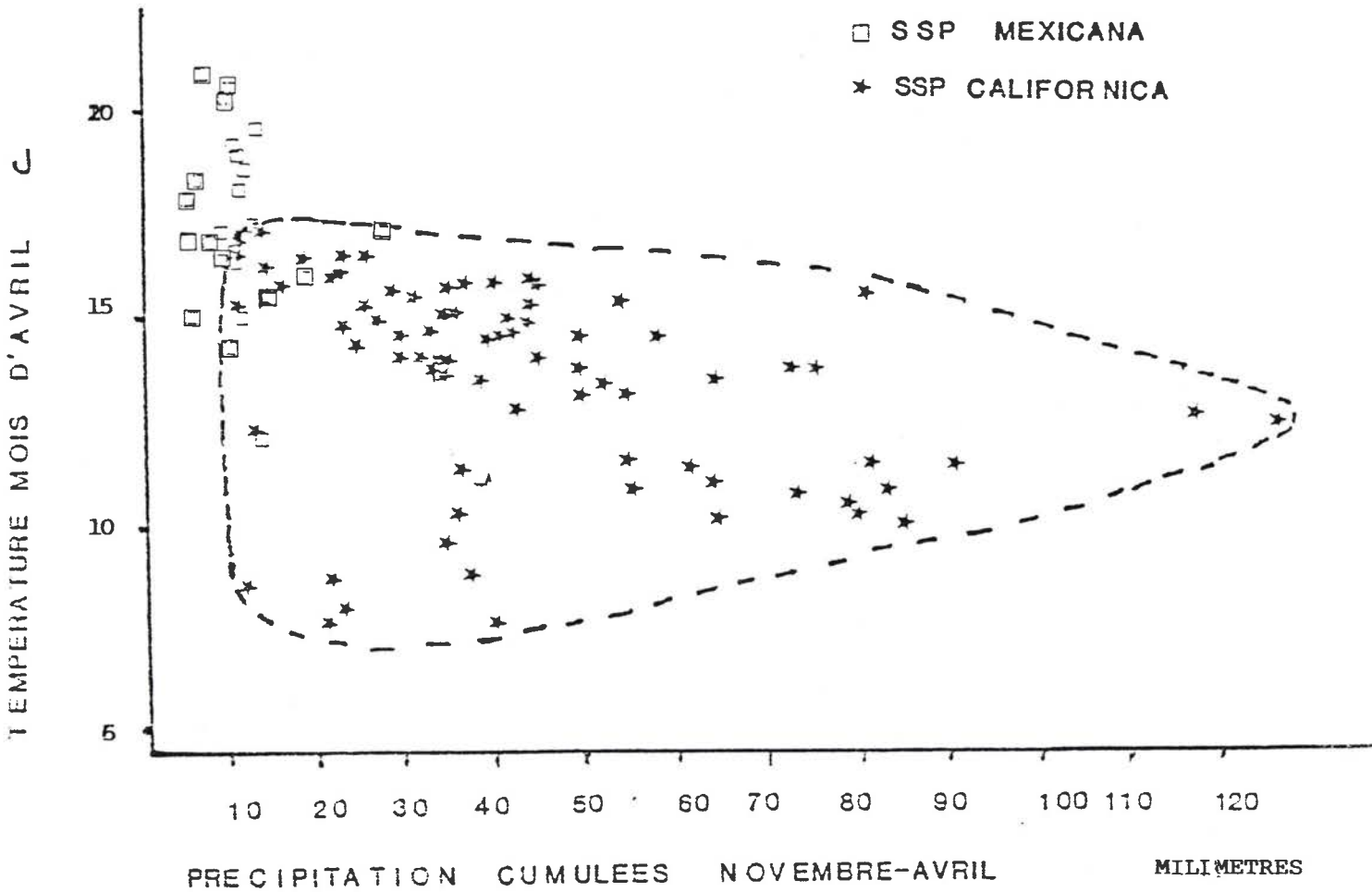


Fig. 5 : Tolérance climatique de E. californica ssp. californica et E. californica ssp. mexicana

V - ESSAIS BOTANIQUES

Notre étude botanique d'*E. californica* Cham. ne saurait être complète si nous n'avions pas entrepris l'étude histologique microscopique des différents organes de la plante.

L'analyse histologique fait partie intégrante de la systématique et nous permet de confirmer la détermination botanique de l'espèce par la présence ou l'absence de certains tissus spéciaux.

Nous avons réalisé une coupe transversale d'une tige sèche, préalablement immergée dans de l'alcool à 60° pendant 12 heures, d'une feuille fraiche, d'une racine, et nous avons relevé les éléments constitutifs d'une poudre des parties aériennes broyées.

Pour la détermination histologique nous nous sommes référés à l'ouvrage sur l'anatomie des dicotylédones de Metcalfe (1950) qui nous donnent les caractères généraux de la famille Papaveraceae (cf. paragraphe I).

V.1. MATIERE PREMIERE

Nous avons utilisé des plantes provenant du Maine et Loire (Procoherbes).

V.2 OBTENTION DES COUPES HISTOLOGIQUES

V.2.1 - Techniques de coloration (Genevès L. 1962)

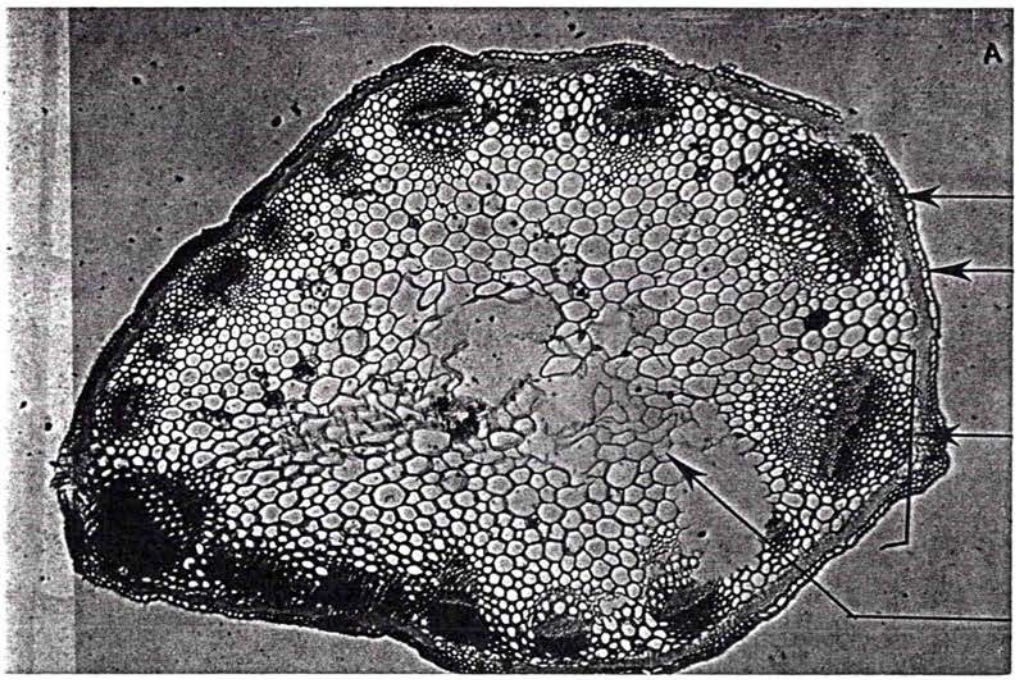
Une bonne coloration et la facilité avec laquelle on observe les détails d'une préparation d'histologie dépendent en grande partie de la finesse de la coupe. Des coupes suffisamment minces permettent de voir les tissus pourvus de petites cellules (phloème, faisceau vasculaire).

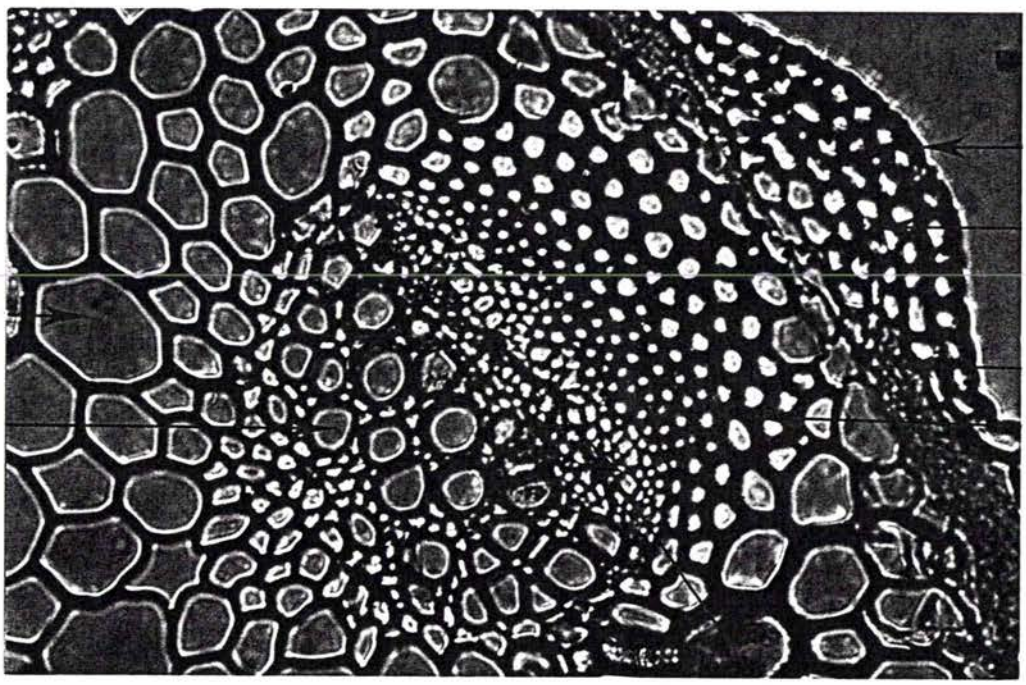
Nous utilisons les techniques en double coloration au carmin aluné, vert d'iode.

V.2.2 Observation des coupes

Les préparations ainsi obtenues sont passées à plusieurs reprises successivement dans de l'éthanol à 70°, 96° et absolu, ensuite sont placées dans une goutte de résine, type Baume du Canada et recouvertes par une lamelle . Après séchage et durcissement de la résine, les préparations peuvent être observées au microscope.

V.2 - 2.1 : Coupe d'une tige d'Eschscholzia californica Cham .





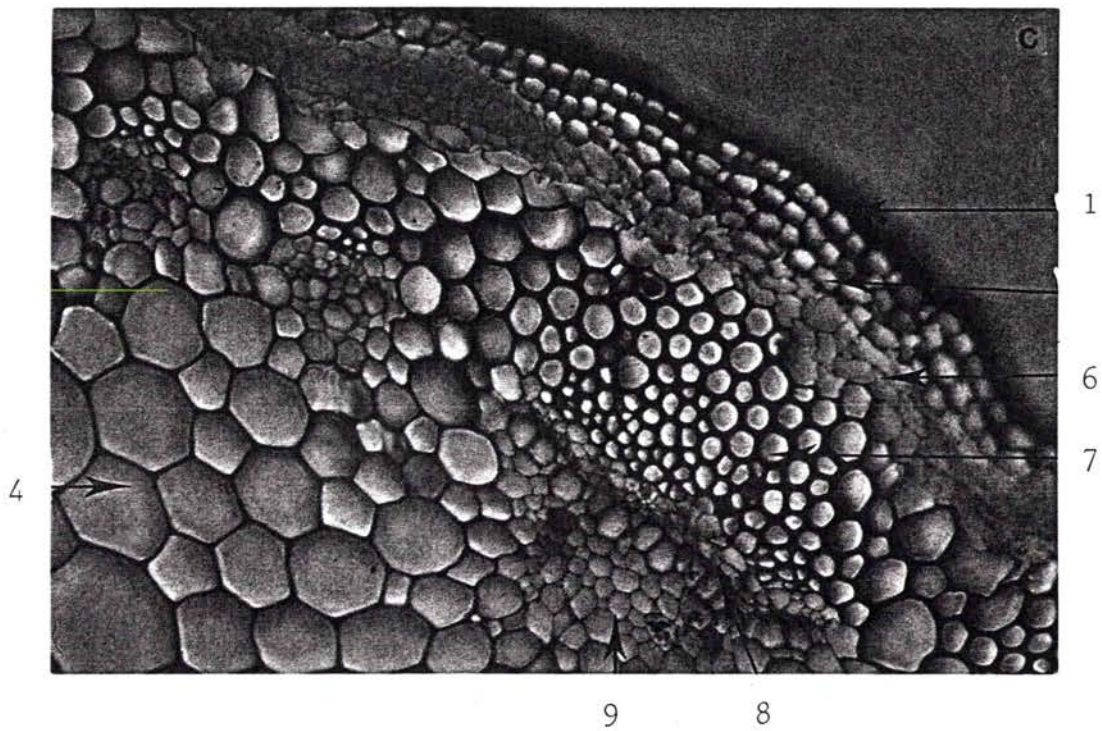


PHOTO 15 : La coupe transversale de la tige présente des éléments suivants de l'extérieur vers l'intérieur. 1 : épiderme, 2 : hypoderme, 3 : faisceau libéro. Ligneux, 4 : Parenchyme, 5 : collenchyme, 6 : hypoderme, 7 : sclérenchyme, 8 : phloème, 9 : xylème. A : 30 X ; B : 75 X ; C : 300 X.

V.2 - 2.2 : Coupe d'une feuille d'E. californica Cham.

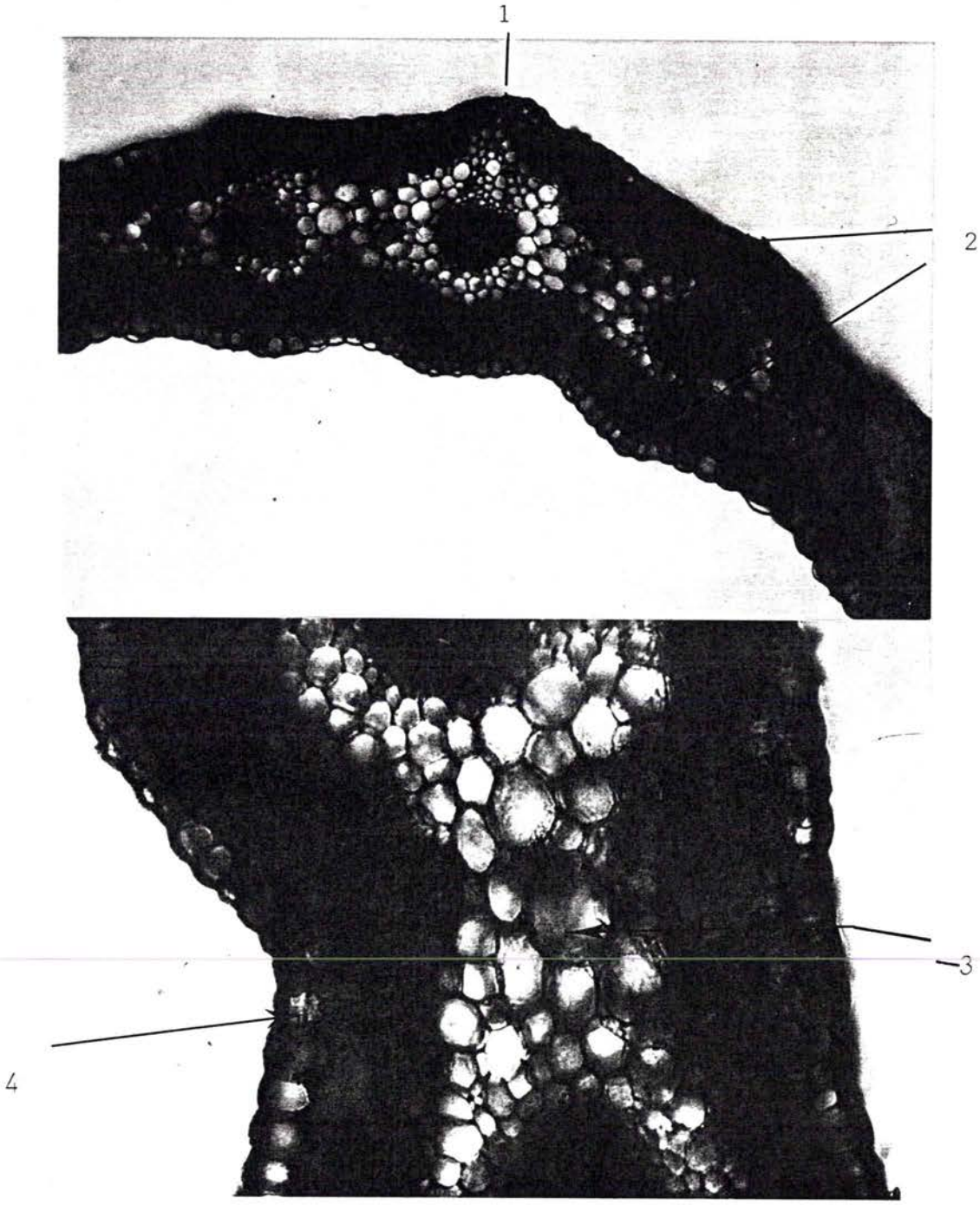


PHOTO 16 : La coupe transversale de la nervure principale de la feuille présente des éléments suivants :
1 : COLLENCHYME ; 2 : PARENCHYME PALISSADIQUE BILATERAL ; 3 : CANAL SECRETEUR ; 4 : STOMATE.
A : 30 X ; B : 75 X.

V.2- 2.3. : Coupe d'une racine d'Eschscholzia californica Cham.

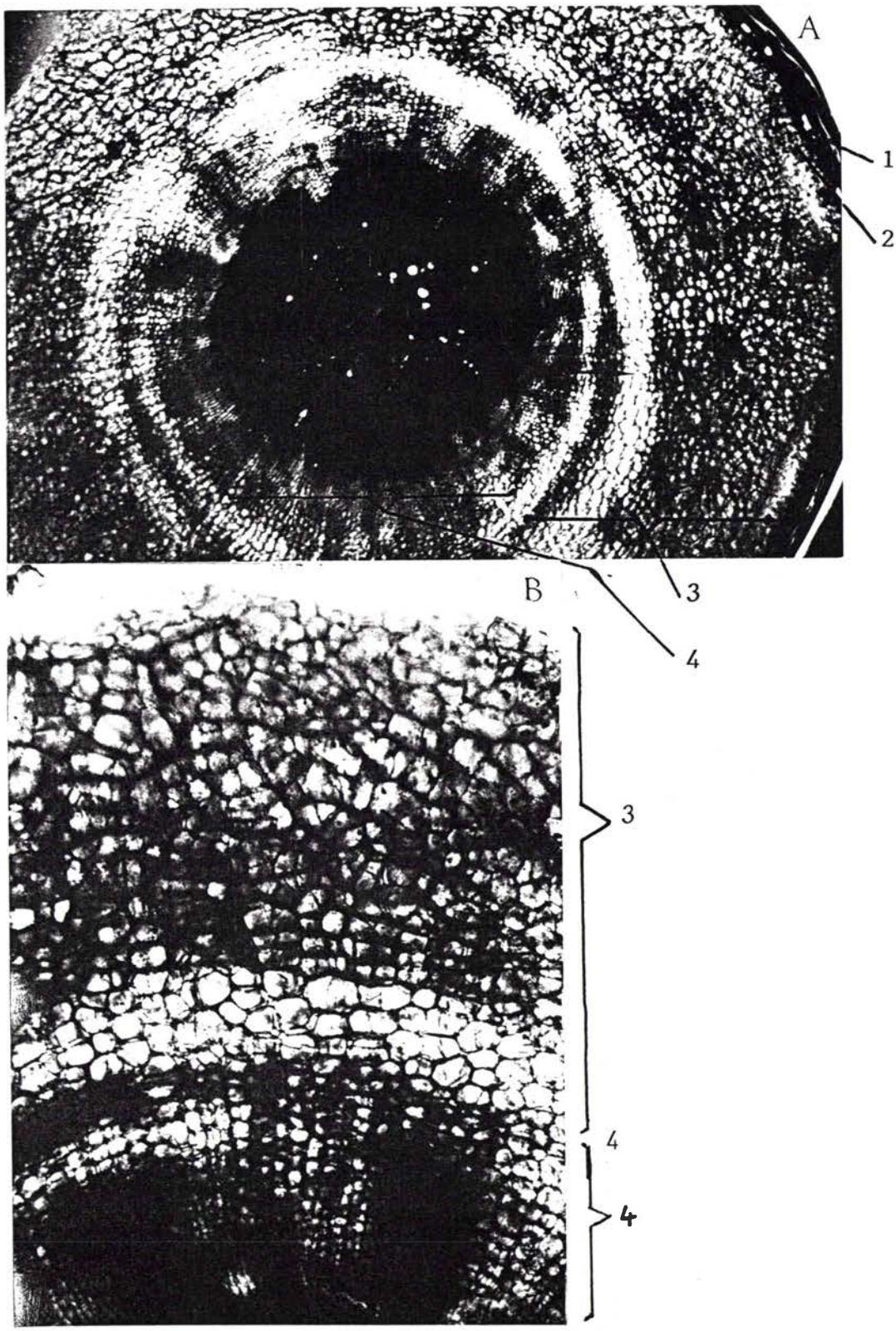


PHOTO 17 - La coupe transversale de la racine présente des éléments suivants de l'extérieur vers l'intérieur.
1 : SUBER ; 2 : PHELODERME ; 3 ; CORTEX avec PARENCHYME
4 : CYLINDRE CENTRAL : FAISCEAU LIBERO-LIGNEUX avec RAYONS MEDULAIRES
A : 30 x ; B : 75 x

V.3. PREPARATION, COLORATION ET OBSERVATION DE LA POUDRE DES PARTIES AERIENNES D'E. CALIFORNICA CHAM.

Une très faible quantité de poudre des parties aériennes traitées au mortier est délayée dans un mélange à parties égales des réactifs I et II de Steinmetz.

Le réactif I est composé d'une solution de chloral éclaircissante.

Le réactif II est composé d'une solution d'iode (coloration de l'amidon) et d'une solution de Soudan IV (huile essentielle et la résine se colorent en rouge orangé).

L'examen microscopique d'une préparation de poudre d'Eschscholzia californica Cham. est présenté dans la figure 6.

Dans la préparation de poudre on trouve des grains de pollen en abondance (1), différents types de vaisseaux de bois (2) à savoir spiralé (a), pointu (b) et arrondi (c), des fragments de parenchyme cortical avec stomate caractéristique (3), deux types de poils (2) : poils tecteurs, pluricellulaires, unisériés et allongés à parois relativement minces (a) et de rares poils sécréteurs à tête pluricellulaire et pied unicellulaire (b), des débris de parenchyme fondamental (5) avec de gros canaux laticifères, et enfin l'oxalate de calium (6) est abondant sous forme de gros prismes ou encore de mâcles c).

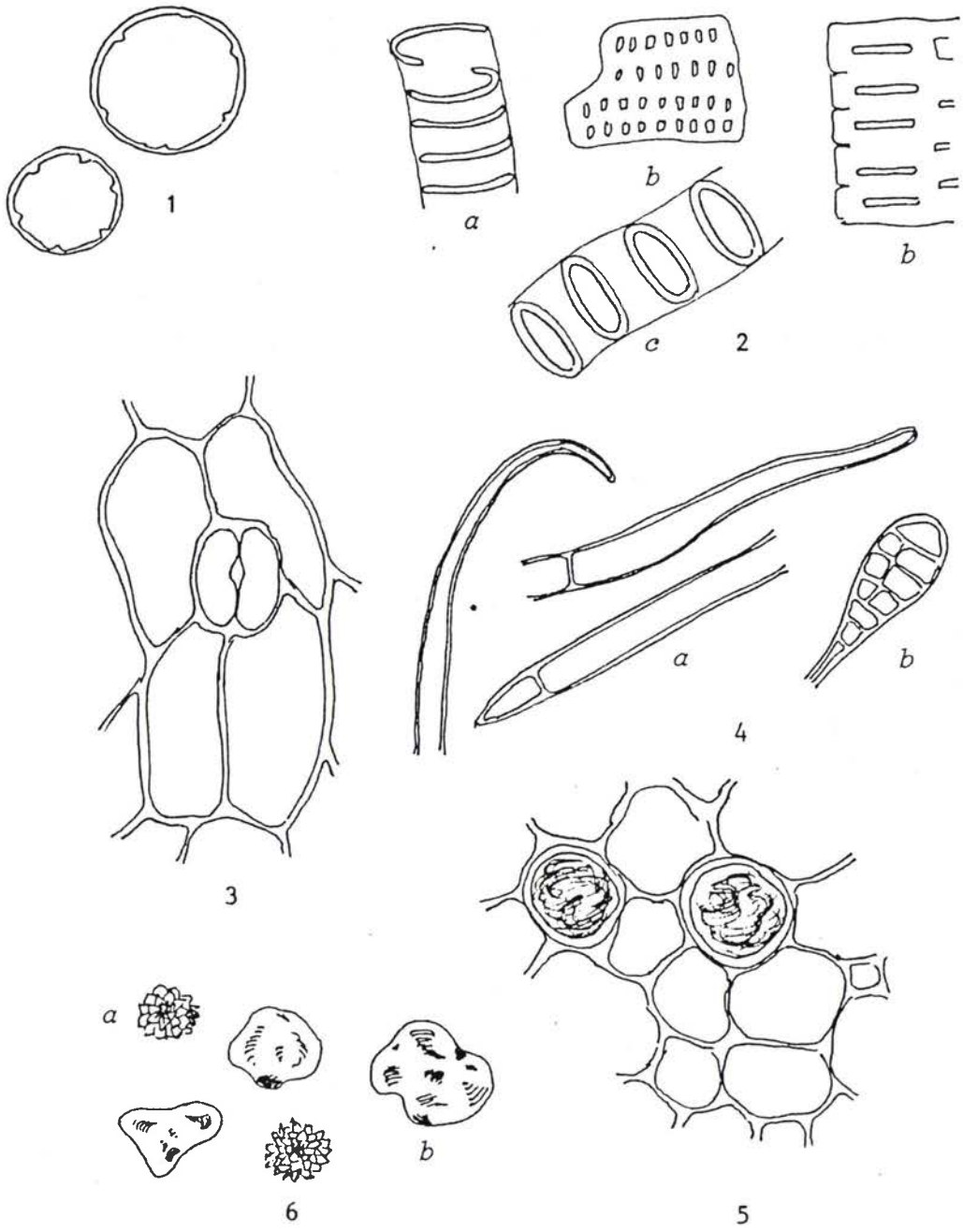


Fig. 6 - Observation de la poudre : 1- grains de pollen, 2 - vaisseaux de bois (a : spiralé, b : ponctué, c: annelé), 3 - parenchyme avec stomate, 4 - Poils (a : tecteurs, b: sécréteur), 5 - canaux sécréteurs, 6 - Oxalate de calcium (a : mâcles, b : prismes).

D E U X I E M E P A R T I E

ETUDE CHIMIQUE

Parmi les diverses espèces du genre Eschscholzia, seule E. californica Cham. a été utilisé en thérapeutique vraisemblablement en raison de son utilisation empirique qui est à l'origine de sa réputation.

Si les études pharmacologiques sont pratiquement inexistantes, les principaux travaux ont pour objet l'anatomie, la physiologie et la chimie principalement orientée vers les alcaloïdes, du fait de l'appartenance de cette espèce à la famille Papaveraceae. Ainsi Fischer dès 1901 isole le premier alcaloïde d'E. californica Cham. : la glaucine.

Il faut noter que l'essentiel des études chimiques a été réalisé entre 1950 et 1975, alors que des chercheurs, spécialisés dans le domaine des alcaloïdes exploraient systématiquement l'existence de ces molécules dans le monde végétal (GERTIG, 1964, 1965 ; Slavik et coll., 1955, 1961, 1967, 1970, 1973, 1975, 1976 ; Manske, 1965, 1966 ; Slavikova, 1966).

Toutefois, si l'étude chimique n'a jamais été réalisée de manière systématique et dans son intégralité, les différents travaux de ces auteurs nous permettent de présenter la composition alcaloïdique d'E. californica Cham.

Quelques travaux isolés ont été effectués permettant de préciser la présence de flavonosides (Sando, 1920 ; Hegnauer, 1969), de caroténoïdes (Abrol, 1966 ; Swain, 1979) et de dérivés cyanogénétiques (Hegnauer, 1969, 1978 ; Hösel, 1985).

Par ailleurs, en dehors de ces substances complexes, Watt (1970) mentionne la présence d'une quantité considérable de nitrate de potassium ainsi que des acides organiques tels que l'acide fumarique et l'acide malique.

I - COMPOSITION CHIMIQUE D'E. CALIFORNICA CHAM. (Rolland, 1987)

Le développement des techniques chromatographiques sur plaques et sur colonnes ont permis la séparation et l'identification d'un grand nombre de substances, mais il n'était pas possible de définir toutes les structures. C'est à l'apparition récente de techniques plus complexes, telles que la raisonnance magnétique nucléaire et la spectrométrie d'absorption qu'il a été possible de préciser et d'identifier les structures encore inconnues (Manske, 1965, 1966 ; Gertig, 1964, 1965, ; Slavik et coll., 1955, 1961, 1967, 1970, 1973, 1975, 1976 ; Slavikova, 1966).

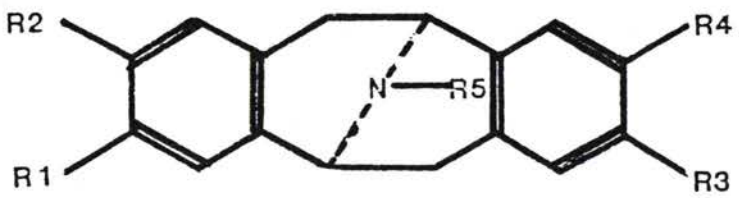
I . 1. - LA PLANTE ENTIERE

II.1 - 1. : Les alcaloïdes

Six groupes d'alcaloïdes ont été répertoriés dans la littérature.

I .1 - 1.1. : Groupe de la pavine

Structure chimique - C'est un groupe très important chez E. californica Cham. puisqu'il renferme des alcaloïdes spécifiques de ce genre dont l'eschscholzine et l'eschscholzidine caractérisent l'originalité de ce genre.



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Organes	Références
Bisnorargemonine $C_{19}H_{21}NO_4$	-OH	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-CH_3$	Racines	Slavik et Slavikova 1970
Eschsholzine $C_{19}H_{17}NO_4$ Synonyme de californine	$-O-CH_2-O-$		$-O-CH_2-O-$		$-CH_3$	Racines	Manske 1964,1965
Californidine $C_{20}H_{20}NO_4^+$	$-O-CH_2-O-$		$-O-CH_2-O-$		$+N(CH_3)_2$	Racines	Slavik 1969,1973
Eschsholzidine $C_{20}H_{21}NO_4$	$-O-CH_2-O-$		$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-CH_3$	Racines	Manske 1966
Norargemonine $C_{20}H_{23}NO_4$	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-CH_3$	Racines	Slavik 1970

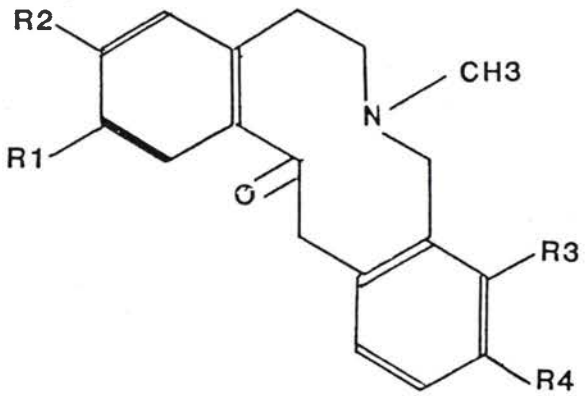
Tableau 1 : **PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ALCALOIDES DU GROUPE DE LA PAVINE**

	Masse Molaire	Point de fusion	Max abs. uv/EtOH nm	Solubilité		
				eau	chloroforme	acétate d'éthyle
Bisnorargemonine $C_{19}H_{21}NO_4$	327	254	288	-	++	++
Eschscholtzine (Hydrochlorure) $C_{19}H_{17}NO_4$	323	246	295	-	++	++
Eschscholtzidine $C_{20}H_{21}NO_4$	329	230	291	-	++	++
Norargemonine $C_{20}H_{23}NO_4$	341	-	225	-	++	++
Californidine $C_{20}H_{20}NO_4^+$	338	-	298	-	++	++

I .1 - 1. 2 : Groupe de la protopine

Ce sont des alcaloïdes très répandus dans le règne végétal et particulièrement dans la famille des Papaveracées. Ils ne présentent aucune spécificité de l'espèce E. californica Chamisso.

Structure chimique



	R_1 R_2	R_3 R_4	Organes	Références
Protopine ou nacleyine ou Fumarine $C_{20}H_{19}NO_5$	$-O-CH_2-O-$	$-O-CH_2-O-$	Plante entière	Henry 1924 Slavik 1955, 1965 Manske 1964
Cryptopine $C_{21}H_{23}NO_6$	$-OCH_3$ $-OCH_3$	$-O-CH_2-O-$	Racines Plante entière	Slavik 1955 Manske 1964
α allocryptopine $C_{21}H_{23}NO_5$	$-O-CH_2-O-$	$-OCH_3$ $-OCH_3$	Feuilles Tiges	Slavik 1955
β allocryptopine $C_{21}H_{23}NO_5$	$-O-CH_2-O-$	$-OCH_3$ $-OCH_3$	Racines	Slavik 1955

Les propriétés physicochimiques sont présentées dans le tableau 2.

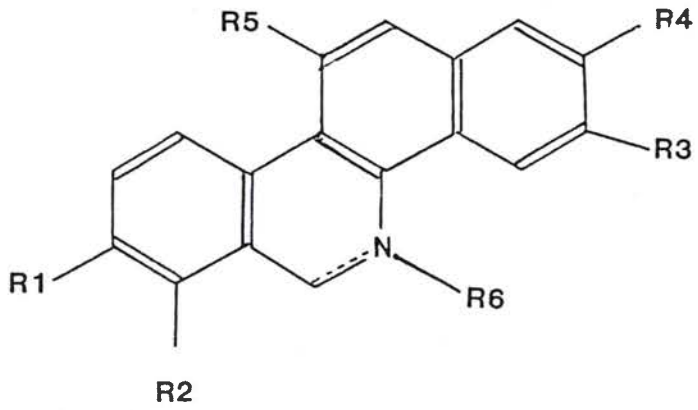
Tableau 2 : PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ALCALOIDES DU GROUPE DE LA PROTOPINE

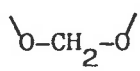
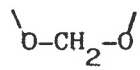
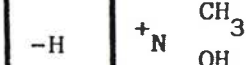
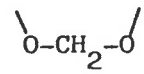
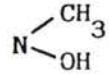
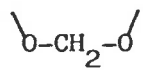
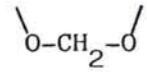
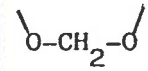
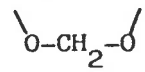
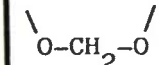
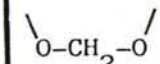
	Masse Molaire	Point de fusion	abs. uv ethOH nm	Solubilité				cristallisation
				eau	EtOH	éther	chloroforme	
Protopine $C_{20}H_{19}NO_5$	353,36	208	293	très faible	++	++	+	prisme monoclinique (alcool + chloroforme)
Cryptopine $C_{21}H_{23}NO_5$	369,40	218		-	++	-	+	prisme (benzène)
α Allocryptopine $C_{21}H_{23}NO_5$	369,40	160		-	++	++	++	prisme (éthanol)
β Allocryptopine $C_{21}H_{23}NO_5$	369,40	160		-	++	++	++	prisme (éthanol)

I .1 - 1. .3 : Groupe du N, Benzophénanthridine

Ces alcaloïdes sont également très communément rencontrés dans les genres voisins.

Structure chimique



	R_1 R_2	R_3 R_4	R_5	R_6	Organes	Références
Sanguinarine $C_{20}H_{15}NO_5$			-H		Racines	Gertig 1965
Chélérythrine $C_{21}H_{19}NO_5$	$-OCH_3$ $-OCH_3$		-H		Racines	Henry 1924
Chélirubine $C_{21}H_{17}NO_5$			$-OCH_3$	N—CH_3	Plante entière	Slavik 1965
Chélilutine $C_{22}H_{21}NO_5$	$-OCH_3$ $-OCH_3$		$-OCH_3$	N—CH_3	Parties aériennes	Slavik 1955, 1965
Chélidonine $C_{20}H_{19}NO_5$			-OH	N—CH_3	Plante entière	Slavik 1955, 1965
Homochélidonine $C_{21}H_{23}NO_5$	$-OCH_3$ $-OCH_3$		-OH	N—CH_3	Plante entière	Manske 1964

Les propriétés physicochimiques des alcaloïdes sont présentées dans le tableau 3.

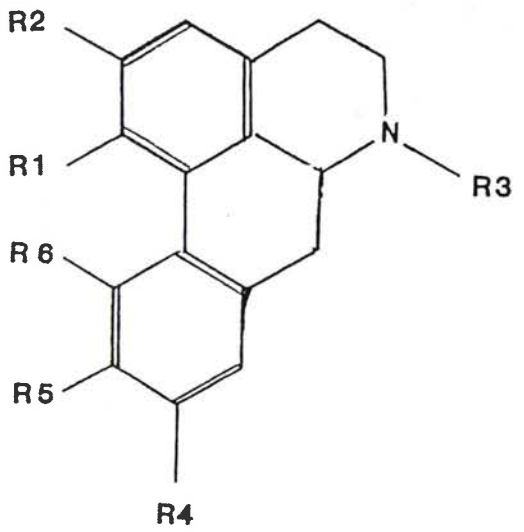
Tableau 3 : **PROPIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ALCALOIDES DU GROUPE DU N, BENZOPHENANTHRIDINE DE E. CALIFORNICA CHAMISSO**

	Max abs. uv Me OH nm	Masse molaire	Point de fusion	Solubilité				cristallisation	coloration naturelle
				eau	EtOH	éther	chloroforme		
Sanguinarine $C_{20}H_{15}NO_5$	234 253 325	349,33	212	-	+	+	++	-	base libre : incolore sel(IV): rougeâtre
Chélérythrine $C_{21}H_{19}NO_5$	234 283 325	365,37	207	-	+	++	++	prisme incolore (chloroforme + éthanol)	base libre : incolore sel(IV) : jaune
Chélidonine $C_{20}H_{19}NO_5$		353,36	135-136	- +	+	++	++	prisme monoclinique (chloroforme + éthanol)	solution aqueuse de la base et du sel : fluorescence violette
Homochélidonine $C_{21}H_{23}NO_5$	-	369,26	180	-	+	+	++	prisme orthorhombique (éthanol)	-
Chélirubine $C_{21}H_{17}NO_5$	-	363	-	-	+	+	++	-	-
Chélilutine $C_{22}H_{21}NO_5$	-	377	-	-	+	++	++	-	-

I .1 -1. .4 : Groupe de l'Aporphine

Le groupe comprend des alcaloïdes à structure phénolique et des alcaloïdes à structure non phénolique.

Structure chimique



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	Organes	Références
Laurotétamine $C_{19}H_{21}NO_4$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-H$	$-OH$	$-OCH_3$	$-H$	Plante entière	Manske 1964
N,méthyllaurotétamine $C_{20}H_{23}NO_4$ Syn. Lauroscholzine	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-CH_3$	$-OH$	$-OCH_3$	$-H$	Plante entière	Manske 1964
Glaucine $C_{21}H_{25}NO_4$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-CH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-H$	Parties aériennes	Fischer 1901
Esholine $C_{20}H_{24}NO_4^+$ Syn. Magnoflorine	$-OH$	$-OCH_3$	$+N(CH_3)_2$	$-H$	$-OCH_3$	$-OH$	Racines	Gertig 1965

Les propriétés physicochimiques sont présentées dans le tableau 4.

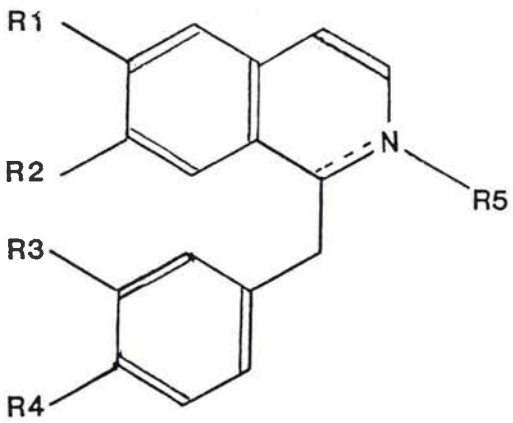
Tableau 4 : **PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ALCALOIDES DU GROUPE DE L'APORPHINE DE E. CALIFORNICA CHAMISSO**

	Max abs. uv EtOH nm	Masse molaire	Point de fusion °C	Solubilité					cristallisation
				eau	EtOH	éther	chloro-forme	acétate d'éthyle	
Laurotétamine $C_{19}H_{21}NO_4$	-	327,36	125	-	++	+	+	++	aiguilles (alcool)
Glaucine $C_{21}H_{25}NO_4$	-	355,44	120	-	++	+	+	++	prisme orthorhombique (éther)
Esholine $C_{20}H_{23}NO_4$	228 275 313	341,16	(iodure) 248	-	++	+	+	++	cristaux (méthanol + acétone)
N méthyl laurotétamine $C_{20}H_{23}NO_4$	217 282 304	341,16	-	-	++	+	+	++	

J .1.- 1. .5 : Groupe de la benzyltétrahydroisoquinoléine

Ce groupe d'alcaloïdes présente de grandes similitudes structurales avec la Papavérine.

Structure chimique



	R_1 R_2	R_3 R_4	R_5	Organes	Références
Escholinine $C_{21}H_{26}NO_4^+$	$O-CH_2-O$	$-OCH_3$ $-OCH_3$	$(CH_3)_2$ $^+$ CH_3 CH_3	Racines	Slavik 1973 Gertig 1965
Escholamine $C_{19}H_{16}NO_4^+$	$O-CH_2-O$	$O-CH_2-O$	$-CH_3$	Racines	Hegnauer 1969

Il faut noter que ces deux alcaloïdes sont en quantité mineure dans les racines de la plante.

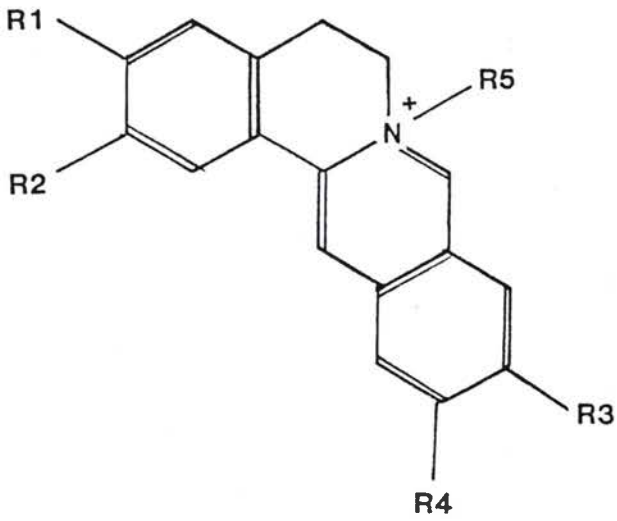
Les propriétés physicochimiques de ces deux alcaloïdes quaternaires sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ALCALOIDES DU GROUPE DE LA BENZYLTETRAHYDROISOQUINOLEINE CHEZ E. CALIFORNICA CHAMISSO

	Masse molaire	Point de fusion °C	Max abs. uv dans le méthanol	Solubilité			
				eau	alcool	éther	chloroforme
Escholinine $C_{21}H_{26}NO_4^+$	355,17	197 - 198	234 386	-	±	++	++
Escholamine $C_{19}H_{16}NO_4^+$	322	(iodure)	225 254 292 314	-	++	+	++

I .1 - 1. .6 : Groupe de la protoberberine

Structure chimique



	R_1 R_2	R_3 R_4	R_5	Organes	Références
Coptisine $C_{19}H_{15}NO_5^+$	$O-CH_2-O$	$O-CH_2-O$	—OH	Racines	Slavik 1970
Escholidine $C_{20}H_{22}NO_4^+$	$O-CH_2-O$	$-OCH_3$ $-OH$	$-CH_3$	Racines	Slavik 1970
N. Méthyl canadine $C_{21}H_{24}NO_4^+$	$O-CH_2-O$	$-OCH_3$ $-OCH_3$	$-CH_3$	Racines	Slavik 1970

Il faut noter que l'Escholidine représente l'alcaloïde quaternaire le plus abondamment rencontré dans les racines.

Les propriétés physicochimiques sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ALCALOIDES DU GROUPE DE LA PROTOBERBERINE CHEZ E. CALIFORNICA CHAMISSO

	Masse molaire	Point de fusion 0° C	Max abs. uv dans le méthanol	Solubilité alcaloïdes sous forme perchlorate				Teneur en alcaloïde des racines
				eau	alcale	alcool	chloroforme	
Coptisine $C_{19}\ H_{15}\ NO_5^+$	337,3	218	-	++	++	+	-	0,004
Escholidine $C_{20}\ H_{22}\ NO_4^+$	340	281-282	236 288	++	+	++	-	0,042
N Méthyl canadine $C_{21}\ H_{24}\ NO_4^+$	354	160-163	235 286	++	+	++	-	0,013

I .1 -.2 : Constituants courants

	Organes	Références
Hétérosides cyanogénétiques		
Triglochinine	feuilles tiges	Valen 1978
D'hurrin $C_{14} H_{17} NO_7$	tiges feuilles	Valen 1978 Hösel 1985
La Linamarine $C_{10} H_{19} NO_6$	parties aériennes	Hegnauer 1969 Abrol 1966

Il y a quelques discordances dans la littérature quant à la présence de certains hétérosides cyanogénétiques puisque Hegnauer (1969) ne mentionne la présence que de la Linamarine alors que Valen (1978) n'a répertorié que la triglochinine et Höser (1985) la triglochinine et la D'hurrin.

Eschscholzantine	pétales	Svain 1979
Violaxanthine	pétales	Hegnauer 1969
Lutéine	pétales	Hegnauer 1969
Hétérosides flavoniques		
Rutine (quercétine gluco-rahmnoside)	.pétales	Hegnauer 1969
Sels minéraux		
Nitrate de potassium		Watt 1970
Acides organiques		
Acide fumarique		Watt 1970
Acide malique		Watt 1970

I . .2. REPARTITION DES DIFFERENTES SUBSTANCES CHIMIQUES DANS LA PLANTE

I - 2.1 : Les alcaloïdes

L'ensemble des alcaloïdes sont regroupés dans le tableau 7 en fonction de la structure chimique de leur noyau. Pour chacune de ces substances nous avons indiqué leur présence (+) ou leur absence (-) dans les différentes parties de la plante (Maschi, 1983).

On peut remarquer que les racines renferment la presque totalité des alcaloïdes alors que dans les graines on ne rencontre que les bases phénanthridines : les deux alcaloïdes spécifiques de l'espèce (eschscholzine et eschscholzidine), la protopine et l' αallocryptopine.

Enfin la protopine, l' αallocryptopine, l'eschscholzine et l'eschscholzidine peuvent être caractérisés dans la plante entière.

Il faut noter cependant que cette répartition peut subir quelques modifications en fonction des conditions climatiques et écologiques du lieu de leur développement (Manske 1950 ; Brindejonc, 1911).

TABLEAU 7 : COMPOSITION QUALITATIVE EN ALCALOIDES DES DIFFERENTS ORGANES DE E. CALIFORNICA CHAM. SELON MASCHI (1983).

	Parties aériennes	Racines	Graines
* **PROTOPINES**			
protopine	+	+	+
α allocryptopine	+	+	+
β allocryptopine	+	+	+
* **PAVINES**			
eschscholtzidine	+	+	+
eschscholtzine	+	+	+
norargemonine	?	+	–
bis-norargemonine	?	+	–
californidine	+	+	–
* **APORPHINES**			
laurotétanine	+		
lauroscholtzine	+	+	–
glaucine	+		?
esholine	–	+	+
* **BENZOPHENANTHRIDINES**			
sanguinarine	–	+	+
chélérythrine	–	+	+
chélilutine	–	+	+
chélirubine	–	+	+
* **PROTOBERBERINES**			
coptisine	–	+	?
escholidine	–	+	–
* **BENZYLTETRAHYDRO-ISOQUINOLEINES**			
escholinine	–	+	–
escholamine	–	?	–

+ : présence – : absence.

I - 2.2. Les dérivés cyanogénétiques

Comme pour les alcaloïdes, les dérivés cyanogénétiques peuvent être localisés dans des parties différentes de la plante et si il est possible d'expliquer les variations dans la composition qualitative des alcaloïdes d'E. californica Cham. par des modifications écologiques, ce n'est pas la seule explication que l'on doit donner pour comprendre la présence ou l'absence d'un dérivé cyanogénétique dans un organe végétal.

L'étude des dérivés cyanogénétiques d'E. californica Cham. a débuté avec les travaux de Rosenthaler (1926), Hegnauer (1958). Ces auteurs ont mis en évidence la forte cyanogenèse de ce genre mais l'identification de ces composés (Hegnauer, 1960 ; Valen, 1978 ; Kant, 1983 ; Hösel, 1985) et les études de ce mécanisme phytochimique chez les végétaux vivant dans les écosystèmes semi arides (Urbanska, 1981, 1982, 1984, 1985) sont intervenues tardivement. Urbanska (1987) a montré l'importance de la cyanogénèse chez les taxons vivant dans des conditions climatiques extrêmes. En effet le rôle de ce mécanisme phytochimique n'est pas envisagé uniquement dans ses rapports avec la défense des plantes contre les herbivores mais également dans ses relations avec l'assimilation et l'économie de l'azote démontrant ainsi l'avantage physiologique qu'ont ces plantes pour l'assimilation des nitrates.

Chez des espèces annuelles comme E. californica Ssp. Mexicana, possédant par conséquent une croissance rapide et donc une demande en azote importante, il a été montré (Urbanska 1981, 1985) que malgré la déficience en azote de l'écosystème dans lequel la plante se développe, sa teneur en dérivés cyanoglucosidiques était importante et qu'elle se modifiait en fonction de la croissance des différents organes. Ainsi l'auteur a bien mis en évidence chez E. californica Cham. Ssp. Mexicana Green, qu'au début du développement de la plante les dérivés cyanogénétiques sont surtout présent dans les racines puis dans les feuilles et les tiges, puis au fur et à mesure que la période reproductrice prend l'avantage sur la période végétative, les composés cyanogénétiques migrent dans les parties reproductrices et principalement le péricarpe retrouvant là la propriété de protection des organes reproducteurs ce qui est essentielle pour une plante annuelle dont la survie repose uniquement sur les graines.

II. METHODES D'EXTRACTION ET DE SEPARATION DES ALCALOIDES

II. .1. EXTRACTION DES ALCALOIDES TOTAUX (Maschi, 1983)

Deux techniques sont proposées par l'auteur mais quelle que soit la méthode d'extraction des alcaloïdes, le principe reste fondé sur les propriétés qu'il a d'être soluble en milieu aqueux sous forme de sel (forme acide) et d'être soluble en milieu organique sous forme de base (forme alcaline). Grâce au jeu de ces solvants en milieu acide ou alcalin il est possible d'obtenir un extrait total partiellement purifié.

Première technique

La drogue pulvérisée est épuisée à plusieurs reprises par de l'acide sulfurique dilué. Après filtration ou centrifugation l'extrait brut d'alcaloïdes est partiellement purifié au moyen du chloroforme après déplacement à l'ammoniaque. Le résidu sec d'alcaloïdes bases est obtenu par évaporation de l'extrait chloroformique au bain marie à 60°c.

Deuxième technique

Cette technique a pour but d'obtenir les alcaloïdes sous la forme de chlorhydrate. Elle est proche de celle utilisée précédemment par l'auteur mais elle fait intervenir une technique de précipitation et d'extraction sur colonne de résine.

La drogue pulvérisée est épuisée à plusieurs reprises par de l'acide sulfurique dilué. Après filtration ou centrifugation, les alcaloïdes de la phase aqueuse sulfurique sont précipités par une solution d'iodomercurate de potassium. Le précipité est lavé dans l'acide sulfurique et remis en solution dans un mélange d'acétone - méthanol - eau. Le mélange hydroacétoalcoolique est passé sur une colonne de résine anionique (Irn 78) permettant ainsi d'obtenir des alcaloïdes purifiés sans passer par la forme chlorhydrate.

II. 2 METHODE D'EXTRACTION ET DE SEPARATION DES ALCALOIDES

Les auteurs Slavik et coll. 1955, 1961, 1965 ; Gertig 1964, 1965 et Manske 1964, 1966) ont tous réalisé l'extraction des alcaloïdes à partir de différentes parties de la plante (racines, parties aériennes) au moyen d'une extraction en continu (type soxhlet) et en utilisant le méthanol et le benzène comme solvant d'extraction. Chacune des fractions obtenues est ensuite analysée qualitativement par chromatographie sur couche mince.

II.2 - .1. Méthode d'extraction et de séparation de Gertig (1964)

L'auteur a utilisé deux types de drogues, soit la racine, soit les parties aériennes. Dans les deux cas, la technique générale d'extraction et de séparation est la suivante.

La drogue séchée et pulvérisée est extraite par le benzène dans un appareil du type soxhlet. Le résidu d'extraction sera analysé chromatographiquement après dessiccation et extraction au méthanol alors que l'extrait benzénique sera mis en contact avec de l'acide sulfurique dilué. Puis les alcaloïdes de la fraction aqueuse sulfurique sont séparés après alcalinisation et purification à l'éther.

Il a été obtenu 8 fractions à partir des racines alors que 4 fractions seulement ont été isolées des parties aériennes. Le calcul des rendements a montré que le taux de chacun des alcaloïdes isolés se situe entre 0,1 °/₀₀ et 50 °/₀₀ pour l'extraction à partir des racines alors qu'il se situe entre 3 et 7 °/₀₀ pour les parties aériennes.

L'auteur a pu mettre en évidence d'une part le nombre important d'alcaloïdes present dans l'extrait benzénique de racine alors qu'il est moins important dans l'extrait de parties aériennes et d'autre part que chacun des extraits obtenus ne renferme qu'un mélange d'alcaloïdes.

II.2 - .2 Méthode d'extraction, de séparation et d'identification de Slavik (1960, 1966, 1970)

Cette technique a pour but de séparer les bases quaternaires, les bases phénanthridines et les bases phénoliques et non phénoliques. La drogue séchée (parties aériennes ou les racines) est extraite à l'éthanol dans un appareil soxhlet et après distillation du solvant le résidu est mis en contact à plusieurs reprises avec de l'acide sulfurique dilué. Les extraits acides sont traités par de l'éther éthylique après alcalinisation soit à l'aide de soude pour isoler les bases quaternaires et quelques alcaloïdes en faible quantité, soit à l'aide de carbonate dissodique pour isoler les bases phénoliques, non phénoliques et les pseudocyanides.

II. .3 COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE SUR COUCHE MINCE DES ALCALOIDES D'E. CALIFORNICA (Slavik et coll. 1961, 1975, 1976 ; Gertig, 1964, 1965).

Nous avons relevé les principaux systèmes chromatographiques utilisés dans la littérature et les résultats obtenus avec les principaux alcaloïdes d'E. californica.

Support (phase stationnaire) : Le support est constitué par une couche mince de silice 60 sur une plaque de verre 20x20cm.

Systèmes de solvant (phase mobile)

S_1 : n. butanol, acide acétique, eau 10 : 1 : 3 V/V
S_2 : n. butanol saturé avec de l'acide acétique 5 %
S_3 : cyclohéxane, chloroforme, diéthylamine 7 : 2 : 1 V/V
S_4 : chloroforme, benzène 40 : 50 V/V saturé avec 0,5 ml de formamide.

Méthode de révélation

. U.V. 366 nm : mise en évidence des fluorescences.
. Iodoplatinate de potassium : mise en évidence des alcaloïdes par précipitation.
. Draggendorf : mise en évidence des alcaloïdes par précipitation.

Résultats

Les résultats obtenus par les auteurs sont présentés dans le tableau 8

Tableau 8 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE QUELQUES ALCALOIDES D'E. CALIFORNICA CHAM. (selon Slavik et coll., 1976 ; Gertig 1964, 1965)

Solvants / Alcaloïdes	S 1 R.F	S 2 R.F	S 3 R.F	S 4 R.F
Protopine	0,63	0,37		0,21
β Allocryptopine	0,65	0,37		0,08
Chélirubine		0,58	0,63	0,77
Sanguinarine	0,46	0,41		0,71
Chélérythrine	0,58	0,26		0,60
Coptisine	0,42			
Chélilutine		0,67	0,35	0,64
Californine			0,49	
Californidine		0,38		
Esholine		0,18		
Eschscholtzidine			0,51	
Eschscholtzine			0,47	

Après obtention des fractions alcaloïdiques, Gertig (1964) a utilisé le système S_4 pour analyser chromatographiquement la composition des différents extraits permettant une bonne séparation et une caractérisation importante du nombre d'alcaloïdes dans l'extrait benzénique de racine à la différence de l'extrait benzénique des parties aériennes qui n'en renferment qu'une quantité moindre. L'auteur a pu vérifier également que chacun des extraits qu'il a séparé contenait un mélange d'alcaloïdes.

II. .4 METHODE DE SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION (Maschi, 1983)

Cette technique a pour but de caractériser et de doser les alcaloïdes d'E. californica, toutefois elle n'a pu être mise au point que pour la séparation de 6 alcaloïdes dont 4 présentent une importance chez cette espèce, soit par leur abondance, soit par leur toxicité, soit pour leur utilisation comme un éventuel traceur chimique (Protopine, Eschscholzine, Sanguinarine, Glaucine, Lauroscholzine et la Chelérythrine).

La figure 7 reproduit le profil chromatographique obtenu avec les conditions opératoires suivantes.

Colonne : Waters Microbondapak phényl.
Phase mobile : Tampon phosphate pH 3/acétonihile : 65/35
Extraits déposés : Alcaloïdes de référence
Chelerythrine : 3 ug
Glaucine : 14,5 ug
Protopine : 50 ug
Sanguinarine : 3 ug
Eschscholzine : 30 ug
Lauroscholzine : 105 ug
Détection : Spectrophotomètre UV : 280 nm
Débit de la phase : 1ml/minute
Vitesse de défilement du papier : 4 cm/mn

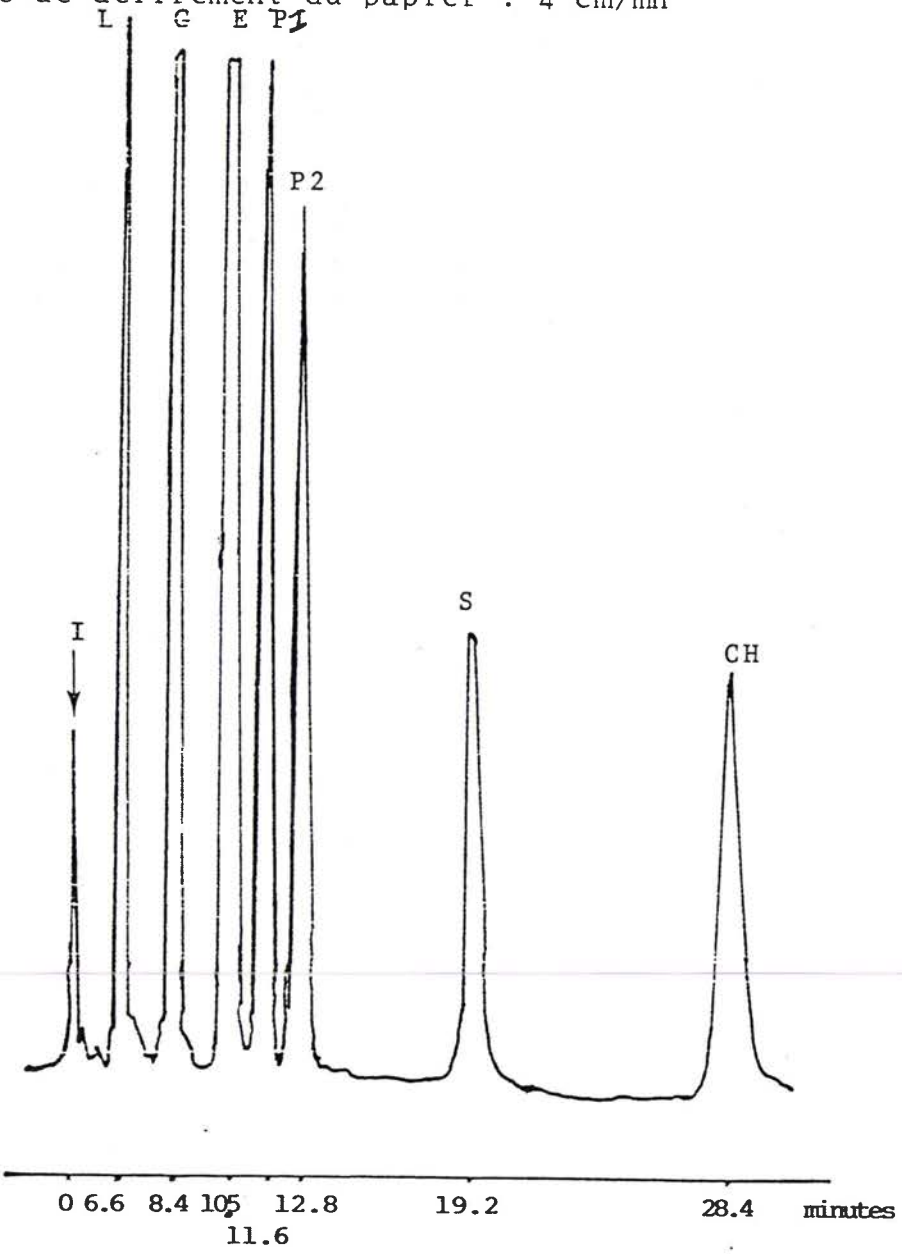


Fig. 7 : Profil chromatographique de quelques alcaloïdes standards d'E. Californica Cham.
I : Injection - L : Lauroscholzine - G : Glaucine - P : Protopine - S : Sanguinarine - E : Eschscholzine - CH : Chélérythrine.

L'auteur a obtenu des pics fins, très bien séparés avec les temps de rétention suivants :

Lauroscholzine	6,6 minutes
Glucine	8,4 minutes
Eschscholzine	10,5 minutes
Protopine 1	11,6 minutes
Protopine 2	12,8 minutes
Sanguinarine	19,2 minutes
Chélérytrhine	28,4 minutes

La protopine injectée seule se dédouble en deux structures confirmées par les deux pics observés sur le chromatogramme (Fig. 7). Alors qu'il n'a été injectée qu'une seule molécule de protopine, deux pics ont été obtenus à 11,6 minutes et à 12,8 minutes.

TROISIEME PARTIE

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

S E C T I O N A

INDICATIONS THERAPEUTIQUES TRADITIONNELLES

ET

ETUDES PHARMACOLOGIQUES ANTERIEURES

1. INDICATIONS THERAPEUTIQUES TRADITIONNELLES ET UTILISATION ACTUELLE

1.1. Indications thérapeutiques traditionnelles

Très peu d'ouvrages mentionnent les indications thérapeutiques traditionnelles d'E. californica. Toutefois CHENEY (1964) nous rapporte que les Indiens et les premiers colons de Californie consommaient les feuilles, cuites et séchées sur des pierres chaudes, comme alimentaire. Les populations rurales l'utilisaient aussi traditionnellement en usage interne contre les maux de dents, les coliques et pour diminuer la lactation, et en usage externe sous forme de cataplasme contre les ulcères.

Par la suite, les parties aériennes de la plante ont été indiquées chez l'adulte, comme hypnotique, calmante et analgésique (CHENEY 1964). Sur la côte Nord-Ouest des Etats Unis mais aussi en Europe E. californica est prescrit comme somnifère, en particulier chez l'enfant atteint de coqueluche (CHENEY, 1964, ; FOURNIER, 1948).

Selon les auteurs, il n'existerait pas d'effets secondaires telle qu'une action dépressive, ni accoutumance ; d'autre part, l'activité se maintiendrait pendant plusieurs heures.

1.2. Utilisations actuelles et formes pharmaceutiques

L'industrie pharmaceutique, en France, ne dispose actuellement d'aucune spécialité renfermant E. californica dans sa formule. Par contre, en Allemagne, pour les traitements de troubles psychiques de l'enfant et de l'énurésie nocturne, la plante est associée à Avena Sativa L. sous la forme d'extrait fluide dans la spécialité "Requiesan " dont la posologie est de 30 à 40 gouttes dans une infusion tiède d'une autre plante réputée sédative comme Melissa officinalis L. (WEISS, 1980). Pour la même indication, E. californica est utilisé sous forme de tisane de plante entière à raison d'une cuillère à café par tasse.

Sur le continent américain E. californica est fréquemment présente en pédiatrie comme sédatif nocturne (HAGER, 1973) sous forme d'infusion, à la dose de 2 à 10 g ou d'extrait fluide, à la dose de 1 à 2 ml.

Toutefois, si en France il n'y a pas de spécialité pharmaceutique, les médecins phytothérapeutes et les homéopathes prescrivent E. californica contre l'insomnie ou pour désaccoutumer certains patients de l'emploi prolongé de tranquillisants et autres psychotropes (DELAVEAU, 1984). Ces différentes prescriptions se font à partir de nébulisats ou de teintures mères.

Les nébulisats

Deux laboratoires commercialisent le nébulisat d'E. californica.

. L'Expansion Aromatique Française sous le nom d'Extrénorm ®

. Les laboratoires Vernin sous le nom de Titrex (R) dont la fiche technique de contrôle est présentée en Annexe 2.

Le nébulisat est un extrait pulvérulant titré en plante sèche, étudié pour les prescriptions magistrales et pour les usages internes. La technique d'obtention du nébulisat consiste en une extraction hydroalcoolique de la plante séchée suivie par une élimination totale du solvant par nébulisation ou l'extrait passe dans un courant d'air chaud. Le nébulisat permettrait de conserver sous une forme concentrée et stable les principes actifs de la plante (cf. chapitre III.2.A.1)

L'usage le plus fréquent du nébulisat est l'élaboration de gélules à visées sédatives dont la posologie quotidienne est habituellement de 0,30 g à raison de 3 à 6 gélules par jour (chaque gélule est dosée à 50 mg de nébulisat) (VAN STEENBRUGGHE, 1981). Toutefois, il est courant de constater que les phytothérapeutes prescrivent le nébulisat à des doses beaucoup plus importantes, jusqu'à 2g par jour.

Les teintures mères

La teinture mère commercialisée par les laboratoires Lehning (Metz) et Dolisos (Paris) est une préparation liquide alcoolique dont le titre est voisin de 45 % (V/V). Elle est obtenue par l'action dissolvante de l'éthanol sur des drogues fraiches d'origine végétale dans des conditions déterminées. La fiche technique de contrôle est présentée en annexe 3.

Les phytothérapeutes ou les homéopathes prescrivent la teinture mère d'E. californica, soit seule, à raison de 70 à 150 gouttes au coucher pour favoriser le sommeil, soit en association avec d'autres teintures mères à visées sédatives (Tilia europeaeT.M., Valériana officinalis T.M., Passiflora incarnata T.M., Crataegus oxyacanta T.M.).

Entre les différentes formes galéniques qui représentent des formes titrées en principes actifs ou supposés actifs, il existe une correspondance de doses :
1 gramme de nébulisat = 5 g de plante sèche = 5 g d'extrait fluide = 50 g de teinture mère = 1,2 g d'extrait mou.

2. ETUDES PHARMACOLOGIQUES, TOXICOLOGIQUES ET CLINIQUES DANS LA BIBLIOGRAPHIE

Il est tout à fait surprenant de constater que, malgré la progression des prescriptions médicales des formes pharmaceutiques d'E. californica, et les nombreux travaux réalisés sur la composition chimique, aucune publication scientifique internationale ne fasse référence à un travail pharmacologique pouvant affirmer ou infirmer les données de la tradition ; il existe cependant quelques travaux succints mentionnant l'activité d'E. californica T.M. sur le comportement habituel de la souris et sur sa toxicité aiguë et chronique vis à vis de la souris et du cobaye.

2.1. Etude d'E. californica T.M. sur le comportement habituel de la souris

Il se dégage, d'après l'éthogramme (Fig. 8) établi par TETAU (1971), que la souris femelle dort plus facilement que la souris mâle avec E. californica T.M.. En effet, alors que les souris témoins présentent une phase d'activité de 9h à 11h (toilette, prise de boisson et de nourriture) suivie d'une période de sommeil, puis une deuxième phase d'activité plus courte de 14h à 15h suivie d'une période de repos jusqu'à 18h (heure d'arrêt du test), les animaux traités présentent un temps d'endormissement raccourcit pour des phases de sommeil plus longues avec un effet maximal à la dose de 0,5 ml (voie IP). A cette dose (lot C) les souris femelles sont atteintes d'un sommeil profond durant toute la journée.

A la dose de 1 ml de TM, soit une dose très élevée et équivalente chez un homme de 50 kg à 2 litres de TM, on observe une phase d'excitation nette, plus importante chez la femelle que chez le mâle.
Les travaux ne précisent cependant pas le nombre de souris utilisées et ne présentent pas de résultats statistiques.

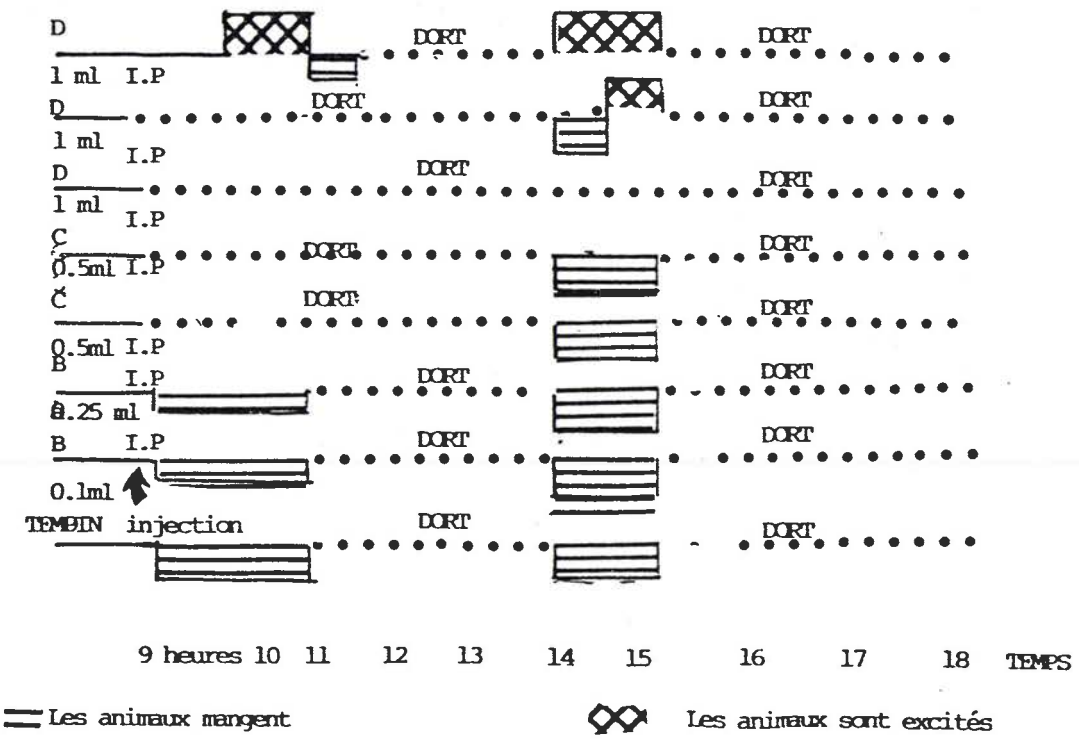


Fig. 8 : Ethogramme après injection IP d'E. californica T.M. à des souris selon TETAU et coll. (1971)

Si nous n'avons pas à notre disposition d'autres études antérieures sur la pharmacologie de la plante entière, il existe des travaux sur la pharmacologie de certains constituants et en particulier des alcaloïdes présents chez E. californica. Ces travaux ne portent pas sur les alcaloïdes spécifiques de la plante tels que ceux à noyaux pavine (Eschsholzine, Eschscholzidine) mais sur des alcaloïdes plus communément rencontrés chez les Papaveraceae (l'allocryptopine, la protopine, la chélidonine, la sanguinarine et la glaucine).

2.2. Propriétés pharmacologiques de quelques alcaloïdes d'E. californica

2.2.- 1 : Propriété pharmacologique de l'allocryptopine

L'allocryptopine existerait chez E. californica sous la forme α dans les parties aériennes et sous la forme β dans les racines. Seule la forme α est pharmacologiquement active.

L' α allocryptopine ralentit le coeur de rat et de grenouille et prolonge la systole. Elle ralentit les battements du coeur chez les rats et les lapins aux doses de 10 - 20 mg/kg (Kerharo et Adam, 1974).

A des concentration de 1/1 000 000 à 1/20 000 elle provoque, sur le coeur de grenouille perfusé, une diminution de l'amplitude et un ralentissement de la fréquence des battements. A des doses supérieures, apparaît l'arrêt cardiaque. Il s'agit là, d'une action directe sur le myocarde, non affectée par l'atropine, l'acétylcholine, ou la pilocarpine.

Les propriétés antifibrillantes de l' α allocryptopine ont été abondamment démontrées chez les animaux. D'après certains cliniciens, elle serait plus efficace que la quinidine dans les arythmies à fibrillation et flutter auriculaire (Alles, 1952).

2.2.- 2 : Propriété pharmacologique de la protopine.

La protopine provoque chez la grenouille une bradycardie qui n'est pas inverséepar l'atropine. La systole est légère et incomplète avec une diastole prolongée. Des contractions irrégulières apparaissent aux fortes doses avec fibrillation ventriculaire (KERHARO, 1974).

Chez le lapin curarisé, la protopine provoque une baisse de pression sanguine qui est à la limite de l'état de choc. On s'attend donc à une accélération des réflexes cardiaques, en fait la protopine induit une bradycardie (KERHARO, 1974). Chez le cobaye, on constate un prolongement de la période réfractaire, action moins intense que celle de l'allocryptopine, mais qui s'installe plus rapidement. Comme l'allocryptopine, la protopine sensibilise le coeur aux arythmies ventriculaires provoquées par l'épinéphrine et (comme la papavérine) augmente le flux de l'artère coronaire.

Après avoir isolé la protopine du totum alcaloïdique chez Argemone mexicana, BOSE et coll. (1963) ont trouvé qu'elle était douée d'activités stimulantes sur le coeur, la respiration, les muscles striés et lisses, la pression sanguine.

2.2.- 3 : Propriétés physiologiques de la chélidonine

Effet narcotique : C'est en 1892 que débuta l'étude de la chélidonine, où MEYER (1892) montre son effet narcotique. Cet effet n'est pas aussi prononcé que celui produit par les narcotiques morphiniques, cependant la dépression produite par la narcose n'est pas ici, suivie par une excitation du système nerveux central.

HANZLICK (1920) reprit les études de MEYER (1892) et confirma l'activité narcotique de la chélidonine. Il prolongea les investigations et trouva une légère diminution de l'activité respiratoire lors de l'administration d'une forte dose, alors qu'à faible dose la chélidonine est sans influence.

Action cardiaque et musculaire : Comme MEYER (1892), HANZLICK (1920) montra une baisse de l'activité du muscle cardiaque avec diminution du pouls et baisse de la pression sanguine. MEYER (1892) avança l'hypothèse d'une stimulation du nerf vague. Hypothèse qui semble peu probable puisque HANZLICK (1920) après section de ce nerf vague effectua les mêmes expériences et obtint des résultats identiques.

D'après ces mêmes auteurs la chélidonine déprime l'ensemble de la musculature lisse (bronches, utérus, intestin, vaisseaux sanguins) et antagonise l'action de la pilocarpine et de l'histamine d'où son utilisation éventuelle pour lutter contre les cholécystites, l'asthme et les bronchites. Tous ces effets sont à rapprocher de ceux de la papavérine.

SEEL et PEPLAU (1939), après leurs travaux sur la grenouille et le coeur isolé, nous apportent des renseignements sur la toxicité et les doses efficaces de la chélidonine : après injection en sous cutanée d'une dose de 0,25 mg d'alcaloïdes par kg de poids d'animal, ces auteurs ont obtenu, suite à une brève période d'excitation, une narcose. Après répétition à des doses différentes les auteurs ont constaté que la dose efficace était comprise entre 0,05 mg/kg et 0,125 mg/kg de poids d'animal.

- Au delà de 0,5 mg/kg l'animal meurt par arrêt cardiaque.

- A 0,02 mg/kg d'alcaloïdes, il se produit une augmentation de la force de contraction de 1/3 de sa valeur initiale et un ralentissement du pouls. Les contractions ventriculaires deviennent irrégulières. Après lavage au liquide de Ringer il y a retour à la normale.

- De 0,05 mg à 0,5 mg il se produit une arythmie avec bloc et arrêt cardiaque temporaire.

- Au delà de la dose de 0,5 mg/kg l'arrêt cardiaque devient irréversible.

A la suite de ces résultats HAMET (1933) entreprit l'étude de l'activité de la chélidonine comme antiadrénaline.

Ainsi, après avoir obtenue une hypertension à la suite de l'injection d'adrénaline par voie intraveineuse, chez un chien anesthésié, soumis à la respiration artificielle et privé du nerf vague, HAMET (1933) reprit la même expérience en injectant, en prévention, une dose de sulfate de chélidonine.

L'hypertension due à l'adrénaline s'est trouvée atténuée.

Activité antibiotique : ZBIERSKA J. (1979 et 1980) nous rapporte que la chélidonine et, particulièrement le méthyliodure et le nitrate oxyde ont des propriétés anticancéreuses non négligeables et surtout une activité antibiotique et antifongique vis à vis de plusieurs souches de bactéries et de champigons (tableau 9).

Ces propriétés sont à rapprocher de l'utilisation empirique dans le traitement des plaies et des ulcères.

Tableau 9 : SOUCHES DE BACTERIES ET DE CHAMPIGNONS SENSIBLES A L'ACTION ANTIBIOTIQUE DU METHYLIODURE ET DU NITRATE OXYDE CHELIDONINE

BACTERIES	CHAMPIGNONS
Staphyloccus aureus	Trichophyton mentagrophytes
Staphylococcus epidermidis	Trichophyton gypseum
Staphylococcus albus	Aspergillus fumigatus
Streptococcus faecalis	Scopularriopsis brevicaolis
Escherichia coli	Penicillium notatum
Enterobacter colacae	Cladosporium herbarum
Klebsiella pneumoniae	Candida albicans
Serratia marcescens	Candida parapsilosis
Proteus morganil	Torulopsis utilis
Pseudomonas aeruginosa	Cryptococcus neoformans

2.2.- 4 : Propriétés physiologiques de la sanguinarine

La sanguinarine semble posséder deux actions fondamentales. Selon DYKE (1979) et SEIFEN (1979), cet alcaloïde semble être d'une part responsable de nombreux cas de cécité causés par un glaucome chronique et d'autre part il aurait une activité sur le muscle cardiaque en induisant un effet inotrope positif.

Action au niveau oculaire : DYKE (1979) rapportant les travaux de HAKIM, nous révèle l'existence d'une relation entre la présence des végétaux à sanguinarine (comme Argemone mexicana) et l'apparition de glaucome endémique parmi la population où ces végétaux apparaissent. L'intoxication se produisant par ingestion des huiles de cuisine contaminées par l'huile d'Argemone mexicana.

Dans l'huile d'Argémone mexicana, la sanguinarine se présente sous deux formes chimiques voisines. D'une part la sanguinarine et d'autre part la dihydrosanguinarine qui y est contenu en proportion plus importante. De ces deux molécules, seule la sanguinarine est très toxique pour l'oeil, cependant la dihydrosanguinarine s'oxyde très facilement à l'air et se transforme en sanguinarine.

Lors de ce glaucome, la pression intra-oculaire fluctue au cours de la journée, ce qui exclut les facteurs mécaniques (tel que l'obstruction de canaux) comme reponsables de ce trouble. En fait, l'humeur aqueuse étant en partie sécrétée à partir du sang, DYKE (1979) avance l'idée que la pression interne de l'oeil est contrôlée par une hormone secrétée dans les centres hypotalamiques du cerveau. Selon HAKIM (in DYKE, 1979), par des travaux plus récents, cette hormone serait la prostaglandine F_2 dont le taux de libération serait contrôlé par des toxines telles que la sanguinarine.

Effet inotrope positif : Des études de SEIFEN, (1979) effectuées sur l'oreillette gauche du coeur de Cobaye montrent que la sanguinarine a un effet de renforcement important sur les contractions de l'oreillette. Le renforcement est cependant inférieur à celui induit par l'ouabaïne (glucoside cardiotonique, utilisé ici comme produit de référence). L'effet maximum de la sanguinarine est atteint à la dose de $6\ 10^{-5}$M.

Parallèlement à cet effet inotrope positif, la sanguinarine, comme les glucosides cardiotoniques, inhibe l'activité de l'enzyme ATPase Na^+, K^+ dépendante, enzyme responsable du transport actif du sodium de la cellule vers le milieu extra cellulaire. L'effet maximum étant atteint à la dose de 10^{-4} M.

On pourrait supposer que ces deux effets puissent avoir une relation causale, cependant il est connu que la quinidine, molécule qui a un effet inotrope négatif, inhibe également l'activité ATPase.

2.2.- 5 : Action physiologique de la glaucine

La glaucine, à la fois légèrement narcotique et convulcivante, déprime le coeur et exerce une action nocive sur les muscles striés (GARNIER, 1961).

2.3. Etude toxicologique d'E. californica T.M. (TETAU et coll., 1972)

2.3.- 1 : Toxicité aiguë

Chez le cobaye :

Après évaporation de l'alcool à basse température, le résidu est repris par de l'eau distillée et injectée par voie intra-péritonéale. Aucune toxicité aiguë n'est apparue, même chez les animaux ayant reçu une forte dose de 20 ml de T.M./kg de poids corporel. De la même façon aucune toxicité aiguë n'a pu être mise en évidence par voie orale.

Chez la souris :

Comme précédemment la T.M., débarassée de son alcool par évaporation à basse température, est administrée par voie I.P. à dose croissante à 6 lots de souris (tableau 10).

Tableau 10 : TOXICITE AIGUE D'UNE T.M. D'E. CALIFORNICA CHEZ LA SOURIS PAR VOIE IP SELON TETAU ET COLL. (1972)

N	T.M.(ml) souris	Mortalité
10	0,001	0
10	0,05	0
10	0,1	0
10	0,25	0
10	0,50	0
10	1	0

N = nombre d'animaux

Aucune toxicité n'a pu être mise en évidence chez la souris en traitement aiguë d'une seule injection I.P.

2.3.- 2 : Toxicité chronique

Chez le cobaye, par voie orale.

Les animaux sont divisés en deux lots recevant respectivement 1 ml de T.M. par animal et par jour
0,1 ml de T.M. par animal et par jour.

Les animaux sont traités pendant un mois, en alternant une semaine de traitement et une semaine de repos.

Si aucune mortalité n'a été observée, un léger amaigrissement est observé après chacun des traitements.

Chez la souris, par voie I.P.

Les auteurs ont déterminé une dose léthale chronique après deux injections à 8 jours d'intervalle, et en surveillant les animaux trois semaines. Les résultats sont regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11 : TOXICITE CHRONIQUE D'UNE T.M. D'E. CALIFORNICA CHEZ LA SOURIS PAR VOIE I.P. SELON TETAU ET COLL. (1972)

Lot	Dose ml souris	Nombre d'injections	Mortalité 5e jour %	8e jour %	12e jour %	21e jour %
F	0,00	2	0	0	0	0
E	0,05	2	0	50	50	50
A	0,1	2	17	65	100	100
B	0,25	2	25	37	100	100
C	0,5	2	0	0	33	100
D	1	2	25	75	100	100

2.4. Etude clinique d'Eschscholzia californica

Malgré l'absence de dossier pharmacologique chez l'animal concernant cette plante, plusieurs équipes de médecins ont rapporté des observations obtenues après traitements de plusieurs patients choisis pour leur symptomatologie par E. californica, soit sous la forme de teinture mère à la dose croissante de 50 à 300 gouttes par jour, soit sous la forme de nébulisat à la dose de 3 à 6 gélules dosées à 0,05g par jour.

L'ensemble de ces observations sont rapportées en annexe 3, 4, 5 et 6 et les conclusions que l'on peut donner sont les suivantes:

Si l'ensemble des observations relatées en annexe 3, 4, 5, 6 révèle plusieurs échecs dans le traitement de l'insomnie par E. californica, il faut remarquer que le pourcentage de réussite est largement positif et, compte tenu de l'inocuité du produit, les médecins semblent encourager l'utilisation d'une telle drogue.

Selon ces résultats, il n'est pas possible de déduire que l'une des deux formes galéniques est meilleure que l'autre.

En ce qui concerne les échecs relevés dans les différentes observations il faut noter (surtout pour les expériences de Van STEENBRUGGHE, 1981) le caractère particulier des patients choisis et l'absence d'étude de terrain.

Il faut noter également que quelques rares effets paradoxaux ont été relevés (insomnie totale ou partielle avec hyperactivité psychomotrice et absence de fatigue). Ces effets ne doivent pas être ignorés, toutefois ils sont rapidement réversibles et ils présentent une absence totale d'effets secondaires ultérieurs.

S E C T I O N B

ETUDE PHARMACOLOGIQUE :

TRAVAUX PERSONNELS

L'utilisation par la médecine traditionnelle des parties aériennes de l'espèce Eschscholzia californica Chamisso pour leurs actions sédatives et anxiolytiques a été décrite au chapitre III A.1.

Eu Europe, les prescriptions thérapeutiques de cette plante en tant que psychotrope tiennent une place de plus en plus importante parmi les traitements phytothérapiques et différentes spécialités retiennent l'attention des prescripteurs, parmi lesquelles la teinture-mère est la prescription la plus fréquemment rencontrée.

L'étude bibliographique préalable a montré que cette utilisation thérapeutique n'est justifiée que par des résultats (annexe 1) obtenus à partir d'essais classiques et de protocoles expériemntaux mal définis. Par ailleurs, les études chimiques réalisées antérieurement ont été essentiellement consacrées à la classe chimique des alcaloïdes, car ceux-ci pourraient ou devraient être le support de l'activité pharmacologique. En effet, de nombreux alcaloïdes de la famille Papaveraceae sont de puissants sédatifs de premier ordre (Kerharoet Adam, 1974 ; Paris, 1965 ; Schmitt, 1976).

Les alcaloïdes d'E. californica ont ainsi été identifiés mais leur implication dans l'activité pharmacologique n'a jamais été démontrée. Ce problème constituera un des sujets de notre travail.

Notre démarche pharmacologique a été réalisée en cinq étapes.

- **La première étape** a été entièrement consacrée d'une part, à la confirmation ou à l'infirmation de la tradition par la détermination, au moyen de plusieurs tests pharmacologiques, du comportement animal, de l'activité psychotrope d'un extrait total d'E. californica et, d'autre part, à la détermination du profil pharmacologique de l'extrait. L'ensemble de ces expériences nous permet de définir le spectre pharmacologique du totum. Aussi, pour cette recherche, avons-nous utilisé un nébulisat d'E. californica du commerce qui est administré à l'animal, dans un premier temps, par voie intra-péritonéale.

- **Dans une deuxième étape**, notre objectif s'est orienté vers la recherche du mécanisme d'action. Pour ce faire, nous avons entrepris, d'une part une technique *in vivo* et, d'autre part une technique *in vitro*. Dans la première expérimentation, notre but est de vérifier si les effets du totum d'*E. californica* sont inhibés par un antagoniste hautement spécifique des récepteurs aux benzodiazépines. Dans la deuxième expérimentation, nous avons tenté d'adapter aux extraits végétaux une technique *in vitro* de binding appliquée aux molécules. Ce genre de technique est en plein essor actuellement pour les molécules de synthèse et a pour but la mise en évidence d'une éventuelle affinité d'un extrait d'*E. californica* pour les sites récepteurs aux benzodiazépines.

- **Dans une troisième étape,** nous tentons de confirmer l'activité pharmacologique d'*E. californica*, en administrant les substances *per os* et par voie rectale.

- **Dans une quatrième étape,** nous avons recherché à mettre au point un extrait d'*E. californica*, dont la fabrication peut facilement être mise en oeuvre dans l'industrie pharmaceutique et qui a conservé les propriétés pharmacologiques du totum. Pour cela, plusieurs extraits ont été réalisés et contrôlés pharmacologiquement. Ainsi cette démarche nous a permis de sélectionner un extrait pour lequel un screening pharmacologique a confirmé les propriétés du nébulisat.

- **Enfin, dans la cinquième étape,** nous avons réalisé plusieurs fractionnements nous permettant de situer l'activité dans l'environnement chimique complexe de l'extrait de la plante.

C H A P I T R E I

RECHERCHE DES PROPRIETES PSYCHOTROPES D ' *ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA*

Depuis la synthèse, en 1950, par Charpentier du premier neuroleptique -la chlorpromazine (Largactil, Ciba-Geigy)- son utilisation en anesthésiologie par Laborit, qui le considère comme un "stabilisateur végétatif" potentialisant les effets des anesthésiques, et le premier travail en 1952 concernant son emploi en thérapeutique psychiatrique (Delay et coll., 1952), un nombre impressionnant de molécules psychotropes ont vu le jour. En dépit des difficultés qui existent dans la classification de certaines d'entre elles, il est devenu courant, depuis Delay, de distinguer trois grandes catégories de psychotropes :

- **Les psycholeptiques** (hypnotiques, neuroleptiques, tranquillisants),

- **Les psycho-analeptiques** (stimulants de la vigilance, antidépresseurs),

- **Les psychodysleptiques** (hallucinogènes).

Beaucoup de ces substances ont été étudiées de façon approfondie au niveau de leurs effets sur le comportement animal. La plupart des psycholeptiques entraînent chez l'animal de la sédation au-delà d'une certaine dose, variable selon la molécule. Parmi les molécules de synthèse les plus récentes présentant des propriétés tranquillisantes figurent les benzodiazépines.

L'intérêt de celles-ci est multiple : elles ont des effets anxiolytiques et relaxantes très puissants chez l'homme ; elles rétablissent le comportement de l'animal inhibé par des situations aversives, stressantes ou conflictuelles et, depuis 1977, on sait qu'elles se fixent sur des récepteurs spécifiques du système nerveux central au niveau d'un complexe neuronal impliquant les récepteurs du GABA couplés à l'ionophore chlore (Braestrupp, 1977 ; Costa et Guidotti, 1977).

Dans la mesure où la tradition mentionne fréquemment l'activité sédative d'Eschscholzia, nous avons décidé d'orienter nos études pharmacologiques dans cette direction, en utilisant d'abord plusieurs tests susceptibles de mettre en évidence d'éventuels effets dépressifs sur l'activité locomotrice de la souris : actographe, activimètre, test d'exploration libre. Puis, comme ces diverses procédures nous ont permis d'observer de nettes propriétés sédatives, nous

B.U. METZ

nous sommes demandés si la plante, à des doses plus faibles, pouvait présenter, à l'instar des benzodiazépines, une action désinhibitrice -encore appelée anticonflit ou anxiolytique par analogie avec l'homme- sur le comportement de la souris. A cette fin, nous avons soumis les animaux à des situations aversives et conflictuelles propres à révéler d'éventuels effets désinhibiteurs.

Les substances psychotropes présentent des interactions avec les barbituriques, entraînant soit une potentialisation, soit un antagonisme, soit aucune modification du sommeil expérimental.

Aussi, depuis les travaux de Boissier et coll. (1967) et Boismare et coll. (1967), on constate que pour une étude pharmacologique secondaire, l'interaction des substances psychotropes avec un ou deux barbituriques chez la souris fait partie des batteries d'épreuves destinées à la classification de ces substances. Par ailleurs on sait, depuis le développement des tranquillisants mineurs, que ces substances potentialisent le sommeil induit par les barbituriques. Nous avons recherché une interaction entre E. californica et deux barbituriques qui présentent un métabolisme différent, à savoir le pentobarbital et le barbital (Simon et coll., 1985) ; ce qui nous permettra de préciser le site d'action de la plante.

1. LES EXTRAITS ET LES ANIMAUX

1.1. CHOIX ET PREPARATION DES EXTRAITS UTILISES

1.1.1. Extrait d'E. californica

Pour la réalisation de cette étude, notre choix s'est porté sur un extrait nébulisé déjà utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour conditionner les gélules d'E. californica prescrites dans les troubles du sommeil.

Parmi les différentes techniques d'extraction et de stabilisation d'une plante à étudier, la lixiviation à l'éthanol est presque toujours sélectionnée. Cette technique permet la réalisation d'un extrait fluide total, renfermant le maximum de constituants. L'extrait ainsi obtenu doit alors être sujet à une conservation de longue durée et pour cela, il est nécessaire de le rendre plus stable et de le protéger contre une éventuelle altération ; pour cela le produit est transformé en une poudre pulvérulente fortement déshydratée (élimination du solvant interparticulaire et du solvant d'imbibation).

La lyophilisation est la technique d'élimination du solvant la plus rencontrée à l'échelle du laboratoire alors que la nébulisation est de plus en plus utilisée à l'échelle industrielle. Le mode opératoire de l'obtention du nébulisat est le suivant (Fig. 9) : les différentes parties aériennes de la plante sont broyées et réduites en poudre fine. après séchage de la poudre, il est procédé à une lixiviation par de l'éthanol à 70 % au moyen d'un extracteur en continu.

L'extrait est filtré, stérilisé et alors débarrassé du solvant et concentré par évaporation sous vide à 36° C jusqu'à l'obtention d'un extrait fluide, qui est pulvérisé de force (soit par la force centrifuge dans les atomiseurs à pulvérisation par turbine, soit par l'application d'une forte pression dans les atomiseurs à pulvérisation par buses) dans une tour où est administré de l'air chaud à 170° C. Le séchage des particules est quasi instantané ce qui permet d'éviter au maximum les phénomènes d'hydrolyse, d'oxydation ou de décomposition. Il est alors obtenu un extrait sec pulvérulent, très hydroscopique qui est ensuite titré en plante sèche. Le nébulisat que nous utilisons titre 5 g de plante sèche pour 1 g de poudre nébulisée.

Pour les tests pharmacologiques, la préparation des échantillons d'E. californica se fait par dissolution des quantités adéquates de nébulisat dans une solution de NaCl 0,9 % .

Les doses d'E. californica administrées aux animaux sont toujours exprimées en plante sèche et non en nébulisat.

1.1.2. Extrait de Poa species (Poaceae)

Nous utilisons un lyophilisat d'un extrait hydro-alcoolique obtenu de la façon suivante :

Les différentes parties aériennes de la plante sont séchées à température ambiante, puis broyées et réduites en poudre fine. On procède à une lixiviation par de l'éthanol à 60 % au moyen d'un extracteur en continu (Soxhlet). L'extrait hydro-alcoolique obtenu est filtré. On obtient un résidu solide (RE 5) et une phase hydro-alcoolique limpide qui est débarrassée de l'alcool par évaporation sous vide à 36° C. La phase aqueuse restante est alors lyophilisée (Lyophilisateur, Heto, CD 52-1).

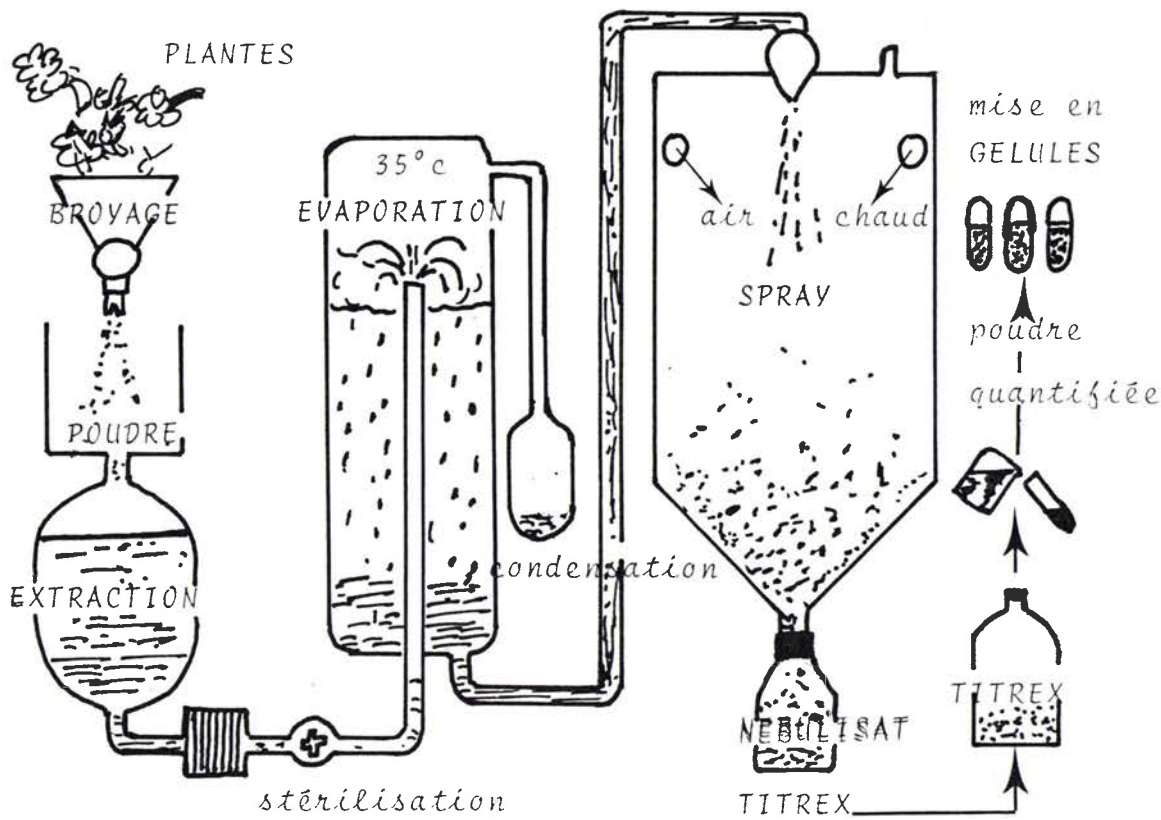


Fig. 9 - SCHEMA D'OBTENTION D'UN NEBULISAT TITRE DE PLANTES

Caractéristiques de l'extrait : fiche technique signalétique du fabricant :

- **Partie utilisée** : Plante entière

- **Extraction** : Hydro-alcoolique, puis la fraction hydro-alcool soluble obtenue est concentrée sous vide à basse température, puis nébulisée afin d'obtenir une poudre pulvérulente

- **Caractéristiques organoleptiques de l'extrait :**

  C'est une poudre fine de couleur beige foncée

- **Solubilité** :
  . Solubilité complète dans l'eau,
  . Solubilité partielle dans l'alcool à 60°,
  . Solubilité partielle dans l'alcool à 60°

- **Réaction et identification** : Chromatographie sur couche mince

  . Positif au réactif des flavonosides,
  . Positif au réactif des alcaloïdes,
  . Positif en UV à 360 nm

- **Dosage** : Les alcaloïdes

- **Essais** : Acidité, alcalinité (pH) de 4 à 6 ;
  Résidus d'énumération : 20 à 30 %

- **Recherche d'agents de contamination :**

  Recherche des métaux lourds : teneur inférieure à la limite

- **Recherche de l'arsenic :**

  Réaction négative

- **Conservation, précautions d'emploi :**

  Conserver la poudre à l'abri de l'humidité,
  Fermer soigneusement le flacon après utilisation,
  Ne pas ôter la capsule deshydratante,
  Eviter la proximité de l'eau lors de la mise en gélules

- **Durée de conservation :**

  Celle-ci est de 3 ans (emballage d'origine, à l'abri de la lumière et de l'humidité).

1.2. LES ANIMAUX : CONDITIONS GENERALES D'ELEVAGE ET D'EXPERIMENTATION

1.2.1. Les espèces utilisées

. Les souris :

Les animaux utilisés sont des souris mâles hétérozygotes de la lignée Swiss provenant, soit de l'élevage du laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg (L), soit du laboratoire Césal (C) (Montmédy, France), soit du laboratoire Janvier (Le Genest, France) (J), d'un âge moyen au moment des tests pharmacologiques de 8 à 9 semaines.

. Les rats :

Il s'agit, soit de rats mâles de la lignée OFA (Iffa Credo, L'Arbresle, Rhône), d'un poids moyen compris entre 300 et 350 g au moment du test, soit de rats femelles de la lignée Wistar (Iffa Credo, L'Arbresle, Rhône), d'un poids moyen compris entre 250 et 300 g au moment du test.

. Les cobayes :

Il s'agit de cobayes mâles (Iffa Credo, L'Arbresle, Rhône) d'un poids moyen compris entre 250 et 300 g au moment du test.

1.2.2. Conditions d'élevage

. Les souris :

Les souris du laboratoire de Psychophysiologie de Strasbourg (L) sont sevrées à l'âge de 4 semaines et sont alors groupées par sexes dans des cages standards en macrolon (5 par cage), avec nourriture et boisson à volonté. L'animalerie, éclairée en lumière artificielle de 8 h à 20 h, est maintenue à une température constante (21° C $\pm$ 1° C).

Les souris du laboratoire Césal (Montmédy, Meuse) et du laboratoire Janvier (L'Arbresle, Rhône) sont réparties, dès leur arrivée, au hasard par groupe de 5 dans des cages standards en macrolon. Elles reçoivent de l'eau et de la nourriture à volonté et sont placées dans l'animalerie cyclée et maintenue à une température constante de 21° C $\pm$ 1° C.

Quinze jours avant le test, les animaux sont alors placés dans la pièce expérimentale dont le cycle jour/nuit est décalé de 5 heures par rapport au cycle habituel, la lumière s'allumant à 1 heure du matin pour s'éteindre à 13 heures. Comme les tests sont effectués entre 14 h et 17 h, nous observons et enregistrons le comportement des animaux pendant la période nocturne, car cette période correspond au début de la phase active de leur cycle nyctéméral et cela en lumière rouge.

. **Les rats** :

Quinze jours avant le test, les rats sont répartis dès leur arrivée, au hasard par groupes de 10, dans de grandes cages en macrolon. Ils sont abreuvés et nourris, ad libitum et sont maintenus dans une animalerie cyclée (12 h/12 h) : la lumière s'allumant à 18 h pour s'éteindre à 6 h.

. **Les cobayes** :

Quinze jours avant le test, les animaux sont groupés au hasard par groupe de 5 dans des cages standards en macrolon et reçoivent de l'eau et de la nourriture à volonté. Ils sont placés dans une animalerie cyclée (12 h/12 h) : la lumière s'allumant à 9 h pour s'éteindre à 21 h.

1.2.3. La nourriture

. **Les souris et les rats**

Les animaux sont abreuvés par de l'eau au moyen de biberons et sont nourris par des croquettes fournies, soit par UAR (soit par Extra-Labo (Provins). (Croquettes complètes et vitaminées M25, Tableau 12).

. **Les cobayes**

Les animaux reçoivent de l'eau additionnée de vitamine C et sont nourris par des croquettes vitaminées M25 (Extra-Labo, Provins) (Tableau 12).

TABLEAU 12 - COMPOSITION CHIMIQUE DES CROQUETTES M25 POUR RATS ET SOURIS DES LABORATOIRES EXTRA-LABO (PROVINS)

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

2. TOXICITE AIGUE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA PAR VOIE IP CHEZ LA SOURIS SWISS ET EVALUATION DE LA DOSE LETHALE 50

2.1. PROTOCOLE OPERATOIRE ET RESULTATS

La toxicité aiguë a été étudiée chez la souris mâle (Césal, Montmédy) après administration du nébulisat par voie IP.

Les mortalités sont relevées à 1 h, 24 h et 48 h, puis 8 jours après administration des extraits. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 13. Toutes les mortalités sont intervenues dans les cinq minutes suivant l'administration du produit à la suite de violentes contractions des flancs puis d'importantes convulsions avec difficultés respiratoires.

Le nébulisat d'E. californica présente une faible toxicité par voie IP. La DL50 est comprise entre 11 et 12 g/KG. Toutefois, il n'est pas possible d'évaluer précisément par le calcul, la valeur de la DL50 car la relation dose/effet est très hétérogène autour de la valeur 50 %.

2.2. DISCUSSION

La DL50 aiguë du nébulisat obtenue chez la souris par voie IP est comprise entre 11 et 12 g/Kg. Or, le produit n'est pas une substance pure mais un mélange complexe de nombreuses molécules. La DL50 obtenue ici à une dose aussi élevée ne peut être considérée que comme indicative. En effet, cette D150 correspond pour un homme de 60 Kg à l'administration d'une quantité de 132 g de nébulisat, ce qui est bien supérieure à la prescription médicale voisine de 50 à 100 mg de nébulisat par prise. Cela montre d'une part, qu'aux doses couramment prescrites, la toxicité aiguë du nébulisat d'E. californica peut être considérée comme nulle et, d'autre part, que dans l'étude de la toxicité aiguë d'un extrait total, il n'est pas nécessaire de dépasser des doses de l'ordre de 5 g/Kg (exprimée en plante sèche). Ces résultats sont en accord avec la littérature, puisque Tétau (1971) n'a mis aucune toxicité aiguë avec une teinture mère d'E. californica en évidence après élimination de l'alcool, jusqu'à la dose de 1 ml de teinture mère par souris ; ce qui représente dans ce cas 200 g d'extrait par prise pour un homme de 60 Kg. Les études du même auteur sur des cobayes ont donné les mêmes conclusions.

TABLEAU 13 - TOXICITE AIGUE UNE HEURE APRES ADMINISTRATION DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA CHEZ LA SOURIS PAR VOIE I.P. ET EVALUATION DE LA DL50

NEBULISAT g/Kg	SOURIS NOMBRE	MORTALITE %	EVALUATION DE LA DL50 mg/Kg
0,5	10	0	
1	10	0	
2	20	0	
5	10	0	
10	20	0	
11	10	0	
12	10	60	$11 < DL50 < 12$
13	10	70	
14	10	80	
15	10	80	
20	10	80	
22	10	100	

L'étude bibliographique révèle chez la souris Swiss mâle (Tétau, 1971) que la DL50 chronique, obtenue après deux injections par jour, et cela pendant un mois, d'une solution de teinture mère privée d'alcool, est de 0,05 ml par souris, soit 2 ml par Kg de poids corporel ; ce qui représente pour un homme de 60 Kg une injection IP de 120 ml de teinture mère. Il est clair qu'aux doses thérapeutiques de teinture mère (50 à 150 gouttes par jour) la toxicité chronique est également faible. Cependant, il faut admettre que les modes d'administration utilisés ne sont pas identiques, puisque l'auteur emploie une fois la voie orale pour une espèce de rongeurs, et une autre fois la voie IP pour une autre espèce de rongeurs. Or à notre connaissance, aucun travail pharmacologique n'a démontré l'activité d'E. californica, ni per os, ni par voie IP ; il n'est donc pas évident que le produit soit aussi efficace dans les deux voies d'administration chez l'animal. Ainsi nous ne retiendrons ces résultats de la DL50 chronique qu'à titre indicatif.

3. PROPRIETES SEDATIVES ET ANXIOLYTIQUES D'E. CALIFORNICA

3.1. PROPRIETES SEDATIVES

3.1.1. L'activité locomotrice

Pour apprécier les éventuels effets sédatifs d'une substance au niveau du système nerveux central, il est courant d'utiliser des tests qui permettent de quantifier les déplacements des animaux, soit dans leur cage d'élevage, soit en les introduisant dans des enceintes spécialement conçues pour l'enregistrement des mouvements locomoteurs, ceux-ci étant sensés refléter le degré d'éveil cérébral "historique". Divers tests ont ainsi été utilisés pour tenter d'évaluer au mieux les propriétés sédatives des tranquillisants : Activimètre, test d'exploration, actographe.

Certains de ces tests sont contraignants (Activi-test), dans la mesure où l'on introduit de force un animal dans l'appareil expérimental ; d'autres sont conçus pour permettre d'enregistrer la locomotion des animaux dans une enceinte qui leur est familière (test d'exploration). En effet, dans cet appareil expérimental on crée une continuité topographique entre le compartiment familier et le nouveau.

Placés dans l'actographe, les animaux sont en situation contraignante au début du test, puis dans la mesure où le test est réalisé sur une période de 24 h, l'enceinte devient familière pour les souris qui se trouvent alors en situation non contraignante dans la deuxième partie du test.

Au moyen de l'Activitest et du test d'exploration, nous pouvons quantifier l'effet sédatif de l'extrait de plante et avec l'actographe, évaluer sa cinétique.

3.1.2. Matériel et méthode

3.1.2.1. L'Activitest

. Les animaux

Il s'agit de souris fournies par le laboratoire Césal (Montmédy).

. Description

Cet appareil, conçu et réalisé dans notre laboratoire, permet de quantifier avec une bonne sensibilité et une grande précision l'ensemble de l'activité "physique" d'une souris placée dans une enceinte spéciale (Figure 10).

L'enceinte est constituée d'une cage standard en matière plastique (24 cm x 11 cm x 10 cm) qui repose sur deux cables d'acier multibrin reliés à 4 cellules piezzo. Toute composante de force créée par chaque mouvement de la souris -qu'elle soit verticale, latérale ou transversale- provoque une flexion des cellules céraniques, engendrant un signal électrique amplifié et retransmis à un compteur mécanique. Des diodes reliées aux cellules piezzo et un micro ampéremètre permettent de contrôler le bon fonctionnement de l'appareil. L'activitest présente une grande sensibilité, chaque mouvement peut être détecté, même la respiration lorsque l'animal est immobile.

. Protocole expérimental

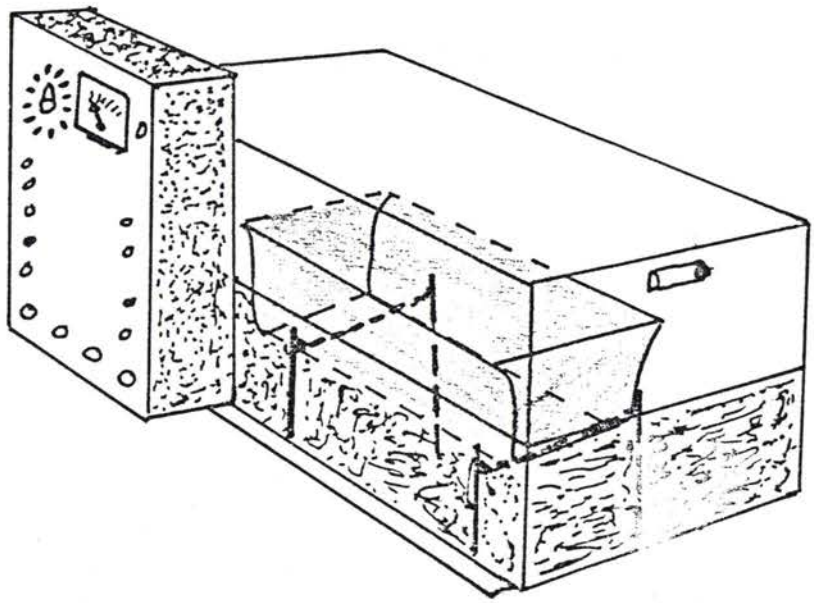
Une demi-heure avant l'expérimentation, les souris reçoivent une injection IP de l'extrait d'E. californica aux doses de 10, 50, 100, 200, 400, 800 et 1600 mg/Kg. Un lot témoin reçoit une solution de NaCl 9 % dans les mêmes conditions.

Au moment du test, l'animal est déposé dans une cage nouvelle placée sur l'activitest et l'activité motrice est relevée chaque minute et cela pendant 5 minutes.

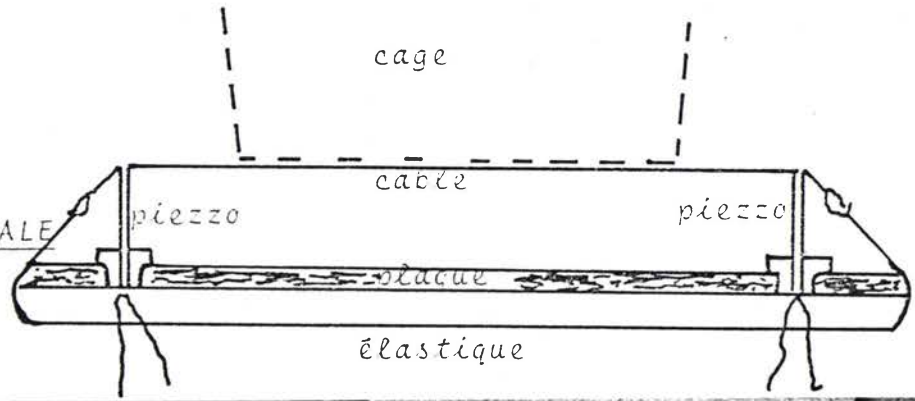
Les résultats sont analysés statistiquement à l'analyse de variance, suivie du test de comparaison multiple de Duncan.

La dose efficace 50 (DE 50) est évaluée par la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

A : VUE GENERALE



B : COUPE TRANSVERSALE



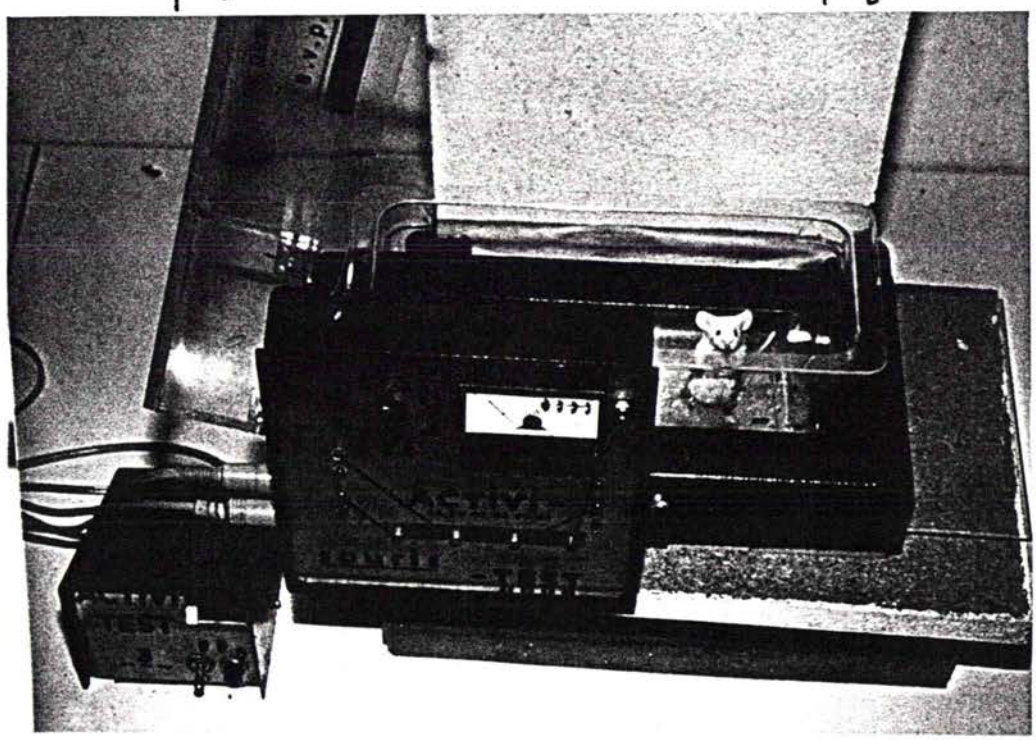


Fig. 10 - L'ACTIVITEST

3.1.2.2. Test d'exploration du milieu nouveau

. **Description de l'appareil**

Il est composé d'une cage en PVC (30 x 20 x 20 cm) subdivisée en 6 unités carrées de surface égale, communiquant entre elles par de petites ouvertures. Elle est recouverte de plexiglass et peut être temporairement partagée, dans le sens de la longueur, en deux compartiments égaux au moyen d'une cloison percée de trois ouvertures, chacune d'elles étant munie d'une porte guillotine (Figure 11).

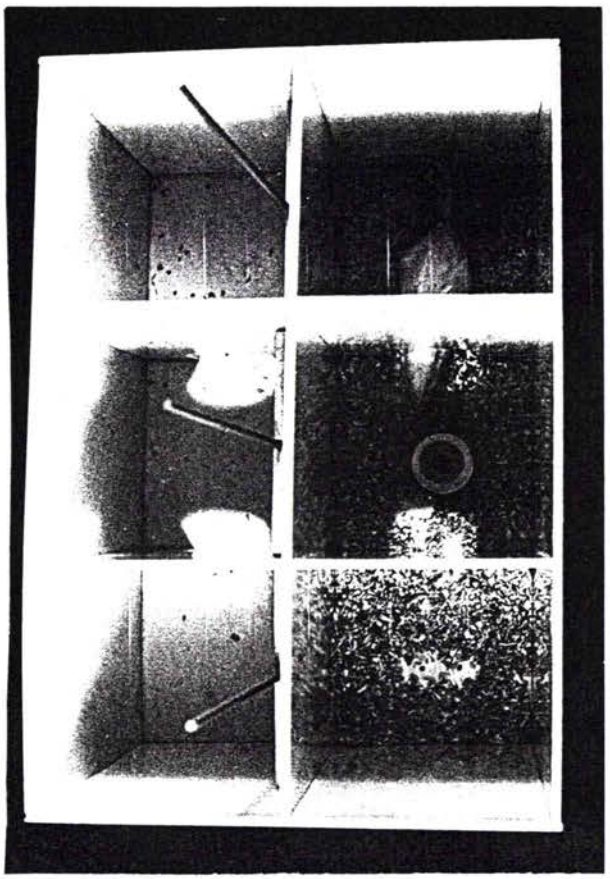
. **Protocole expérimental**

Les animaux (souris L) sont isolés 24 heures avant le test dans l'un des compartiments de l'appareil, que nous désignerons comme le compartiment familier (CF), l'autre restant provisoirement inaccessible. Le CF contient de la sciure, et l'animal reçoit de la boisson et de la nourriture à volonté.

Approximativement 24 h plus tard, chaque animal est exposé au compartiment nouveau (CN) par l'escamotage des portes guillotines. Son comportement est alors observé en lumière rouge durant 10 minutes. Au début de chaque période de 10 secondes, indiquée par un top sonore, on note de quel côté de l'appareil se trouve l'animal. Ce paramètre est appelé "préférence néotique".

Pour enregistrer le paramètre de la préférence néotique, la méthode d'échantillonnage temporel (time sampling) a été utilisée puisque Misslin (1983) a montré qu'il y avait une corrélation entre le temps passé par les animaux dans le compartiment nouveau et le nombre de fois où l'animal est vu, toutes les 10 secondes, dans ce compartiment (échantillonnage temporel).

Nous enregistrons également le nombre d'unités totales pénétrées par l'animal, sans distinction des unités franchies dans le compartiment familier et celles franchies dans le nouveau. Ce paramètre définissant l'activité locomotrice. Il faut préciser que l'on considère qu'une unité est franchies par l'animal lorsque les quatre pattes ont pénétré dans l'unité suivante.



A

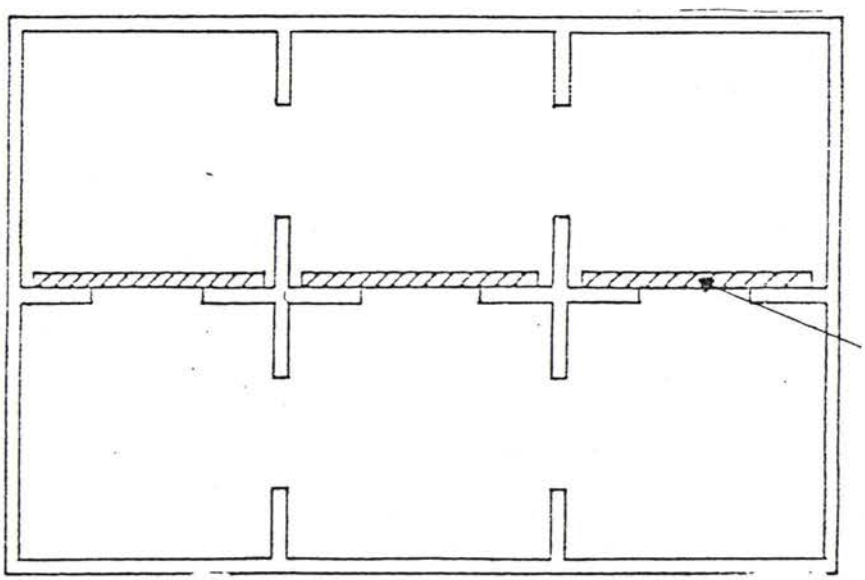


Fig. 11 - CAGE D'EXPLORATION

A : ASPECT GENERAL

B : PLAN DESSINE A L'ECHELLE

Nous avons constitué 8 groupes de 10 souris chacun. A chaque groupe correspond une dose d'E. californica. Les doses utilisées sont les suivantes : 0 - 12,5 - 25 - 50 - 75 - 100 - 150 - 300 mg/Kg. L'administration du produit se fait par voie IP 30 minutes avant le début du test, chaque sujet recevant 10 ml/Kg de solution. Les animaux témoins reçoivent une solution saline à 0,9 %.

Pour administrer le produit, l'animal est retiré du compartiment familier ; la substance est injectée par voie IP et le sujet est replacé immédiatement après l'injection dans le compartiment familier de l'appareil. Misslin (1983) a constaté que l'injection en tant que telle n'avait pas d'effet propre sur le comportement des animaux dans ce test.

Le test du signe nous permet d'apprécier statistiquement, minute par minute, la préférence des animaux pour l'un ou l'autre des compartiments.

Les différences de locomotion entre les groupes de souris traitées et celui des témoins sont globalement estimées à l'aide de l'analyse de variances. Dans le cas où l'on constate une différence globale significative, nous utilisons le test de comparaisons multiples de Duncan pour comparer les groupes deux à deux.

Pour l'enregistrement de l'activité locomotrice totale, les résultats des lots traités et des lots témoins sont comparés globalement au moyen du test de l'analyse "F" de variance, suivi du test de comparaisons multiples de Duncan.

3.1.2.3. Test de l'actographe

Ce test a comme intérêt principal de vérifier l'effet sédatif du nébulisat d'E. californica en enregistrant l'activité locomotrice des animaux, mais aussi d'évaluer la durée de l'effet sédatif. Le calcul de la DI 50 est effectuée par la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

. Description de l'appareil

Il s'agit d'enceintes en verre (100 x 23 x 20 cm) (Figure 12). A la base de la paroi principale sont disposées 9 cellules photo-électriques espacées de 12 cm. Chaque passage devant une cellule est enregistré sur un compteur comme une unité.

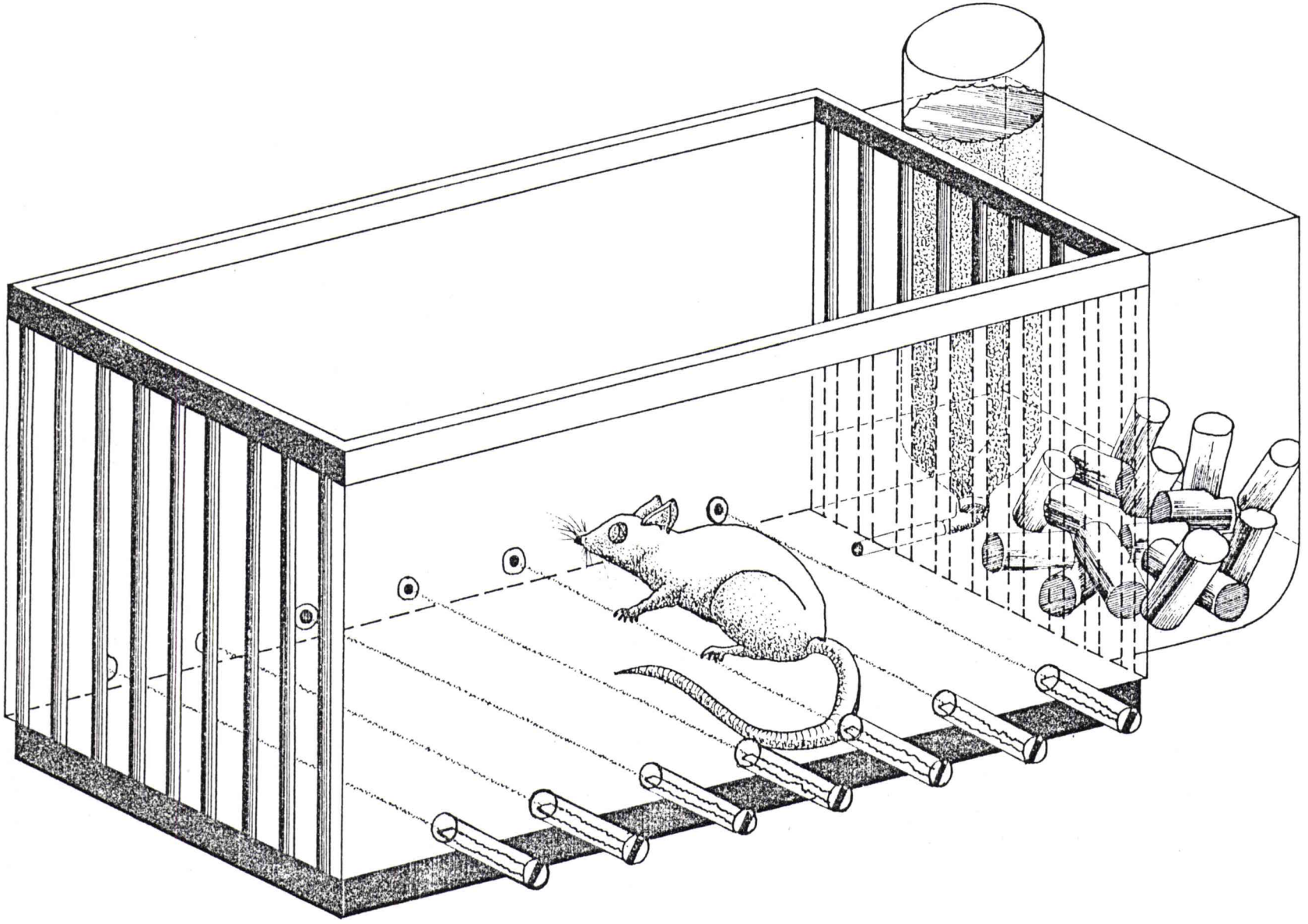


Fig. 12 - L'ACTOGRAPHE

. **Protocole expérimental**

Au moment du test, deux groupes de 10 souris (L) ont été constitués, les animaux traités reçoivent une solution de 400 mg/Kg d'*E. californica* par voie IP ; les animaux témoins une solution saline à 0,9 % . Chaque souris est placée individuellement dans un actographe. Au bout de 10 minutes, on enregistre l'activité effectuée des animaux durant cette période. Puis on leur administre la solution choisie, et on les replace dans les actographes. On enregistre durant les deux heures suivantes, de 10 minutes en 10 minutes, leur niveau d'activité, puis à partir de la troisième heure jusqu'à la treizième, leur activité est enregistrée d'heure en heure.

3.1.3. Résultats

3.1.3.1 Test de l'activitest

La figure 13 représente la courbe effets/doses de l'action d'*E. californica* sur la mobilité générale des animaux enregistrée durant 5 minutes dans l'activimètre à piezzos. On constate que la plante réduit de façon significative la mobilité des souris traitées et cela à partir de la dose de 100 mg/Kg. La DI 50 a été calculée égale à 276 mg/Kg (271 - 279). Le test de la linéarité de la relation effet/dose a été validé pour $P < 0.05$.

Lorsque l'on suit l'activité des souris telle qu'elle apparaît de minute en minute (Fig. 14), on observe que les animaux témoins ont une activité globale approximativement équivalente pendant chacune des minutes et cela pour les 5 minutes que dure le test. Il en est de même pour les animaux traités à la dose de 50 mg/Kg. En revanche, pour ceux traités aux doses de 100 et 200 mg/Kg, qui présentent une activité globale significativement diminuée ($P < 0.05$) sur la durée totale du test, les courbes s'infléchissent légérement à partir de la deuxième minute. L'écart et l'inflexion s'accentuent de manière importante et cela pour chacune des minutes avec les animaux traités aux doses de 400 et 800 mg/Kg.

On observe que la substance induit une réduction dose -dépendante de l'activité locomotrice des sujets.

Après le calcul de l'indice d'habituation (Tableau 14) défini ici comme ,étant la différence entre l'activité enregistrée pour chaque minute successive à compter de la deuxième minute, divisée par l'activité de la première minute et rapportée à 100, on constate que les animaux témoins ont une

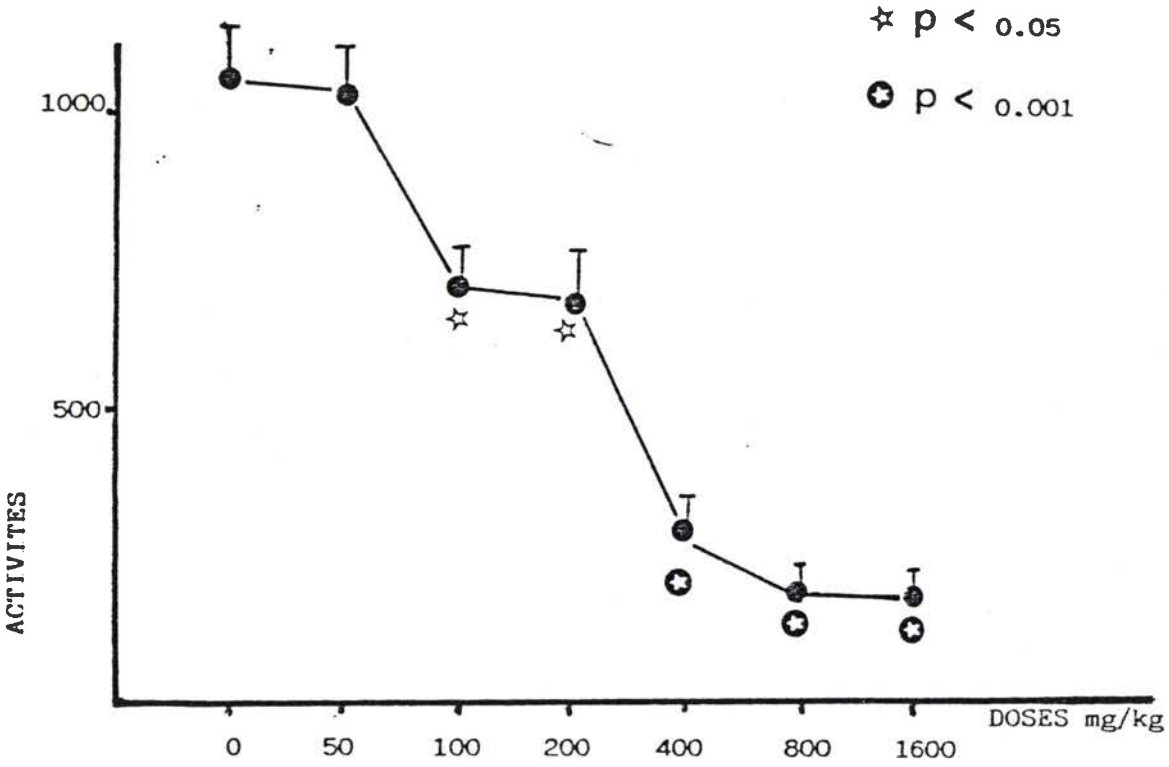


Fig. 13 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LA MOBILITE DES SOURIS (TEST DE L'ACTIVITEST). EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES, EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS-STANDARDS DES MOUVEMENTS ENREGISTRES.

N = 10 pour E. californica

N = 20 pour les témoins

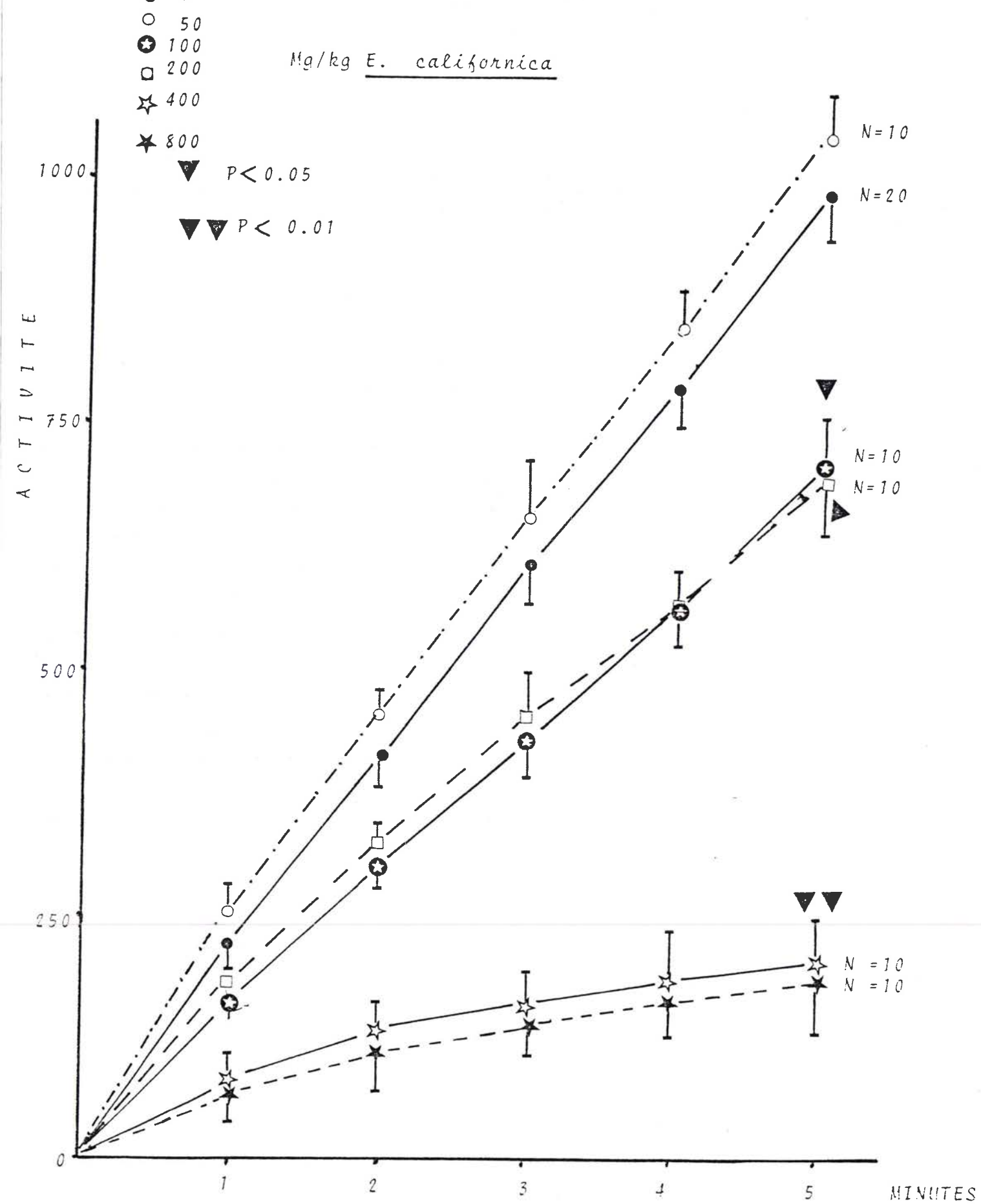


Fig. 14 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LA MOBILITE DES SOURIS ENREGISTREE DE MINUTE EN MINUTE DE MANIERE CUMULATIVE. EN ABSCISSE FIGURENT LES MINUTES, EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS-STANDARDS DES MOUVEMENTS ENREGISTRES.

TABLEAU 14 - EFFET D'E.CALIFORNICA SUR L'INDICE D'HABITUATION CALCULE DE MINUTE EN MINUTE CHEZ LA SOURIS SWISS INTRODUITE DANS L'ACTIVIMETRE

N	DOSES mg/Kg	HABITUATION 2e minute	HABITUATION 3e minute	HABITUATION 4e minute	HABITUATION 5e minute
20	0	87,4	87,5	83,14	89,4
10	50	83,1	80,6	83,13	80,03
10	100	81,5	76,5	76,4	88,5
10	200	80,2	68,1	66,8	64,6
10	400	63,3	52,5	31,1	28
10	800	61,6	48,7	25,1	38,71

activité constante au cours de chacune des minutes. Ceci est encore vrai pour les animaux traités aux doses de 50 et 100 mg/Kg. Par contre, pour les animaux traités aux doses de 200, 400 et 800 mg/Kg, l'activité globale diminue après la première minute. La comparaison entre l'indice d'habituation pour chacun des lots traités et celui des animaux témoins -et ceci pour chacune des minutes- montre qu'il diminue chez les animaux traités à la dose de 200 mg/Kg à partir de la troisième minute, tandis qu'il diminue à partir de la deuxième chez les animaux traités aux doses de 400 et 800 mg/Kg.

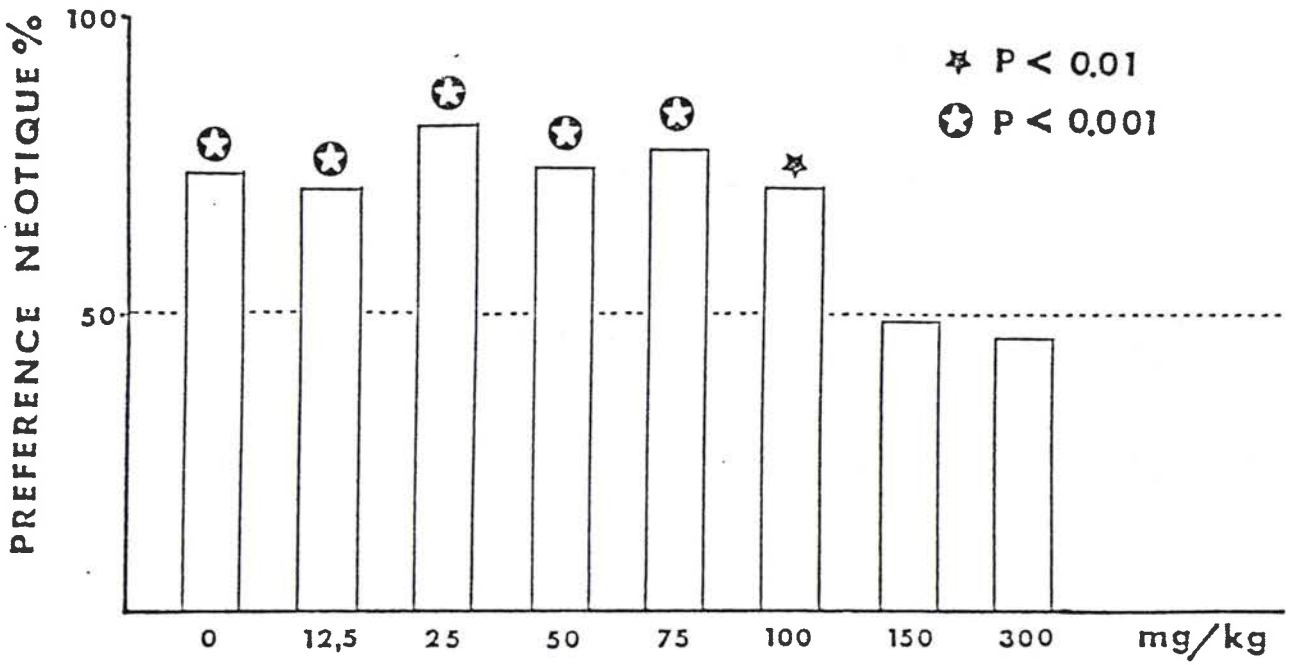
3.1.3.2 Test d'exploration d'un milieu nouveau

. La préférence néotique

La figure 15 représente, en pourcentage et en fonction des doses, la préférence marquée par les différents groupes de souris pour le milieu nouveau pendant la durée totale du test (10 minutes).

Cette figure montre que les souris ont tendance à marquer une préférence significative (test du signe) pour le milieu nouveau, sauf les animaux traités avec les doses élevées d'E. californica (150 et 300 mg/Kg), lesquels ne marquent plus de préférence pour aucun des deux milieux.

Lorsqu'on considère l'indice de préférence néotique des différents groupes tel qu'il apparaît de minute en minute (Fig. 16), on observe que les animaux témoins préfèrent le milieu nouveau de façon significative à partir de la troisième minute ; ceci est vrai aussi pour les animaux traités avec 12.5, 50, 75 et 100 mg/Kg. En revanche, les souris traitées avec 25 mg/Kg préfèrent le milieu nouveau dès la deuxième minute, tandis que les animaux traités avec 150 et 300 mg/Kg ne manifestent plus de préférence significative pour ce milieu à aucun moment du test.



ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA

Fig. 15 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LA PREFERENCE NEOTIQUE. EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES, EN ORDONNEE LES PERFORMANCES (%).

N = 10

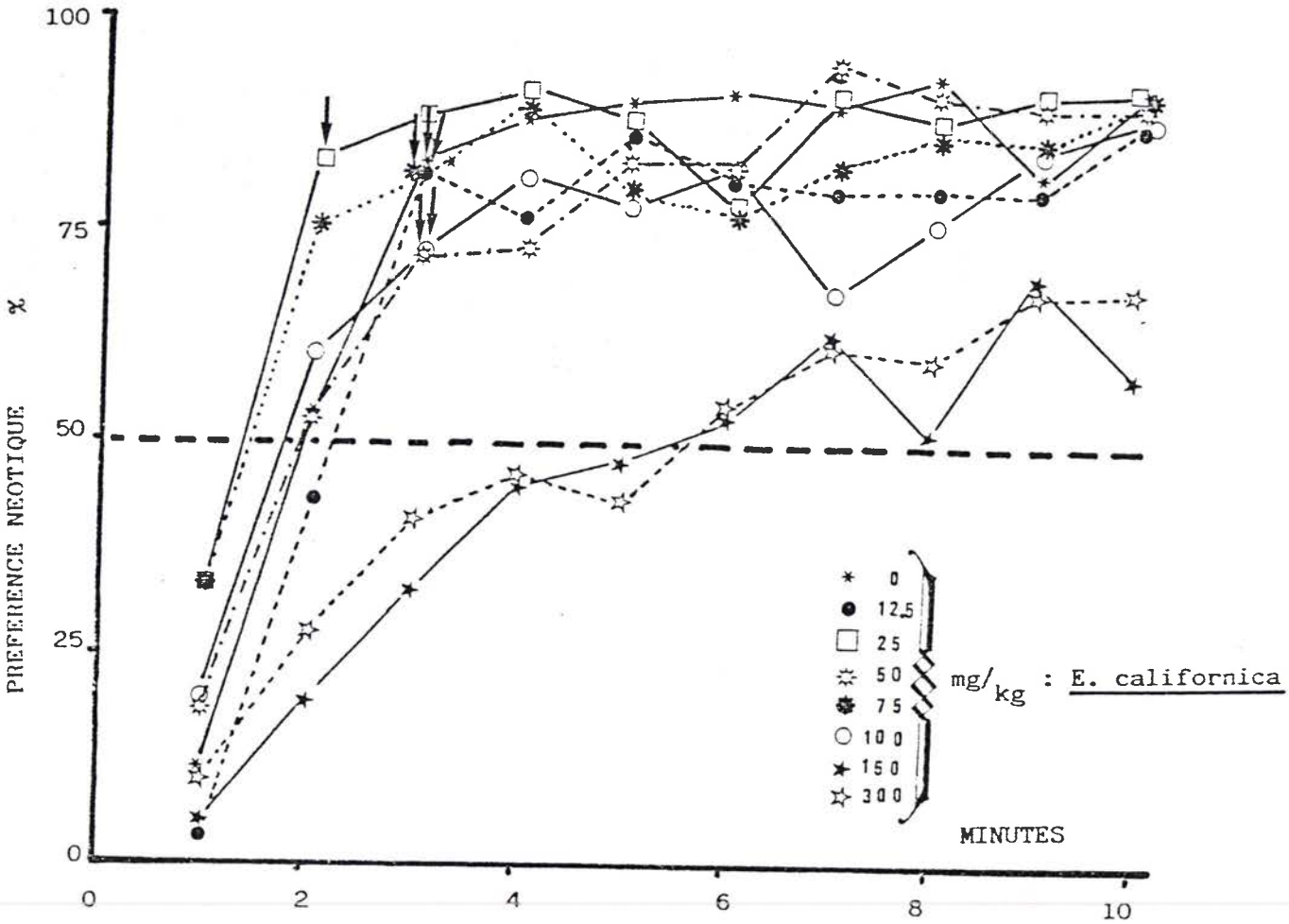


Fig. 16 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LA PREFERENCE NEOTIQUE ENREGISTRÉE DE MINUTE EN MINUTE. EN ABSCISSE FIGURENT LES MINUTES, EN ORDONNEE LES PERFORMANCES (%). LES FLECHES VERTICALES INDIQUENT LE MOMENT A PARTIR DUQUEL LES ANIMAUX PREFERENT LE MILIEU NOUVEAU DE FACON SIGNIFICATIVE (TEST DU SIGNE)

. **L'activité locomotrice**

Le nombre total d'unités franchies par les différents groupes expérimentaux, en dix minutes, est représenté sur la figure 17.

Lorsqu'on compare globalement entre elles les performances des différents groupes expérimentaux à l'aide d'une analyse de variance, on constate qu'elles diffèrent de façon significative ($P < 0.001$). Ceci autorise que l'on compare les performances des animaux traités à celles des témoins à l'aide du test de Duncan. Cette comparaison met en évidence qu'*E. californica* réduit de façon significative le niveau de l'activité locomotrice des souris à partir de la dose de 50 mg/Kg. La DI 50 a été calculée égale à 124,9 mg/Kg (122,9-126,9). Le test de la linéarité de la relation effet/dose a été validé pour $P < 0.05$.

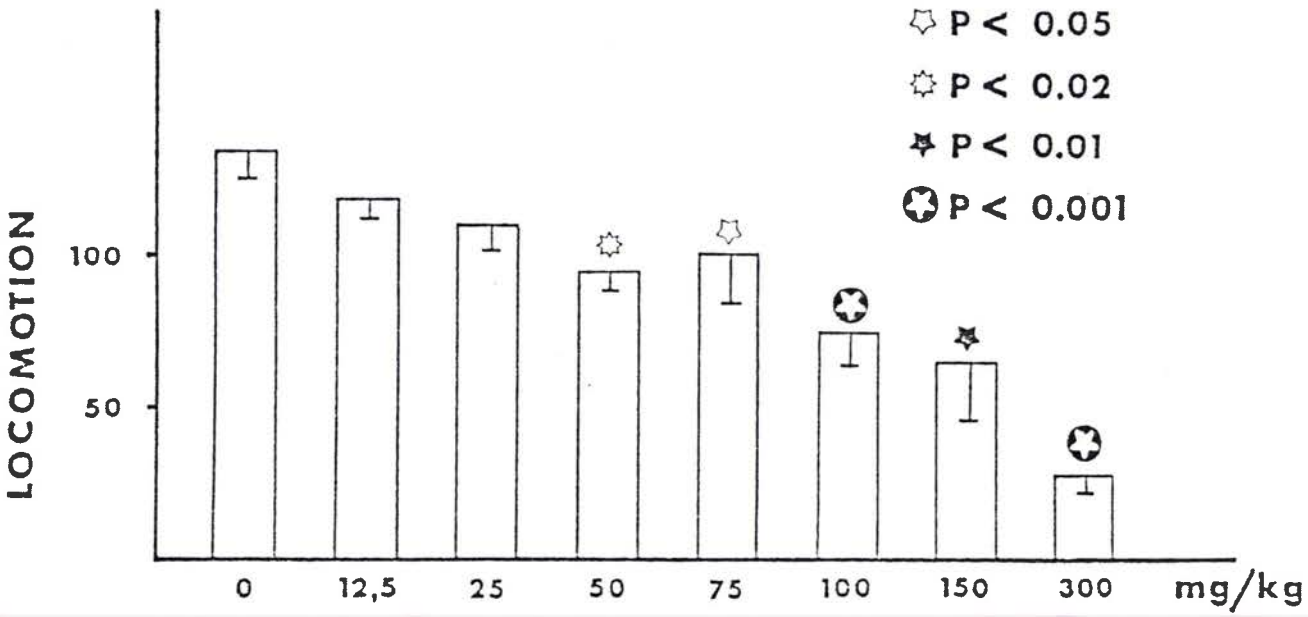


Fig. 17 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE. EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES D'E. CALIFORNICA. EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS-STANDARDS DU NOMBRE D'UNITES FRANCHIES (LOCOMOTION).

N = 10

3.1.3.3. Test de l'actographe

La figure 18 représente le décours temporel de l'activité locomotrice enregistrée durant 13 heures après injection chez un groupe de souris traitées avec 400 mg/Kg d'E. californica et chez les témoins.

On constate qu'E. californica réduit de façon significative l'activité locomotrice des souris traitées (test "t" de Student) à partir de la trentième minute suivant l'injection, jusqu'à la soixantième minute. Ensuite l'activité locomotrice entre les traitées et les témoins ne diffère plus de façon significative, sauf à la cinquième heure où les animaux traités présentent un niveau d'activité inférieur à celui des témoins et à la onzième heure où l'inverse se produit.

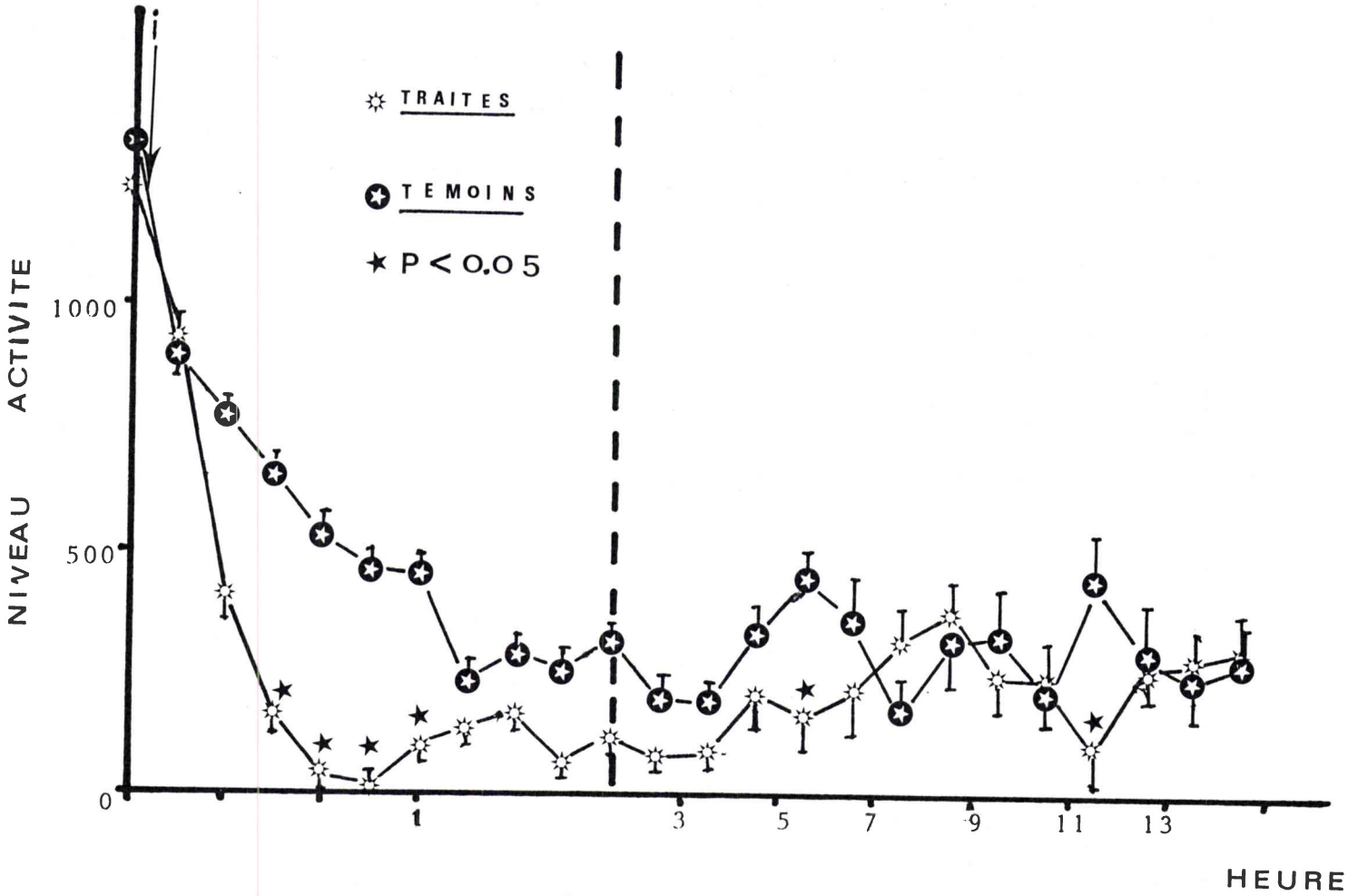


Fig. 18 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE ENREGISTREE DANS UN ACTOGRAPHE.
EN ABSCISSE FIGURENT LES PERIODES DURANT LESQUELLES L'ACTIVITE LOCOMOTRICE EST ENREGISTREE. CES PERIODES SONT DE 10 MINUTES LES DEUX PREMIERES HEURES, ET D'UNE HEURE LES HEURES SUIVANTES. EN ORDONNEE FIGURENT LES MOYENNES ET ERREURS-STANDARDS DU NOMBRE DE PASSAGES DES ANIMAUX DES DEUX GROUPES DEVANT LES CELLULES PHOTO-ELECTRIQUES. LA FLECHE INDIQUE LE MOMENT DE L'INJECTION.

N = 10

3.1.4. Discussion

Les résultats des trois expériences montrent l'existence chez E. californica de propriétés psychotropes de nature sédative. En effet, la plante sous la forme d'extrait hydro-alcoolique nébulisé, entraîne à des doses élevées -150 mg/Kg et plus- une réduction significative de l'ensemble des activités comportementales des animaux traités. Elle réduit leur niveau de locomotion, aussi bien dans le test non contraignant (test d'exploration du milieu nouveau) que dans les tests contraignants (test de l'actographe, test de l'activimètre). Cette action est tout à fait comparable à celle que l'on observe lorsqu'on administre à des souris des doses élevées de benzodiazépines (Misslin et coll., 1975 ; Misslin et coll., 1976 ; Misslin, 1982). Il s'agit probablement d'une action dépressive générale sur le système nerveux central que l'on peut interpréter comme une réduction du niveau d'activation du système nerveux central. Cette hypothèse est rendue plausible par le fait que lorsqu'on enregistre l'activité locomotrice des animaux placés de force par l'expérimentateur dans une enceinte inconnue, l'effet dépressif sur ce paramètre comportemental apparaît de façon significative avec les fortes doses : 100 mg/Kg et plus dans le test de l'activimètre. En revanche, lorsque l'animal est libre d'explorer ou non un milieu nouveau (test de l'exploration du milieu nouveau), on constate que l'action sédative d'E. californica sur la locomotion apparaît déjà avec la dose de 50 mg/Kg, ce dernier test étant moins contraignant, donc moins sollicitant pour les animaux.

Il faut savoir, en effet, que le fait d'introduire un petit rongeur comme la souris, de force, dans un milieu nouveau, représente une situation très stressante dans la mesure où cet animal est territorial et que cette procédure entraîne une rupture de la continuité topographique entre le milieu familier de l'animal et l'enceinte nouvelle. Ceci a pour effet d'activer significativement le système nerveux central des animaux, ce qui se traduit entre autre par une activation de l'axe hypothalamo-hypophysocorticosurrénalien (Misslin et coll., 1982). Ce n'est pas le cas lorsqu'on laisse l'animal libre d'explorer un milieu nouveau à partir de son enceinte familière (test de l'exploration du milieu nouveau).

On peut donc légitimement penser qu'une substance aux propriétés sédatives aura d'autant plus de chance de réduire le niveau de la locomotion des animaux que le niveau d'activation du système nerveux central sera bas.

Ainsi, chez des animaux très activés, les doses nécessaires pour amener un effet significatif de sédation seront d'autant plus élevées.

Cela justifie que la DI 50 d'E. californica, évaluée dans l'activimètre (test contraignant), égale à 275 mg/Kg (271 -279) , soit nettement supérieure à celle évaluée dans le test de la préférence néotique pour la locomotion (test non contraignant) égale à 125 mg/Kg (123-127).

La durée de la sédation consécutive à l'administration d'une dose de 400 mg/Kg est significative durant l'heure qui suit l'injection. Cet effet n'est pas hypnotique, car les animaux traités présentent, en dépit de la sédation, une certaine activité locomotrice (test de l'actographe).

L'activité sédative d'E. californica a été démontrée dans les trois tests (DI50 du clorazépate est de 5 mg/Kg par voie I.P. selon les dossiers techniques en ce qui concerne la motricité volontaire).

3.2. PROPRIETES ANXIOLYTIQUES

3.2.1. Introduction : l'anxiolyse

Les résultats que nous avons obtenus en observant les effets de doses croissantes d'E. californica sur certaines activités motrices des animaux nous ont permis d'établir l'existence de propriétés sédatives comparables à celles des benzodiazépines. C'est cette similitude, à ce niveau, entre E. californica et les tranquillisants dits "mineurs", qui nous a incité à rechercher pour la plante une activité appelée couramment "anxiolytique". En effet, le succès thérapeutique des benzodiazépines est essentiellement dû à l'action calmante de ces molécules, bien plus qu'à leurs propriétés sédatives. Les effets recherchés chez l'homme se traduisent en général par un sentiment de "détente" face au stress de la vie sociale et professionnelle. Cette détente a, entre autres conséquences, celle de réduire le niveau d'anxiété des gens, de lever partiellement l'inhibition comportementale consécutive aux effets du stress et de favoriser l'endormissement. Ces divers effets s'observent généralement à des doses nettement inférieures à celles qui entraînent sédation et somnolence.

Divers modèles expérimentaux de l'anxiété ont été mis au point chez l'animal pour simuler les situations sensées créer chez l'homme l'anxiété. Cependant, il convient de préciser d'emblée, avant de décrire certains de ces prétendus modèles, que l'utilisation du concept et donc du terme d'"anxiété" dans l'étude du comportement animal pose de sérieux problèmes épistémologiques dans la mesure où l'on confère, à partir de l'expérience subjective humaine, l'existence chez les animaux d'états mentaux analogues. Comme nous n'avons pas les moyens de savoir s'il existe chez les animaux des états subjectifs comparables à ceux de l'homme, il va de soi que nous ne sommes pas en droit de parler de modèles, chez l'animal, de l'anxiété humaine. En revanche, ce que l'on peut observer chez l'animal, ce sont ses conduites. De fait, l'étude des effets des benzodiazépines sur le comportement animal a montré que ces substances entraînent à fortes doses de la sédation, se traduisant par une dépression de l'ensemble des séquences comportementales propres à une espèce animale donnée. Par contre, à des doses non sédatives, les benzodiazépines présentent des effets paradoxaux puisque très souvent, elles augmentent la probabilité d'apparition de certains comportements. Ces effets ne sont paradoxaux qu'en apparence car ils s'expliquent par le fait qu'on ne les observe que lorsque les animaux sont confrontés à des situation qui comportent des aspects aversifs. Par exemple,

lorsqu'on introduit de force un animal comme un petit rongeur (rat, souris) dans une enceinte qu'il ne connaît pas, il aura tendance dans un premier temps à rester immobile ou à se mouvoir lentement dans le milieu inconnu. C'est une réaction normale traduisant l'insécurité dans laquelle l'animal est brusquement plongé. C'est précisément dans ce genre de situation que l'administration de faibles doses de benzodiazépines entraîne une réduction plus ou moins prononcée de l'inhibition comportementale induite par le stress. On a considéré ces effets désinhibiteurs comme analogues de ce qu'il est convenu d'appeler, chez l'homme, les propriétés anxiolytiques ou tranquillisantes de ces molécules, et de nombreux auteurs utilisent le qualificatif d'anxiolytique -par commodité- pour l'appliquer à l'action désinhibitrice des benzodiazépines sur le comportement animal. Mais il doit être clairement précisé que, dans ce cas, le terme d'anxiolytique ne désigne pas un processus mental, mais a une valeur opératoire visant à qualifier des modifications induites par les benzodiazépines au niveau purement comportemental.

Les propriétés désinhibitrices des benzodiazépines se manifestent parfois, dans certaines situations dites conflictuelles, comme des substances capables de réduire l'intensité de ce conflit. Dans ce cas on trouve fréquemment dans la littérature spécialisée le terme d'"anticonflit" pour désigner ces effets. Par exemple, Geller et Seifter (1960) ont mis au point un test expérimental consistant à conditionner des rats à appuyer sur une pédale pour obtenir des boulettes de nourriture. Lorsque les animaux ont appris la tâche, l'expérimentateur leur administre de légers chocs électriques chaque fois qu'ils font un appui sur la pédale. Les animaux sont ainsi placés dans une situation dans laquelle s'affrontent deux sortes de motivations contradictoires : celle qui les incite à appuyer pour recevoir les boulettes de nourriture et celle qui les pousse à éviter les chocs électriques. Dans cette situation, les rats témoins ont tendance à arrêter d'appuyer sur la pédale ; en revanche les rats traités avec des tranquillisants persévèrent dans cette voie. Il s'agit ici d'une situation de conflit conditionné. Crawley et Goodwin (1980) ont imaginé d'utiliser une situation de conflit spontané chez la souris. Ces auteurs, s'appuyant sur la tendance de la souris à préférer des endroits sombres à des endroits éclairés, ont placé deux cages côte-à-côte, l'une fortement éclairée, l'autre obscurcie. Ils introduisent la souris dans la cage sombre et enregistrent le nombre de transitions que l'animal effectue entre les deux cages. En effet, les animaux marquent une nette préférence pour la cage sombre. Cependant, ils font de temps en temps des excursions dans la cage éclairée pour retourner ensuite dans la cage obscure. On peut donc supposer

que les animaux sont placés dans une situation conflictuelle dans laquelle la tendance à préférer la cage sombre s'oppose à celle "d'explorer" le milieu nouveau. On constate que les benzodiazépines ont tendance à augmenter le nombre de transitions entre les deux cages ; ce que les auteurs interprètent comme un effet "anti-conflit". Misslin (communication personnelle) a modifié cet appareil que nous décrirons ultérieurement.

Il a montré que les tranquillisants ont tendance ainsi à augmenter le temps passé par les souris dans la cage éclairée. Contrairement à Crawley et Goodwin, Misslin considère que les excursions dans la cage éclairée ne représentent pas vraiment des conduites d'exploration, mais des tentatives de fuite. En effet il a montré que lorsqu'on place de force une souris dans une enceinte inconnue, ce n'est pas tant la nouveauté de la situation qui agit sur l'état motivationnel de l'animal que la façon contraignante avec laquelle il est confronté au nouveau. Celle-ci déclenche des conduites qui représentent des tentatives d'échappement (locomotion, redressements) (1984, 1986). Les conditions de contrainte entraînent une activation du système neurovégétatif qui se manifeste par une niction et une défécation importantes, lesquelles sont quasi absentes dans une situation de "choix" et une augmentation de la corticostérine plasmatique.

3.2.2. Matériel et méthode

3.2.2.1. Test de l'escalier

. Description de l'appareil (Figure 19)

Ce test est inspiré de la technique mise au point par Molingo et Rocci (1970). L'enceinte (Figure 19) en plexiglass opaque (47 x 10 x 25 cm) comprend à l'intérieur un escalier composé de 5 marches de 3 cm de haut, 7 cm de profondeur et 10 cm de large. L'enceinte est éclairée à l'aide d'une lampe à incandescence blanche.

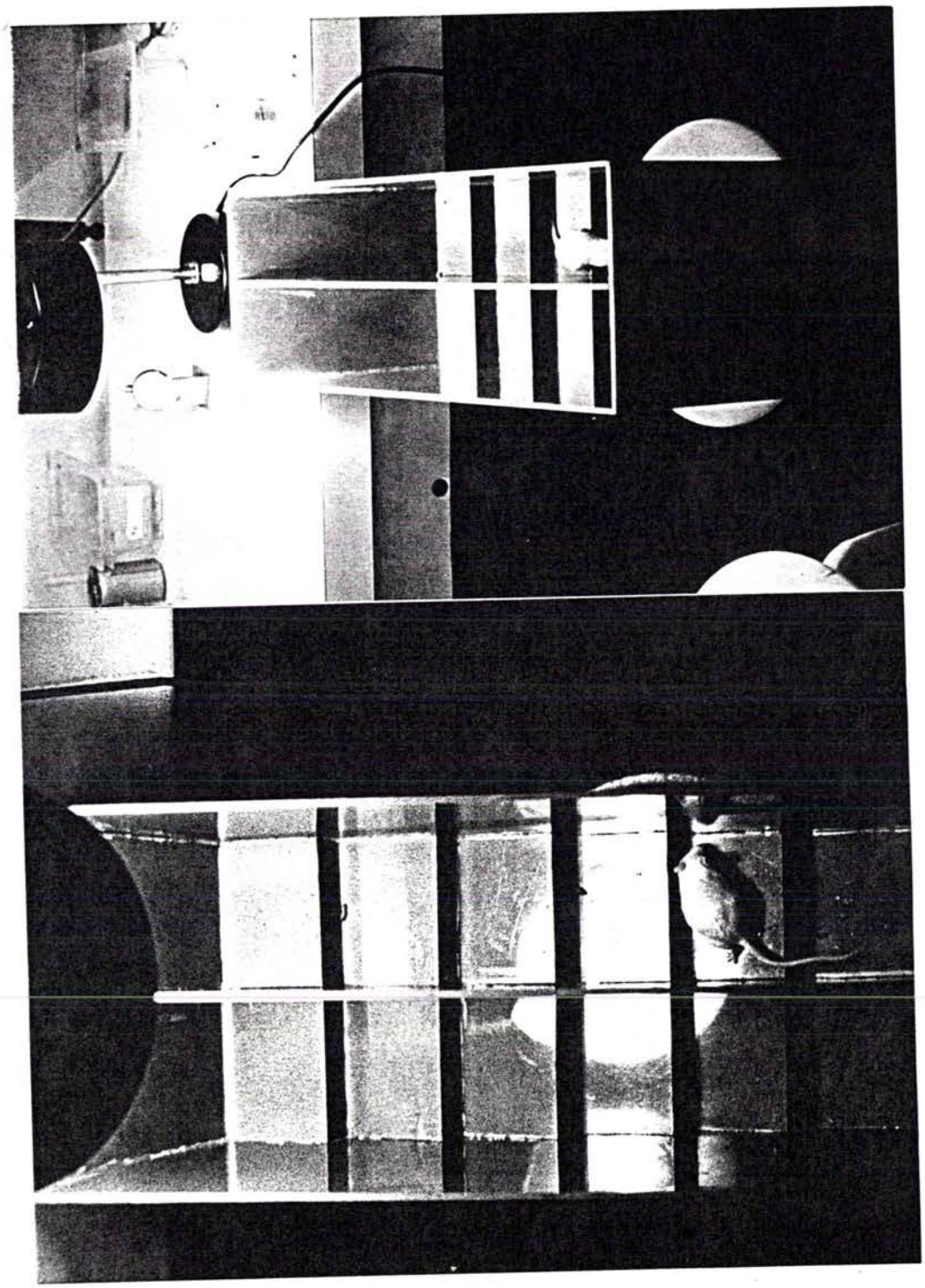


Fig. 19 - TEST DE L'ESCALIER

. **Protocole expérimental**

L'animal (souris L) est retiré de sa cage d'élevage et déposé par l'expérimentateur au niveau 0 toujours de la même manière, c'est-à-dire la tête dirigée vers la paroi opposée aux marches. On enregistre, pendant 5 minutes, le nombre de marches montées et le nombre de redressements. Une demi-heure avant le test, les animaux (L) reçoivent par voie IP, soit une solution d'E. californica, soit une solution saline à 0,9 %. Les doses utilisées ont été les suivantes : 0 - 25 - 50 - 75 - 100 - 300 mg/Kg. Chaque groupe expérimental comprend 20 animaux. Le clorazépate dipotassique (Tranxène®, Clin Midy) a été utilisé comme produit de référence aux doses de 5 - 10 - 20 - 40 et 80 mg/Kg.

Pour chacun des paramètres enregistrés, les performances des lots traités et des lots témoins sont comparés globalement à l'aide de l'analyse de variance et si les résultats diffèrent de façon significative, ils sont comparés deux à deux à l'aide du test de comparaisons multiples de Duncan.

La DI 50 pour E. californica, et pour le clorazépate dipotassique, a été calculée selon la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

3.2.2.2. Test de l'enceinte claire-obscure

. **Description de l'appareil**

Ce test est inspiré de la technique de Crawley et Goodwin (1980). L'appareil est constitué de deux cages en plexiglass (20 x 20 x 20 cm) reliées entre elles par un court tunnel. A la base de chaque cage, sur l'une des faces, se trouve une ouverture permettant à l'animal de passer d'une cage à l'autre. L'une des cages est fortement éclairée, tandis que l'autre est rendue obscure au moyen d'un cache (Figure 20).

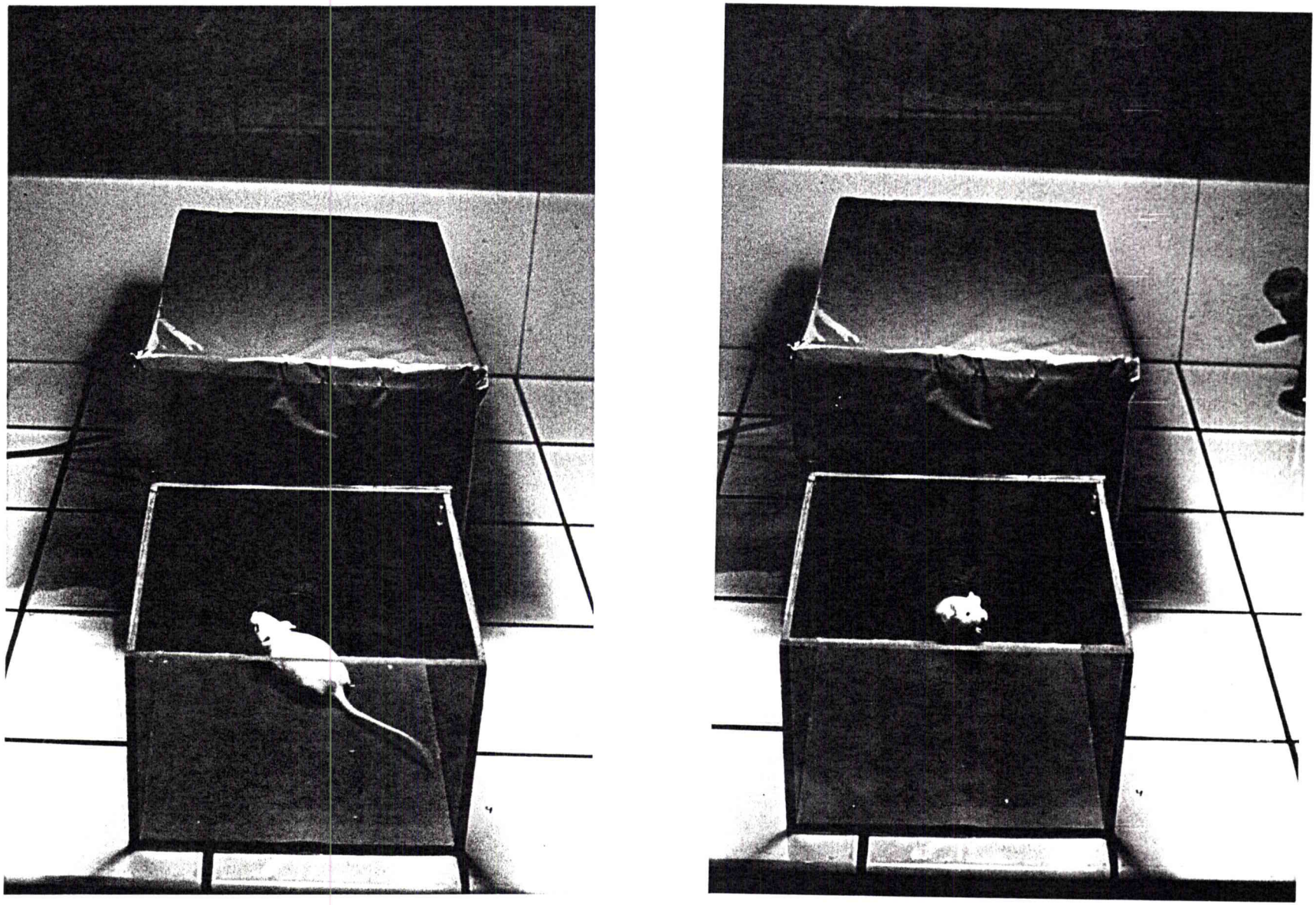


Fig. 20 - COMPARTIMENT CLAIR ET COMPARTIMENT OBSCUR

. **Protocole opératoire**

Au début du test, l'animal est retiré de sa cage d'élevage et placé dans le compartiment éclairé. Le test dure 5 minutes et l'on enregistre le temps passé par chaque animal dans la cage claire. Trois groupes de 20 animaux (souris L) sont constitués. A chacun de ces groupes correspondent les doses suivantes : 0 - 12,5 - 25 mg/Kg. Le témoin recevant une solution de NaCl 0,9 %. L'extrait d'E. californica est injecté par voie IP une demi-heure avant le test.

Les performances des lots traités et des lots témoins sont comparées globalement à l'aide de l'analyse de variance et si les résultats diffèrent de façon significative, ils sont comparés deux à deux à l'aide du test de comparaisonsmultiples de Duncan.

3.2.2.3. Test de l'open-field modifié

. **description de l'appareil**

Ce test pharmacologique, qui a été longtemps employé à tord en tant que test dit de "situation libre", a été imaginé par Hall (1934) dans le but de susciter chez l'animal d'importantes réactions "émotionnelles". Dans ce test, l'animal est placé de force dans l'enceinte sans possibilité pour lui de se réfugier dans un endroit familier, ce qui modifie considérablement son comportement exploratoire.

Il s'agit d'une enceinte carrée (50 x 40 cm) dans laquelle sont placés quatre objets de forme parallèlépipédique. Ces objets (2 x 2 x 6 cm) sont disposés de façon symétrique sur le plancher est divisé en 25 carrés de 10 cm de côté (Fig. 21).

Au centre de l'appareil se trouve une plate-forme carrée (L = P : 8,5 cm, h = 2,5) sur laquelle les souris peuvent grimper. L'open-field est éclairé par une ampoule (100 watts) disposée en-dessous du plancher constitué par une plaque de verre translucide.

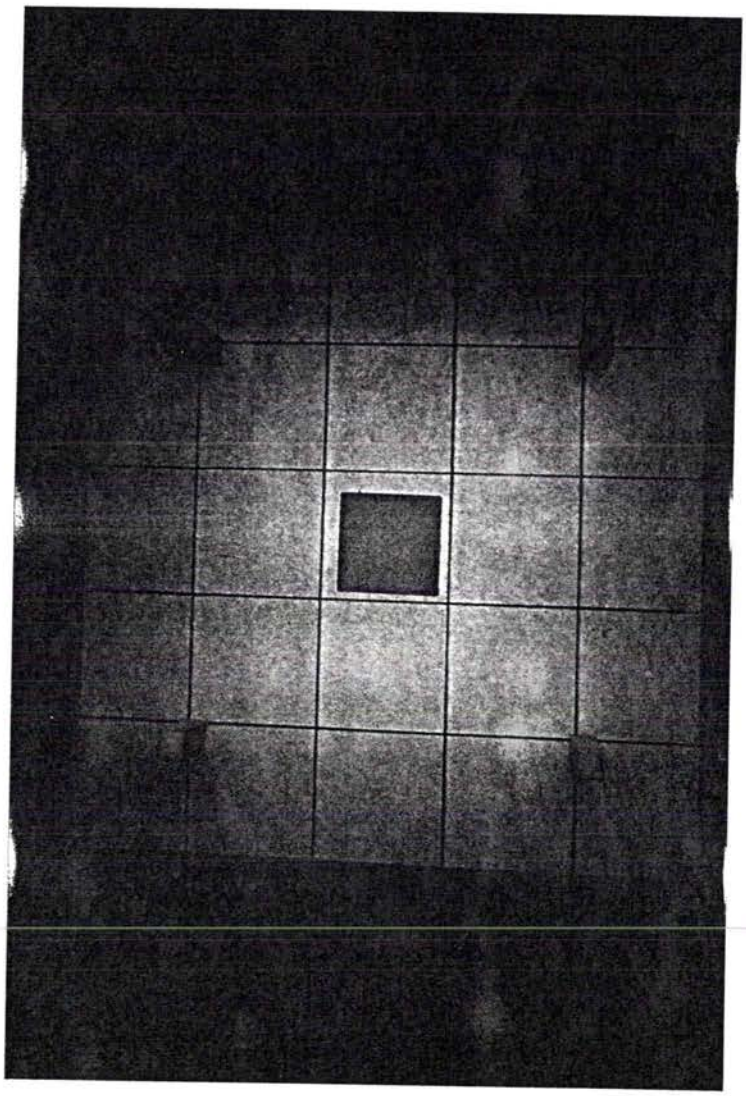


Fig. 21 - L'OPEN-FIELD

. **Protocole expérimental**

Les animaux (souris L) sont placés individuellement dans l'open-field et chaque sujet est testé en une seule séance de 5 minutes. On enregistre le nombre de carrés traversés (qui définit aussi l'activité locomotrice). On enregistre également les redressements effectués soit contre les parois de l'appareil, soit contre les objets, soit contre la plate-forme.

Une demi-heure avant le test, les souris reçoivent par voie IP les différents produits à tester : E. californica (25, 50 et 200 mg/Kg), clorazépate (5, 10, 20, 40 et 80 mg/Kg) et un extrait hydro-alcoolique de Poa sp lyophilisé (cf. § 1.1.2.) à la dose de 200 mg/Kg ; plante connue pour son inactivité pharmacologique sur le système nerveux central, et servant de témoin négatif.

En effet, un extrait végétal total est un mélange très complexe de toute une multitude de substances extraites de la drogue par le solvant et on peut se demander si les effets pharmacologiques, observés du nébulisat d'E. californica ne peuvent pas être attribués à un artefact dû à la préparation.

Les performances des animaux sont testées à l'aide de l'analyse de variance, suivie par le test de comparaisons multiples de Newmann-Keuls. De plus, nous calculons la CI 50 selon la méthode de Liechtfield et Wilcoxon.

3.2.3. Résultats

3.2.3.1. Test de l'escalier

On constate (Fig. 22) qu'E. californica augmente de façon significative le nombre de redressements chez les souris traitées avec 25 et 75 mg/Kg, et celui des marches montées chez les animaux traités avec 25 mg/Kg. En revanche, la même substance réduit de façon significative les redressements et les marches montées chez les souris traitées avec 150 et 300 mg/Kg.

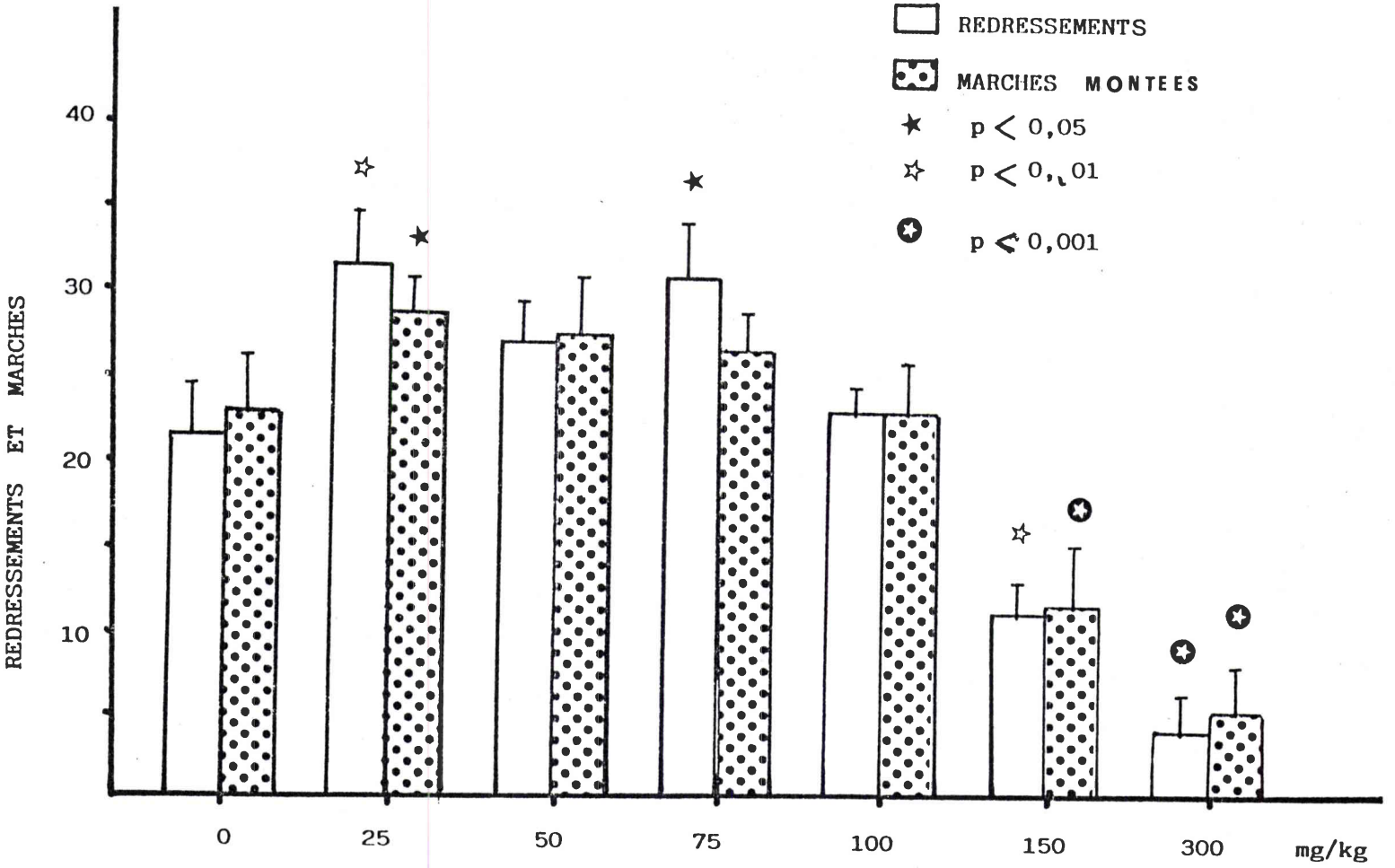


Fig. 22 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS DANS LE TEST DE L'ESCALIER.
EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES, EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS-STANDARDS DU NOMBRE DE REDRESSEMENTS ET DE CELUI DES MARCHES MONTEES.

N = 20

La figure 23 (A et B) représente les pourcentages du nombre de redressements (A) et celui des marches montées (B) des animaux traités avec E. californica et le clorazépate dipotassique par rapport aux animaux qui ont présenté un effet maximal (25 mg/Kg pour E. californica, quelque soit le paramètre enregistré ; 1 mg/Kg pour le clorazépate en ce qui concerne les redressements et 5 mg/Kg en ce qui concerne les marches montées). Elle nous permet de calculer la DI 50 pour E. californica et pour le clorazépate. On constate qu'elle est de 136 mg/Kg (135 -137) pour l'extrait de plante, en ce qui concerne les redressements et de 150 mg/Kg (148,8-151,7) pour les marches montées ; elle est de 15,5 mg/Kg (15,3-15,8) pour le clorazépate en ce qui concerne les redressements, et de 22,5 mg/Kg (22,2-22,8) en ce qui concerne les marches montées. Dans tous les cas, les tests de linéarité effet/dose ont été validés par $P < 0.05$.

3.2.3.2. Test de l'enceinte claire/obscure

La figure 24 représente les nombres moyens et les erreurs-types du temps passé (en secondes) par les animaux dans la chambre claire sur la durée totale du test (10 minutes). On constate que les souris traitées avec 25 mg/Kg demeurent plus longtemps dans la chambre claire que les souris témoins ($P < 0.05$) : analyse de variance globale suivie du test de Duncan).

3.2.3.3. Test de l'open-field modifié

Les effets d'E. californica et du Poa sp sur la locomotion et sur les redressements sont présentés sur la figure 25.

On constate que le nébulisat d'E. californica réduit de façon significative (analyse de variance suivi du test de Newmann-Keuls) la locomotion des souris lorsqu'il est administré à la dose de 200 mg/Kg.

En revanche, aux doses de 25 et 50 mg/Kg, la substance n'a pas d'effets significatifs.

Sur les redressements, les effets d'E. californica sont fonction des doses : à faible dose, le nébulisat augmente significativement le nombre de redressements ; à la dose de 200 mg/Kg, il réduit le même paramètre.

De plus, on remarque que le Poa sp n'a pas d'effet significatif.

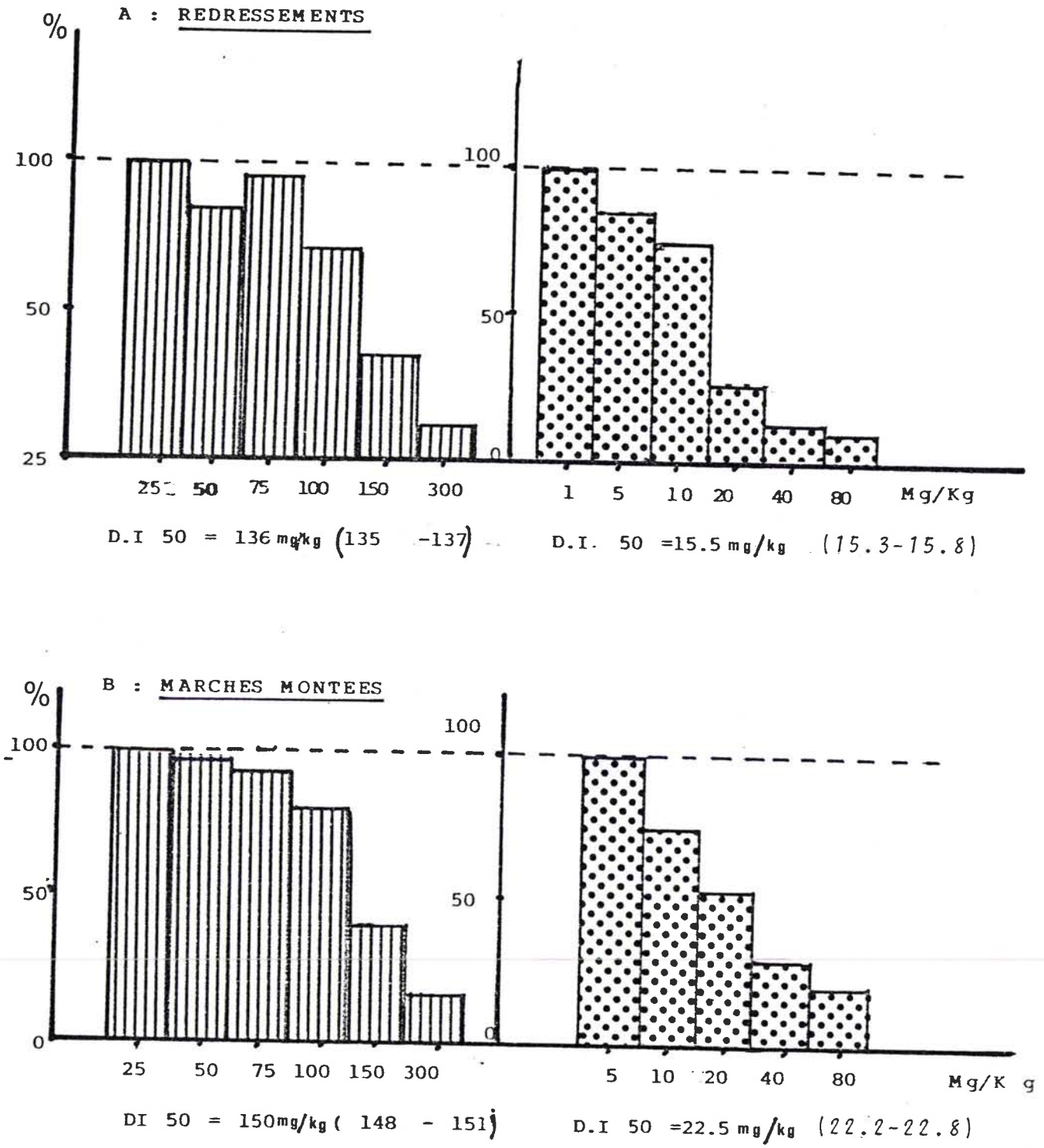


FIG.23 Effet d'E. californica(E.C.) et du Clorazépate dipotassique(C.D.) sur le comportement de la souris dans le test de l'escalier. En abscisse figurent les doses, en ordonnée, les pourcentages du nombre des redressements (A) et celui des marches montées.(B).

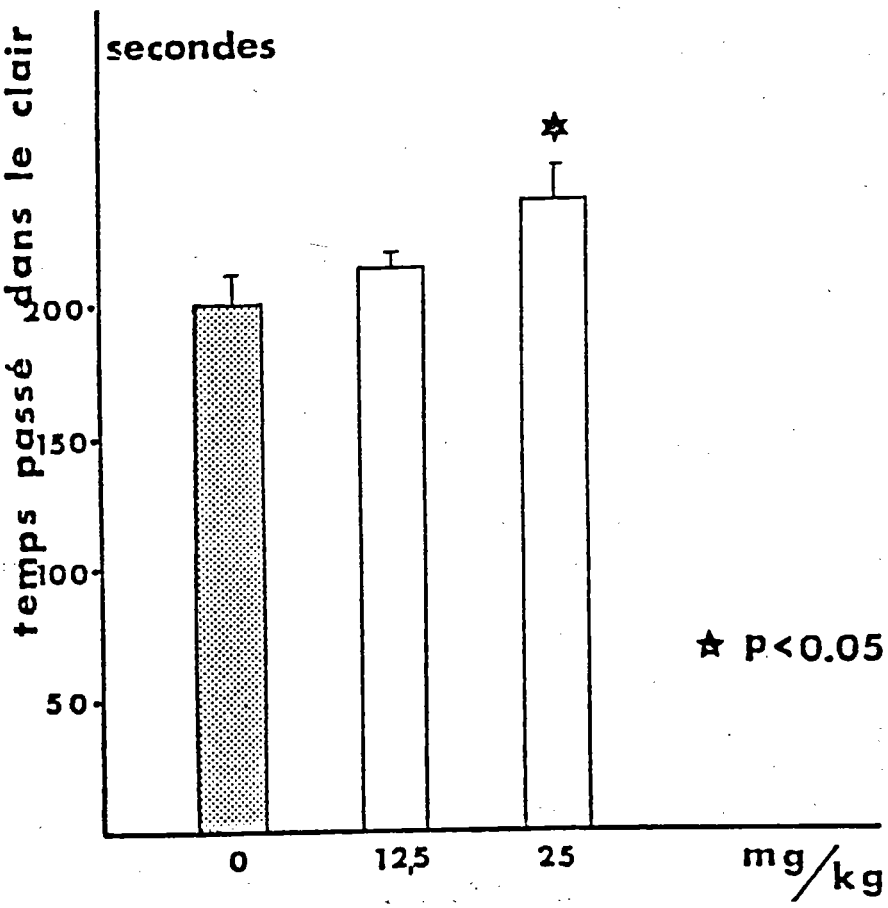


Fig. 24 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LA DUREE DE SEJOUR DES ANIMAUX DANS LA CHAMBRE CLAIRE (TEST DE L'ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE).
EN ORDONNEE LES MOYENNES ET ERREURS-STANDARDS,
EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES

N = 20

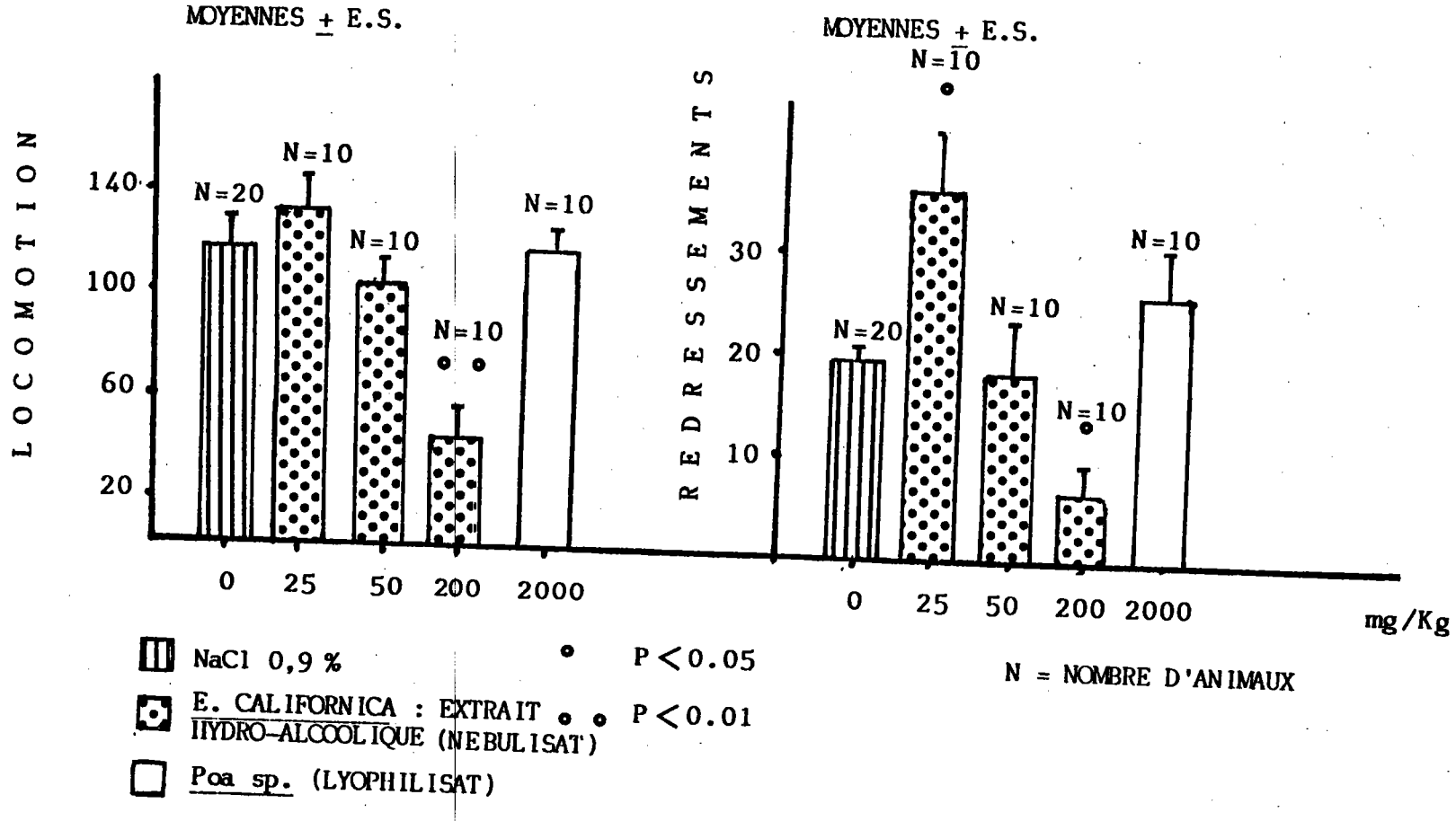


Fig. 25 - EFFET COMPARATIF DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA ET DU LYOPHILISAT DE POA sp. SUR LES REDRESSEMENTS ET LA LOCOMOTION DES SOURIS INTRODUITES DANS L'OPEN-FIELD MODIFIE.

3.2.4. Discussion

L'ensemble des résultats montre que lorsque E. californica est administré à faible dose (25 mg/Kg), les paramètres comportementaux sont augmentés. Les redressements et les marches montées (test de l'escalier), le temps de séjour dans la chambre claire/obscure et les redressements (test de l'open-field modifié). Ces effets sont comparables à ceux des benzodiazépines (Rushton et Steinberg, 1966 ; Misslin et coll., 1975 ; Polc, 1976).

Nous avons vu dans l'introduction qu'un animal placé de force dans une enceinte inconnue subissait un stress qui se traduit entre autre, par une inhibition des activités locomotrices. Le nébulisat d'E. californica à 25 mg/Kg, comme les benzodiazépines, semble réduire, à faibles doses, cette inhibition. Ceci est traditionnellement considéré comme un effet anxiolytique.

Du reste, comme on peut le constater d'après nos résultats dans le test de l'escalier et d'après ceux de Belzung et coll. (1987) dans le test des enceintes claire/obscure, le clorazépate, à faibles doses, a des effets anxiolytiques analogues à ceux d'E. californica.

Par ailleurs, les résultats confirment l'existence chez E. californica de propriétés sédatives puisque la plante réduit à fortes doses l'ensemble des activités comportementales.

Cependant, nous avons également observé qu'à la dose de 25 mg/Kg, E. californica a pour effet de hâter la pénétration des souris dans le compartiment nouveau (test d'exploration). Bien que ce test ne soit pas contraignant, on peut néanmoins considérer qu'il s'agisse là d'un léger effet désinhibiteur dans la mesure où la nouveauté provoque, au début du test, un effet transitoirement néophobique. Misslin et Cigrang (1984) ont observé des effets analogues avec l'alcool.

3.3. EFFET DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA SUR LA POTENTIALISATION ET SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL BARBITURIQUE

La mise en évidence dans les études précédentes d'un effet anxiolytique à faible dose et d'un effet sédatif à forte dose d'un nébulisat d'E. californica nous a conduit à tester son activité sur le temps d'endormissement et le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique et le barbital. En effet, la recherche d'une interaction vis à vis du sommeil induit par ces deux barbituriques appartient aux tests classiquement utilisés dans les screenings pharmacologiques de substances actives sur le système nerveux central, comme les sédatifs, les anxiolytiques, les antidépresseurs ou les psychostimulants.

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

L'interaction avec l'hypnose, induite par un barbiturique à métabolisme hépatique comme le pentobarbital sodique, peut résulter soit d'une action au niveau d'un récepteur central, soit d'une interaction dans le catabolisme du pentobarbital au niveau hépatique (Simon et coll., 1982 ; Jori et coll., 1970) ; soit les deux à la fois en parallèle (Tateoka et coll., 1987). Aussi, l'utilisation d'un barbiturique non métabolisé par voie hépatique, le barbital, devrait nous permettre de trancher entre ces deux hypothèses (Tien-Tung et coll., 1977 ; Simon et coll., 1980, 1987). Cette différenciation dans le mécanisme d'action est la principale raison du choix de la plupart des auteurs du pentobarbital sodique et du barbital pour réaliser ce test au cours des différents screenings pharmacologiques (Boissier et coll., 1972 ; Simon et coll., 1985 ; Rambert et coll., 1986 ; Persolt et coll., 1987).

Les nombreux travaux récents, qui ont été menés sur les barbituriques, nous amènent à faire des rappels sur les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de ces substances.

3.3.1. Introduction

Rappel sur la notion de structure-activité, la pharmacocinétique et la pharmacologie du pentobarbital et des barbituriques.

. Relation structure-activité et pharmacocinétique

Les barbituriques dérivent de la substitution d'un atome d'hydrogène, placé sur le carbone en position 5, d'une molécule d'acide barbiturique ou malonyl-urée, par un groupement alkyl ou aryl (Harvey, 1975 ; Schmitt, 1975 ; Giroud, 1979) qui confèrent à la molécule les propriétés hypnotiques et sédatives. Cette substitution donne à la molécule un caractère lipophyle lui permettant d'avoir une grande affinité pour le système nerveux central. La lipophilie peut être accrue par augmentation de la chaîne carbonée ; ce qui a pour conséquence de diminuer la durée d'action du barbiturique, d'accélérer sa métabolisation et d'augmenter son pouvoir sédatif (Hô, 1981 ; Roth, 1979). En revanche, la substitution d'un groupement polaire diminue la liposolubilité du barbiturique et abolit de ce fait l'activité hypnotique.

La liposolubilité, définie par le coefficient de partage huile/eau (39 pour le pentobarbital et 1 pour le barbital) et l'hydrosolubilité, définie par le degré d'ionisation (qui est fonction du pH et du pKa) jouent un rôle important dans la pharmacocinétique des barbituriques et par conséquent, dans le mécanisme d'action de certains d'entre eux, ainsi que dans les interférences qu'ils ont avec d'autres substances (Sato et coll., 1979, 1980).

La liposolubilité favorise l'interaction des barbituriques avec les zones hydrophobes des protéines et justifie par conséquent les facilités de certains barbituriques avec les protéines plasmatiques (35 % pour le pentobarbital) (5 % pour le barbital) et le cytochrome P450 (Roth et coll., 1979 ; Willaw et coll., 1981 ; Tateoka et coll., 1986).

. Métabolisme

A l'exception du barbital qui est entièrement éliminé par les reins (Goodmann et Gilman, 1970 ; Remmer, 1972), la dégradation hépatique représente une étape essentielle dans le métabolisme des barbituriques et du pentobarbital en particulier qui est dégradé sous l'action du système NADPH -cytochrome P 450 reductase- cytochrome P 450 qui inactive la molécule par hydroxylation de la chaîne latérale en position 5 (Fig. 26). cette réaction métabolique libère des catabolites hydrosolubles, inactifs qui seront éliminés par la bile, les reins ou les fécès (Albrecht, 1972).

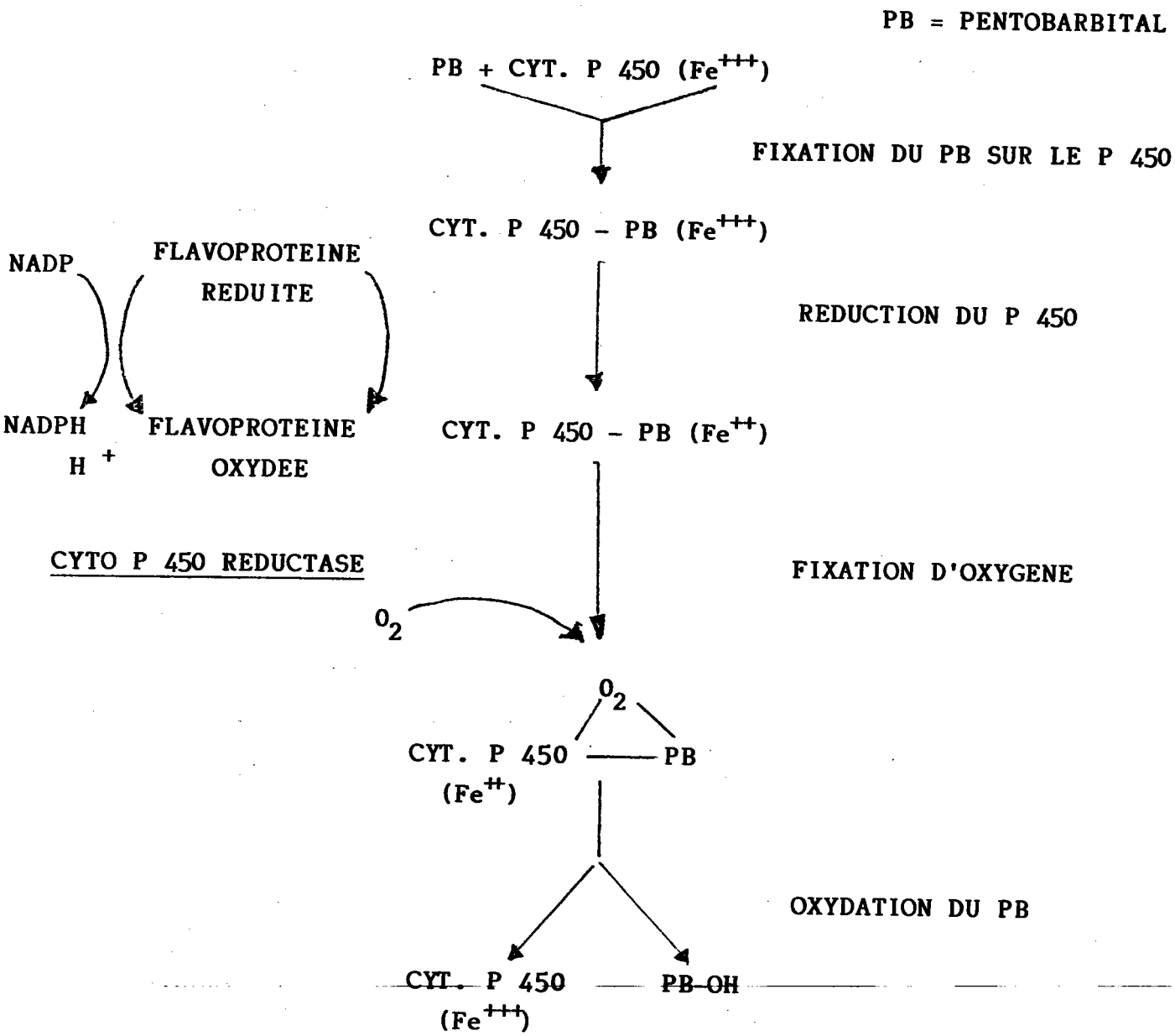


Fig. 26 - ROLE DU CYTOCHROME P 450 DANS LE METABOLISME DU PENTOBARBITAL (PB)

(d'après WAROT ET COLL., 1979)

. Propriétés pharmacologiques

Harvey et coll. (1975), Schmitt (1975), Passouant et Billard (1978), Warot et coll. (1979), Hô et coll. (1986).

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

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

- **Sur l'électro-encéphalogramme,** on remarque que le pentobarbital modifie les activités électriques des différentes structures encéphaliques. A dose hypnotique, il altère les étapes du sommeil, diminue la latence d'endormissement et augmente faiblement les ondes delta et l'activité de l'électro-encéphalogramme enregistrée pendant le sommeil. Ainsi, il faut noter que ce barbiturique diminue la durée totale du sommeil paradoxal et son pourcentage par rapport au sommeil physiologique et que les stades de sommeil lent et profond sont diminués (stade III et IV).

- **Sur le système cardiovasculaire,** aux doses sédative et hypnotique, l'ensemble des barbituriques ne produit qu'une légère diminution de la pression sanguine, une légère bradycardie qui semble être tout à fait comparable à celle enregistrée pendant le sommeil physiologique.

- **De nombreux travaux ont démontré l'influence de certains barbituriques, et en particulier du pentobarbital, sur le système microsomal hépatique** qui métabolise la plupart des médicaments (Albrecht, 1972 ; Harvey et coll., 1975 ; Giroud, 1979 ; Mavier et coll., 1983).

Si le mécanisme intime de l'action des barbituriques n'est pas encore connu, de nombreux auteurs (Hô et coll., 1975 ; Gerardy et coll., 1982 ; Costa et coll., 1982 ; Haefely et coll., 1983) suggèrent pour expliquer l'ensemble des effets observés sur l'animal que le mode d'action des barbituriques se situe non seulement au niveau du récepteur gaba, pour expliquer l'inhibition de la transmission synaptique, mais également sur l'ionophore chlore.

Par ailleurs, sur les neurotransmetteurs, le pentobarbital augmente la quantité d'acétylcholine dans tout le cerveau et plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Norberg et coll., 1976) ; il diminue le turnover de la nor-adrénaline et de la sérotonine et augmente celui de la dopamine (Okamoto, 1978).

3.3.2. Problèmes méthodologiques

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

Des études de Davis (1962), Vessel et coll. (1968), Friedman et coll. (1969) ont montré chez le rat traité par des barbituriques que le temps d'endormissement est augmenté et que le temps de sommeil diminue pendant la phase d'obscurité. C'est au cours de cette phase que la température corporelle est maximale, que le taux de 5 hydroxytryptamine est minimal et que le taux de nor-adrénaline est maximal (Friedman et coll., 1968). D'autre part, il est bien connu que l'activité globale des souris est maximale au cours de la phase nocturne et minimale au cours de la phase diurne (Friedman et coll., 1968 ; Kempf et coll., 1982).

Il apparaît ainsi qu'un test comportemental réalisé sur une durée trop longue ou sur une durée englobant des périodes différentes au cycle nyctéméral des animaux, génère une variabilité importante dans les résultats. Dès 1971, Remberg et coll. ont mis en évidence l'importance de la méthodologie qui doit être strictement définie pour éviter des erreurs d'interprétation. Aussi est-il nécessaire de synchroniser tous les animaux qui sont utilisés dans une étude expérimentale, et de choisir la phase du cycle optimal pendant laquelle les expérimentations seront réalisées. Quant aux autres paramètres, poids, âge, sexe, il nous a paru opportun de travailler avec des animaux d'âge constant (Rolland, 1984).

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

- Nous avons ensuite recherché les effets potentialisateurs d'une administration aiguë d'E. californica, puis les effets d'un traitement chronique d'E. californica vis à vis du pentobarbital ;

- Nous avons recherché les effets potentialisateurs d'E. californica vis à vis du barbital ;

- Nous avons enfin étudié les effets inducteurs du sommeil d'E. californica lorsque la pentobarbital est administré à doses infra-hypnotiques.

3.3.3. Matériel et méthodes

3.3.3.1. Mise au point et validation du protocole

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

- Les animaux : de même âge (7 à 9 semaines)

- Sexe des animaux : mâle, à cause du cycle oestral de 4 à 6 jours des souris femelles

- Période de réalisation du test :

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

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

3.3.3.2. Potentialisation de l'hypnose induite par le pentobarbital sodique

. Protocole expérimental

7 lots de 10 souris (C) reçoivent par voie IP (0,5 ml/50 g) des doses d'E. californica de 10, 50, 100, 200, 300, 400 et 800 mg/Kg, 30 minutes avant l'injection de pentobarbital sodique (Nembutal ®, Abbott) par voie IP à la dose de 40 mg/Kg ; à cette dose le pentobarbital induit un sommeil voisin de 30 minutes. Un lot de 10 souris (C) témoins reçoit une solution de NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions.

Deux paramètres sont alors mesurés : le temps d'endormissement et le temps de sommeil. Le début du sommeil est pris en compte lorsque les souris acceptent la position en décubitus latéral, le temps de réveil lorsque la souris quitte cette position après trois tentatives de remise en position initiale. Le temps d'endormissement est l'intervalle de temps entre l'injection de pentobarbital et l'apparition du sommeil. Le temps de sommeil est l'intervalle de temps entre le début du sommeil et le réveil.

. Présentation des résultats-Analyses statistiques

Les résultats présentés dans le tableau 15 correspondent aux moyennes et aux erreurs-standards des valeurs obtenues pour chacun des lots de 10 souris (C), exprimés en secondes pour les temps d'endormissement et les temps de sommeil, alors que les résultats présentés dans la figure 27 correspondent aux pourcentage d'augmentation du temps de sommeil des animaux traités en comparaison de celui des animaux témoins.

Les valeurs moyennes ont été comparées tout d'abord globalement par une analyse de variance, puis deux à deux à l'aide du test de comparaisons multiples de Newmann Keuls.

3.3.3.3. Effet d'un prétraitement d'*E. californica* 6 jours, 3 jours, 1 jour et 30 minutes sur le temps d'endormissement et le temps de sommeil induits par le pentobarbital

. Protocole expérimental

Les lots traités reçoivent un prétraitement par voie IP (0,5 ml/50 g) d'*E. californica* 6 jours, 3 jours, 1 jour et 30 minutes avant l'injection, par voie IP, à la dose de 40 mg/Kg de pentobarbital sodique (Nembutal , Abbott). On a constitué 4 lots de 10 souris (C) traitées qui reçoivent en prétraitement des doses d'*E. californica* de 10, 50, 300 et 400 mg/Kg et un lot témoin de 10 souris qui reçoit en prétraitement une solution de NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions.

Deux paramètres sont alors mesurés : le temps d'endormissement et le temps de sommeil, selon le protocole décrit dans le § 3.3.3.2.

. Présentation des résultats- Analyses statistiques

La démarche pour la présentation des résultats et leur interprétation statistique est identique à celle présentée dans le paragraphe 3.3.3.2.

3.3.3.4. Effet du nébulisat d'*E. californica* sur l'hypnose induite par le barbital

. Protocole expérimental

Un lot traité de 10 souris (C) reçoit une administration par voie IP de nébulisat d'*E. californica* à la dose de 400 mg/Kg (0,5 ml/50 g), 30 minutes avant l'administration par voie IP de barbital sodique (Cooper, Melun) à la dose de 200 mg/Kg (0,5 ml/50 g).

Un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % par voie IP dans les mêmes conditions. Le temps d'endormissement et le temps de sommeil, exprimés en secondes, sont alors mesurés selon les critères décrits au § 3.3.3.2.

. **Présentation des résultats-Analyse statistique**

Les résultats présentent, d'une part les moyennes et les erreurs-standards du temps d'endormissement et des temps de sommeil, exprimés en secondes, pour les lots traités et le lot témoin (Tableau 17) ; et d'autre part les pourcentages de diminution et d'augmentation du temps de sommeil des lots traités par comparaison à celui du lot témoin.

Les valeurs moyennes des lots traités et du lot témoin ont été comparées globalement à l'aide de l'analyse de variance puis les comparaisons deux à deux sont réalisées au moyen du test de comparaisons multiples de Newmann-Keuls.

3.3.3.5. Effet inducteur du sommeil du nébulisat d'*E. californica* après traitement à une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique

. **Protocole expérimental**

Des lots de 10 souris (C) traitées reçoivent soit le nébulisat d'*E. californica* par voie I.P. à la dose de 400 mg/Kg (0,5 ml/50 g), soit une solution de clorazépate dipotassique utilisé comme produit de référence (Tranxène ®, Clin-Midy, Montpellier) aux doses de 5 et 20 mg/Kg, 30 minutes avant l'administration par voie I.P. de pentobarbital sodique (Nembutal ®, Abbott) à une dose non hypnotique de 25 mg/Kg. Un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions.

Le nombre de souris endormies pour chacun des lots est alors enregistré. Le critère d'endormissement est celui décrit au paragraphe 3.3.3.2.

. **Présentation des résultats-Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre d'animaux endormis pour chacun des lots. La comparaison du score des lots traités avec celui du lot témoin est réalisée au moyen du test du χ^2 .

3.3.4. Résultats

3.3.4.1. Potentialisation du sommeil induit par le pentobarbital

Les résultats sont présentés dans le tableau 15. On remarque que le nébulisat d'E. californica augmente significativement le temps de sommeil des animaux traités à partir de la dose de 100 mg/Kg. Par contre, le temps d'endormissement est diminué aux doses de 300 et 800 mg/Kg, alors qu'il n'est pas modifié aux doses de 10, 50, 100, 200 et 400 mg/Kg.

La figure 27 représente la relation dose/effet, exprimée en pourcentage de variation, d'E. californica sur le temps de sommeil induit par le pentobarbital, et met en évidence une augmentation significative (+ 100 %) du temps de sommeil à partir de la dose de 100 mg/Kg. Dans la figure, les témoins sont représentés par la ligne 0.

On remarque que cette augmentation est dose dépendante puisqu'elle atteint plus de 120 % à la dose de 200 mg/Kg ; 150 % à 400 mg/Kg et plus de 200 % à 800 mg/Kg.

TABLEAU 15 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET SUR LE TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (40 mg/Kg) APRES UN PRETRAITEMENT UNIQUE DE 30 MINUTES

mg/Kg	TEMPS D'ENDORMISSEMENT secondes ± E.S.	P	TEMPS DE SOMMEIL secondes ± E.S.	P
0	248 ± 30	/	1284 ± 573	/
10	206 ± 36	NS	1350 ± 650	NS
50	220 ± 43	NS	2188 ± 1890	NS
100	218 ± 33	NS	2106 ± 767	0.05
200	204 ± 43	NS	2301 ± 921	0.01
300	208 ± 22	0.05	2815 ± 1012	0.001
400	209 ± 49	NS	3387 ± 1235	0.001
800	208 ± 19	0.05	3659 ± 1320	0.001

NS : DIFFERENCE STATISTIQUEMENT NON SIGNIFICATTIVE

E.S. : ERREURS-STANDARDS

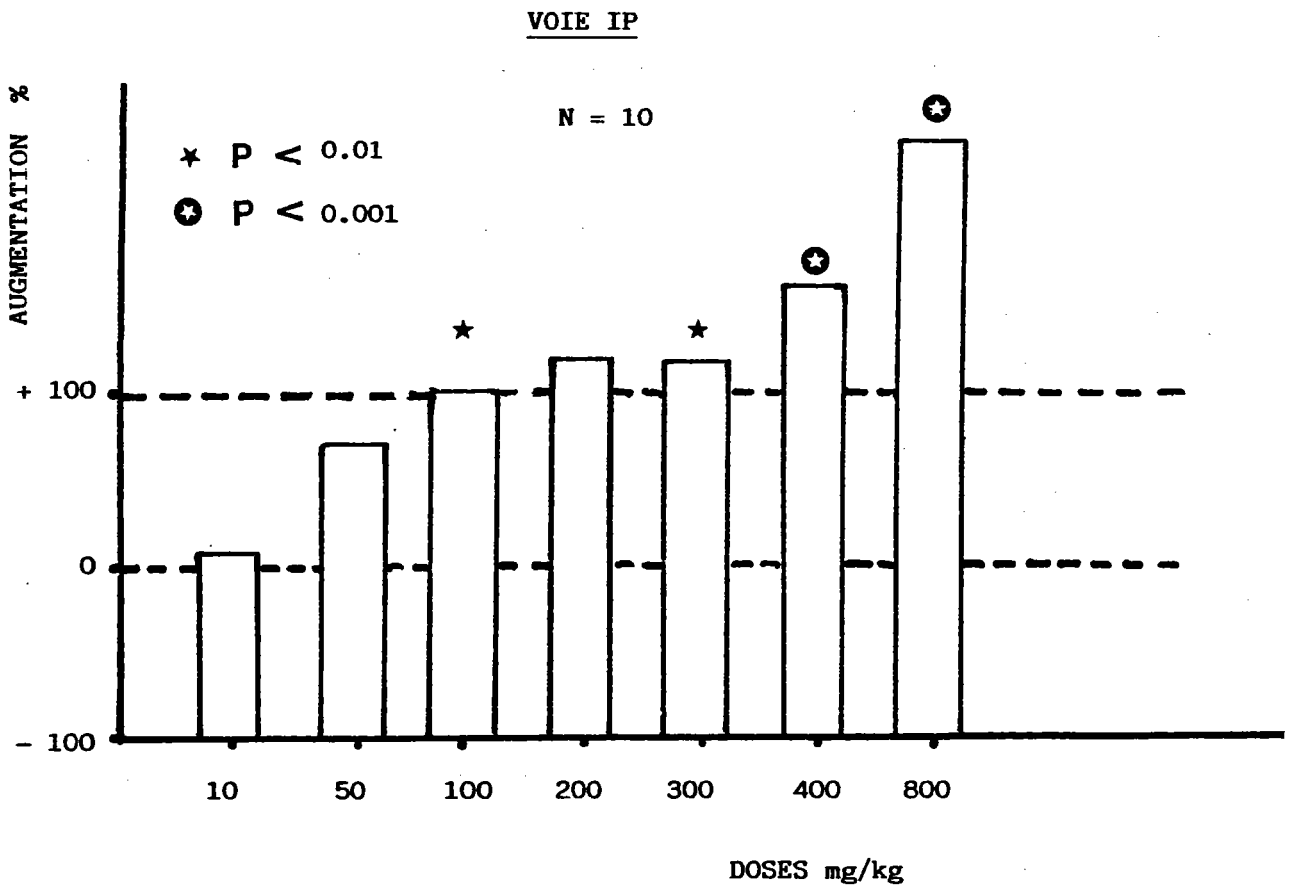


Fig. 27 - EFFETS D'E. CALIFORNICA (NEBULISAT), INJECTE PAR VOIE I.P., SUR LE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (40 mg/Kg)

3.3.4.2. Influence d'un prétraitement d'*E. californica* de 6 jours, 3 jours, 1 jour et 30 minutes sur le temps d'endormissement et le temps de sommeil induit par le pentobarbital

Les résultats obtenus pour le temps de sommeil sont présentés en secondes dans le tableau 16 et en pourcentage de variation dans la figure 28 où ils sont comparés à ceux obtenus lors du prétraitement unique de 30 minutes. Dans la figure 28, les témoins sont représentés par la ligne 0. On constate que si l'on prétraite avec *E. californica* les souris à plusieurs reprises avant le test narcotique, on observe une augmentation significative de la durée du sommeil (test de Newmann Keuls) dès la dose de 10 mg/Kg alors que cette augmentation n'apparaît qu'à la dose de 100 mg/Kg (Fig. 28) lors d'un unique traitement 30 minutes avant l'injection du pentobarbital.

Les résultats présentés dans le tableau 16 montrent que le temps d'endormissement n'est pas modifié aux doses de 10, 50 et 400 mg/Kg, alors qu'il est significativement diminué à la dose de 300 mg/Kg.

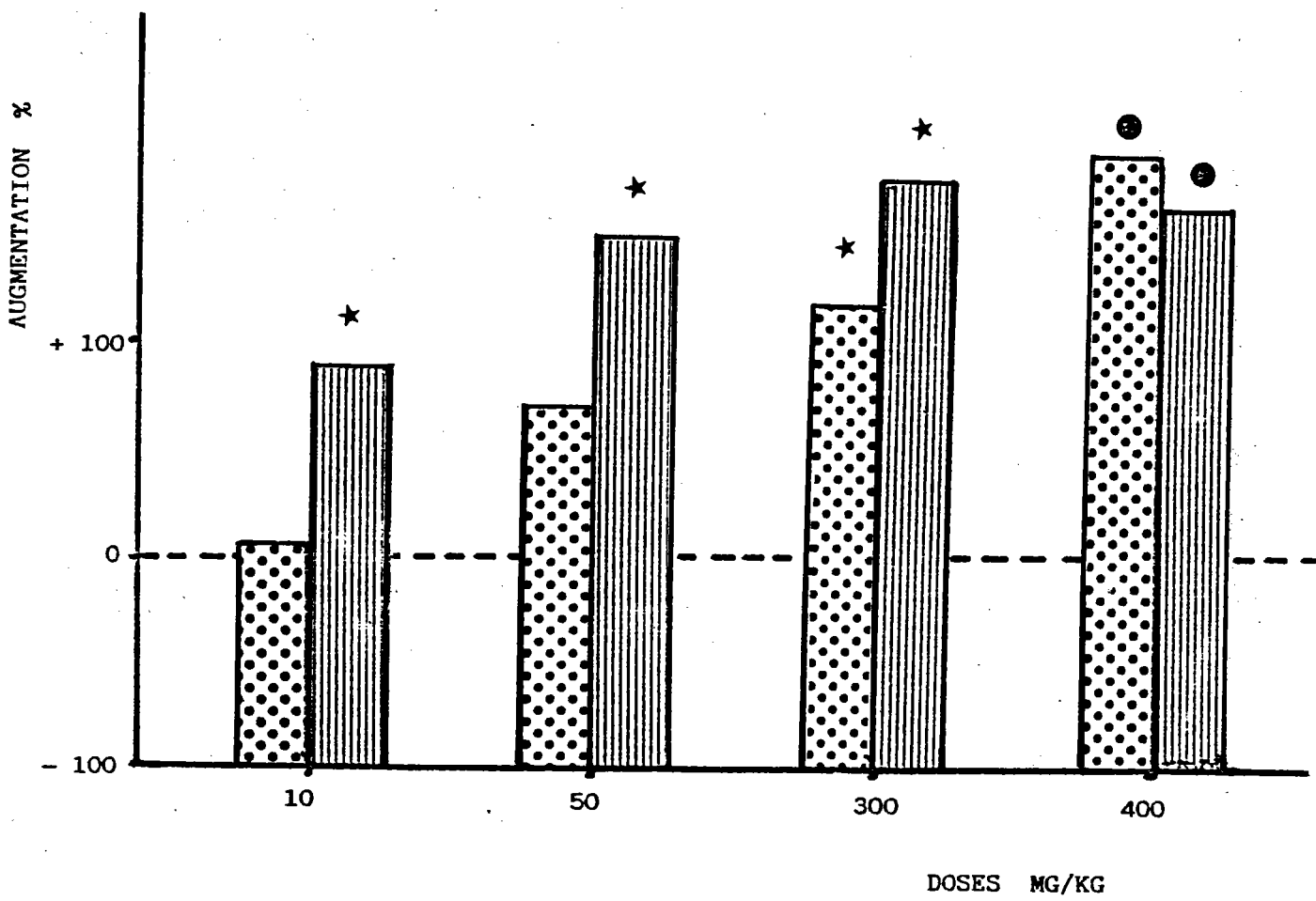
La différence dans les résultats obtenus avec les deux protocoles diminue au fur et à mesure que les doses d'*E. californica* augmentent, pour disparaître totalement lorsque la plante est administrée à la dose de 400 mg/Kg (Fig. 28).

TABLEAU 16 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET SUR LE TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (40 mg/Kg) APRES UN PRETRAITEMENT DE 6 JOURS, 3 JOURS, 1 JOUR ET 30 MINUTES

mg/Kg	TEMPS D'ENDORMISSEMENT secondes ± E.S.	P	TEMPS DE SOMMEIL secondes ± E.S.	P
0	268 ± 99	/	845 ± 763	/
10	212 ± 34	NS	1541 ± 399	0.01
50	258 ± 165	NS	2008 ± 1046	0.001
300	192 ± 19	0.05	2337 ± 610	0.001
400	242 ± 45	NS	2359 ± 957	0.001

NS : DIFFERENCE STATISTIQUEMENT NON SIGNIFICATIVE

E.S. : ERREURS-STANDARDS



PRETRAITEMENT
6j, 3j, 1j, 30 min

PRETRAITEMENT 30 min

★ $P < 0.01$

● $P < 0.001$

Fig. 28 - EFFETS D'UN PRETRAITEMENT AVEC E. CALIFORNICA (NEBULISAT) ADMINISTREE PAR VOIE I.P., 6 JOURS, 3 JOURS, 1 JOUR ET 30 MINUTES AVANT LE TEST, SUR LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL SODIQUE (25 mg/Kg)

3.3.4.3. Interaction d'*E. californica* avec l'hypnose induite par le barbital

Les résultats présentés dans le tableau 17 montrent que le nébulisat d'*E. californica* administré à 400 mg/Kg potentialise significativement (+ 65 %) la durée du sommeil induite par le barbital sodique et diminue significativement le temps d'endormissement (- 29 %).

Ces résultats nous permettent de suggérer l'hypothèse d'une action centrale d'*E. californica* en raison des effets potentialisateurs observés avec les deux barbituriques à voie métabolique différente.

TABLEAU 17 - EFFET D'*E. CALIFORNICA* (400 mg/Kg) SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET SUR LE TEMPS DE SOMMEIL PAR LE BARBITAL SODIQUE (200 mg/Kg)

N = 10

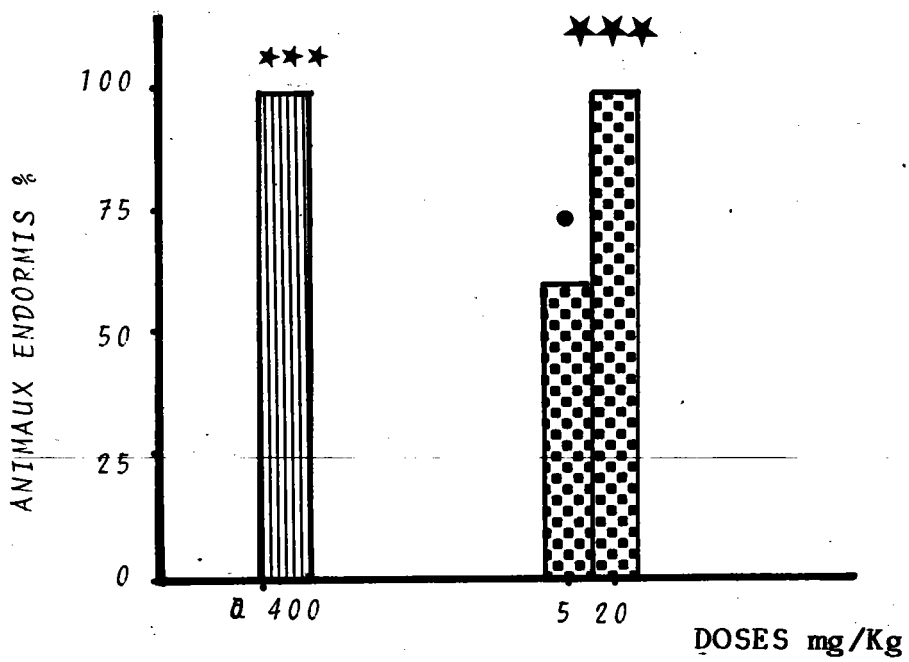
E. CALIFORNICA mg/Kg	TEMPS D'ENDORMISSEMENT MOYENNES ± E.S.	DIMINUTION DU TEMPS D'ENDORMISSEMENT %	TEMPS DE SOMMEIL MOYENNES ± E.S.	AUGMENTATION DU TEMPS DE SOMMEIL %
0	2175 ± 148	/	3238 ± 174	/
400	1547 ± 166 *	- 29 *	5340 ± 117 **	+ 65 **

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3.3.4.4. Effet inducteur du sommeil d'E. californica apres traitement d'une faible dose de pentobarbital sodique

La figure 29 montre que le nébulisat d'E. californica administré par voie IP en traitement unique 30 minutes avant l'administration du barbiturique, à la dose de 400 mg/Kg induit le sommeil chez 100 % des souris traitées avec une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg).

Avec une benzodiazépine de référence : le clorazépate dipotassique (Tranxène ®) l'induction du sommeil est partielle (60 %) à la dose de 5 mg/Kg, alors qu'elle est complète (100 %) à 20mg/Kg (Fig. 29).



E. CALIFORNICA

CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE

• P < 0.05

*** P < 0.001

Fig. 29 - ACTION D'E. CALIFORNICA ET DU CLORAZEPATE SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES ADMINISTRATION D'UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL SODIQUE.

3.3.5. Discussion

Sur le temps de sommeil induit par le barbiturique, le nébulisat d'E. californica produit une potentialisation à partir de la dose de 100 mg/Kg, qui est dose dépendante jusqu'à 800 mg/Kg (Fig.27 et Tableau 15). Le nébulisat d'E. californica produit une diminution du temps d'endormissement à forte dose (300 mg/Kg et 800 mg/Kg, Tableau 14) chez les souris traitées au pentobarbital sodique (40 mg/Kg) par voie IP.

Cette action sur le sommeil induit par le pentobarbital sodique est encore plus nette lorsque les animaux sont prétraités avec E. californica plusieurs jours avant l'injection du barbiturique (Fig. 28 et Tableau 16), puisque la potentialisation est significative dès la dose de 10 mg/Kg. Mais lorsque la dose augmente les différences, observées dans les deux protocoles de prétraitement, diminuent pour s'annuler à la dose de 800 mg/Kg (Fig. 31).

Il est indéniable qu'E. californica potentialise la narcose barbiturique et les deux expériences que nous avons réalisées le prouvent. De plus, ce végétal est capable d'induire, à la dose de 400 mg/Kg, le sommeil des animaux traités avec une dose infra-hypnotique de pentobarbital (Fig. 29), et cet effet est comparable à celui d'un tranquillisant de la famille des benzodiazépines : le clorazépate administré à la dose de 20 mg/Kg (Fig. 29). Ce qui confirme les observations faites au niveau du comportement de la souris qui plaident en faveur de l'existence chez E. californica de propriétés psychotropes du type de celles des tranquillisants mineurs.

Cependant, comme le pentobarbital est dégradé au niveau du foie par le système NADPH-cytochrome P 450 reductase-cytochrome P 450, il est donc concevable qu'E. californica, en potentialisant la narcose due au pentobarbital, puisse agir soit au niveau du système nerveux central par action directe sur les centres récepteurs, soit au niveau du foie par modification de la cinétique de la pénétration, ou du métabolisme du pentobarbital ou inhibition des systèmes enzymatiques catabolisant le barbiturique.

Selon Siest et coll. (1981), nous savons que les inducteurs ou les inhibiteurs enzymatiques agissent principalement sur le cytochrome P 450, sur les fonctions mono-oxygénases mixtes, sur les hydrolases epoxides et sur les NADP glucuronyltransferases. Une inhibition enzymatique du cytochrome P 450 par un prétraitement de 6 jours aurait pour conséquence la diminution du catabolisme du pentobarbital et donc un temps de sommeil plus important.

Ainsi l'augmentation du temps de sommeil consécutive à un prétraitement d'E. californica de 6 jours, 3 jours, 1 jour et 30 minutes en comparaison au temps de sommeil obtenu après un prétraitement unique de 30 minutes, laisserait à penser qu'E. californica ait un site d'action au niveau du foie.

Toutefois, on a mis en évidence (Tableau 17) le fait qu'E. californica à la dose de 400 mg/Kg diminue le temps d'endormissement et augmente le temps de sommeil des animaux lorsque l'extrait de plante est administré par voie IP, 30 minutes avant l'administration également par voie IP d'un barbiturique non métabolisé par le foie, à savoir le barbital. Ce résultat nous permet de rejetter l'hypothèse d'une interaction au niveau hépatocytaire comme seul mécanisme d'action mais, au contraire, on peut suggérer qu'E. californica a principalement une action sur les sites récepteurs du système nerveux central. Pour valoriser notre démarche, ce résultat peut être opposé à celui obtenu avec une autre plante, botaniquement différente. En effet, il a été démontré dans notre laboratoire qu'une plante, originaire du Yémen, Crepis rueppellii, dont l'activité hépatotrope a été démontrée (Lanhers et coll., 1986 ; Fleurentin et coll., 1986), potentialise l'hypnose au pentobarbital sans modifier l'hypnose au barbital. Cette activité différenciée a été expliquée par une action probable au niveau hépatique sur la cinétique de biotransformation du pentobarbital ou sur la perméabilité membranaire des hépatocytes (Fleurentin, 1983).

Ces deux résultats opposés montrent bien le pouvoir discriminant de ce test par rapport au site d'action d'un extrait lorsque l'on utilise le pentobarbital sodique et le barbital comme hypnotiques.

Dans ces conditions, E. californica pourrait agir à un niveau commun des deux barbituriques, qui interviendrait dans le mécanisme du sommeil et qui se situerait, soit au niveau du système Gaba, soit au niveau de la libération ou de la recapture des neurotransmetteurs, comme l'acétylcholine, la nor-adrénaline, la dopamine ou la sérotonine, soit une juxtaposition de ces deux phénomènes.

L'augmentation des effets des deux barbituriques par l'extrait végétal peut être rapprochée de celle induite par l'iproniazide, l'imipramine (antidépresseur), la clonidine et la L-DOPA (substances agissant sur les systèmes nor-adrénergiques ou dopaminergiques), le diazépam, le clobazam (benzodiazépines), le L' hydroxytryptamine, le fenfluramine (substances agissant sur le système sérotoninergique) et la chlorpromazine (neuroleptique) (Simon et coll., 1982).

La potentialisation de l'hypnose au pentobarbital sodique et au barbital, ainsi que l'induction du sommeil après l'administration d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique, confirme les résultats précédemment obtenus avec les tests comportementaux, à savoir que le nébulisat d'E. californica présente un effet sédatif à forte dose (100 mg/Kg et plus). Les tests comportementaux ont également montré un effet anxiolytique à faible dose. Le profil de l'activité psychotrope du nébulisat d'E. californica semble donc s'apparenter à celui des tranquillisants mineurs classiques : les benzodiazépines. Toutefois, des substances appartenant à d'autres classes pharmacologiques que les tranquillisants mineurs sont connues pour présenter des effets sédatifs et/ou anxiolytiques. C'est le cas des neuroleptiques, de la plupart des antidépresseurs, des anti-histaminiques, des barbituriques à faibles doses, des analgésiques (Boissier et coll., 1968 ; Giroud, 1979 ; Rambert, 1986).

Ainsi, dans différents protocoles classiques de la pharmacologie expérimentale, nous avons recherché chez E. californica l'existence d'effets antihistaminiques, neuleptiques, antidépresseurs et analgésiques.

4. RECHERCHE D'UN EFFET NEUROLEPTIQUE

Les neuroleptiques sont des médicaments qui réduisent les psychoses aiguës et chroniques. Ce sont des dépresseurs du système nerveux central et en particulier de la formation réticulée ascendante méso-diencéphalique. Il s'agit de la réserpine, des phénothiazines, dont le chef de file est la chlorpromazine qui a été le premier neuroleptique utilisé, ainsi que l'halopéridol. Les neuroleptiques diminuent l'activité spontanée et l'agressivité des animaux sans effet hypnotique. Ils suppriment également les réflexes conditionnés et les réactions végétatives émotionnelles. Ils induisent une sédation à faible dose et une catatonie, avec conservation des attitudes acquises, à forte dose en inhibant l'activité du système dopaminergique. Il s'est avéré opportun de vérifier si les propriétés sédatives d'E. californica pouvaient s'opposer à un effet neuroleptique. Par ailleurs, les neuroleptiques sont hypothermisants par une action directe sur les centres régulateurs hypothalamiques. Au niveau du système nerveux autonome, les neuroleptiques sont adrénolytiques, inversant les actions tensionnelles de l'adrénaline ; ce qui se traduit par une forte hypotension renforcée par une diminution de la résistance vasculaire périphérique due à une action sur les fibres musculaires lisses.

La réserpine provoque une diminution de la concentration de 5 hydroxytryptamine et de catécholamine de l'organisme.

Les neuroleptiques ont un effet anti-dopaminergique en vidant le neuromédiateur (dopamine) des vésicules post-synaptiques, soit par inhibition du mécanisme de recaptage de la dopamine ATP-Mg^{++} dépendant (la réserpine), soit en bloquant les récepteurs post-synaptiques (phénothiazine, butyrophénone, réserpine). Nous pouvons mettre en évidence cet effet antidopaminergique par deux protocoles différents. D'une part, par la recherche d'un effet cataleptique représentant les effets secondaires extrapyramidaux dus à l'action des neuroleptiques sur la voie dopaminergique nigronéostriatale, et d'autre part, par la recherche d'un antagonisme des effets d'une substance stimulant les récepteurs dopaminergiques, comme l'amphétamine.

4.1. RECHERCHE D'UN EFFET CATALEPTIQUE ET HYPOTHERMIQUE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA

Administrés à fortes doses pendant une longue période, les neuroleptiques bloquent les récepteurs post-synaptiques de la voie dopaminergique nigronéostriatale, impliquée dans la motricité involontaire, ce qui a pour conséquence d'entraîner chez l'homme des troubles neurologiques de type extra-pyramidal dus à une exacerbation du système cholinergique, qui se manifestent par des tremblements intenses lors de mouvements volontaires. En effet, dans les noyaux gris centraux, la voie cholinergique est en équilibre avec la voie dopaminergique. Aussi, une inhibition de la voie dopaminergique entraîne-elle indirectement une stimulation de la voie cholinergique. Chez l'animal, la catalepsie est souvent considérée comme l'équivalence expérimentale des troubles extra-pyramidaux de l'homme.

4.1.1. Matériel et Méthodes

4.1.1.1. Les animaux

Il s'agit de rats mâles OFA (Iffa Credo, l'Arbresle) d'un poids moyen de 200 grammes dont la description, les conditions d'élevage et la nourriture sont décrites au § 1.2.1.

4.1.1.2. Protocole expérimental

Deux lots de 10 rats reçoivent une administration d'E. californica par voie IP aux doses de 200 ou 800 mg/Kg (0,5 ml/50 g) 30 minutes avant le test. Un lot témoin reçoit par voie IP du NaCl 0,9 % et un autre lot reçoit un neuroleptique de référence, la chlorpromazine (Largactil ®, Ciba-Geigy) à une dose voisine de la DE 50 (20 mg/Kg) dans les mêmes conditions :

- **La température rectale** est mesurée par une sonde thermique de précision (1/10 degrés C) couplée à un galvanomètre, avant l'injection d'E. californica, 20 minutes après, puis toutes les heures pendant 7 heures. Une dernière prise de température est réalisée 24 heures après la première injection.

- **L'appréciation de la catalepsie** est réalisée après chaque prise de température selon 5 méthodes effectuées dans l'ordre suivant :

a) **Croisement des pattes homolatérales**

La catalepsie est considérée comme positive lorsque l'animal accepte et conserve le croisement de ses pattes antérieures avec ses pattes postérieures homolatérales sans distinction de temps.

b) **Méthode du pilier**

La catalepsie est positive si le rat accepte de conserver une de ses pattes antérieures sur un pilier de 3 cm de hauteur pendant 10 secondes.

c) **Méthode du bouddha**

Si le rat est en catalepsie, il doit accepter une position assise sur le train postérieur avec le tronc légèrement voûté qui lui est imposé.

d) **Méthode des 4 bouchons**

En état de catalepsie, un rat doit accepter une position de telle façon que ses quatre pattes reposent sur quatre bouchons de 25 mm de hauteur et 32 mm de diamètre, placés aux quatre coins d'un rectangle de 85 mm de largeur et 135 mm de longueur.

e) **Méthode des barres asymétriques**

Deux tiges métalliques sont tendues entre deux piliers à 3 cm de hauteur et entre deux piliers à 11 cm de hauteur. Les deux tiges sont alors distantes de 14 cm. Un rat en état de catalepsie peut rester immobile pendant au moins 10 secondes avec ses pattes antérieures reposant sur la tige la plus haute et avec ses pattes postérieures reposant sur l'autre tige.

4.1.1.3. Analyses statistiques

Les pourcentages d'animaux traités présentant un effet positif aux différents tests sont comparés à ceux des animaux témoins au moyen du test du X^2 . Les moyennes des températures des animaux traités sont comparées à celles des animaux témoins au moyen du test "t" de Student après vérification de l'homogénéité des variances.

4.1.2. Résultats

Le tableau 18 qui regroupe les pourcentages d'animaux présentant un effet positif aux cinq méthodes d'évaluation de la catalepsie montre qu'E. californica ne présente pas d'effet cataleptique aux doses de 200 et 800 mg/Kg, à la différence du neuroleptique de référence (chlorpromazine, 20 mg/Kg) qui présente des réponses comprises entre 50 et 100 % dans les cinq méthodes, à l'exception de la méthode du croisement des pattes homolatérales où à la 7ème heure seulement 25 % des animaux répondent positivement au test.

La figure 30 montre l'évolution de la température corporelle des rats traités avec E. californica (200 ou 800 mg/Kg) et des rats traités avec la chlorpromazine (20 mg/Kg) en fonction du temps, et cela pendant 24 heures. On constate que la température corporelle des animaux traités avec le neuroleptique (20 mg/Kg) diminue continuellement de la première à la troisième heure, l'hypothermie se maintient jusqu'à la septième heure et peut être au-delà ; puis revient à la valeur de base après 24 heures. Par contre, la température corporelle des animaux traités avec E. californica à la dose de 200 mg/Kg diminue légèrement (- 1,4° C) pendant la première heure, puis revient à la normale dès la deuxième heure et augmente régulièrement en fonction du temps jusqu'à la septième heure. A 800 mg/Kg, on observe une faible (- 0,8° C) et fugace hypothermie (2 h) par rapport à celle obtenue avec la chlorpromazine qui se prolonge (- 4° C, supérieur à 7 heures). La légère, mais régulière, élévation de température après la quatrième heure et la baisse de cette température entre la sixième et la vingt-quatrième heure s'expliquent par les variations du cycle nyctéméral en accord avec la littérature (Rolland, 1984). En effet, l'expérience a débuté en fin de matinée (11 h 30) alors que les animaux sont en phase diurne, et s'est terminée le soir lorsque la lumière s'est éteinte.

D'après ces résultats, E. californica ne présente pas d'effet antidopaminergique, donc neuroleptique. Cette absence d'activité doit être vérifiée par la recherche d'une interaction des effets de l'amphétamine.

TABLEAU 18 - EFFET CATALEPTIQUE DE LA CHLORPROMAZINE (20 mg/Kg) ET D'E. CALIFORNICA A 200 ET 800 mg/Kg CHEZ LE RAT.

SUBSTANCES mg/Kg	METHODES	POURCENTAGE DE RATS PRESENTANT UN EFFET POSITIF							
		HEURES							
		0,5	1	2	3	4	5	6	7
CHLORPROMAZINE 20	a	75	100	100	100	75	50	50	25
	b	100	100	100	100	100	100	100	100
	c	100	100	100	100	100	100	75	75
	d	100	100	100	100	100	100	100	75
	e	50	50	75	75	100	75	50	100
E. CALIFORNICA 200	a b c d e	NEGATIF POUR 100 % DES ANIMAUX							
E. CALIFORNICA 800	a b c d e	NEGATIF POUR 100 % DES ANIMAUX							

DIFFERENTS PARAMETRES ENREGISTRES :

a : CROISSEMENT DES PATTES HOMOLATERALES
b : PATTES SUR PILIER DE 3 cm N = 6
c : BOUDDHA
d : 4 BOUCHONS
e : BARRES ASYMETRIQUES

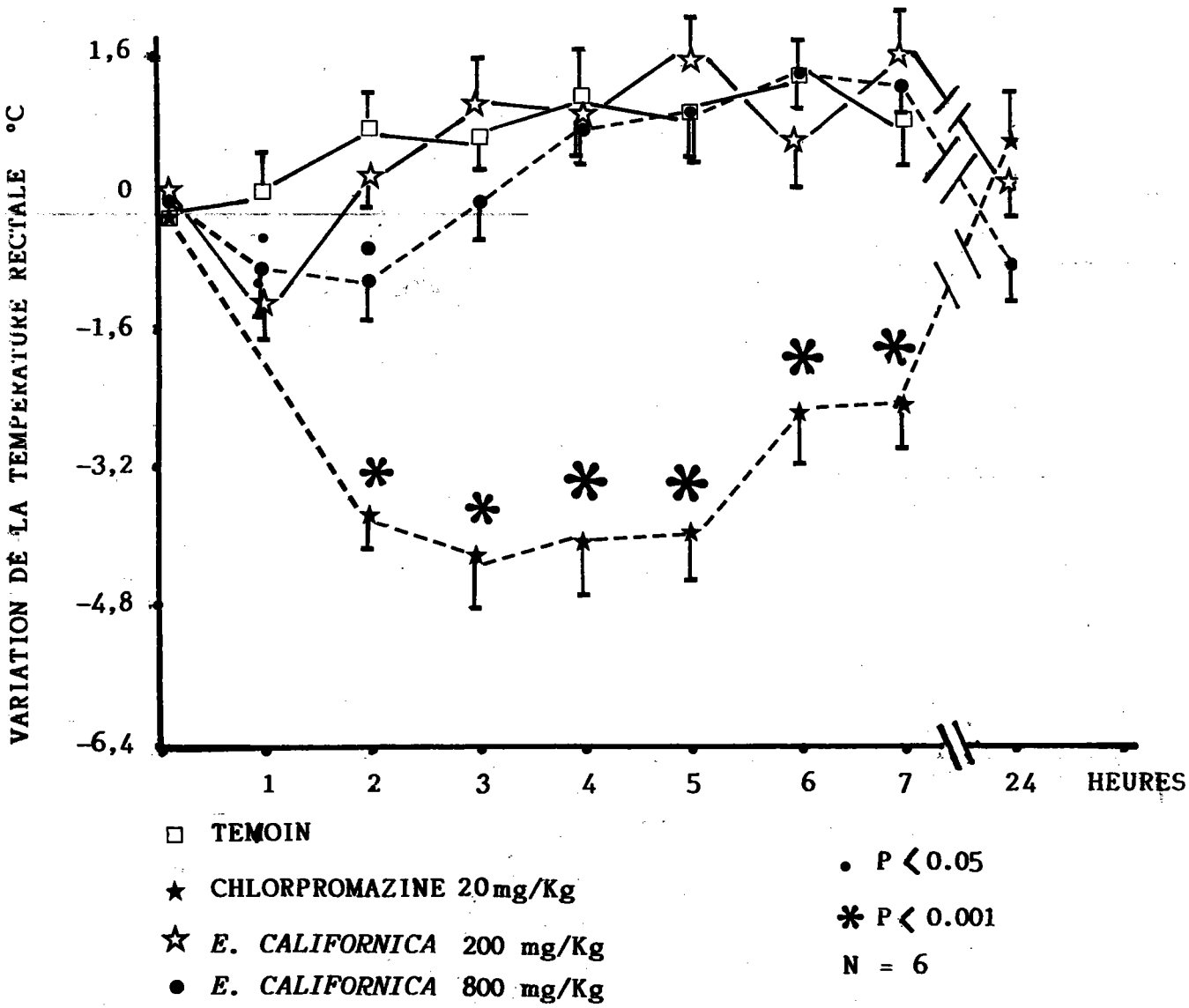


Fig. 30- EVOLUTION DE LA TEMPERATURE CORPORELLE DES RATS APRES ADMINISTRATION PAR VOIE IP D'*E. CALIFORNICA* ET DE CHLORPROMAZINE.

4.2. RECHERCHE D'UNE INTERACTION D'E. CALIFORNICA AVEC L'AMPHETAMINE

4.2.1. Introduction

L'amphétamine appartient à la classe pharmacologique des thymoanaleptiques. Les substances amphétaminiques SONT EN étroite relation avec les fonctions cérébrales des amines biogènes et principalement avec deux catécholamines : la dopamine et la noradrénaline, qu'elles libèrent des vésicules de stockage. Cet effet a pour conséquence d'induire chez l'animal, à forte et moyenne doses, une stimulation du système nerveux central se traduisant par une augmentation de l'activité locomotrice, souvent accompagnée de mouvements stéréotypés (Costa et coll., 1972 ; Samanin et coll., 1972), et une stimulation de l'humeur sans avoir de propriétés anti- dépressives vraies (Lapierre et coll., 1979). Par contre, à faible dose, l'amphétamine diminue le pouvoir exploratoire des souris (Misslin et coll., 1981, 1983).

Les neuroleptiques, qui inhibent le recaptage de la dopamine ou qui bloquent les récepteurs dopaminergiques post-synaptiques peuvent antagoniser sélectivement les effets comportementaux des agonistes dopaminergiques, comme l'amphétamine (Misslin et coll., 1984). Par ailleurs, des substances à action stimulante, apparentées aux amphétamines, qui libèrent des catécholamines dont la dopamine, et certaines substances anticholinergiques, sérotoninergiques ou antidepressives peuvent au contraire stimuler les stéréotypies induites par l'amphétamine. Cet effet a également était observé avec plusieurs benzodiazépines (Babbini et coll., 1971 ; Treit, 1985).

Si E. californica présente des effets neuroleptiques ou antidépresseurs, on doit obtenir un antagonisme ou une potentialisation des effets de l'amphétamine. Pour cela, nous avons réalisé 3 expérimentations dont le but est d'objectiver un éventuel effet d'E. californica sur les voies dopaminergiques.

- **Dans une première expérience** nous avons recherché un effet d'E. californica sur la toxicité de groupe induite par l'amphétamine.

  L'amphétamine provoque, à des doses infra léthales chez les souris groupées, une toxicité importante évaluée par le pourcentage de mortalité des animaux (Lapin, 1962 ; Boissier et coll. 1971). Ainsi les neuroleptiques, en inhibant la libération et le stockage de la dopamine, présentent un effet protecteur. Par contre les thymoanaleptiques qui favorisent la libération de dopamine, et donc en stimulant directement ou indirectement les récepteurs dopaminergiques, potentialisent ainsi les effets toxiques de l'amphétamine.

- **Dans une deuxième expérience,** nous avons recherché un effet d'E. californica sur la préférence néotique et la locomotion chez les animaux traités avec de la méthamphétamine. On sait que l'amphétamine à faible dose (1 mg/Kg) présente une action inhibitrice sur la préférence néotique (Misslin et coll., 1981, 1983). Certaines substances, comme les neuroleptiques sont capables d'inhiber cette action de l'amphétamine (Misslin et coll., 1983).

- **Dans une troisième expérience,** nous avons recherché l'influence d'E. californica sur les stéréotypies induites par le tartrate d'amphétamine.

L'amphétamine, à la dose de 5 ou 10 mg/Kg, a la propriété d'induire chez le rat des mouvements anormaux et répétitifs que l'on appelle stéréotypies, par stimulation directe ou indirecte des récepteurs dopaminergiques centraux (Samanin et coll., 1977). Après administration de l'amphétamine, le rat présente des mouvements rapides de la tête (hochements, déplacements latéraux et en triangle, reniflements), de la sphère buccale (rongements, morsures des parois de la cage, mâchonnements de la litière et léchage) et des pattes antérieures. A plus fortes doses, ce comportement s'accompagne d'une hypersalivation. Les neuroleptiques et les parasympathomimétiques sont capables d'inhiber les stéréotypies, par contre les antidépresseurs et les benzodiazépines potentialisent ces effets (Babbini et coll., 1971 ; Boissier et coll., 1971 ; Treit, 1985 ; Rambert et coll., 1986).

4.2.2. Matériel et méthodes

4.2.2.1. Les animaux

Nous avons utilisé soit des souris mâles (J) (test de toxicité), soit des souris mâles (L) (test de la préférence néotique), soit encore des rats mâles OFA (Iffa-Credo, L'Abresle, France) d'un poids moyen de 280 grammes (test d'évaluation des stéréotypies induites par la dexamphétamine). Les conditions d'élevage et l'alimentation sont décrites dans le § 1.2.1.

4.2.2.2. Protocoles expérimentaux et tests statistiques

a) Recherche d'un effet d'E. californica sur la toxicité de groupe induite par le tartrate d'amphétamine

La technique est inspirée des méthodes de Boissier et coll. (1972) et de Gouret et coll. (1973).

Un premier lot de 10 souris (J), chacune isolée dans une cage standard en macrolon (24 x 11 x 10 cm) à une température de 24° C ± 1° C, reçoit par voie IP, 30 minutes avant l'injection de tartrate d'amphétamine (Maxiton®, Delagrange, France) (40 mg/Kg ; 0,5 ml/50 g) une solution de NaCl 0,9 % . Ce lot témoin nous permet de vérifier que la dose utilisée d'amphétamine n'est pas toxique pour les animaux isolés.

Trois autres lots de 10 souris (J) sont alors constitués et les 10 animaux d'un même lot sont maintenus groupés dans une même cage standard en macrolon (24 x 11 x 10 cm) à la température de 24° C ± 1° C. Deux lots traités reçoivent par voie IP, 30 minutes avant l'injection de tartrate d'amphétamine (Maxiton®, Delagrange, France) (40 mg/Kg ; 0,5 ml/50 g, voie IP) l'extrait nébulisé d'E. californica à la dose pour l'un de 25 mg/Kg et pour l'autre de 400 mg/Kg (0,5 ml/50 g). Un lot témoin reçoit une solution de NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions.

La mortalité est relevée 4 heures après l'injection d'amphétamine, les pourcentages de mortalité des lots traités sont comparés aux pourcentages de mortalité des lots témoins au moyen du test du X^2 .

b) Recherche d'un effet d'E. californica sur la préférence néotique et la locomotion chez les animaux traités avec la méthamphétamine

Nous avons utilisé le test de l'exploration décrit au § 3.1.2.2.

Une heure avant le test, quatre lots de 10 souris (L) reçoivent par voie IP, soit une solution saline à 0,9 %, soit une solution de nébulisat d'E. californica aux doses de 25, 75 ou 150 mg/Kg. Une demi-heure plus tard, ils reçoivent une solution de méthamphétamine à la dose de 1 mg/Kg.

Un lot témoin reçoit deux fois du NaCl à 0,9 % dans les mêmes conditions.

Au moment du test, la locomotion et la préférence néotique sont enregistrées(cf. § 3.1.2.2.).

Les moyennes des unités franchies (locomotion) des lots traités sont comparées statistiquement à ceux des lots témoins par le test F de l'analyse de variance, puis les comparaisons deux à deux sont réalisées par le test de comparaison multiple de Duncan. La préférence pour le milieu nouveau des différents lots est analysée statistiquement par le test du signe.

c) Recherche d'une influence d'E. californica sur les stéréotypies induites par le tartrate d'amphétamine

La technique est inspirée des protocoles expérimentaux de Malliwell et coll. (1964), Boissier et coll. (1971 a et 1971 b), Simon et Charmat (1972), Simon et Boissier (1974), Worms et coll. (1986). Une étude préliminaire nous a permis de choisir une dose de tartrate d'amphétamine de 5 mg/Kg.

Deux lots de 4 rats reçoivent du nébulisat d'E. californica par voie I.P. aux doses de 200 ou 800 mg/Kg (1 ml/100 g), 30 minutes avant l'administration de tartrate d'amphétamine (Maxiton ®, Delagrange, France) par voie I.P. à la dose de 5 mg/Kg (1 ml/100 g). Un lot témoin de 4 rats reçoit du NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions. Et, pour vérifier l'effet inhibiteur sur les stéréotypies d'un neuroleptique, un lot témoin de 4 rats reçoit de la chlorpromazine (Largactil ®, Ciba-Geigy) à la dose de 20 mg/Kg.

Après injection de tartrate d'amphétamine, les animaux sont placés en cage individuelle et les observations sont relevées toutes les 10 minutes pendant 210 minutes.

Les observations sont relevées selon la cotation de Simon (Simon et coll., 1972, 1974) ; on attribue les coefficients suivants :

- **0** pour l'absence de mouvement stéréotypé et de tout mouvement anormal,
- **1** lorsque l'on peut observer de rares mouvements stéréotypés ou un reniflement presque continu, la tête du rat étant dirigée vers le haut,

- 2 lorsque l'on peut observer des reniflements intenses avec mouvements saccadés et rapides de la tête, parfois interrompus par de courtes phases de mâchonnement,

- 3 lorsque l'on peut observer des mouvements stéréotypés intenses (mâchonnements, léchage souvent accompagnés de mouvements répétés des pattes antérieures contre la paroi).

La valeur cumulée des indices de stéréotypie de chacun des lots traités est comparée à celle du lot témoin au moyen du test non paramétrique de Mann Whitney.

4.2.3. Résultats

4.2.3.1. Recherche d'un effet d'E. californica sur la toxicité de groupe induite par le tartrate d'amphétamine chez le rat

Les résultats sont présentés dans le tableau 19. On constate qu'à 40 mg/Kg, le tartrate d'amphétamine ne provoque que 20 % de mortalité lorsque les animaux sont isolés dans les cages, alors qu'elle induit 100 % de mortalité lorsque les animaux sont groupés. Qu'ils reçoivent ou non un prétraitement par E. californica aux doses de 25 et de 400 mg/Kg ne modifie pas la toxicité de groupe induite par l'amphétamine.

TABLEAU 19 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LA TOXICITE DE GROUPE INDUITE PAR LE TARTRATE D'AMPHETAMINE

N = 10

	E. CALIFORNICA mg/Kg	MORTALITE %
ANIMAUX ISOLES	0	20 %
ANIMAUX GROUPES	0	100 ***
	25	100 ***
	400	100 ***

*** $P < 0.001$

4.2.3.2. Recherche d'un effet du nébulisat d'E. californica sur la préférence néotique et la locomotion chez les animaux traités avec la méthamphétamine

Les résultats sont représentés dans la figure 31.

On constate que la méthamphétamine entraîne une réduction significative de la préférence néotique, mais qu'elle n'affecte pas le niveau de la locomotion chez les animaux préalablement traités avec une solution de NaCl 0,9 % .

Ceci reste vrai aussi chez les souris traitées avec les doses d'E. californica de 25 et 75 mg/Kg ; par contre lorsque cette dose est de 150 mg/Kg, on observe une réduction significative de la locomotion.

4.2.3.3. Recherche d'une effet du nébulisat d'E. californica sur les stéréotypies induites par le tartrate d'amphétamine

Dans le tableau 20, nous avons représenté la valeur cumulée des indices de stéréotypie relevés pour l'ensemble des quatre rats pendant toute la durée du test, c'est-à-dire 210 minutes et cela pour chacun des trois lots traités et pour le lot témoin. On constate que la chlorpromazine, comme le mentionne la littérature sur les neuroleptiques (Simon et coll., 1972, 1974), antagonise les stéréotypies induites par le tartrate d'amphétamine (- 38 %).

Par contre, l'extrait d'E. californica potentialise les stéréotypies à la dose de 200 mg/Kg (+ 68 %) et à la dose de 800 mg/Kg (+ 78 %).

Si l'on représente les indices de stéréotypie tels qu'ils apparaissent toutes les 10 minutes pendant 210 minutes (Figure 32), plusieurs remarques peuvent être effectuées :

- Les stéréotypies des rats témoins débutent dès la 10ème minute et présentent un maximum à 70 minutes après l'administration de tartrate d'amphétamine pour disparaître à la 140ème minute.

- Si l'on administre en prévention (- 30 minutes) un neuroleptique comme la chlorpromazine, les stéréotypies sont totalement supprimées pendant les 30 premières minutes du test, puis réapparaissent et présentent un niveau maximal à la 70 ème minute. Ce score est de moitié par rapport à celui enregistré pour les animaux témoins. Le nombre de stéréotypies demeure très faible jusqu'à la fin du test.

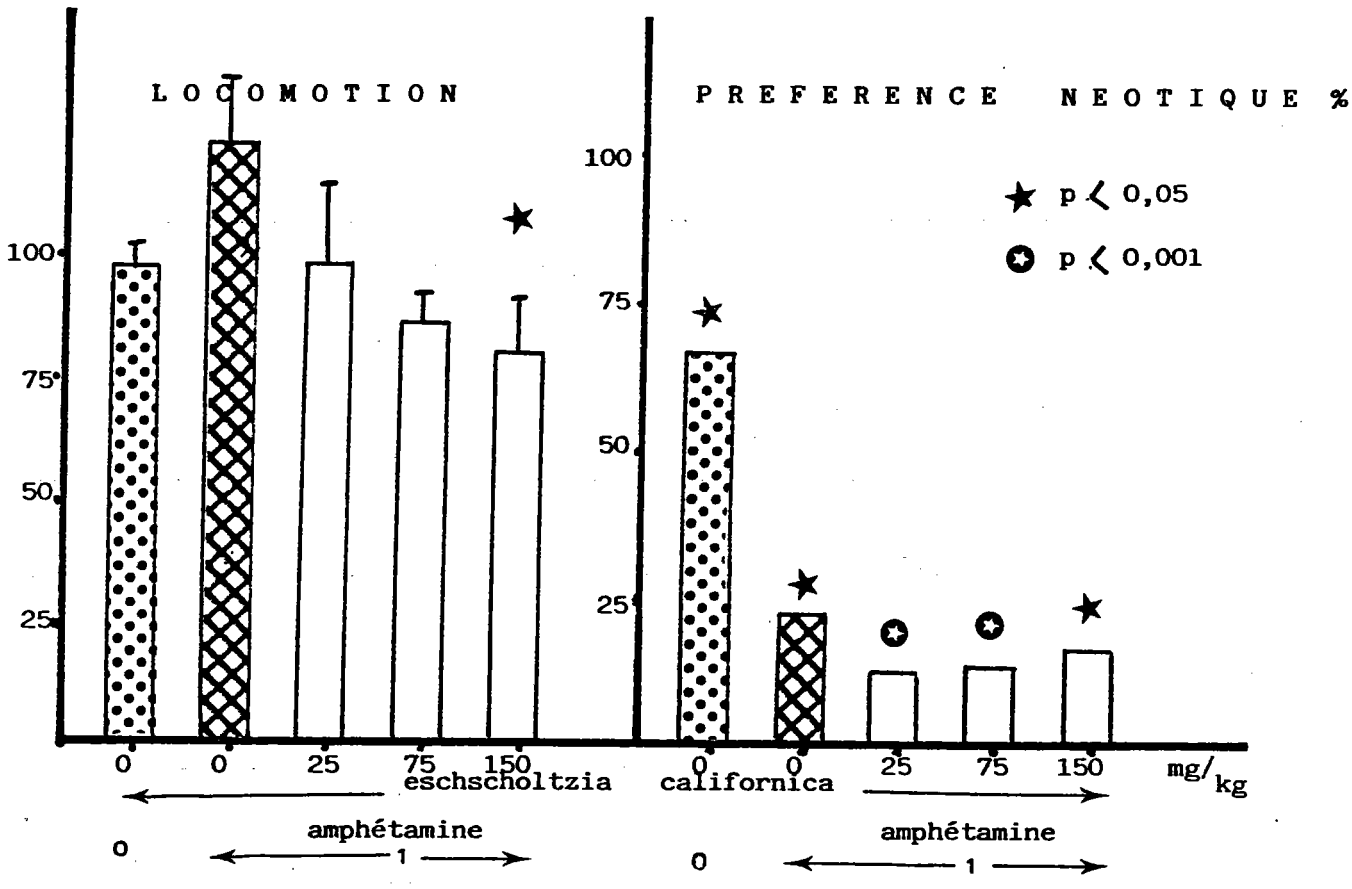


Fig. 31 - Effets de la méthamphétamine sur la préférence néotique et la locomotion chez des animaux traités avec E. californica. En abscisses figurent les doses des substances injectées, en ordonnées les performances. La préférence néotique est exprimée en pourcentages de préférence du milieu nouveau, la locomotion en moyennes et erreurs-types d'unités franchies. n = 10.

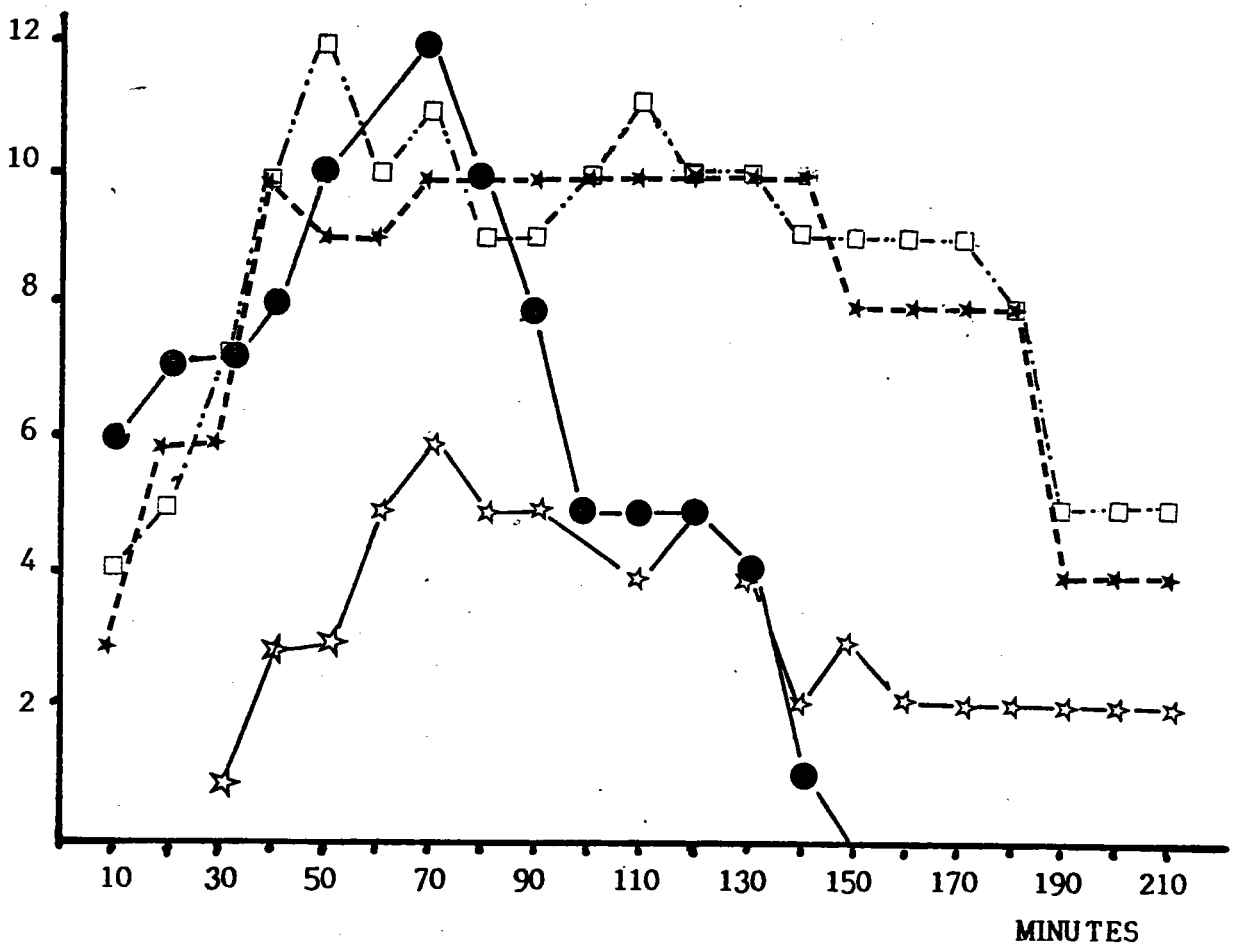
TABLEAU 20 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LES STEREOTYPIES INDUITES PAR LE TARTRATE D'AMPHETAMINE. LES VALEURS DE L'INDICE DE STEREOTYPIE REPRESENTENT LE CUMUL DES VALEURS OBTENUES POUR LES QUATRE RATS ET PENDANT 210 MINUTES

N = 4

CHLORPROMAZINE mg/Kg	E. CALIFORNICA mg/Kg	TARTRATE D' AMPHETAMINE mg/Kg	INDICE DE STEREOTYPIE CUMULEE 210 MINUTES	VARIATION %
0	0	5	99	/
20	0	5	62 **	- 38 %
0	200	5	167 **	+ 68 %
0	800	5	177 ***	+ 78 %

** $P < 0,01$

*** $P < 0,001$



● TEMOIN NaCL 0,9 %

☆ CHLORPROMAZINE 20 mg/Kg

✶ E. CALIFORNICA 200 mg/Kg

□ E. CALIFORNICA 800 mg/Kg

N = 4

Fig. 32 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA ET DE LA CHLORPROMAZINE SUR LES STEREOTYPIES INDUITES PAR LE TARTRATE D'AMPHETAMINE CHEZ LE RAT.

- Après l'administration préventive (- 30 minutes) d'E. californica aux doses de 200 et 800 mg/Kg, les stéréotypies induites par le tartrate d'amphétamine sont potentialisées, car elles présentent un niveau maximal qui apparaît avant celui du témoin de tartrate d'amphétamine (40ème et 50ème minutes), mais surtout en raison de la prolongation de l'effet du tartrate d'amphétamine qui persiste à un niveau élevé jusqu'à la 190ème minute.

L'ensemble de ces résultats tend donc à montrer qu'E. californica ne présente pas d'effet neuroleptique car il ne s'oppose pas aux stéréotypies induites par l'amphétamine.

4.3. DISCUSSION

E. californica ne présente aucun effet cataleptique à 200 et 800 mg/Kg et l'hypothermie induite par l'administration des extraits est très faible par comparaison à un neuroleptique de référence.

A faible dose (25 mg/Kg) et à forte dose (400 mg/Kg), E. californica ne présente aucun effet protecteur vis à vis de la toxicité de groupe induite par le tartrate d'amphétamine (Tableau 19).

Dans la deuxième expérience concernant la préférence néotique (Fig. 31), E. californica n'a pas présenté d'effet neuroleptique puisque nous n'avons pas observé d'effets antagonistes à l'encontre de l'action inhibitrice de la méthamphétamine sur la préférence néotique. De plus, nous retrouvons l'effet sédatif propre de l'extrait à 150 mg/Kg sur l'activité locomotrice des animaux alors que l'amphétamine à 1 mg/Kg est sans effet.

A l'encontre des stéréotypies induites par le tartrate d'amphétamine, le nébulisat d'E. californica dans la troisième expérience n'a pas montré d'effet protecteur aux doses de 200 et 800 mg/Kg (Fig. 32 et Tableau 20), alors qu'un neuroleptique de référence, la chlorpromazine, a antagonisé les stéréotypies à la dose de 20 mg/Kg (- 38 %, Tableau 20).

Ces résultats concordent pour montrer qu'E. californica ne présente pas d'effets neuroleptiques et, par conséquent, pas d'effets sur les terminaisons dopaminergiques. Toutefois, si E. californica n'antagonise pas les stéréotypies amphétaminiques, il les accroît et surtout, il prolonge l'effet aux doses de 200 et 800 mg/Kg (Fig. 32).

Ce résultat est en accord avec la littérature puisqu'un effet similaire a été obtenu non seulement avec les antidépresseurs (Schmitt et coll., 1966 ; Boissier et coll., 1971, 1972), mais aussi avec les benzodiazépines (Babbini et coll., 1971 ; Treit, 1985).

D'autre part, des expérimentations similaires effectuées avec une autre espèce botanique, E. hirta, dont on a montré dans notre laboratoire ses propriétés sédatives, ont donné des résultats semblables, bien que la potentialisation des stéréotypies soit moins importante qu'avec E. californica.

L'ensemble de ces résultats tend à démontrer qu'E. californica ne présente pas d'effet neuroleptique propre et que les effets sédatifs mis en évidence mettent en cause un autre mécanisme d'action que celui des systèmes dopaminergiques.

5. RECHERCHE D'UN EFFET ANTIDEPRESSEUR

Les antidépresseurs sont des médicaments qui stimulent l'humeur lorsqu'elle est déprimée ; ils renforcent le système adrénergique des catécholamines en s'opposant, soit au recaptage au niveau de la synapse (nor-adrénaline, dopamine) (dérivés tricycliques), soit au catabolisme de la nor-adrénaline (IMAO). Certains antidépresseurs sont plus spécifiques de la dopamine ou de la sérotonine que de la nor-adrénaline.

Certains antidépresseurs présentent des propriétés sédatives (amitryptilline), d'autres des activités anxiolytiques. Aussi avons-nous recherché si les extraits d'E. californica possèdaient une activité pharmacologique pouvant s'apparenter aux antidépresseurs.

Par leur action, les antidépresseurs s'opposent aux propriétés des neuroleptiques et des cholinergiques ; aussi deux tests pharmacologiques seront mis en oeuvre : un test permettant la mise en évidence d'un effet antagoniste vis à vis de la réserpine, et un autre test déterminant un effet antagoniste vis à vis d'un cholinergique : l'oxotrémorine.

5.1. RECHERCHE D'UNE INFLUENCE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA SUR L'HYPOTHERMIE, LE PTOSIS ET L'AKINESIE INDUITE PAR LA RESERPINE

5.1.1. Introduction

La réserpine a la propriété d'induire chez la souris une baisse importante de la température corporelle, un ptosis et une akinésie. L'effet maximal de l'hypothermie est obtenu après 17 heures (Graid, 1980).

Le test à la réserpine, visant à démontrer un effet antagoniste des trois symptomes induits par le neuroleptique, est considéré comme étant un modèle pharmacologique important pour mettre en évidence un effet antidépresseur (Boissier et coll., 1971, 1972 ; Gouret et coll., 1973 ; Bourin et coll., 1981 ; Worms et coll., 1986 ; Porsolt et coll., 1987).

La littérature montre qu'en réalité ce test met en évidence trois mécanismes d'action différents (Bourin et coll., 1983 ; Rambert et coll., 1986) :

- L'antagonisme à l'hypothermie met en évidence des propriétés β mimétiques directes ou indirectes, induites le plus souvent avec les antidépresseurs ;

- L'antagonisme de la ptose met en évidence une action adrénergique ou une action sérotoninergique (possible avec les antidépresseurs) :

- L'antagonisme de l'akinésie met en évidence une action dopaminergique directe ou indirecte, rencontrée pour les antidépresseurs ayant un effet psychostimulant.

5.1.2. Matériel et méthodes

5.1.2.1. Les animaux

Il s'agit de souris du laboratoire Janvier (Le Genest, France). Les caractéristiques, les conditions d'élevage et la nourriture sont précisées au § 1.2.1.

5.1.2.2. Protocole expérimental

Le protocole opéraroire est inspiré de la technique de Gouret et coll. (1973).

Des lots de 10 souris (J) reçoivent une administration de nébulisat d'E. californica par voie I.P. aux doses de 50, 100, 200, 400 ou 800 mg/Kg (0,5 ml/50g), 30 minutes avant l'administration de réserpine (Serpasil®, Ciba-Geigy) par voie I.P. à la dose de 2 mg/Kg (0,5 ml/50 g). Un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % et un lot de référence reçoit de l'amitryptilline (Aldrich) à la dose de 12 mg/Kg P.O. dans les mêmes conditions (Gouret et coll., 1973).

La température rectale est mesurée par une sonde thermique de précision (Technotherm 1/10 de degrès C) couplée à un galvanomètre avant l'injection de la plante (- 30 minutes), avant l'injection de réserpine (0 minute), puis 240 minutes après l'injection du neuroleptique.

Le ptosis est évalué 240 minutes après l'administration de la réserpine, selon la cotation de Rubin et coll. (1957) :

. **0** : occlusion des paupières nulle

. **1** : occlusion des paupières au 1/4

. **2** : occlusion des paupières au 1/2

. **3** : occlusion des paupières au 3/4

. **4** : occlusion totale des paupières

L'akinésie est également évaluée 240 minutes après l'administration de la réserpine. l'évaluation est déterminée en tout ou rien, en considérant le paramètre comme positif (présence d'akinésie) si l'animal est prostré dans sa cage et s'il ne se déplace pas d'une distance au moins égale à la longueur de son corps, ou comme négatif (absence d'akinésie) dans le cas contraire.

5.1.2.3. Analyse statistique

Les comparaisons entre les lots traités et le lot témoin sont effectuées par le test de Newmann et Keuls pour les relevés de températures et par le test de Mann-Withney pour le ptosis.

5.1.3. Résultats

Les moyennes et les erreurs-types obtenues pour chaque lot sont présentées dans les tableaux 21 et 22.

240 minutes après l'administration de la réserpine, la diminution de la température du lot témoin (- 6,4° C) et des lots traités avec E. californica sont sensiblement égales et ne présentent pas de différences significatives. Par contre, l'antidépresseur de référence (Amitryptilline) s'oppose significativement à l'hypothermie réserpinique (- 2,6° C). Des résultats similaires sont obtenus avec le ptosis. Quant à l'akinésie, on n'observe aucune différence entre les lots témoins et les lots traités avec la plante et l'amitryptilline.

TABLEAU 21 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR L'HYPOTHERMIE INDUITE PAR LA RESERPINE

AMITRYPTILLINE mg/Kg PO - 60 min	mg/Kg IP - 30 min	RESERPINE mg/Kg IP 0 min	TEMPERATURES (DEGRES C) MOYENNES ET ERREURS-TYPES		VARIATION DEGRES C
			CONTROLE - 30 min	240 min	
0	0	2	37,6 ± 0,9	31,2 ± 1,2[a]	- 6,4
12	0	2	37,8 ± 1,1	35,2 ± 0,8*	- 2,6
0	50	2	38,5 ± 0,6	31,3 ± 0,7[a]	- 7,2
0	100	2	38,8 ± 0,7	31,6 ± 1,1[a]	- 7,1
0	200	2	38,9 ± 0,7	31,3 ± 1 [a]	- 7,6
0	400	2	39,2 ± 0,9	32,0 ± 0,9[a]	- 7,2
0	800	2	38,5 ± 0,8	31,6 ± 0,8[a]	- 6,9

NOMBRE D'ANIMAUX = 6

* $P < 0.01$ / TEMOIN
a $P < 0.01$ / CONTROLE

TABLEAU 22 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LE PTOSIS ET L'AKINESIE INDUITS PAR LA RESERPINE

AMITRYPTILLINE mg/Kg PO - 60 min	mg/Kg IP - 30 min	RESERPINE mg/Kg IP 0 min	PTOSIS		AKINESIE	
			CONTROLE - 30 min	240 min	CONTROLE - 30 min	240 min
0	0	2	0	5,7±1,1[a]	N	P
12	0	2	0	2,8±1,1*	N	P
0	50	2	0	5,7±0,6[b]	N	P
0	100	2	O	4,7±0,8[a]	N	P
0	200	2	O	4,0±0,9[a]	N	P
0	400	2	0	5,8±0,7[b]	N	P
0	800	2	O	5,7±0,6[b]	N	P

N = NEGATIF (ABSENCE D'AKINESIE)
P = POSITIF (PRESENCE D'AKINESIE)

NOMBRE D'ANIMAUX = 6

* $P < 0.05$/TEMOIN

a $P < 0.05$/CONTROLE
b $P < 0.01$/CONTROLE

E. californica n'antagonise pas les effets de la réserpine, aussi avons-nous choisi d'étendre notre étude en tentant de mettre en évidence un effet anticholinergique.

5.2. RECHERCHE DE L'INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR L'HYPOTHERMIE, LA SALIVATION ET LES TREMBLEMENTS INDUITS PAR L'OXOTREMORINE

5.2.1. Introduction

Pour affirmer l'absence d'effet antidépresseur de l'extrait d'E. californica, nous nous sommes servis d'un test couramment utilisé en tant que test prévisionnel d'un effet antidépresseur et qui consiste à rechercher une activité inhibitrice des effets périphériques et centraux de l'oxotrémorine.

L'oxotrémorine est une substance cholinergique centrale, agoniste des récepteurs muscariniques, qui induit des symptômes périphériques comme les tremblements, la salivation, les larmoiements et un symptôme central : l'hypothermie (Nortgren et coll, 1987). Des substances à composantes antidépressives peuvent antagoniser les symptômes cholinergiques de l'oxotrémorine (Schmitt et coll., 1966 ; Gouret et coll., 1973, 1975 ; Boissier et coll., 1971 ; Nordgren et coll., 1987 ; Worms et coll., 1987).

Par ailleurs, Nortgren (1987) a montré qu'une benzodiazépine, le diazépam, pouvait antagoniser les tremblements induits par l'oxotrémorine sans modifier la salivation ou l'hypothermie mais en modifiant la réceptivité des récepteurs muscariniques.

5.2.2. Matériel et méthode

5.2.2.2. Protocole expérimental

La technique est inspirée de la méthode de Spencer (1966).

Des lots de 10 souris (J) Swiss mâles reçoivent une administration d'*E. californica* par voie I.P. aux doses de 200 et 800 mg/Kg (0,5 ml/50 g), 30 minutes avant l'administration par voie I.P. d'oxotrémorine (Sigma) à la dose de 0,5 mg/Kg (0,5 ml/50 g). Un lot témoin reçoit une solution de NaCl 0,9 % et un lot de 10 souris reçoit une solution d'imipramine (Tofranil,® Ciba-Geigy) par voie I.P. à la dose de 5 mg/Kg (0,5 ml/50 g) dans les mêmes conditions. La température rectale est mesurée par sonde thermique de précision (1/10 de degré C) (Technotherm, couplée à un galvanomètre, avant l'injection d'*E. californica* (-30 minutes), avant l'injection d'oxotrémorine (0 minute), puis 30, 60 et 120 minutes après.

Les tremblements et la salivation sont observés avant chaque mesure de la température rectale, des coefficients de 0 à 3 sont attribués à chaque souris en fonction de l'ampleur des phénomènes :

0 pour l'absence de salivation, de tremblement et de larmoiement

3 pour un état pathologique important

1 et 2 pour des états intermédiaires

5.2.2.2. Analyse statistique

Les comparaisons entre les températures des lots traités et celles des lots témoins sont effectuées par le test de l'analyse de variance, suivie du test de Newmann Keuls. La comparaison des autres paramètres s'effectue par le test non paramétrique de Mann Withney.

5.2.3. Résultats

5.2.3.1. Influence d'*E. californica* sur l'hypothermie induite par l'oxotrémorine

Les moyennes des résultats obtenus pour chaque lot sont présentées dans la figure 33.

30, 60 et 120 minutes après l'administration de l'oxotrémorine, les diminutions de la température corporelle du lot témoin (- 4,8° ; - 6,8° ; - 6,5°) et des lots traités avec *E. californica* à 200 mg/Kg (- 5,2° ; - 6,9° ; - 5,1°) et à 800 mg/Kg (- 5,9° ; - 7,1° ; - 6,6°) sont sensiblement égales et ne présentent pas de différences significatives ; bien qu'à 800 mg/Kg il semble que l'extrait d'*E. californica* a tendance à accentuer légèrement l'hypothermie induite par l'oxotrémorine ; des résultats similaires ont été obtenus par Nordgren (1987) avec le diazépam.

Par contre, l'imipramine à la dose de 5 mg/Kg antagonise significativement la température corporelle des animaux traités à partir de la 30ème minute, et cela jusqu'à la fin du test (120 minutes) (- 2,9° ; -5,3° ; - 3,3°).

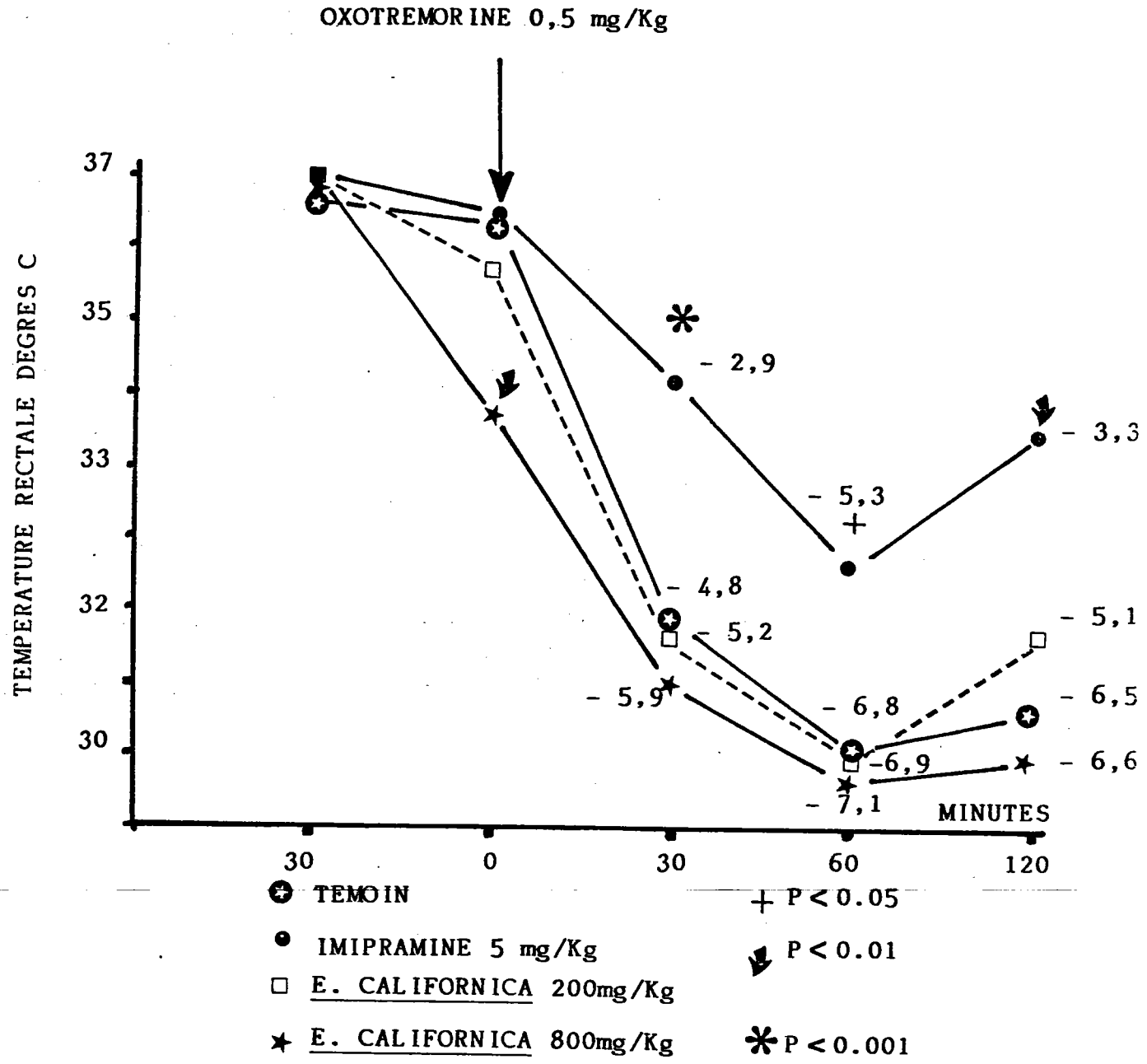


Fig. 33 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA ET DE L'IMIPRAMINE SUR LA TEMPERATURE RECTALE AVANT ET APRES INJECTION D'OXOTREMORINE CHEZ LA SOURIS

Sur la figure 33, on remarque que la température des animaux est stable 30 minutes après l'administration des produits, à l'exception de l'extrait d'E. californica qui diminue significativement la température corporelle lorsqu'il est administré à la dose de 800 mg/Kg.

5.2.3.2. Influence du nébulisat d'E. californica sur les tremblements, la salivation et les larmoiements induits par l'oxotrémorine

L'analyse des résultats des tableaux 23 A, 23 B et 23 C montre qu'E. californica ne s'oppose pas aux tremblements, à la salivation et au larmoiement induits par l'oxotrémorine, à la différence de l'imipramine qui a antagonisé les effets de la substance cholinergique.

5.3. DISCUSSION

E. californica ne s'oppose ni aux effets neuroleptiques de la réserpine (hypothermie, ptosis et akinésie), ni aux effets cholinergiques de l'oxotrémorine (tremblements, larmoiement et salivation). Par conséquent, on est en mesure d'exclure l'hypothèse d'un effet antidépresseur d'E. californica pour expliquer les effets sédatifs obtenus dans les tests comportementaux.

TABLEAU 23 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA ET DE L'IMIPRAMINE SUR LES TREMBLEMENTS (A), LE LARMOIEMENT (B) ET LA SALIVATION (C) INDUITS PAR L'OXOTREMORINE CHEZ LA SOURIS

A

IMIPRAMINE mg/Kg	E. CALIFORNICA mg/Kg	OXOTREMORINE mg/Kg	TREMBLEMENTS (MOYENNES)				
			CONTROLE - 30 min	0 min	30 min	60 min	120 min
0	0	0,5	0	0	3,0	2,70	1,5
5	0	0,5	0	0	1,7 **	1 **	0 **
0	200	0,5	0	0	2,8	2,3	1,2
0	800	0,5	0	0	2,8	2,7	1,5

B

IMIPRAMINE mg/Kg	E. CALIFORNICA mg/Kg	OXOTREMORINE mg/Kg	LARMOIEMENTS (MOYENNES)				
			CONTROLE - 30 min	0 min	30 min	60 min	120 min
0	0	0,5	0	0	2,7	3,0	2
5	0	0,5	0	0	1,3 **	1,7 **	0,7 **
0	200	0,5	0	0	2, 5	2, 7	1, 5
0	800	0,5	0	0	3	3	2,2

C

IMIPRAMINE mg/Kg	E. CALIFORNICA mg/Kg	OXOTREMORINE mg/Kg	SALIVATIONS (MOYENNES)				
			CONTROLE - 30 min	0 min	30 min	60 min	120 min
0	0	0,5	0	0	2,7	2,2	1,3
5	0	0,5	0	0	1,3 **	0,8 **	0,3 **
0	200	0,5	0	0	2,8	2,3	1
0	800	0,5	0	0	3	2,3	1,3

** $P < 0.01$

NOMBRE D'ANIMAUX = 10

6. RECHERCHE D'UN EFFET D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE SPONTANEE DE L'ILEON DE COBAYE : EFFET POTENTIALISATEUR OU INHIBITEUR DE LA CONTRACTION INDUITE PAR L'HISTAMINE

6.1. INTRODUCTION : RAPPEL DE PHYSIOLOGIE (Schmitt, 1970)

L'intestin est constitué par de la musculature lisse et est animé de mouvements rythmiques lents se propageant sur toute sa longueur. Il comporte une innervation intrinsèque constituée par des plexus nerveux (Meissner et Auerbach) et une innervation extrinsèque neurovégétative dérivée du rameau nerveux du nerf splenchnique et du nerf pneumogastrique (Wright, 1979). Les muscles lisses sont innervés par des fibres sympathiques et parasympathiques et l'influx nerveux est transmis par des médiateurs soit du système sympathique (nor-adrénaline), soit du système parasympathique (acétylcholine). Au niveau de l'intestin chacune de ces substances présentent des sites récepteurs spécifiques. Ainsi, l'acétylcholine en agissant sur les récepteurs cholinergiques du muscle lisse détermine une contraction alors que l'adrénaline, en agissant sur les récepteurs Beta, impliqués dans les effets inhibiteurs, a une action sur la relaxation musculaire.

L'intestin peut répondre à d'autres substances pharmacologiques ; en particulier l'histamine, largement distribué au niveau intestinal. Il présente des sites récepteurs à l'histamine de type H_1 et H_2 dont l'activation est susceptible d'induire des contractions (Barker, 1981). La liaison de l'histamine à son récepteur est de nature compétitive et les anti-histaminiques comme la prométhazine ou la dexchlorphéniramine se fixent sur les récepteurs H_1 pour s'opposer ainsi de manière spécifique et compétitive aux effets H_1 de l'histamine caractérisés par des contractions.

Chez l'animal, il est possible d'enregistrer les réponses de l'intestin aux différentes substances, in vitro sur l'organe isolé. On sait que l'intensité de cette réponse est fonction de l'espèce animale et du fragment d'intestin utilisé. C'est pourquoi, en raison de ces différents critères, nous avons choisi l'iléon de cobaye, sur lequel nous avons prélevé la partie terminale de l'intestin grêle, riche en récepteurs H_1 et H_2 (Barker, 1981, 1982, 1983, 1985) pour la recherche d'un effet anti ou histaminergique éventuel d'E. californica.

En dehors de la propriété de s'opposer spécifiquement aux effets H_1 de l'histamine, les antihistaminiques H_1 engendrent une dépression du système nerveux central qui se manifeste par un effet sédatif prononcé. Dans ces conditions, il nous est apparu nécessaire de vérifier si les extraits d'E. californica présentaient des propriétés antihistaminiques. Par ailleurs, ils présentent des effets cholinergiques périphériques (diminution des sécrétions gastriques, troubles bronchique et oculaire, antitussif et anti-émétique).

6.2. MATERIEL ET METHODES

6.2.1. Les animaux

On utilise les cobayes mâles (Iffa Credo, L'Arbresle) dont la description, les conditions d'élevage et la nourriture sont décrites au paragraphe 1.2.1.

6.2.2. Protocole opératoire

6.2.2.1. Prélèvement et mise en place du fragment d'iléon dans la cuve d'expérimentation

La technique de l'action in vitro, de différents substances sur la contraction de l'iléon de cobaye a été décrite par Barker (1981) selon la méthode de Magnus. Cette technique a été mise au point et adaptée aux extraits végétaux dans notre laboratoire par Soulamani (1987). Après anesthésie de l'animal par injection par voie I.P. de pentobarbital sodique (Clin-Midy, Montpellier) à la dose de 0,3 ml pour 100 g de poids corporel, et ouverture de la cavité abdominale, un fragment d'environ 4 cm d'intestin grêle est prélevé dans sa portion terminale (avant le caecum).

Après ligature des deux extrémités, ce fragment d'iléon est fixé par ses deux ligatures, dans une cuve à organe isolé, d'une contenance de 20 ml et reliée à un bain marie thermostaté, à un dispositif d'oxygénation et de brassage et à un dispositif de remplissage et de vidange. La cuve est constamment remplie de liquide physiologique (thyrode) additionné d'atropine à raison de 1 mg par millilitre, soit 1 ml d'atropine pour 2 litres de thyrode. L'atropine bloque les récepteurs à l'acétylcholine et permet l'enregistrement des contractions histaminiques seules. La thyrode est maintenue à une température de 37°C $\pm$ 1°C et est oxygénée en continu à raison d'une bulle par seconde.

L'extrémité supérieure de l'organe est relié à un capteur qui transmet les variations du muscle (variations de la tonicité ou de la longueur) à un amplificateur (Narco-Bio-System, Réf. 7113), lui-même relié à un inscripteur (physiographe : "Narcobio-systems").

La technique envisagée ici est de nature isométrique, elle nécessite un capteur transducteur (Narco bio systems, FGO) permettant la mesure des variations de longueur du muscle. Cette technique est très sensible et la visualisation des contractions de très faibles amplitudes (contractions spontanées) est possible.

L'iléon est laissé au repos, dans la solution physiologique, pendant environ 30 minutes, pour stabiliser les contractions spontanées de l'organe.

Au moment du test, la substance à étudier est ajoutée dans la cuve sous un volume constant de 0,1 ml, deux minutes plus tard l'agoniste (histamine) est ajouté au bain, également sous un volume constant de 0,1 ml et à une dose correspondant à la DE 50. Après chaque essai, l'organe est lavé trois fois de suite avec la solution physiologique de tyrode et chaque expérience est repliquée trois fois, nous laissons au repos le muscle au moins trois minutes entre chaque essai.

Comme l'intensité de la réponse peut dépendre de la fraction d'intestin isolé, il est nécessaire de réaliser plusieurs expériences d'agonisme et d'antagonisme pour vérifier le bon fonctionnement de l'organe isolé avant chaque expérience.

6.2.2.2. Préparation des solutions

. Solution de tyrode

Pour maintenir l'iléon dans un environnement ionique, propre au fonctionnement des systèmes physiologiques, et pour lui apporter une source énergétique (glucose) indispensable aux échanges et le maintenir dans un environnement légèrement alcalin, le liquide physiologique de tyrode, dans lequel baigne l'intestin isolé, a la composition suivante :

NaCl	40g
KCl	3,80g
$CaCl_2$	1g
$MgCl_2$	0,5g
$NaHCO_3$	5g
Na_2HO_4	0,25g
Glucose	5g
H_2O distillée qsp 5 litres	

Une quantité d'atropine de 10^{-3} g soit 1 ml d'atropine (Aguettant, France) est additionnée pour deux litres de tyrodes.

- **Solution d'histamine**

Les 6 solutions de travail ont une concentration en histamine comprise entre $2\ 10^{-3}$ mole/litre et $2\ 10^{-8}$ mole/litre. Elles sont préparées à partir d'une solution mère, concentrée à 5 m moles/litre et conservées à + 4° C puis diluées dans la tyrode pour obtenir les concentrations suivantes :

A_1 : 2.10^{-3} M/l ; A_2 : 2.10^{-4} M/l ; A_3 : 2.10^{-5} M/l ;

A_4 : 2.10^{-6} M/l ; A_5 : 2.10^{-7} M/l ; A_6 : 2.10^{-8} M/l.

- **Solution de dexchlorphéniramine : Polaramine ®**

Les 5 solutions de travail ont une concentration en dexchlorphéniramine comprise entre 5 mg/litre et 5.10^{-4} mg/litre. Elles sont préparées à partir d'une solution mère (ampoules de Polaramine ®), concentrée à 5 mg/ml. Des dilutions sont réalisées avec une solution de NaCl à 0,9 % pour obtenir les concentrations suivantes :

E_1 : 5 mg/l ; E_2 : 5.10^{-1} mg/l ; E_3 : 5.10^{-2} mg/l ;

E_4 : 5.10^{-3} mg/l ; E_5 : 5.10^{-4} mg/l

- **Extrait d'E. californica**

Le nébulisat est dissout dans la solution physiologique de Tyrode pour obtenir des solutions de travail, dont les concentrations respectives, exprimées en plante sèche, sont de $12,5.10^2$; 25.10^2 ; 5.10^3 ; 10^4 ; $1,6.10^4$; $3,2.10^4$ et $6,4.10^4$ mg/litre. Ces solutions sont préparées en sachant que le rendement de l'extraction du nébulisat est dans le rapport de 1 g de nébulisat pour 5 g de plante sèche.

6.2.2.3. Réalisation chronologique de l'expérimentation

Pour vérifier le bon fonctionnement de notre modèle expérimental, nous avons établi dans un premier temps une courbe effet/dose de l'action de l'histamine sur l'iléon de cobaye, puis dans un deuxième temps, nous avons évalué l'inhibition (DI 50) des contractions histaminiques par un antagoniste spécifique des récepteurs histaminiques : le dexchlorphéniramine (Polaramine ®). Enfin nous avons rechercher un éventuel effet antagoniste ou potentialisateur d'E. californica sur les contractions induites par l'histamine.

. Etude de l'action de l'histamine (Prolabo)

L'expérience débute par une sensibilisation de l'iléon à l'histamine en ajoutant 0,1 ml de la solution de travail A ($2\ 10^{-3}$ mole/litre, ce qui correspond à une concentration en histamine dans la cuve de 10^{-5} mole/litre). Plusieurs essais sont réalisés jusqu'à l'obtention de trois contractions successives identiques. L'organe est lavé trois fois de suite avec la solution physiologique puis laissé au repos pendant trois minutes entre chaque essai. Nous avons ensuite établi la courbe dose/effet à l'aide des différentes solutions de travail en ajoutant dans le bain 0,1 ml de chacune d'elle. On obtient alors dans la cuve des concentrations en agonistes de 10^{-10} ; 10^{-9} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} mole/litre.

Au moyen de la courbe dose/effet on détermine la dose sensible (DS) -dose à partir de laquelle apparaît une première contraction-, et la dose qui induit une contraction maximale (DE 100). La dose 50 % qui fait apparaître une contraction réduite de moitié par rapport à la DE 100 est calculée par la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

. Etude de l'action d'un antagoniste : le dexchlorphéniramine (Polaramine)

L'expérience débute par la détermination d'une quantité d'agonistes suffisante pour provoquer 100 % de contraction de l'organe (DE 100) ; cette expérience est renouvellée jusqu'à l'obtention de trois contractions de même amplitude.

Puis, on met l'organe en contact préventivement à l'ajout de l'agoniste (histamine) avec une quantité croissante de l'antagoniste (dexchlorphéniramine) jusqu'à l'obtention d'une inhibition totale des contractions induites par l'histamine. L'évaluation de l'antagonisme du dexchlorphéniramine est déterminée par le calcul de la DI 50, c'est-à-dire de la dose qui réduit de moitié l'amplitude des contractions induites par l'agoniste seul, selon la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949), pour chaque essai 0,1 ml de chacune des solutions de travail de dexchlorphéniramine (Polaramine®) est ajouté au bain, 2 minutes avant l'ajout de la première dose d'histamine qui induit la contraction maximale de l'iléon (DE 100). Les concentrations obtenues dans la cuve en antagoniste sont alors de : $2,5\ 10^{-5}$; $2,5\ 10^{-4}$; $2,5\ 10^{-3}$; $2,5\ 10^{-2}$; $2,5\ 10^{-1}$ mg/litre.

La sensibilité du muscle à l'histamine est vérifiée régulièrement par addition de la dose maximale d'histamine.

- **Etude de l'action d'E. californica vis à vis de la contraction de l'iléon de cobaye induite par l'histamine**

Les solutions de travail d'E. californica sont ajoutées sous un volume de 0,1 ml, et ceci deux minutes avant l'addition de la solution d'histamine efficace à 50 % (DE 50). On obtient alors des concentrations dans la cuve de 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 80 - 160 et 320 mg/litre. Ce protocole permet d'apprécier une éventuelle diminution ou augmentation de la contraction de l'iléon en présence de l'extrait végétal.

Comme pour l'étude de l'antagonisme du dexchlorphéniramine, la sensibilité du muscle à l'histamine est vérifiée régulièrement par addition d'histamine à la dose maximale.

6.3. RESULTATS

6.3.1. Etude de l'effet-dose de l'histamine et de l'antagonisme par le dexchlorphéniramine

La figure 34 représente les pourcentages de contraction de l'iléon de cobaye en fonction de la concentration d'histamine (mole/litre) présent dans la cuve. L'effet dose de l'histamine sur les contractions de l'iléon de cobaye semble être de nature Michaelienne, et met en évidence l'existence des sites récepteurs spécifiques H_1 pour l'histamine.

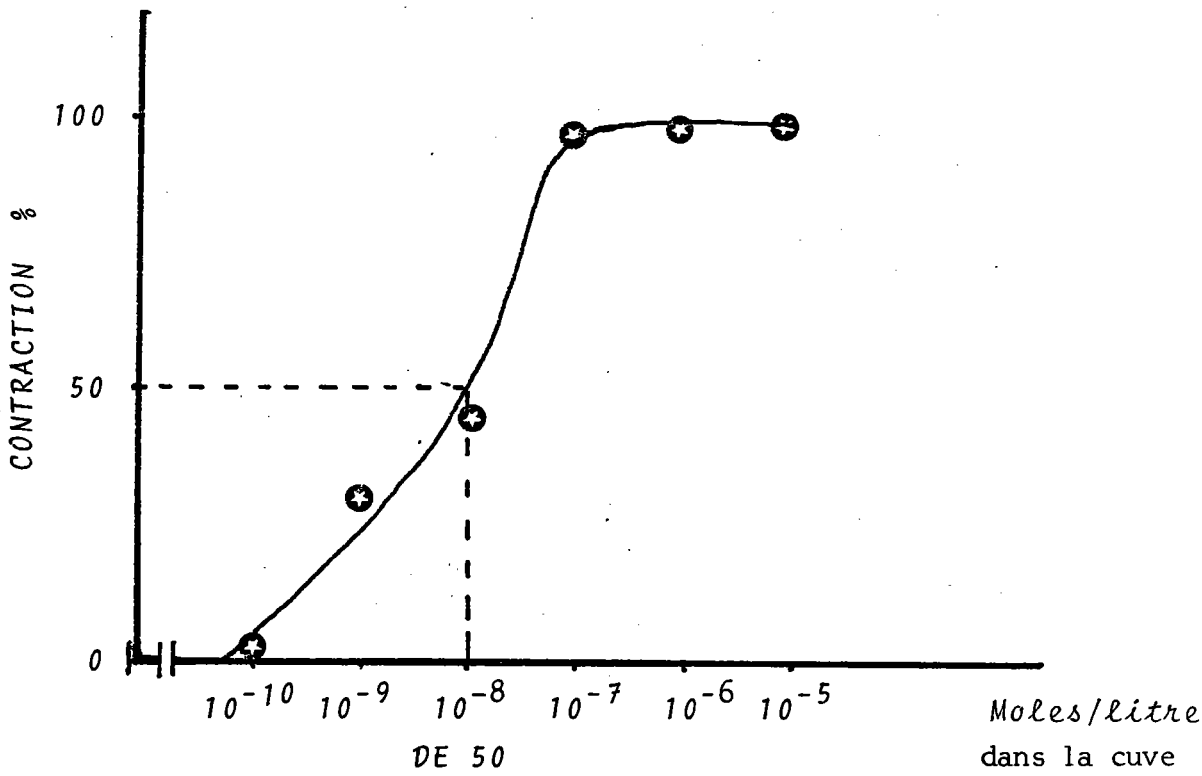


Fig. 34 - DOSE/EFFET DE L'HISTAMINE SUR LES CONTRACTIONS DE L'ILEON DE COBAYE MESUREES PAR LA TECHNIQUE ISOMETRIQUE.

On peut constater qu'à la concentration de 10^{-10} mole/litre, les premiers sites récepteurs sont occupés par l'histamine (DE 0), à la concentration de 10^{-7} mg/litre, tous les sites récepteurs sont occupés, ce qui se traduit par un plateau d'amplitude maximale. Au-delà de cette concentration, l'intensité du pic n'augmente plus, tous les sites sont occupés (DE 100). La DE 50, caractérisée par une contraction d'une amplitude de moitié par rapport à la contraction maximale a été calculée égal à $6,22\ 10^{-9}$ mole/litre (5,84 - 6,63). La droite de linéarisation de la relation dose/effet a été validée pour un risque inférieur à 5 % (test du X^2).

Les résultats consignés dans le tableau 24 mettent en évidence l'inhibition (exprimée en pourcentage de constraction) des effets histaminiques par la dexchlorphéniramine. La DI 50 %, caractérisée par la dose de l'antagoniste qui inhibe 50 % de la concentration obtenue avec l'histamine (DE 100), est calculée égale à $2,75\ 10^{-3}$ mg/litre (2,40 - 3,12). La droite de linéarisation de la relation dose/effet a été validée pour un risque inférieur à 5 % (test du X^2)

6.3.2. Influence d'E. californica sur la contraction induite par l'histamine sur l'iléon de cobaye

Les résultats représentés sur la figure 35 montrent que la contraction de l'iléon de cobaye induite par une dose de 10^{-8} mole/litre d'histamine (approximativement DE 50) n'est pas modifiée lorsque l'on introduit dans la cuve, 2 minutes avant l'histamine les doses respectives d'E. californica de 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 80 ; 160 et 320 mg/litre.

6.4. DISCUSSION

Les résultats n'ont pas mis en évidence d'effet significatif d'E. californica à l'encontre des contractions de l'iléon de cobaye induits par une dose voisine de la DE 50 d'histamine, puisqu'il n'y a aucune variation des amplitudes de contraction histaminique et cela quelque soit la dose d'extrait introduit dans la cuve (6,25 à 320 mg/litre) (Fig. 35).

E. californica n'a donc aucune affinité pour les récepteurs H_1 de l'iléon de cobaye et, par conséquent, l'hypothèse d'une action anti H_1 pour tenter d'expliquer l'effet sédatif de l'extrait peut être rejettée.

TABLEAU 24 - EFFET ANTI-HISTAMINIQUE DE LA DEXCHLORPHENIRAMINE SUR L'ILEON DE COBAYE

DEXCHLORPHENIRAMINE mg/litre DANS LA CUVE	HISTAMINE mole/litre DANS LA CUVE	% CONTRACTION	% INHIBITION
$2,5\ 10^{-1}$	$5\ 10^{-6}$	0	100
$2,5\ 10^{-2}$	$5\ 10^{-6}$	35	65
$2,5\ 10^{-3}$	$5\ 10^{-6}$	47,5	52,5
$2,5\ 10^{-4}$	$5\ 10^{-6}$	75	25
$2,5\ 10^{-5}$	$5\ 10^{-6}$	74	20
$2,5\ 10^{-6}$	$5\ 10^{-6}$	84	16

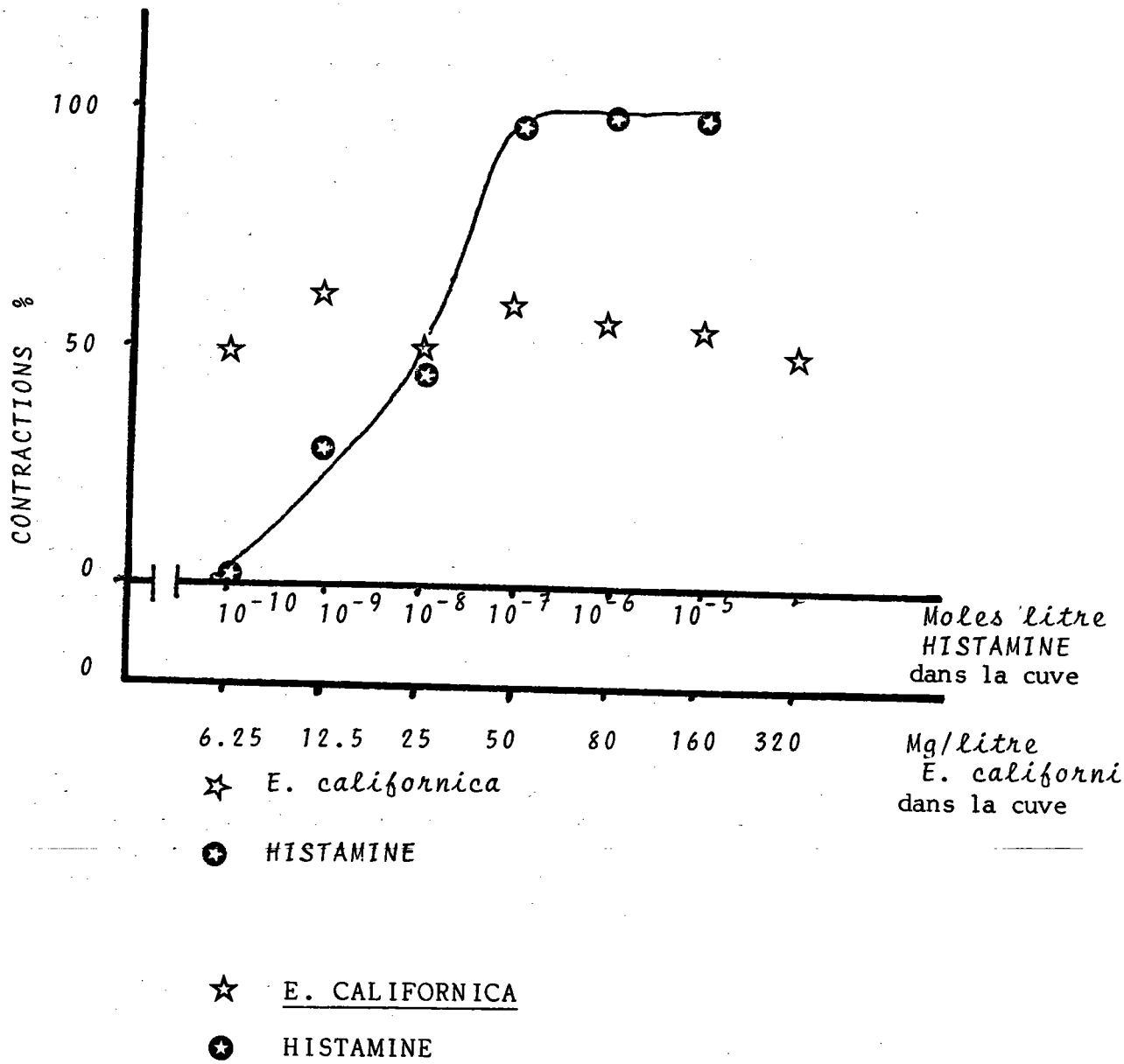


Fig. 35 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LES CONTRACTIONS DE L'ILEON DE COBAYE INDUITES PAR L'HISTAMINE

7. RECHERCHE D'UN EFFET ANALGESIQUE D'E. CALIFORNICA

7.1 INTRODUCTION : RAPPELS PHARMACOLOGIQUES

Les médicaments antalgiques destinés à faire disparaître la douleur sont répartis en deux catégories. D'une part, les analgésiques morphiniques représentés par les opiacés et les composés à structure chimique analogue, hémi-synthétiques ou synthétiques, que l'on appelle analgésiques centraux qui possèdent des propriétés psychotropes de nature à induire une dépression du système nerveux central, matérialisée par de la sédation et parfois une excitation motrice (Lim et coll., 1964 ; Schmitt, 1970), une dépression respiratoire, un ralentissement du transit intestinal, une modification du comportement et du rythme cardiaque (Roques, 1980). D'autre part, les analgésiques non morphiniques, de structure chimique différente agissant en partie localement au siège du stimulus douloureux, d'où leur nom d'analgésiques périphériques.

Les travaux de Benoist (1975) et de Besson (1977) sur les études neurophysiologique, biochimique et comportementale leur ont permis d'envisager des sites d'action multiple des composés morphiniques au niveau du système nerveux central, qui ne correspondent pas tout à fait à la cartographie des récepteurs morphiniques. On peut noter une action au niveau médullaire, du tronc cérébral, des centres diencéphaliques et corticaux.

Au niveau médullaire, une des actions principales de la morphine et des substances apparentées consiste à bloquer la transmission des messages nociceptifs au niveau des neurones relais de la corne dorsale de la moëlle épinière où les substances agissent au niveau des groupes cellulaires de la couche V de Rexed (Roques, 1980).

Au niveau du tronc cérébral, la formation réticulée apparaît comme une structure de contrôle des voies sensitives afférentes ascendantes et des voies motrices afférentes descendantes. Les sites d'action ont été localisés au niveau du plancher du quatrième ventricule situé dans la partie dorsale de la formation réticulée. A ce niveau, et par des projections ascendantes, les substances morphiniques peuvent modifier à distance le fonctionnement du diencéphale et du télencéphale (Néocortex, système limbique et amygdallion, hypothalamus) et contrôler ainsi les formations imliquées dans la perception de la douleur et les réactions affectives

et somatiques qu'elle déclenche. Par ailleurs, au moyen d'interneurones, elles peuvent activer le système inhibiteur situé dans la partie ventrale de la formation réticulée, ce qui permet l'inhibition de la transmission spinale par les voies descendantes. Un autre site d'action morphinique a été localisé par stimulation électrique dans les noyaux sérotoninergiques du Raphé situé dans la région périaqueducale, à proximité du quatrième ventricule. Par l'intermédiaire d'un réseau d'interneurones et de projections nerveuses ascendantes, l'activation de ce site d'action par des dérivés morphiniques modifie également le fonctionnement des structures du diencéphale et du télencéphale et stimule les fonctions inhibitrices des voies descendantes.

La transmission de la douleur au niveau synaptique se ferait probablement par l'intermédiaire d'un neurotransmetteur découvert par Von Euler et Gaddum en 1931 (Privat, 1980), dénommé substance P. Ce peptide de 11 acides aminés a été localisé dans de nombreuses régions du cerveau et de la moëlle épinière (couche 4 et 5 de Rexed), responsables de la transmission et de la régulation des sensations douleureuses (Privat, 1980).

De cette découverte, il a donc été recherché un antagoniste post synaptique spécifique de la substance P qui pourrait supprimer les phénomènes douloureux. Dans ce contexte, il semblerait que les substances morphinomimétiques n'antagoniseraient pas les récepteurs de la substance P, mais agiraient de préférence au niveau pré-synaptique.

Depuis une quinzaine d'années, de nombreux travaux ont permis de démontrer l'existence de récepteurs sur lesquels les substances morphiniques se lient spécifiquement pour exercer leurs effets (Roques, 1980). Puis, rapidement, il a été suggéré l'existence de ligands naturels, endogènes synthétisés par le cerveau et qui moduleraient l'activité de ces récepteurs dans le sens d'un effet morphinomimétique : les endorphines et les enképhalines.

Pour rendre compte de la pluralité des effets des substances morphiniques, la littérature mentionne plusieurs types de récepteurs. D'une part, les récepteurs μ impliqués préférentiellement dans l'analgésie et se liant avec une haute affinité à la morphine.

D'autre part, les récepteurs S et K impliqués probablement dans les états comportementaux, se liant avec une affinité aux peptides morphiniques. Les endorphines se lient aux deux types de récepteurs. L'existence des récepteurs à la morphine a permis d'isoler plusieurs substances antagonistes, spécifiques comme la nalorphine, la naloxone, la pentazorine.

Ces substances, à l'exception de la naloxone, se présentent souvent comme des antagonistes partiels et sont douées de propriétés pharmacologiques propres du type morphinomimétiques, psychotomimétiques et de dépendance suggérant l'existence d'un deuxième récepteur spécifique pour ces substances (Benoist et Misset, 1978).

A la différence des dérivés morphiniques, les analgésiques non opiacés sont dépourvus d'action psychotrope et leur action antalgique est principalement d'origine périphérique (Lim et coll., 1964). Les auteurs ont montré le rôle des prostaglandines E_1 dans la douleur et l'inflammation et ont mis en évidence leur effet de potentialisation de la douleur induite par la bradykinine et l'histamine. La prostaglandine E_1 sensibiliserait les terminaisons nerveuses afférentes à l'action algogène des médiateurs libérés dans le foyer inflammatoire. C'est en inhibant la synthèse des prostaglandines que les dérivés salicylés exerceraient leur effet antalgique modéré. C'est pourquoi ces produits ne peuvent montrer leur effet antalgique que dans le cas de douleurs associées à une lésion tissulaire entraînant la libération des facteurs de l'inflammation et ne répondant pas à un stimulus nociceptif d'origine électrique.

Expérimentalement, cette condition est réalisée lors de l'injection I P de substances nociceptives chimiques comme la phénylbutazone et l'acide acétique. Mais il faut bien admettre que les salicylés ne procèdent pas uniquement à partir de la libération locale des facteurs de l'inflammation et qu'une action centrale, bien que ces substances soient dépourvues d'effet psychotrope, est également probable principalement au niveau de l'hypothalamus, ce qui expliquerait l'effet analgésique des dérivés comme la phénacétine, le paracétamol et l'absence totale d'effet anti-inflammatoire de ces substances.

Notre hypothèse serait que la mise en évidence d'un effet analgésique typiquement central chez E. californica pourrait justifier en grande partie l'effet sédatif observé dans les expériences sur l'étude du comportement de la souris.

Par ailleurs, dans les utilisations traditionnelles d'E. californica, nous avons pu relever quelques indications concernant l'emploi des parties aériennes de la plante comme analgésique et antalgique (calmant, contre les douleurs dentaires) (3ème Partie, Chap. A.1), justifiant ainsi cette expérimentation dans notre objectif de valorisation de la tradition.

Pour évaluer l'effet analgésique d'E. californica, notre choix s'est porté sur deux tests pharmacologiques qui nous permettent de dissocier l'effet central de l'effet périphérique.

Le test du "writhing" permet de mettre en évidence l'activité des analgésiques du type morphine et des analgésiques du type de l'aspirine et de quantifier l'action analgésique d'une substance vis à vis de la douleur occasionnée par l'administration d'une substance nociceptive chimique, à savoir l'acide acétique. Le test de la plaque chauffante permet uniquement de mettre en évidence l'activité des analgésiques du type morphine, par quantification de l'effet analgésique de la substance à analyser vis à vis d'une douleur occasionnée par la chaleur.

Pour séparer l'effet analgésique imputable à une activité de type morphinique de celle imputable à l'activité non morphinique, nous utilisons une substance antagoniste pure et spécifique des composés morphiniques, à savoir la naloxone. Il faut savoir que cet antagonisme est compétitif et que la naloxone n'a pas d'effet intrinsèque agoniste au niveau de la douleur (Rucke Busch et Bueno, 1983).

7.2. MATERIEL ET METHODES

Protocole expérimental

7.2.1. Le test du writhing

La technique est inspirée de la méthode de Siegmund et coll. (1957).

Trois lots de 10 souris (J) reçoivent E. californica par voie I.P. (nébulisat), dissout dans du NaCl 0,9 %, aux doses de 200, 400 et 800 mg/Kg (0,5 ml/50 g) 30 minutes avant l'administration par voie IP de l'agent algique dissout dans de l'eau distillée (acide acétique à 1,2 %, obtenu à partir d'acide acétique Prolabo ; d = 1,05 ; 99-100 %). Un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions.

Des lots de 10 souris (J) reçoivent par voie I.P. les substances de référence suivantes : le clorazépate dipotassique (CD) aux doses de 40 et 80 mg/Kg, l'acétylsalicylate de Lysine (ASL) à la dose de 68 mg/Kg, le sulfate de morphine (M) à la dose de 1,15 mg/Kg, et la naloxone (N) à la dose de 1 mg/Kg. Un lot de 10 souris (L) recevant du sulfate de morphine (1,15 mg/Kg, voie IP) et trois lots de 10 souris (L) recevant E. californica (200, 400 et 800 mg/Kg, voie IP) ont été prétraités par la naloxone (N) à la dose de 1 mg/Kg par voie sous cutanée, 15 minutes avant l'administration des substances à étudier.

La comptabilisation des contorsions et des étirements des pattes postérieures débute immédiatement après l'administration de l'acide acétique et cela pendant 30 minutes.

Les différences du nombre de contorsions entre les groupes de souris traitées et celui des témoins sont également estimées à l'aide de l'analyse de variances, puis sont comparées deux à deux à l'aide du test de comparaisons multiples de Newmann Keuls.

7.2.2 . Test de la plaque chauffante

La technique est inspirée de la méthode de Janssen et Jagueneau décrite par Boissier et coll. (1956).

Les conditions opératoire et les substances étudiées sont identiques à ceux de l'expérience précédente, mais la dose de sulfate de morphine utilisée ici est de 10 mg/Kg.

Le dispositif expérimental est constitué par un bain-marie chauffé et contenant un récipient en verre, dans lequel est déposé l'animal au moment du test. Après une étude préalable, la température du bain-marie a été réglée à 56° C ± 1° C de façon à obtenir une réaction de l'animal, caractérisée par le léchage des pattes antérieures ou par un bond, après un temps approximatif de 5 secondes.

Chaque animal est son propre témoin : avant tout traitement, le temps de réaction de chaque souris est déterminé à deux reprises et à 10 minutes d'intervalle. La moyenne de ces deux valeurs est utilisée comme temps de réaction avant traitement ; le temps de réaction après traitement étant obtenu sur une seule mesure. Pour chaque lot, les temps moyens de réaction sont ensuite calculés et permettent de déterminer un pourcentage d'augmentation du temps de réaction, après traitement ; mais l'interprétation des résultats de l'expérience est donnée par le pourcentage d'animaux qui ont répondu positivement au test, en considérant qu'une réponse est positive lorsque le temps de réaction des animaux traités est doublé par rapport à celui des animaux témoins. La comparaison entre les résultats des lots traités et celui des lots témoins est effectuée au moyen du test du X^2.

7.3. RESULTATS

7.3.1 Test du writhing

Les résultats présentés dans la figure 36 représentent l'inhibition (%) des contractions abdominales des animaux traités par comparaison à celles des animaux témoins. Ils mettent en évidence une activité inhibitrice significative d'*E. californica* aux doses de 200, 400 et 800 mg/Kg vis à vis des contorsions et des étirements induits par l'acide acétique. On constate également que le clorazépate dipotassique diminue les effets de l'acide acétique et cela de manière dose dépendante aux doses de 40 et 80 mg/Kg (-32 % ; - 80 %), que le sulfate de morphine à 1,15 mg/Kg réduit ces effets de 68 % et que l'acétylsalicylate de lysine, testé à la dose efficace 50 % (68 mg/Kg) les réduit de 59 %.

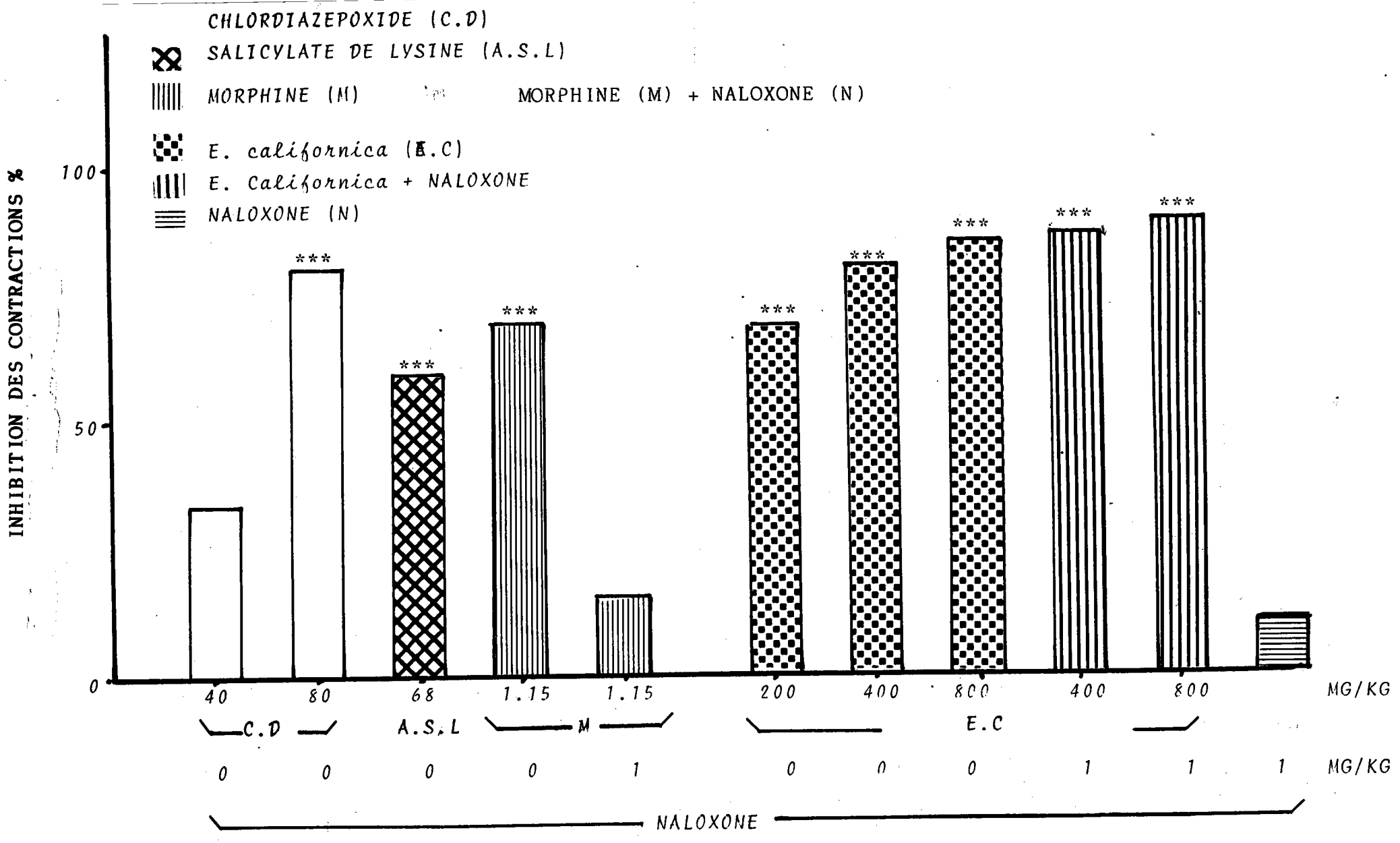


Fig. 36 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA (E.C.), DU SALICYLATE DE LYSINE (A.S.L.), DE LA MORPHINE (M) ET DE LA NALOXONE SUR LES CONTORSIONS INDUITES PAR L'ACIDE ACETIQUE (2 %) CHEZ LA SOURIS

La naloxone, administrée en prétraitement par voie sous-cutanée, 15 minutes avant l'administration par voie I.P. de morphine, a une action antagoniste vis à vis des effets analgésiques du sulfate de morphine, puisque les contractions ne sont plus réduites. Administrée seule, la nalaxone n'a pas d'effet propre sur ces contractions. Par contre, administrée en prétraitement d'E. californica, la nalaxone n'antagonise pas les effets inhibiteurs que la plante exerce sur les contractions induites par l'acide acétique.

7.3.2. Test de la plaque chauffante

Les résultats regroupés dans le tableau 25 ne mettent en évidence aucune augmentation significative du nombre d'animaux traités par E. californica présentant une réponse positive au test et aux doses de 200, 400, 800, 1600 mg/Kg. Ceci est encore vrai pour les animaux traités avec l'acétylsalicylate de lysine à la dose de 68 mg/Kg, du clorazépate dipotassique à la dose de 40 mg/Kg, et ceux recevant la nalaxone (1 mg/Kg, voie S.C.) en prétraitement d'E. californica. Par contre, un nombre significatif d'animaux ont montré un temps de réaction doublé après un traitement avec un analgésique majeur : la morphine à la dose de 9,20 mg/Kg et avec le clorazépate dipotassique à la dose de 80 mg/Kg. L'analgésie obtenue avec la morphine a été antagonisée lorsque les animaux ont été prétraités avec une dose de 1 mg/Kg (voie S.C.) de naloxone.

TABLEAU 25 - EFFETS D'E. CALIFORNICA, DE LA MORPHINE, DU CLORAZEPATE ET DU SALICYLATE DELYSINE SUR LE TEMPS DE REPONSE A LA DOULEUR INDUITE PAR LA CHALEUR CHEZ LA SOURIS.

C.D. : CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE
A.S.L. : SALICYLATE DE LYSINE
M : MORPHINE
N : NALOXONE
E.S. : ERREUR STANDARD
NOMBRE D'ANIMAUX = 10
* $P < 0.05$
** $P < 0.01$

	C.D. mg/Kg				A.S.L. mg/Kg		M mg/Kg		N+ (1 mg/Kg) M (9.2 mg/Kg)		E. CALIFORNICA mg/Kg						E. CALIFORNICA + NALOXONE 1 mg/Kg			
	40		80		68		9.20				200		400		800		1600		800		1600	
	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP	AV	AP
% D'ANIMAUX PRESENTANT UNE REPONSE POSITIVE	10		40 *		0		50 **		0		0		20		30		20		0		0	
MOYENNES SECONDES ±	4,8	6,5	5,4	9,5	5,3	4,7	5,1	9,4	4,9	5,5	5,8	6,0	5,3	7,3	5,2	8,9	5,0	7,7	6,5	8,3	6,0	6,10
E.S.	0.2	0.6	0.3	1.3	0.3	0.4	0.3	0.7	0.2	0.3	0.4	0.6	0.3	0.8	0.8	0.9	0.4	0.8	0.4	0.7	0.3	0.6
% VARIATION AV / AP	35,4		75,9		- 11,3		84,3		12,24		3,4		37,7		71,15		54		27,6		1,7	

7.4. DISCUSSION

Les résultats des deux expériences montrent qu'E. californica n'a aucun effet analgésique central. En effet, si l'extrait d'E. californica à des doses élevées de 400 mg/Kg et plus (Fig. 36) a inhibé les contractions abdominales induites par un stimuli nociceptif d'origine chimique des animaux traités, cet effet n'a pas été antagonisé par la naloxone. Par ailleurs, l'extrait végétal n'a pas modifié le temps de réaction des animaux traités et placés sur une surface chauffée à 56° C (test de la plaque chauffante, Tableau 25) et cela quelque soit la dose utilisée (200, 400, 800 ou 1600 mg/Kg).

Ces résultats pourraient être interprétés comme un effet analgésique périphérique d'E. californica puisque l'on a montré que les propriétés analgésiques centrales de la morphine peuvent être mises en évidence dans les deux tests pharmacologiques (Fig. 36 et Tableau 25), alors que les propriétés analgésiques périphériques de l'acétylsalicylate de lysine ne peuvent être révélées que dans le test du writhing (stimulation nicoceptive d'origine chimique, Tableau 25).

Il faut savoir que les stimulations nociceptives d'origine thermique ou chimique font apparaître un message dolorigène qui est transmis, intégré et transformé en réaction affective et somatique (sensation de souffrance) au niveau de différentes structures du système nerveux central (au niveau médullaire, du tronc cérébral, du diencéphale et du cortex). Or, les analgésiques centraux, comme la morphine, ont des sites d'action multiples au niveau de ces structures (cf. § 7.1.). ceci a pour conséquence de supprimer tous les messages dolorigènes (central et périphérique).

Par contre les analgésiques périphériques, comme l'acétylsalicylate de lysine, dont l'action antalgique s'explique en partie par l'intermédiaire de chémorécepteurs localisés au niveau vasculaire, ont un effet dans le cas de douleurs associées à une lésion tissulaire entraînant une inflammation (cf. § 7.1.).

Ceci est réalisé dans le cas de l'injection par voie I.P. d'acide acétique (test du writhing, Figure 36), alors qu'après une stimulation d'origine thermique (test de la plaque chauffante), l'acétylsalicylate de lysine n'a pas d'effet (Tableau 25).

Certes, il ne nous est pas possible de dire si l'effet observé dans le test du writhing de l'extrait d'E. californica est dû à une action spécifique sur les structures périphériques directement impliquées dans l'élaboration de la douleur, ou si cette propriété dépend en réalité d'une action sédative centrale. Cette action pourrait se manifester d'une part par une dépression des systèmes interneuroniques et, d'autre part par une stimulation de la formation réticulée inhibitrice.

Notre hypothèse serait qu'E. californica, tout comme les tranquillisants mineurs, pourrait agir à la fois dans des régions de régulation spécifique où s'élaborent les émotions comme "l'anxiété", mais aussi dans des régions de régulation plus générale comme la substance réticulée ou la moëlle épinière. Cette hypothèse est suggérée, entre autre, par le fait que les benzodiazépines se fixent sur des récepteurs spécifiques qui se trouvent situer un peu partout dans le système nerveux central et même dans la moëlle épinière. Ces récepteurs sont couplés à des récepteurs gabaergiques ; or le gaba qui inhibe la transmission synaptique se trouve aussi dans toutes les régions cérébrales. La mise en jeu d'une inhibition de la transmission synaptique pourrait expliquer que l'on obtienne dans le test de la plaque chauffante une augmentation importante du temps de réaction des animaux traités avec le clorazépate dipotassique aux doses de 40 et 80 mg/Kg, et une augmentation -mais faible et non dose dépendante- des animaux traités avec E. californica aux doses de 200, 400 et 800 mg/Kg.

En conclusion, les résultats recueillis dans l'ensemble des expériences précédentes (test sur le comportement de la souris et sur l'hypnose barbiturique, la recherche d'un effet neuroleptique, antidépresseur, anti-histaminique et analgésique) plaident toutes en faveur de l'existence chez E. californica d'une action psychotrope dont le profil général ressemble à celui des tranquillisants mineurs classiques, à savoir les benzodiazépines.

Nous avons montré que l'extrait de plante ne présente aucun effet neuroleptique (absence de catalepsie à 200 et 800 mg/Kg et d'antagonisme aux effets de l'amphétamine), antidépresseur (absence d'antagonisme aux effets de la réserpine et de l'oxotrémorine), anti-histaminique et analgésique majeur. Donc les hypothèses que nous avons émises pour justifier l'action sédative à forte dose, démontrée dans les expériences sur le comportement de la souris et confirmées par la potentialisation de l'hypnose barbiturique, par l'un de ces effets, peuvent être rejetés.

Par ailleurs, la potentialisation des stéréotypies induites par l'amphétamine (§4) et l'analgésie mise en évidence dans le test du writhing ont déjà été observées avec les benzodiazépines (Boissier et Simon, 1966 ; Treit, 1988).

Cependant, il ne nous a pas été possible de dire si les propriétés anxiolytiques et sédatives de l'extrait d'E. californica sont dues à une action spécifique sur des structures directement impliquées dans l'élaboration des émotions, telles que celles du système limbique, ou si ces propriétés dépendent en réalité d'une action sédative centrale qui se manifeste tantôt par des effets désinhibiteurs (faibles doses), tantôt par des effets sédatifs (fortes doses).

Dans le but de préciser nos hypothèses sur le profil pharmacologique d'E. californica en comparaison avec celui des tranquillisants mineurs, nous avons recherché des propriétés "benzodiazépine like".

Nous savons d'après la littérature que la plupart des benzodiazépines antagonisent les convulsions induites par le cardiazole et présentent un effet myorelaxant (File et Pellow, 1987 ; Richards et Möhler, 1984), qu'elles diminuent faiblement et de manière non durable la température corporelle des souris et des rats (Danneberg, 1985) et qu'elles diminuent le rythme cardiaque des souris (Misslin et coll., 1976). En revanche, elles ne provoquent aucune modification importante de la pression artérielle (Schmitt et coll., 1967).

8. RECHERCHE DE PROPRIETES "BENZODIAZEPINES LIKE"

8.1. INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LES CONVULSIONS INDUITES PAR LE CARDIAZOLE

Le cardiazole perturbe les centres moteurs et induit des crises d'épilepsie expérimentales qui se traduisent après un temps de latence par des convulsions toniques et des convulsions cloniques qui entraînent la mort.

Le but de cette expérimentation est de vérifier si E. californica comme la plupart des benzodiazépines (File et Pellow, 1987) présentent des propriétés anticonvulsivantes, mises en évidence par un effet protecteur à l'encontre des crises d'épilepsie expérimentales provoquées par le cardiazole.

8.1.1. Matériel et méthodes

Trois lots de 10 souris mâles (J) reçoivent une administration d'E. californica par voie I.P. aux doses de 25, 200 ou 800 mg/Kg (0,5 ml/50 g), 30 minutes avant l'administration de cardiazole (Laboratoire Aldrich) par voie I.P., à la dose de 125 mg/Kg (0,5 ml/50 g).

Un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions. Au moment du test, on relève le temps d'apparition des convulsions toniques et la mortalité. Le clorazépate (Tranxène ® , Clin Midy, Montpellier) est utilisé comme produit de référence aux doses de 1, 10 et 40 mg/Kg.

Les résultats des lots traités sont comparés à ceux du lot témoin, globalement au moyen de l'analyse de variance, suivis du test de comparaisons multiples de Newmann Keuls, pour les comparaisons deux à deux, pour les temps d'apparition en secondes des convulsions toniques, et au moyen du test du X^2 pour les pourcentages de mortalité.

TABLEAU 26 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LES CONVULSIONS TONIQUES ET SUR LA MORTALITE INDUITES PAR LE CARDIAZOLE CHEZ LA LA SOURIS

CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE mg/Kg	E. CALIFORNICA mg/Kg	CARDIAZOLE mg/Kg	CONVULSIONS TONIQUES		MORTALITE %
			TEMPS D'APPARITION SECONDES + E.S.	%	
0	0	125	280 ± 48	100	100
0	25	125	260 ± 40	100	100
0	200	125	300 ± 36	100	100
0	800	125	323 ± 52	100	100
1	0	125	360 ± 60	70	70
10	0	125	/	0***	0***
40	0	125	/	0***	0***

N = 10

*** P < 0.001

8.1.2. Résultats et discussion

Les résultats présentés dans le tableau 26 montrent que le cardiazole, à la dose de 125 mg/Kg, induit des convulsions toniques et provoque la mort de tous les animaux témoins ou prétraités avec E. californica aux doses de 25, 200 ou 800 mg/Kg. Il n'y a aucune différence significative entre le temps d'apparition moyen des convulsions toniques des lots traités et celui du lot témoin. Par contre, chez les animaux prétraités avec le clorazépate dipotassique à la dose de 1 mg/Kg, le cardiazole induit des convulsions toniques, puis la mort chez 70 % des animaux. Les effets du cardiazole sont totalement supprimés lorsque ce prétraitement est de 10 ou de 40 mg/Kg.

Donc E. californica, aux doses de 25, 200 et 800 mg/Kg n'a aucune propriété anticonvulsivante, alors que le clorazépate aux doses de 10 et 40 mg/Kg protège totalement les animaux à la fois des convulsions toniques et de la mortalité.

8.2. INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LE TONUS MUSCULAIRE ET SUR LES REFLEXES D'EQUILIBRATION

Les tranquillisants mineurs ont de multiples sites d'action au niveau du système nerveux central. Au niveau médullaire, ils activent les interneurones chargés de transmettre l'inhibition pré-synaptique et induisent par conséquent une inhibition des réflexes mono et poly synaptiques. Au niveau du tronc cérébral, ils dépriment l'activité réticulaire et entraîneraient ainsi une diminution de l'activité des motoneurones gamma, réglant ainsi l'activité réflexe myotatique (Bussel et Bergego, 1979 ; Schmitt, 1974). Ces deux activités se traduisent chez la souris traitée par une diminution du tonus musculaire, souvent accompagnée d'un effet myorelaxant et, à forte dose d'une perte d'équilibration. Le but de cette expérimentation est de mettre en évidence un effet analogue avec E. californica. Pour cela, nous utilisons le test de la traction pour évaluer la force musculaire et le test du Rota-Rod pour évaluer la perte de l'équilibration.

8.2.1. Appareillage et protocole expérimental

8.2.1.1. Test de la traction

La technique est inspirée de la méthode de Jalou et Courvoisier, décrite par Benoist (1961).

L'appareillage est constitué par une plaque de bois de 30 cm sur 50 cm sur laquelle sont disposés deux piliers de bois distants de 20 cm. Un fil de 2 mm de diamètre est tendu entre les deux piliers à 15 cm de hauteur.

Dix lots de 10 souris (J) reçoivent pour quatre d'entre eux l'extrait d'E. californica dissout dans une solution de NaCl 0,9 %, par voie I.P., aux doses de 100, 200, 400 ou 800 mg/Kg (0,5 ml/50 g) 30 minutes avant le test. Les six autres lots de 10 souris (J) reçoivent le clorazépate dipotassique (Tranxène ® , Clin Midy, Montpellier) utilisé comme produit de référence, par voie I.P. aux doses de 1, 5, 10, 15, 20 ou 40 mg/Kg (0,5 ml/50 mg) également 30 minutes avant le test. Un lot témoin reçoit une solution de NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions.

Au moment du test, chaque souris est suspendue par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement. Un animal normal est capable de se rétablir en 5 secondes, tout animal qui ne parvient pas à effectuer ce rétablissement est considéré comme soumis à un effet myorelaxant. Avant le test, on sélectionne les animaux normaux.

Le calcul de l'ED 50 (dose efficace qui induit un effet myorelaxant chez 50 % des animaux est calculé selon la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

8.2.1.2. test de la tige tournante (Rota-Rod)

La technique est inspirée des méthodes de Dunham et Miya (1956).

L'appareillage est constitué d'un axe épais tournant horizontalement à faible vitesse (10 tours/minutes). La division de cet axe par des disques solidaires de la tige et espacés l'un de l'autre de 5 cm permet de soumettre ensemble 5 souris au test. Un compte temps est situé à la base de l'appareil.

Onze lots de 10 souris (J) reçoivent aux doses de 100, 200, 400 ou 800 mg/Kg, par voie I.P., pour quatre d'entre eux l'extrait d'E. californica. Six autres lots reçoivent le clorazépate dipotassique par voie I.P. aux doses de 1, 5, 10, 15, 20 ou 40 mg/Kg. Un lot témoin reçoit une solution de NaCl 0,9 %.

Au moment du test, les animaux sont placés, les quatre pattes sur la tige, dans le sens inverse de rotation de l'axe. On déclenche simultanément le compte temps et l'on comptabilise le pourcentage d'animaux qui ne se maintiennent pas sur l'axe de rotation pendant au moins 5 minutes. Préalablement au test, nous sélectionnons les animaux capables de se maintenir sur le cylindre pendant 5 minutes.

8.2.1.3. Tests statistiques

Les pourcentages des animaux qui présentent un effet positif sont comparés à ceux des animaux témoins au moyen du test du X^2. Le calcul de l'ED 50 est réalisé selon la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

8.2.2. Résultats

L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 27 . Ils montrent que dans le test de la traction, la totalité des animaux traités avec E. californica aux doses de 100 et 200 mg/Kg sont capables de se rétablir sur le fil en moins de 5 secondes alors que 90 % des animaux traités avec une dose de 400 mg/Kg et 50 % de ceux traités avec une dose de 800 mg/Kg sont capables d'une telle performance.

Dans le test du Rota-Rod, la majeure partie des animaux se maintiennent au moins 5 minutes sur le cylindre et cela quelque soit la dose d'E. californica administrée. Aucune différence significative n'est relevée entre les performances des différents lots traités et celles du lot témoin.

Après un traitement par le clorazépate dipotassique à la dose de 1 mg/Kg, 100 % des animaux se rétablissent en moins de 5 secondes sur le fil et 90 % d'entre eux se maintiennent sur le cylindre au moins 5 minutes. A partir de la dose de 20 mg/Kg, aucun des animaux traités ne peut ni se rétablir sur le fil, ni se maintenir sur le cylindre. Aux doses de 10 et 15 mg/Kg, nous enregistrons une situation intermédiaire. L'ED 50 évaluée égale à 6,43 mg/Kg (6,31-6,50) dans le test de la traction est légèrement inférieure à celle données par le dossier technique (10 mg/Kg) alors que l'ED 50 évaluée égale 7,08 mg/Kg (6,95-7,21) dans le test du Rota-Rod est conforme à la valeur donnée par le dossier technique.

8.2.3. Discussion

E. californica ne présente pas d'effet myorelaxant important, puisque seul un traitement de 800 mg/Kg réduit la tonicité musculaire chez les animaux traités (50 %) (Tableau 27).

Aucun traitement n'a modifié le comportement des animaux dans le test du Rota-Rod. Or, il faut savoir que plusieurs tranquillisants mineurs qui présentent un effet myorelaxant important affectent le comportement des souris dans les deux tests pharmacologiques (Salle et Brunaud, 1968 ; Rostowski et coll., 1986). Dans notre expérimentation, le clorazépate dipotassique diminue significativement, dès la dose de 10 mg/Kg, la force musculaire des souris : ED 50 = 6,43 mg/Kg (6,31-6,50) (Tableau 27) et leur capacité à garder l'équilibre sur la tige tournante : ED 50 = 7,08 mg/Kg (6,95- 7,21) (Tableau 27).

TABLEAU 27 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA ET DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE SUR LE TONUS MUSCULAIRE (TEST DE LA TRACTION) ET SUR LE POUVOIR D'EQUILIBRATION (TEST DU ROTA-ROD) CHEZ LA SOURIS

	TRAITEMENT DOSES mg/Kg	TEMOIN NaCl 0,9 %	E. CALIFORNICA				CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE					
			100	200	400	800	1	5	10	15	20	40
ANIMAUX QUI ONT PRESENTE UNE REPONSE POSITIVE %	TEST DE LA TRACTION	100	100	100	90	50 *	100	70	10 ***	10 ***	0 ***	0 ***
	ROTA-ROD	100	90	80	90	90	90	80	40 **	20 ***	0 ***	0 ***

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

N = 10

8.3. EFFETS D'E. CALIFORNICA (NEBULISAT) SUR LA TEMPERATURE CORPORELLE DES SOURIS ET DES RATS

La majeure partie des substances dépresseurs-centraux induisent une baisse de la température corporelle. Cet effet a également été trouvé chez certains tranquillisants mineurs, à savoir : le chlordiazépoxide, le brotazolam et le diazépam à forte dose (Greeley, 1985 ; Danneberg, 1986) et cela de façon plus importante chez la souris que chez le rat. Toutefois, comparativement à des neuroleptiques comme la chlorpromazine, les expérimentations ont montré que chez ces deux espèces de rongeurs, l'effet hypothermique des benzodiazépines est beaucoup plus faible et fugace. L'expérience réalisée ici a pour but de mettre en évidence chez E. californica, administrée seule par voie IP, un effet hypothermique dose dépendante chez la souris et le rat.

8.3.1 Matériel et méthodes

- Protocole expérimental

Dans une première expérience, quatre lots de 5 souris mâles (J) reçoivent par voie IP E. californica (nébulisat) aux doses de 100, 200, 400 ou 800 mg/Kg. Un lot de 5 souris (J) reçoit par voie IP de la réserpine (Serpasil®, Ciba-Geigy) à la dose 2 mg/Kg ; et un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions. La température de chaque animal est relevée au moyen d'une thermosonde électronique couplée à un galvanomètre (Technoterm, PT-100 type H) au moment de l'injection du produit (temps 0), puis 30, 60, 120 et 180 après.

Dans une deuxième expérience, deux lots de 4 rats mâles OFA, d'un poids moyen de 250 g (Iffa Credo, L'Abresle) reçoivent E. californica par voie IP aux doses de 200 et 800 mg/Kg. Un lot de 4 rats reçoit par voie I.P. une administration de chlorpromazine (Largactil®, Ciba-Geigy) à la dose de 20 mg/Kg. Un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions. La prise des températures est réalisée selon le même protocole que précédemment.

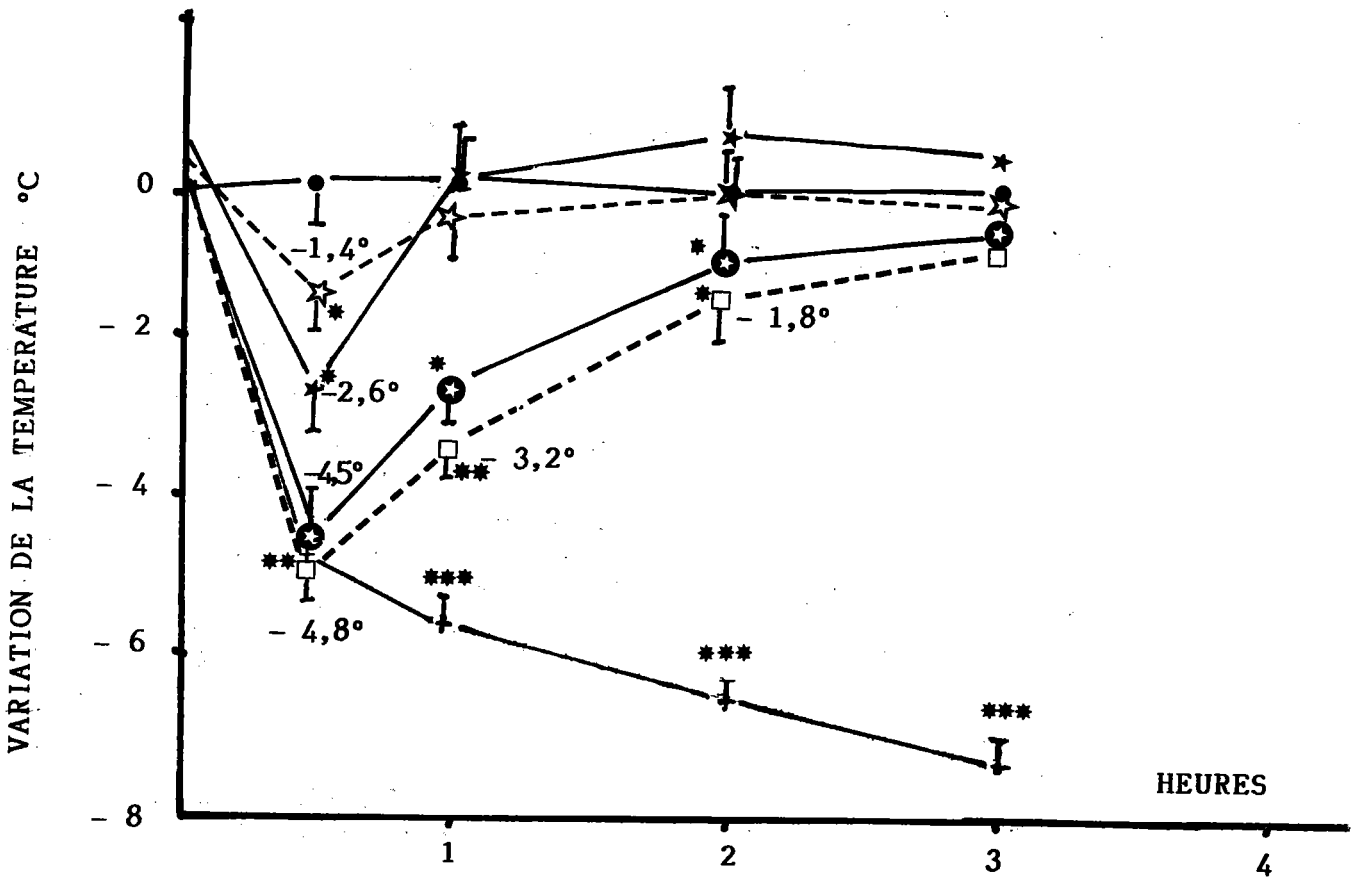
8.3.2 Résultats

Les résultats, présentés dans la figure 37, montrent que chez la souris E. californica réduit la température corporelle des souris à toutes les doses utilisées dès la trentième minute, et cela de façon dose dépendante (- 1,4°C à la dose de 100 mg/Kg et - 4,8°C à la dose de 800 mg/Kg).

On remarque que les animaux traités aux doses de 100 et 200 mg/Kg ont retrouvé un niveau de température normal une heure après le traitement, alors que les animaux traités aux doses de 400 et 800 mg/Kg retrouvent leur température de base seulement après 3 heures.

Les résultats obtenus chez le rat (Fig. 38) confirment la littérature (Greeley, 1985 ; Danneberg, 1986) et montrent que l'hypothermie est moins importante que chez la souris (Fig. 37), puisque l'on obtient seulement une diminution de la température corporelle de - 1° C, 30 minutes après un traitement par E. californica de 800 mg/Kg. Après administration de chlorpromazine (20 mg/Kg IP), la baisse de température est beaucoup plus importante dès la trentième minute et se maintient pendant plusieurs heures.

E. californica a une action modérée sur la température corporelle des rongeurs, et l'effet est fugace. Le végétal n'agit vraisemblablement pas sur les récepteurs spécifiques hypothalamiques contrôlant la température comme les neuroleptiques. Mais on peut supposer que la faible hypothermie est la conséquence d'une dépression générale du système nerveux central.



● TEMOIN

☆ 100

✱ 200

✪ 400 mg/Kg *E. CALIFORNICA*

□ 800

\+ 2 mg/kg *RESERPINE*

* P < 0.05

** P < 0.01

*** P < 0.001

N = 10

Fig. 37 - EVOLUTION DE LA TEMPERATURE CORPORELLE DES SOURIS APRES TRAITEMENT AVEC *E. CALIFORNICA*.

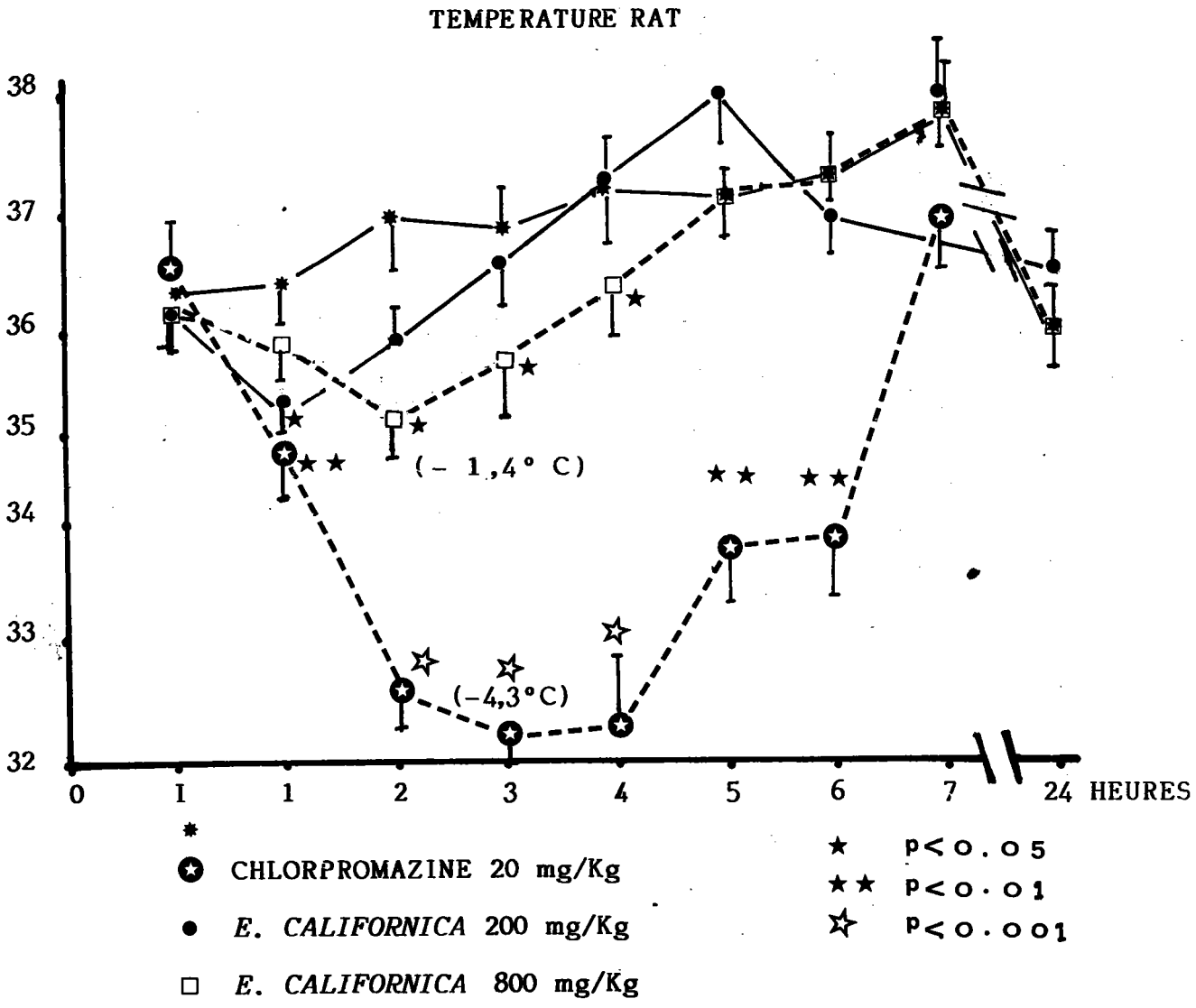
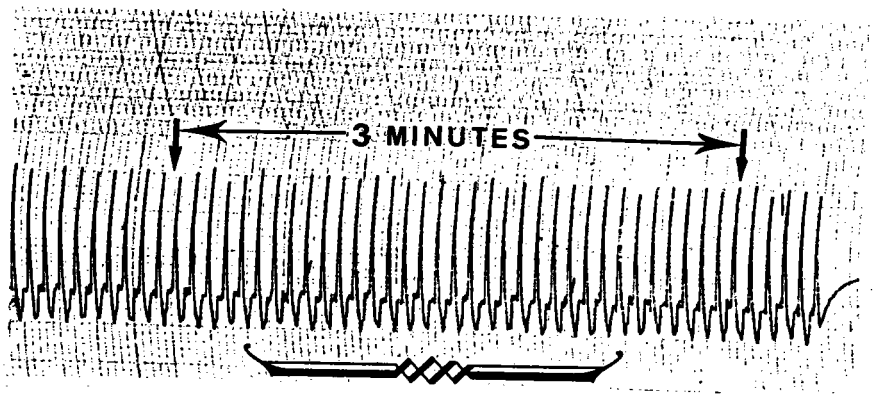


Fig. 38 - EVOLUTION DE LA TEMPERATURE CORPORELLE DES RATS TRAITES AVEC *E. CALIFORNICA* ET LA CHLORPROMAZINE.



Rythme cardiaque de base : 700 battements/minute

FIGURE 39 - ENREGISTREMENT DU RYTHME CARDIAQUE DE BASE D'UNE SOURIS

8.4. INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LE SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE

8.4.1. Effet d'E. californica sur le rythme cardiaque de la souris

La fréquence cardiaque est souvent considérée comme un indice de la réactivité émotionnelle des animaux (Misslin et coll., 1976). Le n dipropylacétate (acide gras à chaîne ramifiée), qui favorise l'adaptation des souris à des situations aversives lorsqu'elles sont administrées à faible dose (Misslin et coll., 1973 ; 1975 ; 1976) réduit aussi la fréquence cardiaque des souris.

8.4.1.1. Matériel et méthodes

La technique est inspirée de la méthode de Misslin (1975).

Nous enregistrons la fréquence cardiaque de deux groupes de 10 animaux auxquels a été administrée par voie IP, soit un extrait hydro-alcoolique d'E. californica (nébulisat) à la dose de 150 mg/Kg, soit une solution de NaCl 0,9 %. L'électrocardiogramme (ECG) est enregistré grâce à des électrodes-épingles posées de part et d'autre du thorax de l'animal. Après la pose de celles-ci, les souris sont placées dans le compartiment expérimental pour une période d'habituation de 30 minutes. Après cette période, l'ECG de repos est réalisé puis les animaux reçoivent l'injection de l'extrait ou de NaCl 0,9 %.

Les moyennes de la fréquence cardiaque des deux lots d'animaux traités sont comparées statistiquement par le test "t" de Student.

8.4.1.2. Résultats et discussion

La figure 39 représente l'enregistrement du rythme cardiaque de base d'une souris après la pose des électrodes-épingles et la période d'habituation de 30 minutes. On peut constater que chez l'animal choisi, le rythme de base est voisin de 700 battements par minute.

Dans la figure 40, on a représenté les moyennes et les erreurs-types des effets d'une dose de 150 mg/Kg d'E. californica sur la fréquence cardiaque des souris, en comparaison à celles des effets de l'injection d'une solution de NaCl 0,9 %.

On constate que les animaux traités présentent un rythme cardiaque qui diminue progressivement à partir du moment de l'injection de la plante.

Après 30 minutes, l'écart entre le rythme cardiaque des animaux traités est significativement différent de celui des animaux témoins.

Ces résultats peuvent être interprétés comme un effet réducteur de la réactivité émotionnelle des souris ; en d'autres termes, comme un effet "anxiolytique". Ils peuvent être rapprochés de ceux obtenus avec le n dipropylacétate qui a la propriété -comme la plupart des substances dites "anxiolytiques"- d'augmenter le niveau de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) endogène par inhibition compétitive de la transaminase qui dégrade le GABA (Godin et coll., 1969 ; Simler et coll., 1973).

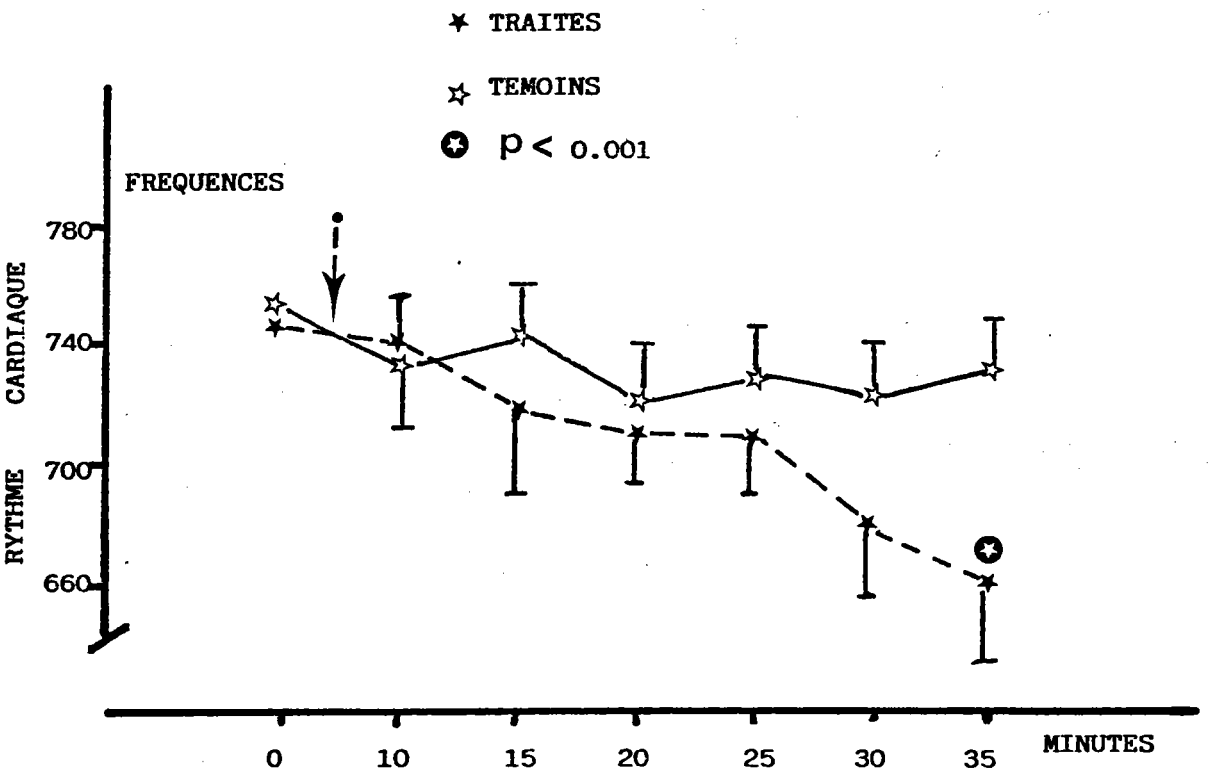


FIGURE 40 - EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR LE RYTHME CARDIAQUE. EN ABSCISSE SONT REPRESENTES LES MOMENTS D'ENREGISTREMENT DE LA FREQUENCE CARDIAQUE, EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS-STANDARDS DES FREQUENCES/MINUTES DU RYTHME.

LA FLECHE INDIQUE LE MOMENT DE L'INJECTION

N = 10

8.5. INFLUENCE D'*E. CALIFORNICA* SUR LA PRESSION ARTERIELLE

Les tranquillisants mineurs ne sont pas réputés modifier la pression artérielle (Simon et Boissier, 1979). Aussi, pour vérifier cette absence d'effet chez *E. californica*, avons-nous mesuré la tension artérielle par voie non sanglante au niveau de la queue du rat.

8.5.1. Matériel et méthode

8.5.1.1. L'appareillage

Il est constitué par :

- Une boîte à contention cylindrique en PVC opaque de 150 mm de long et 60 mm de diamètre. Une des extrémités est obturée par une fenêtre en PVC translucide et perforée de plusieurs trous permettant le passage de l'air et facilitant la respiration de l'animal. L'autre extrémité est libre mais peut être obturée par une porte guillotine.

- Un support constitué par une plate forme sur laquelle peut reposer la boîte à contention, dont la porte guillotine est placée contre un manchon en caoutchouc au travers duquel la queue de l'animal peut être introduite. Le manchon est relié à une poire de gonflage et à un manomètre, lui-même relié à une table traçante enregistrant les différentes pressions admises dans le manchon. De l'autre côté du manchon se trouve une gouttière dans laquelle est placé un capteur relié à un amplificateur, lui-même relié à une table traçante.

8.5.1.2. Protocole expérimental

Cinq minutes avant la prise de la tension artérielle, les animaux sont placés dans la boîte à contention.

La porte guillotine permet d'immobiliser l'animal dans la boîte tout en laissant la queue dépasser au-dehors. l'ensemble est alors placé dans une enceinte chauffée à 35° C. A cette température, les vaisseaux artériels se dilatent légèrement permettant un enregistrement plus aisé de la pression artérielle et des impulsions cardiaques.

Au moment de la prise de tension, la boîte est déposée sur le support et la queue de l'animal est introduite à travers le manchon puis est fixé à l'aide d'un ruban adhésif dans la gouttière, de façon à ce qu'elle repose sur le capteur. La table traçante est alors mise en marche.

L'enregistrement doit laisser apparaître une succession de pics réguliers. On gonfle alors le manchon jusqu'à l'arrêt total de la circulation artérielle au niveau de la queue, matérialisée par un enregistrement plat du rythme cardiaque. On dégonfle alors doucement le manchon jusqu'à réapparition des pics sur l'enregistrement. A ce moment, la lecture sur l'enregistrement des pressions admises dans le manchon détermine la tension artérielle systolique des animaux.

La pression artérielle de chaque animal d'un lot de 4 rats est enregistrée deux fois à 30 minutes d'intervalle (- 30 minutes, 0 minute), puis au temps 0 l'extrait hydro-alcoolique d'E. californica (nébulisat) est administré à la dose unique de 400 mg/Kg par voie I.P. (2 ml/Kg). Les pressions artérielles sont reprises 30 minutes puis 60 minutes après.

8.5.2 Résultats

Les résultats pour chacun des rats sont consignés dans le tableau 28. Ils montrent que E. californica, à la dose de 400 mg/Kg, ne modifie pas la tension artérielle des rats.

TABLEAU 28 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA (400 mg/Kg, voie I.P.) SUR LA PRESSION ARTERIELLE DES RATS

	PRESSION ARTERIELLE mm DE MERCURE			
	- 30	0	+ 30	+ 60
RAT 1	90	85	90	87
RAT 2	97	90	98	110
RAT 3	90	100	90	100
RAT 4	105	95	100	105

C H A P I T R E I I

ETUDE IN VIVO ET IN VITRO DE L'AFFINITE D'ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA POUR LES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES

8.5.3. Discussion

Nous avons mis en évidence chez les animaux traités avec l'extrait hydro-alcoolique d'E. californica (nébulisat) des effets hypothermisants faibles et fugaces plus importants chez la souris que chez le rat et une diminution de la fréquence cardiaque de la souris. Ces effets sont fréquemment rencontrés avec les tranquillisants mineurs.

En revanche, contrairement à ces substances; E. californica n'a pas présenté d'effet anticonvulsivant vis à vis des convulsions induites par le cardiazole, ni d'effet myorelaxant important (test de la traction, test de la tige tournante).

Il semble donc que le profil pharmacologique d'E. californica, proche de celui des benzodiazépines, soit de nature atypique. Aussi, dans le chapitre suivant, nous avons voulu vérifier l'influence d'E. californica sur les sites récepteurs aux benzodiazépines.

CHAPITRE II

ETUDE IN VIVO ET IN VITRO DE L'AFFINITE D'E. CALIFORNICA POUR LES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES

Après avoir démontré dans le premier chapitre, au moyen de tests in vivo, qu'E. californica présentait un profil pharmacologique voisin de celui des tranquillisants mineurs, à savoir les benzodiazépines, notre ambition est de préciser par conséquent si l'extrait d'E. californica présente une affinité pour les sites récepteurs des benzodiazépines. En effet, la découverte des sites récepteurs pour les benzodiazépines et la synthèse d'antagonistes de ces sites récepteurs ont permis la mise au point de techniques in vivo et de techniques in vitro.

- **La technique in vivo** fait appel à un antagoniste des sites récepteurs des benzodiazépines qui est capable de supprimer les effets pharmacologiques de ces substances dans tous les tests comportementaux ;

- **La technique in vitro** recherche sur des homogénats de cerveau l'affinité de molécules sur les sites récepteurs des benzodiazépines en étudiant le déplacement d'une benzodiazépine marquée.

Nous avons choisi ces deux protocoles expérimentaux mis au point pour la recherche de molécules de synthèse et avons essayé de les adapter aux extraits de plantes et principalement à l'extrait d'E. californica.

L'évolution constante des données de la littérature et les nombreux travaux concernant les benzodiazépines nous amènent à faire le point sur la pharmacologie et les sites récepteurs des benzodiazépines et le mode d'action des agonistes et antagonistes.

1 - RAPPELS DE LA PHARMACOLOGIE DES BENZODIAZEPINES

1.1. SITES RECEPTEURS ET MODE D'ACTION DES BENZODIAZEPINES

Le spectre pharmacologique des benzodiazépines est très large. Il révèle des effets sédatif, anxiolytique, myorelaxant, anticonvulsivant et parfois hypnotique et amnésiant (Costa et Guidotti, 1979 ; Palmer, 1980 ; Haefely, 1983_a ; Raffaitin et Cuche, 1983 ; Richards et Möhler, 1984 ; File et Pellow, 1987).

Après la mise en évidence de l'interaction des benzodiazépines avec le système inhibiteur gabaergique, et surtout de l'effet facilitateur des benzodiazépines pour la transmission gabaergique (Costa et coll., 1975 ; Müller, 1987), des sites récepteurs spécifiques aux benzodiazépines ont été caractérisés dans le système nerveux central et dans les tissus périphériques (Squirre et Braestrup, 1977 ; Möhler et Okada, 1977). Selon les auteurs, ces substances disposent de quatre types de sites de fixation chez les mammifères.

- **Le site central** responsable en grande partie du spectre pharmacologique de ces substances. A ce niveau, le système nerveux central possède des récepteurs aux benzodiazépines Na^+, K^+, ATPase dépendants, c'est-à-dire des sites membranaires qui sont spécifiquement récepteurs des molécules de benzodiazépines, et dont l'activation conduit aux effets pharmacologiques.

- **Le site central** à très haute affinité, mis en évidence par Ehlert, mais dont sa fonction et son existence restent à préciser (Morre et Keane, 1983).

- **Le site micromolaire**, à basse affinité situé dans le cerveau, où des concentrations micromolaires de benzodiazépines se lient stéréo-spécifiquement. Cette liaison n'est pas modifiée par le Gaba ou le muscimol, mais par le RO 5-4864, chimiquement apparenté au diazépam et très actif sur ce récepteur (Pellow et File, 1984).

- **Le site périphérique** qui n'induit pas d'activité psychotrope chez l'animal (Möhler et Okada, 1984) et qui est considéré comme accepteur et non récepteur des benzodiazépines. Le diazépam et le chlordiazépoxide ont une affinité plus faible pour ces sites que pour les sites centraux à la différence du RO 5-4864 (Pellow et File, 1984).

Selon Bidet et Gaignault (1984), les sites récepteurs centraux pourraient se subdiviser en récepteurs centraux de type 1 (BZ1) qui seraient mis en jeu dans l'activité anxiolytique et anticonvulsivante des benzodiazépines et en récepteurs centraux de type 2 (BZ2) qui seraient impliqués dans la sédation et l'ataxie. Mais Gee (1982) et Chiu (1983) ont suggéré que cette dissociation en deux types de récepteurs était probablement le résultat de deux états conformationnels différents d'un unique récepteur qui seraient fonction de la température.

La mise en évidence et l'étude in vitro des sites récepteurs aux benzodiazépines a débuté en 1977 par les travaux d'une part de Braestrup et, d'autre part de Möhler et Okada sur la cinétique de fixation et de dissociation du diazépam avec ses récepteurs spécifiques du système nerveux central. Ces études ont permis aux auteurs de montrer la spécificité de ces récepteurs et la faible concentration en benzodiazépines nécessaire pour les saturer (0,8 picomole de diazépam pour 1 mg de protéine contenu dans le cerveau) (Palmer, 1980).

Si l'on sait que le sites récepteurs aux benzodiazépines sont présents un peu partout dans le système nerveux central, leur distribution est très hétérogène (Palmer, 1980 ; Richards et Möhler, 1984). En s'appuyant sur des techniques autoradiographiques de la liaison in vitro d'une benzodiazépine à forte affinité pour les récepteurs centraux, à savoir le clorazépam, les auteurs ont montré une plus forte densité des sites spécifiques au niveau du bulbe olfactif (couches glométubulaires et plexiforme), le cortex cérébral, le pallidium ventral, l'hippocampe et le cervelet, alors que les régions du thalamus et de la moëlle épinière présentent une densité plus faible en récepteurs.

Richardset Möhler (1984) ont remarqué que les récepteurs centraux se situent précisémment au niveau des zones synaptiques et notamment dans les terminaisons nerveuses qui utilisent l'acide gamma aminobutyrique (Gaba) en tant que neurotransmetteur.

Les benzodiazépines facilitent préférentiellement les mécanismes gabaergiques d'inhibition post-synaptique, et probablement près-synaptique (Polc et coll., 1975 ; Costa et coll., 1975 ; Polc et Haefely, 1976 ; Möhler, 1982 ; Müller, 1987). Le Gaba, synthétisé au niveau des terminaisons nerveuses par décarboxylation de l'acide glutamique, est libéré au niveau des synapses où il se comporte comme un neurotransmetteur à fonction essentiellement inhibitrice selon les deux types d'inhibition (pré et post-synaptique).

Dans l'inhibition post-synaptique, les terminaisons nerveuses gabaergiques font synapse de manière axo somatique sur le corps cellulaire efférent. A ce niveau, la libération du neuromédiateur inhibiteur (Gaba) affaiblit post-synaptiquement l'effet des terminaisons excitantes afférentes de la manière suivante : le Gaba libéré se fixe sur un récepteur spécifique associé à un ionophore chlore (pores perméables sélectivement aux ions chlore). Les anions pénétrent dans la fibre post-synaptique et augmentent la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane neuronale, diminuant de ce fait la probabilité pour qu'un stimulus dépolarisant arrivant à ce neurone puisse engendrer un potentiel d'action.

Dans l'inhibition pré-synaptique, les terminaisons nerveuses gabaergiques font synapse de manière axo axonique avec les terminaisons nerveuses excitatrices afférentes qui convergent sur le corps cellulaire efférent. Dans cette situation, le Gaba libéré se lie spécifiquement à son récepteur, ce qui favorise la libération des ions chlorés, qui induisent une dépolarisation inhibant la libération du neurotransmetteur pré-synaptique de la fibre nerveuse excitatrice (Laurent, 1980).

L'hypothèse la plus simple pour expliquer l'effet facilitateur de l'inhibition au niveau de la synapse gabaergique par les benzodiazépines serait donc que la substance se fixe sur le récepteur gabaergique lui-même. Or, depuis les premiers travaux tendant à expliquer le mécanisme d'action moléculaire des benzodiazépines (Braestrup, 1977 ; Costa et Guidotti, 1976), les auteurs sont d'accord pour affirmer que les deux récepteurs sont distincts l'un de l'autre.

Ainsi, les récepteurs spécifiques centraux aux benzodiazépines seraient en réalité en relation étroite avec les récepteurs spécifiques au Gaba, eux-mêmes couplés à l'ionophore chlore (Costa et Guidotti, 1977 ; Braestrup, 1977 ; Costa et Guidotti, 1979 ; Polc et coll, 1982 ; Haefely, 1983).

Pour rendre compte du couplage entre les récepteurs au gaba et l'ionophore chlore qui lui est associé, et pour tenter d'expliquer les interactions spécifiques des benzodiazépines et de leurs ligands (agonistes, agonistes inverses, antagonistes), plusieurs modèles hypothétiques ont été proposés (Costa et Guidotti, 1979 ; Braestrup et coll., 1983 ; Polc et coll., 1983). Par ailleurs, les barbituriques et leurs agonistes, ou antagonistes, augmentent de manière similaire aux benzodiazépines la transmission inhibitrice gabaergique en intervenant de manière directe ou indirecte sur le récepteur au gaba (Johnston et Willow, 1982 ; Miller, 1987). Aussi, tous les modèles suggèrent l'existence d'un complexe protéique renfermant plusieurs sous-unités comportant, d'une part un canal au chlore et, d'autre part, différents sites spécifiques aux benzodiazépines, aux barbituriques et au gaba.

Parmi ces modèles, celui de Polc et coll. (1982) est le plus fréquemment rencontré dans la littérature (Fig. 41). Pour les auteurs, ce modèle peut rendre compte des différentes interactions des benzodiazépines, des barbituriques et de leurs agonistes ou antagonistes sur le système de couplage du récepteur au gaba et de l'ionophore chlore qui lui est associé par différentes voies et cela de la manière suivante : en se liant à son site spécifique, le gaba ou ses agonistes induisent un changement de conformation du récepteur qui déclenche l'ouverture de l'ionophore chlore. Le récepteur aux benzodiazépines agit comme une unité couplée au complexe gaba-canal au chlore (voie 1), modulant la stimulation de l'ionophore chlore. Le couplage entre le récepteur au gaba et l'ionophore chlore ne nécessite pas obligatoirement la présence de benzodiazépines, ou de leurs agonistes, mais la fixation de ces ligands sur le site récepteur des benzodiazépines facilite la réponse du système gabaergique (voie 2).

Les agonistes inverses des benzodiazépines réduisent la fonction de couplage du récepteur gaba-ionophore chlore (Polc et coll., 1982) (voie 3), alors que les antagonistes des benzodiazépines n'agissent pas sur le système de couplage du gaba avec l'ionophore chlore, mais bloquent l'accès du récepteur aux benzodiazépines.

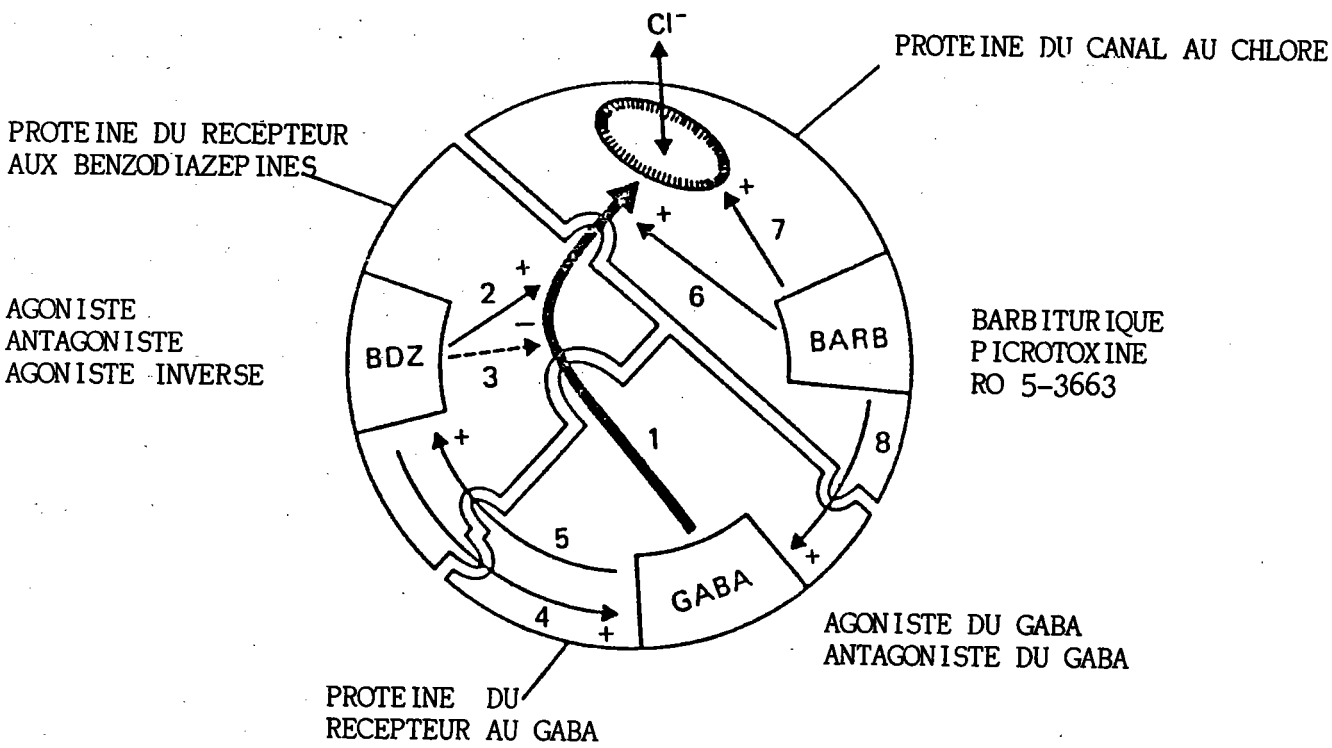


Fig. 41 - MODELE HYPOTHETIQUE

COMPLEXE MULTIMOLECULAIRE : RECEPTEUR GABA - RECEPTEUR AUX BENZODIAZEPINES - IONOPHORE CHLORE (D'APRES POLC ET COLL., 1982)

Au moyen de la voie 4, les benzodiazépines et leurs agonistes augmenteraient l'affinité du récepteur au gaba pour le gaba (Haefely, 1983a). A l'inverse, l'activation du récepteur au gaba par le gaba lui-même, ou des molécules agonistes, augmente l'affinité des benzodiazépines pour leurs récepteurs. Cette modification est à son tour transmise à l'ionophore chlore qui répond au augmentant sa fréquence d'ouverture (voie 5).

Les barbituriques altèrent la cinétique de l'activation du gaba sur l'ionophore chlore (Haefely, 1983b) (voie 6) et à haute dose, ils ouvrent directement le canal aux ions chlores (voie 7). Ils sont également capables d'augmenter l'affinité du récepteur au gaba pour son neurotransmetteur ou ses agonistes en agissant peut-être sur des phospholipides particuliers. En effet, d'après de récents travaux d'Haefely (1985), les lipides constitueraient une fraction importante du complexe multimoléculaire avec des phospholipides, comme la phosphatidyléthanolamine qui pourrait être un inhibiteur de la fixation du gaba sur son récepteur. Par ailleurs, Costa et Guidotti (1979), Bidet et gaignault (1984) ont déjà émis l'hypothèse de l'existence d'une protéine : la gabamoduline, intercalée entre le récepteur au gaba et celui aux benzodiazépines. Cette protéine, en absence de benzodiazépine, maintiendrait le récepteur au gaba dans un état de basse affinité et entraînerait donc l'ouverture de l'ionophore chlore à basse fréquence.

Lorsque le gaba occupe son récepteur en présence de benzodiazépines, la protéine serait inactivée par phosphorylation ; le récepteur au gaba passe à l'états de haute affinité et l'ouverture de l'ionophore chlore passerait à haute fréquence.

1.2. BENZODIAZEPINES ET LIGANDS ENDOGENES

Depuis la découverte dans le système nerveux central de sites de liaison de haute affinité stéréospécifiques et saturables, capables de fixer les benzodiazépines, les chercheurs ont tenté de démontrer l'existence de ligands endogènes des récepteurs aux benzodiazépines, comme cela avait déjà été effectué avec la découverte des sites récepteurs aux Opiacées et des ligands endogènes que sont les endorphines et les β enképhalines. On a ainsi recherché des substances produites par le cerveau, capables de se fixer sur ces sites récepteurs et de présenter les propriétés des benzodiazépines. Pour cela, la plupart des auteurs utilisent les tissus du cerveau de bovins et les urines comme matières premières destinées à l'extraction de ces substances. A la suite de ces différentes

extractions et purifications, de nombreuses molécules ont été proposées comme ligands endogènes (Müller, 1987) ; parmi lesquelles les bases xanthiques nicotinamide (inosine et hypoxanthine) et surtout les β carbolines qui ont été supposées comme les ligands endogènes les plus probables.

Or, aucune de ces substances ne présente tous les critères requis pour être un ligand endogène. L'affinité des bases xanthiques pour le récepteur aux benzodiazépines est faible (Dingemanse et Breimer, 1984 ; Müller, 1987), et cette affinité in vitro n'est pas modifiée par le gaba, ni antagonisée par le RO 15-1788 (antagoniste pur). Par ailleurs, si des propriétés "benzodiazépines like" ont été mises en évidence, plusieurs propriétés antagonistes ont été rapportées par la littérature et ont été reliées à une affinité au récepteur de la picrotoxine (Müller, 1987).

Si les bases xanthiques ne peuvent pas être retenues comme ligand endogène, elles pourraient cependant tenir un rôle de régulation dans le fonctionnement du récepteur aux benzodiazépines.

A la différence des bases xanthiques, les β carbolines extraites d'urine de rat et identifiées dans le cerveau de rat, ont une grande affinité pour les récepteurs aux benzodiazépines (Thiébot et Soubrié, 1983). Cela a permis de les proposer comme ligands endogènes En fait, plusieurs observations permettent de rejeter cette hypothèse. En effet, il semblerait d'une part que ces substances soient un artefact et qu'elles se formeraient à partir de précurseurs (indole endogène) durant la phase d'extraction (Bidet et Gaignault, 1984 ; Müller, 1987) et d'autre part, plusieurs expérimentations ont mis en évidence que les β carbolines se présentent en fait comme des agonistes inverses et non des substances à propriétés "benzodiazépines like" qui seraient endogènes.

Ainsi, la β éthyl, β carboline 3 carboxylate (BCCE) et la méthyl, β carboline 3 carboxylate (BCCM) (Bidet et Gaignault, 1984) ont montré des effets proconvulsivants et convulsivants antagonisés par le RO 15-1788. Le méthylamide β carboline (BCCMA) provoquerait des crises de panique (Thiébot et Soubrié, 1983). Belzung et coll. (1987) ont montré que le BCCM réduisait le temps de séjour dans le compartiment éclairé des animaux traités, à la différence des benzodiazépines. Selon Chapoutier (1987), alors que les benzodiazépines sont amnésiantes, les BCCM sont au contraire, à faible dose, promnésiantes et, à forte dose, anxiogènes.

Dans l'état actuel des recherches, il est donc impossible de démontrer l'existence de ligands endogènes à propriétés "benzodiazépine like".

1.3. LIGANDS DES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES

La recherche du, ou des, ligand(s) endogène(s) et exogène(s), suggérée par plusieurs auteurs a permis de déceler de nombreuses molécules ayant une grande affinité pour les récepteurs aux benzodiazépines, mais ne présentent pas forcément les mêmes propriétés pharmacologiques.

On peut distinguer trois groupes de ligands des récepteurs aux benzodiazépines (Polc et coll., 1982 ; Richards et Möhler, 1984 ; Müller, 1987) :

- **Les agonistes** qui augmentent le couplage entre le récepteur au gaba et le canal ionophore chlore. Ils présentent les propriétés tranquillisantes, sédatives, anticonvulsivantes et myorelaxantes des benzodiazépines (pyrazolochinoline, triazolopyridazine, zopiclone) ;

- **Les antagonistes inverses** qui s'opposent aux effets des benzodiazépines en diminuant le couplage gaba-ionophore chlore (esters ou amides des β carbolines 3 carboxylate) ;

- **Les antagonistes** qui inhibent l'accès du récepteur aux benzodiazépines pour les agonistes ou les agonistes inverses (RO 15-1788), (Bonetti et Coll., 1982.)

Par ailleurs, plusieurs substances ont montré des propriétés intermédiaires que les auteurs ont défini comme agonistes ou antagonistes partiels (Polc et coll., 1982 ; Haefely 1983 b ; Möhler, 1984).

Parmi les substances mentionnées dans la littérature (Shannon et Herling, 1983 ; Haefely et coll., 1983, 1985 ; Keane et coll., 1984 ; Bidet et Gaignault, 1984 ; Bernabe, 1986), une imidazobenzodiazépine (RO 15-1788) a retenu notre attention pour ses propriétés antagonistes pures des récepteurs aux benzodiazépines (Polc et coll., 1982 ; Haefely, 1983 ; Richards et Möhler, 1984 ; File et Pellow, 1987 ; De Deyn et Mac Donald, 1987).

Par des méthodes autoradiographiques, il a été montré que la distribution des sites de liaison du RO 15-1788 dans le système nerveux central est identique à celle des benzodiazépines classiques (Richards et coll., 1982). Par ailleurs, cette substance montre un antagonisme spécifique et puissant des récepteurs aux benzodiazépines vis à vis de tous les effets classiques centraux des benzodiazépines. Elle bloque l'action de tous les composés qui agissent à travers les récepteurs aux benzodiazépines. Par contre, le RO 15-1788 ne se fixe pas sur les sites de liaison aux benzodiazépines non neuronales et sur les sites de liaison périphériques (Hunkeler et coll., 1981). Duka et coll. (1986) ont montré que si le RO 15-1788 antagonise les effets pharmacologiques des benzodiazépines, il peut également antagoniser la diminution induite par les benzodiazépines du taux des catéchilamines du cerveau.

Selon Haefely (1983), le RO 15-1788 n'aurait pas d'effet pharmacologique propre, ni sur l'effet des barbituriques et de l'éthanol. Or, plusieurs auteurs ont montré récemment que cela n'était pas tout à fait exact. En effet, le RO 15-1788 présenterait un effet intrinsèque double selon la dose utilisée. A faible dose, Belzung et coll. (1987) ont antagonisé les effets stimulants de l'alcool et, à plus forte dose, ils ont obtenu des effets "benzodiazépine like". Au-delà de 20 mg/Kg ; le RO 15-1788 présenterait des effets anxiogènes.

2 - ETUDE IN VIVO : RECHERCHE DE L'INFLUENCE D'UN ANTAGONISTE DES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES VIS A VIS DES PROPRIETES SEDATIVES ET ANXIOLYTIQUES D'E. CALIFORNICA

Le protocole consiste à rechercher si les propriétés pharmacologiques d'E. californica sont antagonisées lorsque les sites récepteurs des benzodiazépines sont occupés par un antagoniste. Le choix de l'antagoniste s'est porté sur le RO 15-1788 en raison d'une part du faible nombre de substances disponibles en 1986 et, d'autre part, en raison de l'abondante littérature établissant sa spécificité.

L'influence vis à vis du RO 15-1788 et les propriétés sédatives d'E. californica ont été recherchées dans le test de l'open-field. Le midazolam est le produit de référence utilisé. L'influence du RO 15-1788 vis à vis des propriétés anxiolytiques d'E. californica a été réalisée dans le test de la chambre claire et le clorazépate dipotassique est le produit de référence utilisé.

2.1. PROTOCOLE OPERATOIRE

2.1.1. Les animaux

Il s'agit de souris mâles (L), dont la description, les conditions d'élevage et la nourriture sont décrites au Chapitre 1, § 1.2.1.

2.1.2. L'extrait et les substances témoins

Nous avons utilisé l'extrait hydro-alcoolique d'E. californica du commerce (nébulisat).

- Le midazolam

- Le clorazépate dipotassique

- Le RO 15-1788 qui nous a été gracieusement fournis par les laboratoires Hoffman-Laroche (Bâle, Suisse).

2.1.3. Protocole expérimental

- Le test de l'open-field

La description et le protocole expérimental sont identiques à ceux mentionnés au Chapitre 1, § 3.2.2.3.

E. californica et le midazolam ont été administrés aux doses respectives de 200 et 2 mg/Kg, par voie I.P., soit seuls, soit combinés au RO 15-1788 à la dose de 10 mg/Kg.

- Le test de l'enceinte claire/obscure

La description et le protocole expérimental sont identiques à ceux mentionnés au Chapitre 1, § 3.2.2.2.

E. californica et le clorazépate dipotassique ont été administrés aux doses respectives de 25 et de 2 mg/Kg, par voie I.P., soit seuls, soit combinés au RO 15-1788 à la dose de 1 mg/Kg, voie I.P.

2.1.4. Tests statistiques

Pour chacun des paramètres enregistrés, les performances des lots traités et des lots témoins sont comparées globalement à l'aide du test "F" de l'analyse de variance. Si les résultats diffèrent de façon significative, ils sont comparés deux à deux à l'aide du test de comparaisons multiples de Newmann Keuls.

2.2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.2.1. Antagonisme des effets sédatifs d'E. californica et du midazolam dans le test de l'open-field par le RO 15-1788

Les résultats sont présentés dans les figures 42 et 43. On observe qu'E. californica à la dose de 200 mg/Kg et le midazolam à la dose de 2 mg/Kg diminuent significativement la locomotion et le nombre de redressements dans le test de l'open-field.

Lorsque l'on administre le RO 15-1788 simultanément, E. californica et le midazolam ne diminuent plus significativement les redressements et la locomotion par rapport au témoin. Cependant, on remarque que cet antagonisme du RO 15-1788 est total vis à vis du midazolam, puisque la différence entre le midazolam, avec et sans RO, est significative pour la locomotion et les redressements, alors qu'il n'est que partiel vis à vis d'E. californica, car il n'y a pas de différence significative entre E. californica et E. californica + RO.

Il est vrai que l'on observe un effet propre du RO 15-1788 puisque ce produit augmente significativement les redressements et a tendance à augmenter la locomotion.

Ce résultat est en contradiction avec Richards et Möhler (1984) qui mentionnent que le RO 15-1788 est dénué de tout effet pharmacologique propre. Par contre, nous savons par des travaux plus récents de File et Pellow (1986) et Belzung et coll. (1987) qu'à forte dose, le RO 15-1788 possède des effets comportementaux intrinsèques, capables d'antagoniser certains effets des benzodiazépines ou de l'alcool.

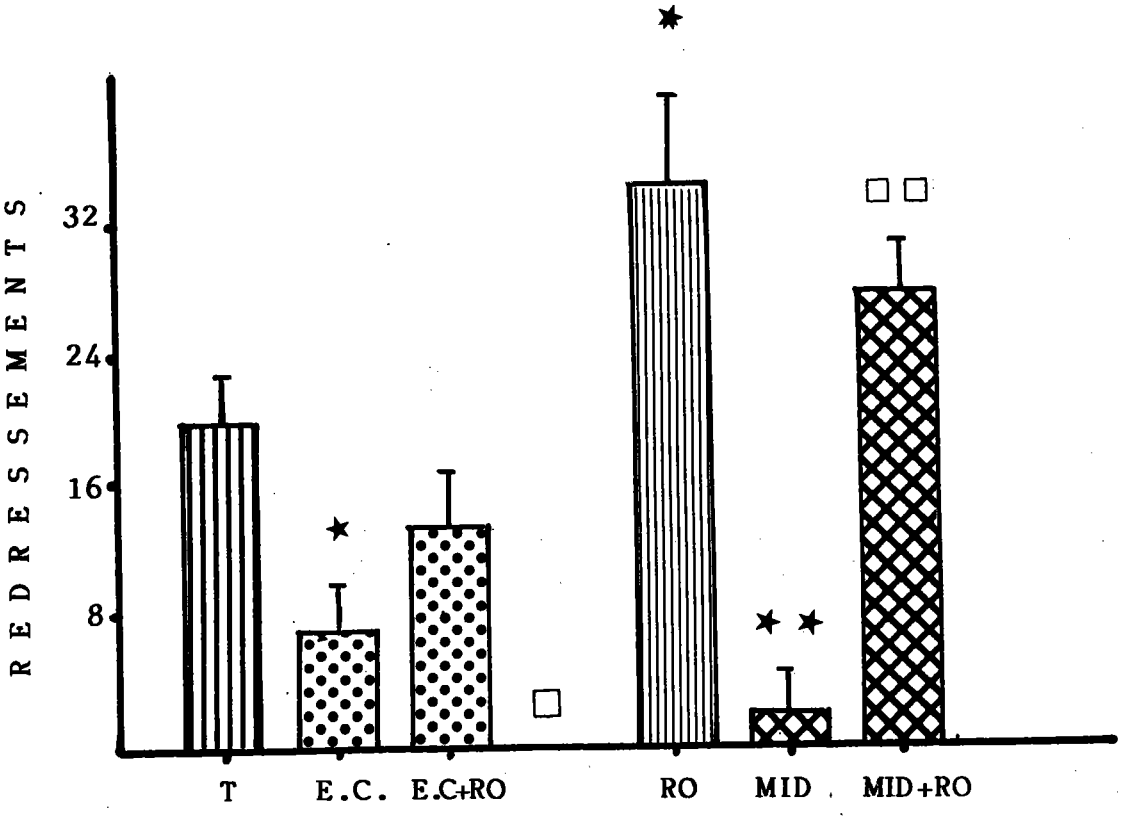
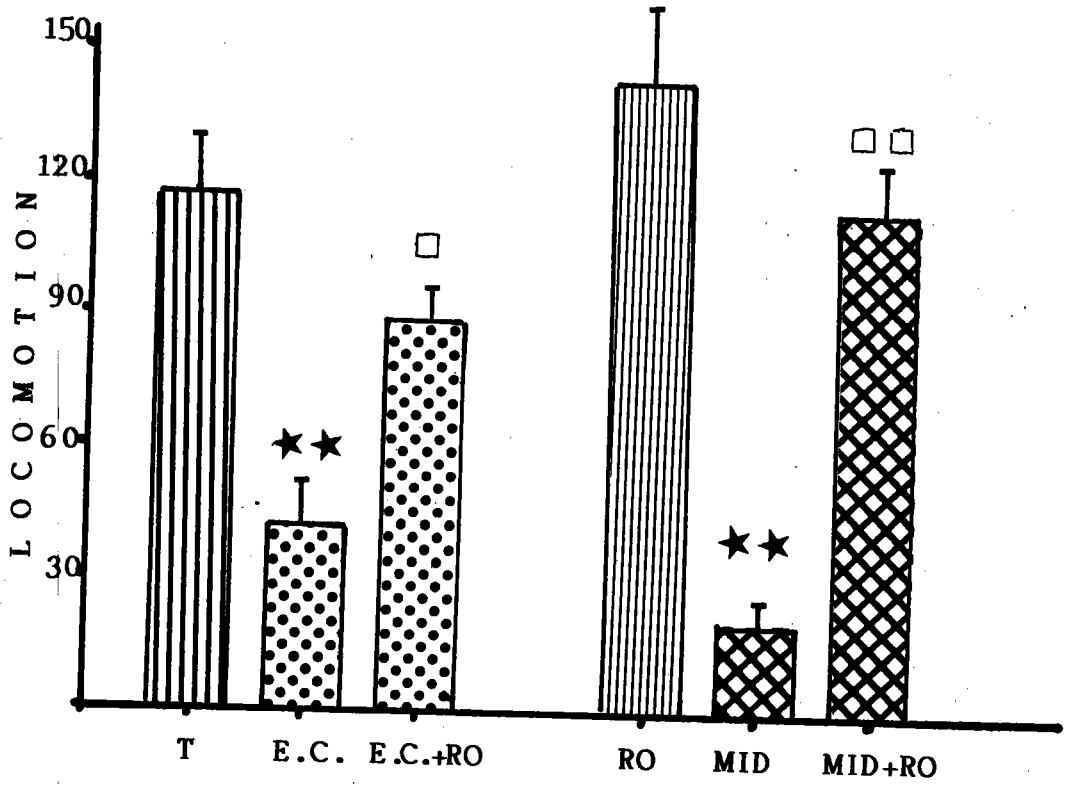


Fig. 42 - EFFETS D'E. CALIFORNICA (E.C. 200 mg/Kg) ET DU MIDAZOLAM (MID. 2 mg/Kg) ADMINISTRES SEULS OU COMBINES AVEC LE RO 15-1788 (R.O. 10 mg/Kg) SUR LES REDRESSEMENTS DES SOURIS PLACEES EN OPEN-FIELD

N = 10



★★ P < 0.01 E.C./T ET MID/T

□ P < 0.05 E.C. + RO/E.C.

□□ P < 0.01 MID + RO/MID

T = TEMOIN

Fig. 43 - EFFETS D'E. CALIFORNICA (E.C. 200 mg/Kg) ET DU MIDAZOLAM (MID 2 mg/Kg) ADMINISTRES SEULS OU COMBINES AVEC LE RO 15-1788 (RO 10 mg/Kg) SUR LA LOCOMOTION DES SOURIS PLACEES EN OPEN-FIELD.

T = TEMOIN
NOMBRE D'ANIMAUX = 10

L'interprétation de nos résultats peut donc s'effectuer non seulement entre les effets du RO 15-1788 au niveau du complexe gabaergique ionophore chlore et de l'affinité éventuelle d'E. californica pour ce complexe, mais aussi au niveau d'une activité propre du RO 15-1788, mise en évidence dans le test de l'open-field. Toutefois, on peut noter que des résultats obtenus selon le même protocole avec deux extraits de plantes appartenant à deux familles botaniques différentes, mais présentant également des propriétés sédatives, n'ont montré aucun antagonisme, même partiel, avec le RO 15-1788 (travaux non publiés et confidentiels). Cela laisse supposer que l'effet intrinsèque propre du RO 15-1788 ne peut en aucun cas expliquer l'antagonisme des effets sédatifs d'E. californica.

2.2.2. Antagonisme des effets anxiolytiques d'E. californica par le RO 15-1788

Les résultats présentés dans la figure 44 montrent que le clorazépate dipotassique (2 mg/Kg, voie I.P.) et E. californica (25 mg/Kg, voie I.P.) augmentent significativement le temps de séjour des animaux dans la chambre claire. Cet effet est totalement antagonisé par le RO 15-1788 à la fois pour le clorazépate et pour l'extrait d'E. californica. On remarque que le RO 15-1788 n'a pas d'effet propre mis en évidence dans ce test à la dose de 1 mg/Kg puisque, administré seul, il ne présente aucun effet par rapport au témoin ; ce qui tend à démontrer qu'E. californica pourrait présenter une affinité pour les récepteurs des benzodiazépines.

Ainsi, les résultats de ces deux expérimentations in vivo (test de l'open-field et test de la chambre claire/obscure) ont montré qu'un antagoniste des sites récepteurs des benzodiazépines s'oppose à la fois aux propriétés anxiolytiques et partiellement aux propriétés sédatives d'E. californica, tendant à montrer une affinité d'E. californica pour les sites récepteurs aux benzodiazépines.

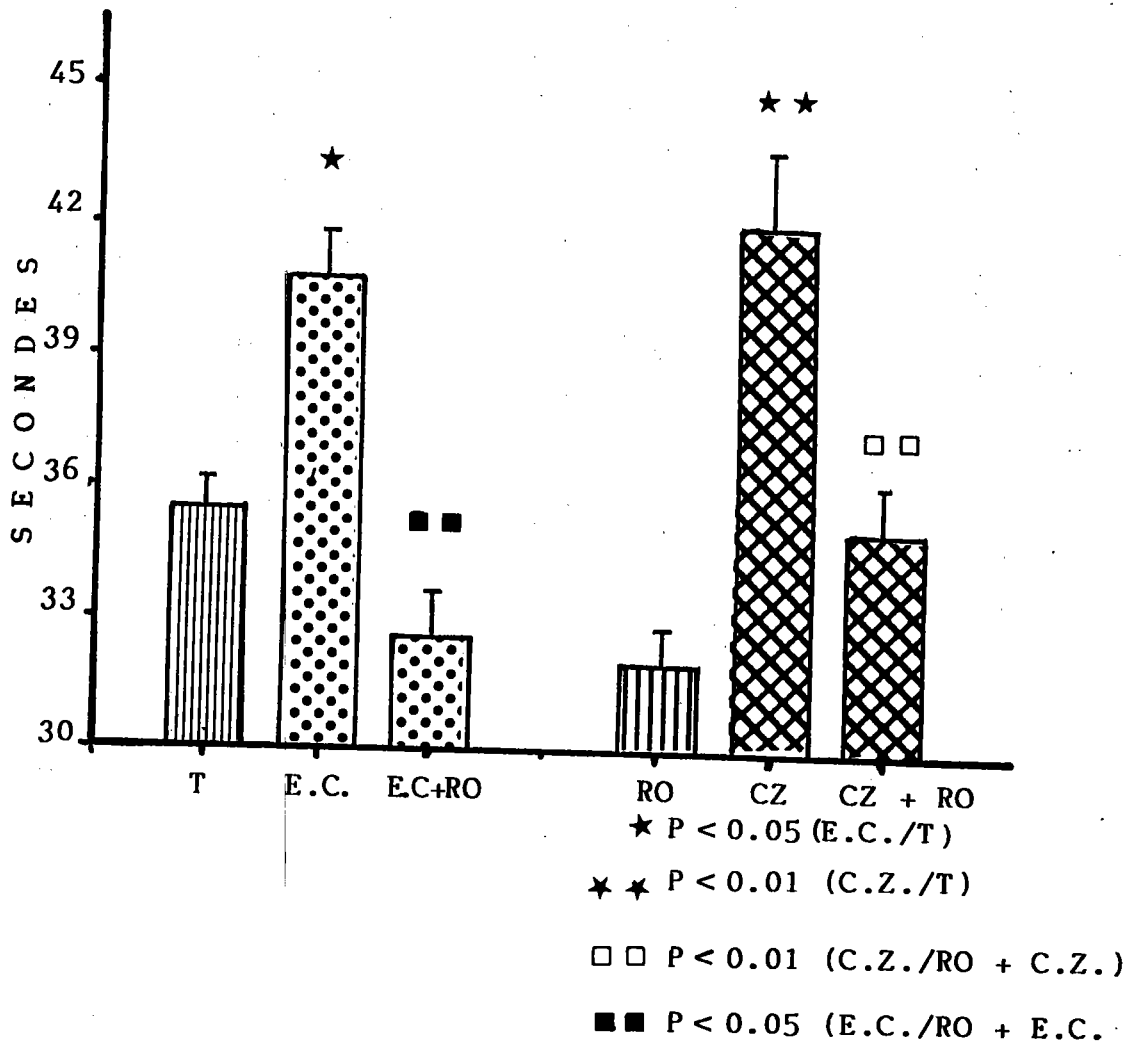


Fig. 44 - EFFETS D'E. CALIFORNICA (E.C. 25 mg/Kg, IP) ET DU CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE (C.Z. 2 mg/Kg) ADMINISTRES SEULS OU COMBINES AVEC LE RO 15-1788 (RO 1 mg/Kg) SUR LE TEMPS DE SEJOUR DE LA SOURIS DANS L'ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE

3 - ETUDE IN VITRO DE L'AFFINITE D'E. CALIFORNICA SUR LES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES

Les techniques in vitro mettent en évidence le caractère spécifique de la liaison des benzodiazépines avec leur récepteur (Braestrup et Squires, 1977 ; Möhler et Okada, 1977).

Ces techniques sont utilisées lors de screening pour démontrer l'existence d'une affinité spécifique de nouvelles molécules pour les sites récepteurs des benzodiazépines. Nous avons essayé d'adapter ce test à l'étude des extraits végétaux car il présente l'énorme intérêt de pouvoir affiner un mode d'action mais a aussi l'inconvénient d'introduire de très nombreuses molécules issues de la complexité de l'extrait végétal.

La méthode, inspirée de la technique de Gray et Whittaker (1962), de Whittaker et coll. (1964) et de Braestrup et Squires (1977) a été mise au point dans notre laboratoire par Bernabe (1986) et consiste, dans un premier temps, à isoler à partir d'homogénat d'encéphale de rat, une suspension enrichie en membranes neuronales par fractionnement subcellulaire. La fraction ainsi isolée renferme les terminaisons pré et post synaptiques qui seront détachées des neurones et qui forment des particules constituées par les principales structures de la synapse nommées "synaptosomes" par Whittaker et al. (1964).

Lors de l'adaptation de la technique aux extraits végétaux, nous avons vérifié la pureté et la richesse en membrane plasmique de la fraction subcellulaire, d'une part à l'aide de la microscopie électronique et, d'autre part, en déterminant l'activité d'une enzyme membranaire : l'adénosine triphosphatase.

Dans un deuxième temps, les synaptosomes sont incubés avec une faible concentration de flunitrazépam marqué (ligand marqué) (benzodiazépine de haute activité spécifique) en présence, ou en absence, d'une benzodiazépine (ligand) non radioactive et à concentration élevée. Après un temps d'équilibre, les membranes ayant fixé le flunitrazépam marqué, sont séparées du milieu restant par filtration et la radioactivité résiduelle fixée sur le filtre est évaluée.

Enfin, un protocole tout à fait semblable est réalisé mais en remplaçant la benzodiazépine non radioactive par l'extrait végétal. La compétition éventuelle visualisée par la radioactivité résiduelle de l'extrait d'E. californica vis à vis du flunitrazépam nous permettra d'évaluer l'affinité de ces molécules pour les sites récepteurs spécifiques des benzodiazépines.

3.1. PROTOCOLE OPERATOIRE

3.1.1. Isolement des synaptosomes

3.1.1.1. Animaux

Les tests sont réalisés sur des rats femelles Wistar pesant entre 300 et 400 g. Les conditions d'élevage et la nourriture sont décrites au Chapitre 1 § 1.2.1.

3.1.1.2. Les extraits végétaux

- **L'extrait d'E. californica** : nous avons choisi l'extrait aqueux industriel pilote (Réf. RT 1095) du fait de sa grande solubilité en milieu aqueux.

- **L'extrait de Poa sp.** : c'est un extrait hydro-alcoolique lyophilisé, obtenu par décoction des parties aériennes. Le rendement d'extraction est de 1/4,8.

3.1.1.3. Protocole expérimental

*** Préparation de l'homogénat d'encéphale**

L'animal est sacrifié par décapitation et l'encéphale entier est prélevé le plus rapidement possible. Toutes les opérations sont effectuées à des températures inférieures à 4° C, afin de réduire l'activité des enzymes libérées.

Après pesée, le cerveau est placé dans une solution de saccharose glacée, isotonique au plasma et de concentration 0,32 M ; puis il est homogénéisé (homogénéisateur de Potter et Elvejem, type A) à 1200 t/min. L'homogénat recueilli est ajusté à une concentration de 10 % (P/V), à l'aide de saccharose 0,32 M.

* **Fractionnement subcellulaire de l'homogénat**

La technique utilisée est celle de Gray et Whittaker (1962), modifiée par Whittaker et coll. (1964).

Le principe de ce fractionnement consiste en plusieurs centrifugations successives de plus en plus poussées permettant l'élimination progressive de diverses organites cellulaires et l'obtention d'une fraction synaptosomale contenant les terminaisons nerveuses et donc les sites récepteurs benzodiazépiniques. Le déroulement des opérations est le suivant :

HOMOGENAT D'ENCEPHALE A 10 % DANS UNE SOLUTION DE SACCHAROSE A 0,32 M

↓ CENTRIFUGATION A 1000 g PENDANT 10 MINUTES

CULOT (noyaux, débris cellulaires grands fragments de myéline)

SURNAGEANT

↓ CENTRIFUGATION A 17000 g PENDANT 55 MINUTES

CULOT (fraction mitochondriale brute : mitochondries-petits fragments de myéline-synaptosomes-quelques microsomes).

SURNAGEANT (microsomes-ribosomes-fraction post microsomale)

↓

- REMISE EN SUSPENSION DANS 3 ml DE SACCHAROSE 0,32 M

↓

- DEPOT SUR UN GRADIENT DE DENSITE DISCONTINUE AU SACCHAROSE (1,2 - 0,8 et 0,32 M)

↓

- CENTRIFUGATION A 53500 g, PENDANT 2 HEURES

↓

INTERFACE DES COUCHES 0,32-0,8 M FRACTION A (fragments de myéline)

INTERFACE DES COUCHES 0,8-1,2 M FRACTION B (fraction synaptosomale)

CULOT DANS DU SACCHAROSE 1,2 M FRACTION C (mitochondries)

- ISOLEMENT A L'AIDE D'UNE PIPETTE PASTEUR COUDEE

- DILUTION DANS UN MEME VOLUME D'EAU DISTILLEE GLACEE CONCENTRATION EN SACCHAROSE D'ENVIRON 0,45 M)

- CENTRIFUGATION A 10 g PENDANT 1 HEURE

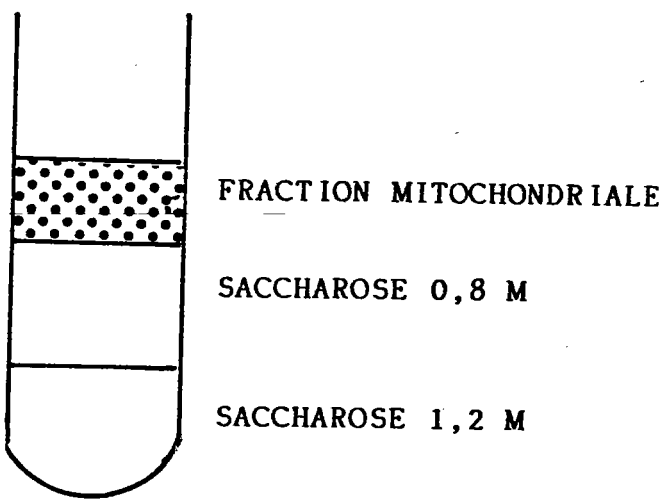
CULOT REMIS EN SUSPENSION DANS UNE SOLUTION DE TAMPON TRIS (50 mM), AJUSTEE AVEC HCL 1N A UN pH de 7,4 A 0° C

La suspension ainsi obtenue est congelée à - 20° C jusqu'à son utilisation dans le test in vitro. Avec nos conditions opératoires de conservation des membranes synaptosomales, on sait (Bernabe, 1986) que la durée de la congélation altère progressivement la liaison spécifique de la benzodiazépine marquée. C'est pourquoi les membranes congelées sont utilisées au maximum 5 jours après leur isolement.

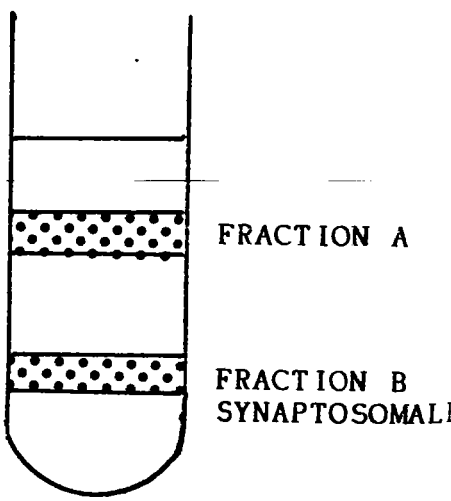
Remarque : La plupart des manipulations sont réalisées à 0° C (dans la glace fondante) avec des ustensiles réfrigérés. C'est le cas des remises en suspension, des prélèvements de solutions, de la réalisation du gradient de saccharose et des dilutions.

Le gradient de densité discontinu en saccharose est préparé une heure avant le dépôt de la fraction mitochondriale brute. Le gradient est constitué de deux solutions de saccharose à 1,2 M et 0,8 M (5 ml chacune), la seconde étant ajoutée à la surface de la première très lentement de façon à obtenir deux phases nettement séparées.

AVANT CENTRIFUGATION



APRES CENTRIFUGATION



a) Microscopie électronique

Pour cette étude, nous avons utilisé les fractions A et B isolées précédemment.

A la fin de la dernière centrifugation d'une heure à 53500 g, on recueille quatre culots sur lesquels porteront les analyses : deux culots contiennent la fraction A et deux la fraction B. Au total, quatre échantillons non congelés sont traités simultanément et vont subir successivement les étapes de : - fixation - deshydratation - imprégnation - inclusion et coloration qui sont nécessaires à toute observation en microscopie électronique. Ces opérations s'effectuent à des températures de 0° à 4° C.

Les culots sont remis en suspension dans un fixateur constitué d'un mélange de glutaraldéhyde (1,54 %) et de formaldéhyde (1,54 %).

Ces deux substances sont diluées extemporanément dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M dont le pH = 7,2 - 7,4 est vérifié avant l'utilisation.

Le milieu de fixation est agité à intervalles réguliers.

Après 30 minutes, le fixateur est récupéré par centrifugation dans le surnageant.

Le culot est soumis à un lavage de 5 min avec le tampon cacodylate de sodium 0,1 M.

Le tampon est ensuite éliminé par centrifugation. L'échantillon contenu dans le culot est mis au contact de l'acide osmique à 1 % dilué dans du tampon cacodylate de sodium, en agitant à intervalles réguliers pendant une heure.

La post fixation terminée, l'excédant d'acide osmique est récupéré par centrifugation dans le surnageant et on procède à deux lavages de 5 min chacun avec le tampon cacodylate.

L'échantillon est ensuite déshydraté en le soumettant à trois bains d'alcool successifs de 5 min chacun :

- le premier dans l'alcool à 30°
- le second dans l'alcool à 50°
- le troisième dans l'alcool à 70°

A ce stade, on peut laisser les préparations dans l'alcool à 70° à la température de 4° C.

Les étapes suivantes se déroulent au laboratoire de Biologie Moléculaire du Développement à Nancy.

Les échantillons sont soumis à un bain d'alcool à 95° (2 x 5 min) puis finalement à un bain d'alcool à 100° (3 x 10 min).

L'imprégnation qui suit la déshydratation est réalisée en trois temps :

- les échantillons sont imprégnés une première fois à l'oxyde de propylène (2 x 10 min) ;
- l'imprégnation vrai se fait ensuite avec un mélange dilué constitué d'oxyde de propylène (3/4) et d'Araldite Epon (1/4) durant trois heures ;
- pour finir, on utilise un mélange d'oxyde de propylène-Araldite Epon (50 % - 50 %) pendant six heures.

L'inclusion est effectuée dans l'Araldite Epon durant :

- 12 heures à la température du laboratoire
- 12 heures à 38° C
- 48 heures à 60° C

Cette température de 60° C est responsable de la polymérisation du mélange ; après refroidissement la résine, dont la composition est la suivante, durcit :

- Araldite MCY 212 (5 ml)
- Epikote 812 (6,25 ml)
- DDSA (15 ml)
- DMP 30 (1 ml)

Le tout est malaxé pendant 10 minutes. Le bloc d'Araldite Epon obtenu est préparé pour les coupes à l'ultramicrotome ; celles-ci sont recueillies sur des grilles porte-objets.

La coloration des grilles pour la microscopie électronique à transmission est réalisée par un mélange d'acétate d'uranyle à 5 % dilué dans l'eau bidistillée et d'alcool à 90° (1v/1v) pendant 10 minutes.

Un premier lavage est effectué à l'acide acétique à 1 % dilué dans l'alcool à 50°, puis on procède ensuite à deux lavages à l'eau distillée.

Les échantillons sont mis au contact d'une solution de citrate de plomb pendant 2 à 3 minutes (Reynolds).

Les deux derniers lavages sont réalisés à l'eau distillée.

Le séchage dure au minimum deux heures et se fait sur papier filtre avec une protection des échantillons qui évite la contamination par des poussières.

Les échantillons sont ainsi prêts pour l'observation au microscope électronique.

b) Activité ATP asique de la fraction synaptosomale comparée à celle de l'homogénat

Selon la méthode de Baginsky décrite par Férard (1986), l'activité de l'enzyme est évaluée en dosant les ions phosphates inorganiques libérés lors de l'hydrolyse de l'ATP par l'enzyme. Cette hydrolyse est réalisée suivant la réaction :

$$\text{ATP} \xrightarrow[\text{en présence de } Mg^{++}]{\text{ATP ase } Na^{+}\ K^{+} \text{ dépendant}} \text{ADP} + H_3PO_4$$

La méthode consiste à doser deux activités enzymatiques différentes. D'une part, l'activité de l'ATP ase dépendante uniquement du magnésium obtenu en incorporant au milieu réactionnel de la ouabaïne qui inhibe sélectivement la pompe à sodium et bloque par conséquent l'ATP ase Na^{+} K^{+} dépendante sans affecter l'ATP ase magnésium dépendante. D'autre part, l'activité globale des deux ATP ase.

- **Essai 2 : Mesure de l'activité globale des deux enzymes.**

On réalise le mélange suivant :

50 µl d'une solution de NaCl (2 M/l) et de KCl (0,2 M/l)

50 µl d'une solution de $MgCl_2$ (60 mM/l)

600 µl de tampon Tris HCl (50 mM/l ; pH = 7,5 à 37° C)

100 µl de la fraction à analyser

- **Essai 3 : Témoin**

On réalise le mélange suivant :

50 µl d'une solution de NaCl (2 M/l) et de KCl (0,2 M/l)

50 µl d'une solution de $MgCl_2$ (60 mM/l)

100 µl d'une solution de ouabaïne (10 mM/l) diluée dans un tampon Tris HCl (50 mM/l ; pH = 7,5 à 37° C)

500 µl tampon Tris HCl (50 mM/l ; pH = 7,5 à 37° C)

Pour les trois essais, la réaction démarre en ajoutant 200 µl d'ATP disodique (15 mM/l) (Boehringer-Mannheim) diluée au dernier moment dans une solution de tampon Tris (50 mM/l ; pH = 7,5 à 37° C). Après agitation, le mélange est incubé pendant 10 min à la température de 37° C dans un bain-marie agité.

La réaction est stoppée en ajoutant dans chaque flacon 1 ml d'un mélange d'acide ascorbique (0,4 g) et d'acide trichloroacétique à 20 % (10 ml) réalisé extemporanément, à la température de la glace. Pour homogénéiser les volumes dans les trois échantillons, on ajoute 100 µl de fraction à analyser au témoin.

L'acide trichloroacétique précipite les protéines. Le précipité est éliminé par une centrifugation de 5 min à 4 000 t/min dans des pots à centrifuger préalablement réfrigérés. On obtient un surnageant S_1.

* **Dosage du phosphore inorganique**

L'orthophosphate réagit avec le molybdate en présence d'un mélange acide et d'un agent réducteur pour former un complexe phosphomolybdate. La couleur bleue obtenue est proportionnelle à la concentration en ions $PO4^{--}$ et mesure par conséquent l'activité ATPasique.

Un mélange de citrate et d'arséniate réagit avec le molybdate en excès.

On prélève 1 ml de surnageant S_1 dans lequel l'orthophosphate est dosé en ajoutant 0,5 ml d'heptamolybdate à 1 % (P/V) (Prolabo). Après agitation, on ajoute immédiatement à chaque flacon 1ml d'une solution constituée par :

Le métarséniate de sodium (Merck, Darmstadt) à 2 % dilué dans la moitié du volume final d'eau distillée.

On ajoute ensuite le citrate trisodique (Merck, Darmstadt) à 2 % et l'acide acétique à 2 % (Prolabo) et on complète avec de l'eau distillée au volume final.

Après 10 minutes à la température de la pièce, la densité optique est lue à une longueur d'onde de 847 nm par rapport au témoin.

Parallèlement, une gamme étalon est constituée à partir d'une solution mère de $K_2H_2PO_4$ (solution à 0,4 mM/l réalisée à partir d'une solution à 20 mM/l) selon le schéma suivant :

SOLUTION FILLE µmole/ml	SOLUTION MERE $K_2H_2PO_4$ 0,4 mM/l	H_2O/ml
0,08	0,2 ml	+ 0,8
0,16	0,4 ml	+ 0,6
0,24	0,6 ml	+ 0,4
0,32	0,8 ml	+ 0,2
0,40	1,0 ml	+ 0

On ajoute à chaque tube de la gamme étalon 1 ml du mélange acide ascorbique-acide trichloroacétique à froid. Après une attente de 5 minutes, 1 ml de la solution sont repris auquel on ajoute 0,5 ml d'heptamolybdate d'ammonium et 1 ml de la solution de citrate et d'arséniate.

Après 10 minutes à la température de la pièce, la densité optique est lue à une longueur d'onde de 847 nm par rapport au témoin.

3.1.2. Détermination de la concentration protéique de la fraction synaptosomale

La qualité de la fraction synaptosomale obtenue varie d'une expérimentation à l'autre, notamment sa teneur en protéines. Aussi, afin d'homogénéiser les résultats, la radioactivité mesurée est rapportée à la teneur en protéines de la fraction synaptosomale utilisée.

La teneur en protéines est estimée selon la technique de Lowry et coll. (1951), modifiée par Miller (1959), dont le principe est le suivant : en milieu alcalin, les protéines réagissent avec le réactif au phénol de Folin et Ciocalteu, en présence d'ions Cu^{++}, pour former un complexe bleuté se prêtant à un dosage colorimétrique.

La densité optique lue au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 500 nm (maximum d'absorption) suit la loi de Beer-Lambert et est proportionnelle à la concentration en protéines dans une échelle de concentration définie par une gamme d'étalonnage. Les travaux de Bernabe (1986) mettent en évidence le faible écart-type des résultats et la bonne reproductibilité de la méthode.

- **Témoins, gamme étalon et échantillon**

Pour l'étalonnage de l'appareil, la solution témoin et les solutions étalons doivent avoir une composition aussi voisine que possible de la solution à doser, de manière à tenir compte de l'interférence possible des différents réactifs sur le développement de la coloration.

Les témoins de lecture (réglage du zéro de l'appareil) sont constitués par 0,5 ml d'une solution de soude 1N et par 0,5 ml d'eau distillée.

La gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution mère d'albumine de plasma de boeuf 0,15 M (1 mg/10ml), diluée dans une solution de chlorure de sodium aux concentrations finales de 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml selon le schéma suivant :

SOLUTION FILLE D'ALBUMINE ug/ml	SOLUTION MERE D'ALBUMINE 0,15 M/ml	NaOH 1 N/ ml	H_2O/ ml
10	0,1	0,5	0,4
20	0,2	0,5	0,3
30	0,3	0,5	0,2
40	0,4	0,5	0,1
50	0,5	0,5	0,0

Les échantillons sur lesquels seront réalisés les mesures renferment :

- 0,1 ml de la fraction protéique à tester et diluée au 1/10è dans de l'eau distillée ;
- 0,4 ml de soude normale ;
- 0,5 ml d'eau distillée.

Le dosage est réalisé trois fois sur chacun des tubes échantillons et sur les tubes de la gamme étalon renfermant 1 ml de solution protéique.

On ajoute dans tous les tubes 1 ml d'un réactif tartrocuivrique préparé extemporanément et contenant 20 ml d'une solution de carbonate dissodique (Prolabo) à 10 % ; 1,8 ml d'une solution de tartrate de sodium (Prolabo) à 1 % et 0,2 ml d'une solution de sulfate de cuivre à 5 % (prolabo).

Les tubes sont agités pendant 10 minutes, puis 3 ml d'une solution du réactif de Folin Ciocalteu (Prolabo) dilué au dernier moment 11 fois dans de l'eau distillée sont ajoutés.

Après agitation, les tubes sont placés au bain marie à 50° C pendant 10 minutes exactement. Les tubes sont alors mis au repos pendant 10 minutes, à température ambiante et à l'obscurité.

La densité optique des différents échantillons et de la gamme est évaluée à une longueur d'onde de 500 nm contre les témoins.

3.1.3. Etude in vitro de la liaison sur les récepteurs des benzodiazépines : détermination du binding total (BT), du binding spécifique (BS) et du binding non spécifique (BNS)

2 expériences sont réalisées :

. **Essai 1** : Caractérisation des sites de fixation totaux spécifiques et non spécifiques des benzodiazépines, contenus dans la fraction synaptosomale (liaison totale = BT).

Le déroulement des opérations (Fig. 45) est le suivant :

a) **Incubation d'une benzodiazépine marquée**, à faible concentration, le flunitrazépam tritié (New England Nuclear, Dupont de Nemours, Paris), en présence des synaptosomes, pendant 30 minutes à la température de la glace fondante.

b) **Filtration sous vide** (filtre en fibre de verre GF/F ; rinçage du flacon avec 2 x 1 ml de tampon Tris ; puis rinçage du filtre avec 3 x 5 ml du même tampon), permettant de récupérer sur le filtre la molécule marquée fixée sur les sites récepteurs spécifiques et non spécifiques ; l'excédent de flunitrazépam tritié se trouve dans le filtrat.

c) **Séchage des filtres**, sous une lampe, pendant 20 minutes, puis introduction du filtre dans 10 ml d'Instagel (Packard, Paris).

d) **Détermination de la radioactivité retenue par le filtre**, par scintillation liquide, après introduction du filtre dans 10 ml d'Instagel (compteur à scintillation LKB Minibeta 1211).

Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions, mais sans ajouter de membranes synaptosomales. Ceci nous permettra de mesurer le bruit de fond de l'appareil qui sera soustrait à toutes les mesures de radioactivité effectuées.

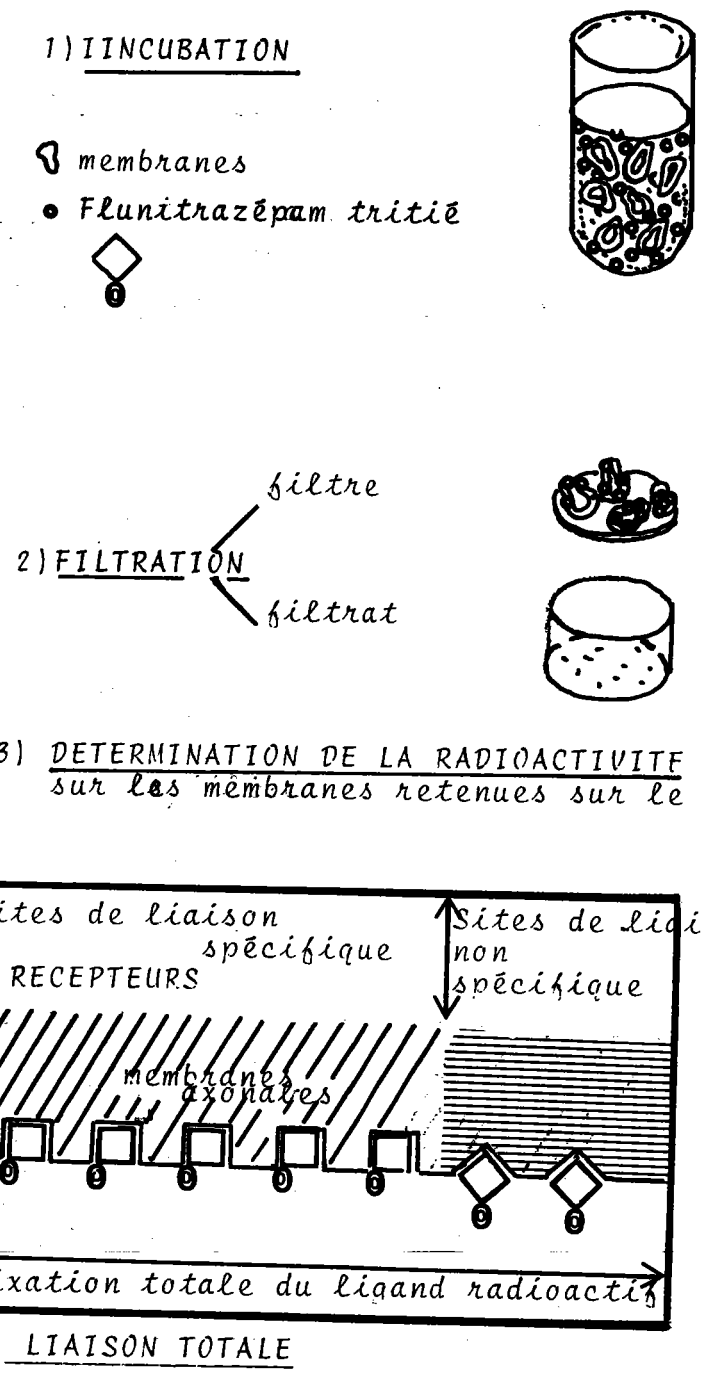


Fig. 45 - CARACTERISATION DES SITES DE FIXATION SPECIFIQUES ET NON SPECIFIQUES DES BENZODIAZEPINES = ESSAI 1.

CONTENU DE CHAQUE ECHANTILLON (VOLUME TOTAL : 2 ml)

- 0,25 ml de fraction synaptosomale de concentration protéique déterminée (optimale pour obtenir une liasion spécifiques maximale).
- 1,550 ml de tampon Tris HCl 50 mM (pH = 7,4 à 0° C).
- 0,2 ml de flunitrazépam tritié (0,2 pM/essai).

L'échantillon est réalisé en 3 exemplaires. Le mélange est agité avant l'incubation.

. **Essai 2** : Caractérisation des sites de fixation spécifiques et non spécifiques des benzodiazépines (liaison spécifique et liaison non spécifique) (Fig. 46).

Le protocole expérimental (incubation - filtration - séchage - détermination de la radioactivité) est identique à celui de l'essai 1. Le principe de la manipulation consiste à déplacer le flunitrazépam tritié fixé, des sites récepteurs spécifiques, par une benzodiazépine non marquée ajoutée en excès dans le milieu d'incubation, le Diazépam (Roche , Neuilly-Sur-Seine) ($2\ 10^{-8}$ moles/essai, soit $0{,}5\ 10^{-2}$ g/essai).

Le ligand froid, en excès, occupe tous les sites spécifiques ; le ligand marqué subsiste sur les sites non spécifiques.

La radioactivité mesurée permet d'évaluer la liaison non spécifique BNS ; par différence avec la radioactivité mesurée dans le premier essai (liaison totale) la liaison spécifique BS peut être déterminée.

On définit la grandeur $\frac{BS}{BT} \times 100$

3.1.4. Etude du déplacement du flunitrazépam tritié avec une benzodiazépine de référence

Le protocole expérimental (incubation - filtration - séchage - détermination de la radioactivité) est identique à celui de l'essai 1 (cf. § 3.1.3.). Le principe de la manipulation consiste à déplacer le flunitrazépam tritié fixé, des sites récepteurs spécifiques par une benzodiazépine non marquée, le diazépam (Roche, Neuilly-Sur-Seine), ajoutée à des concentrations variables. Dans ces conditions, le flunitrazépam tritié est plus ou moins déplacé des sites spécifiques. Ceci nous permet d'établir une relation entre la concentration en ligand froid et le pourcentage de ligand marqué fixé, défini par l'expression :

$$\frac{\text{RADIOACTIVITE MESUREE}}{\text{LIAISON SPECIFIQUE}} \times 100$$

A l'aide de cette relation, on pourra établir la courbe exprimant le pourcentage de déplacement du flunitrazépam tritié en fonction de la dose de diazépam ajoutée et déterminer la CI 50 (concentration qui déplace 50 % du flunitrazépam tritié) du ligand froid par rapport au flunitrazépam, au moyen de la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

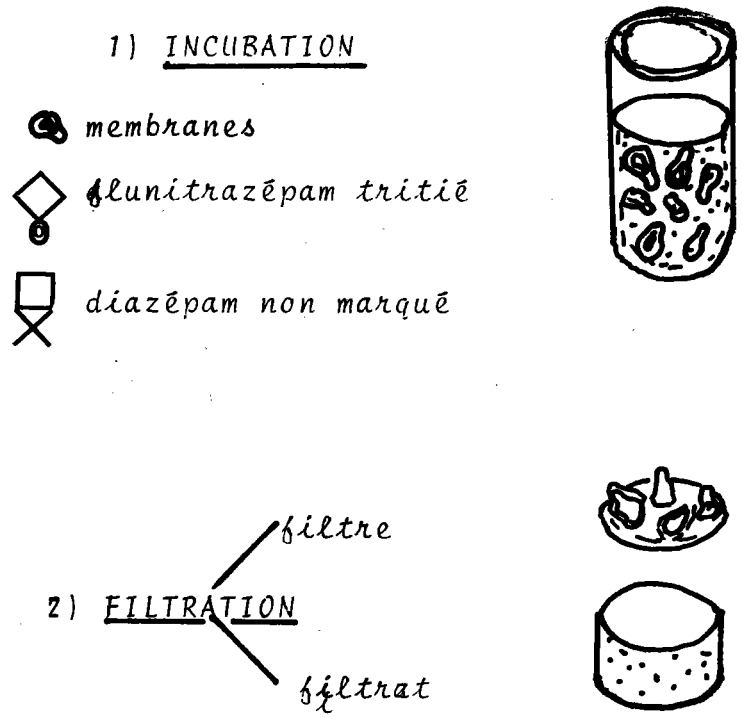


Fig. 46 - CARACTERISATION DES SITES DE FIXATION SPECIFIQUES (BS) ET NON SPECIFIQUES (BNS) DES BENZODIAZEPINES = ESSAI 2.

CONTENU DE CHAQUE ECHANTILLON (VOLUME TOTAL = 2 ml).

- 0,250 ml de fraction synaptosomale de concentration protéique déterminée
- 1,350 ml de tampon Tris HCl 50 mM (pH = 7,4 à 0° C)
- 0,2 ml de diazépam
- 0,2 ml de flunitrazépam tritié (0,2 pM/essai)

Le diazépam est testé à différentes concentrations : 2.10^{-12} - 4.10^{-12} - 2.10^{-11} - 4.10^{-11} - 2.10^{-10} - 4.10^{-10} - 2.10^{-9} M/essai

Chaque essai est repliqué 3 fois.

Le mélange est agité, avant l'incubation, celle-ci débutant après addition du ligand marqué.

3.1.5. Etude de l'influence d'E. californica sur les sites récepteurs benzodiazépiniques (Fig. 47)

Le protocole expérimental est identique à celui de l'essai 2. L'extrait végétal, dissous dans du tampon Tris (pH = 7,4) est ajouté en remplacement de la benzodiazépine froide.

Pour chaque dose d'extrait testé, le flunitrazépam tritié fixé est évalué en pourcentage de liaison spécifique selon l'expression :

$$\frac{\text{RADIOACTIVITE MESUREE}}{\text{LIAISON SPECIFIQUE}} \times 100$$

C'est pourquoi, les liaisons totales (essai 1) et non spécifiques (essai 2, avec diazépam froid en excès) doivent être évaluées.

La dose d'extrait initialement choisie (0,4 mg de plante sèche) a été déterminée par extrapolation, à partir des équivalences évaluées pour le diazépam et concernant les doses utilisées couramment in vivo (3 mg/Kg) et in vitro (CI 50 = 7,4 $nM/_{Kg}$ soit 2,11 $\mu g/_{Kg}$; d'où un facteur de 10^3 entre les tests in vivo et in vitro.

La dose sédative déterminée in vivo pour E. californica est de 400 mg/Kg ; d'où le choix d'une dose de 0,4 mg de plante sèche pour les essais in vitro. Les doses de 0,025 mg correspondent à la dose anxiolytique (25 mg/Kg) déterminée in vivo (Chap. 1).

L'extrait végétal est testé à différentes doses : 80 - 40 - 20 - 4 - 2 - 1 - 0,8 - 0,4 - 0,04 - 0,025 et 0,0125 mg de plante sèche/essai ; le volume de la solution étant toujours 1 ml (préparation des doses testées à partir d'une solution mère de 400 mg de plante sèche dans 10 ml de tampon Tris).

Chaque essai est repliqué 3 fois.

Le mélange est agité avant l'incubation.

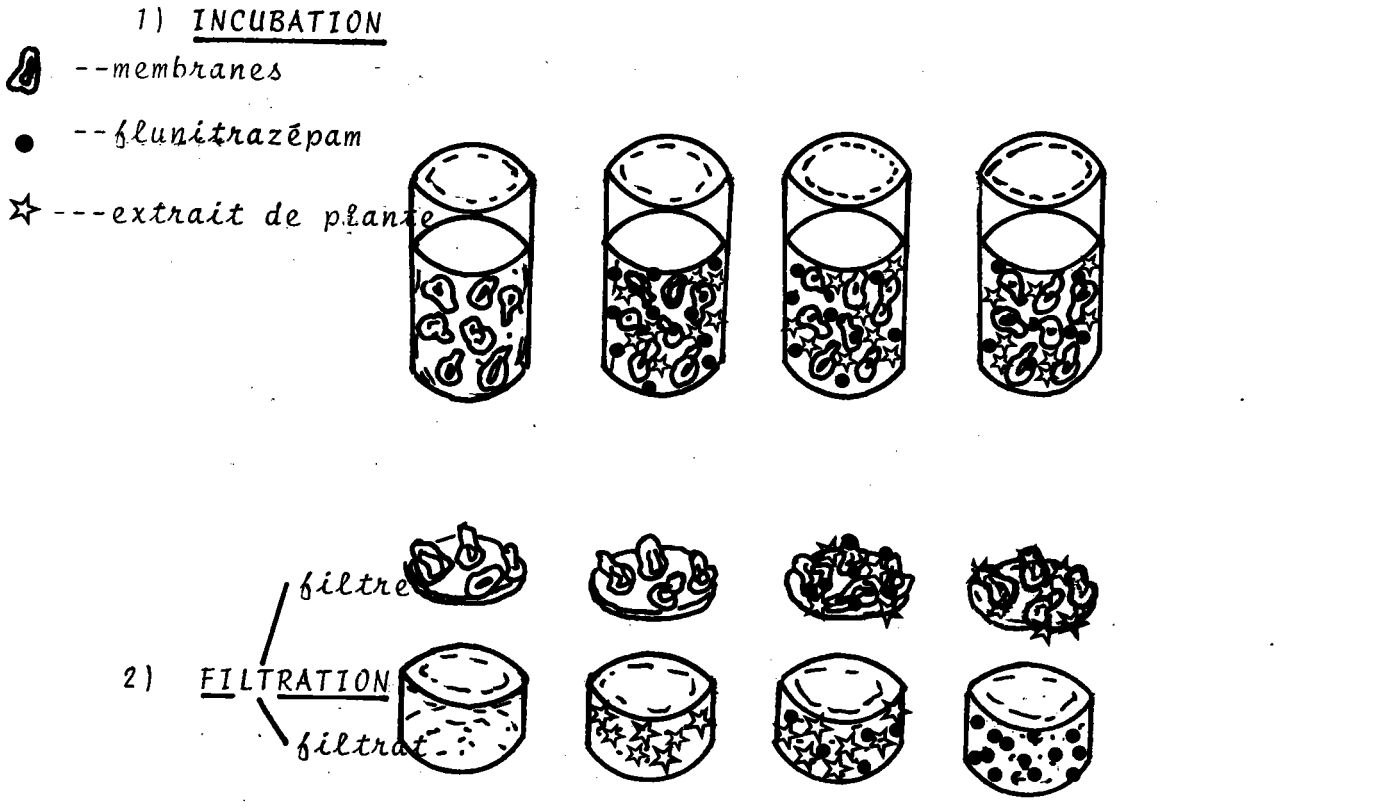


Fig. 47 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA SUR LES SITES RECEPTEURS BENZODIAZEPINIQUES.

CONTENU DE CHAQUE ECHANTILLON (VOLUME TOTAL = 2 ml)

- 0,250 ml de fraction synaptosomale de concentration protéique déterminée.
- X ml de tampon Tris HCl mM (pH = 7,4 à 0° C) (X = volume total - y)
- Y ml d'extrait végétal : E. californica
- 0,2 ml de flunitrazépam tritié (0,2 pM/essai).

3.2. RESULTATS

3.2.1. Contrôle de la fraction synaptosomale

3.2.1.1. Microscopie électronique : contrôle de la fraction A et de la fraction B

Les commentaires accompagnant les électronographies ont été aimablement fournis par le Professeur Delorme de l'Université de Lille par l'intermédiaire de P. Lehr (Centre des Sciences de l'Environnement, METZ).

Dans la photographie 8, les éléments nettement statifiés (y) permettent de conclure à la présence des fragments de myéline dans la fraction A. On peut noter la présence d'éléments non identifiés accompagnant la myéline.

Ces conclusions sont en accord avec celles indiquées par Gray et Whittaker (1962) et Whittaker et coll. (1964).

Dans la photographie 9, trois synaptosomes (s) sont nettement reconnaissables avec leur membrane plasmique (m) et les vésicules synaptiques (v). Trois autres apparaissent de façon plus floue.

L'existence de quelques mitochondries et de quelques lysosomes est probable. L'épaisseur des coupes ne permet pas de quantifier la contamination par les mitochondries qui se retrouvent dans les électronographies présentées par Gray et Whittaker (1962) et Whittaker et coll. (1964).

En conclusion, il est possible d'affirmer que la fraction prélevèe B est bien la fraction contenant les synaptosomes et que la fraction A utilisée aussi dans l'évaluation de l'activité ATPasique par rapport à l'homogénat, mais sur laquelle ne porteront pas d'essais in vitro, renferme bien la majorité de la myéline.

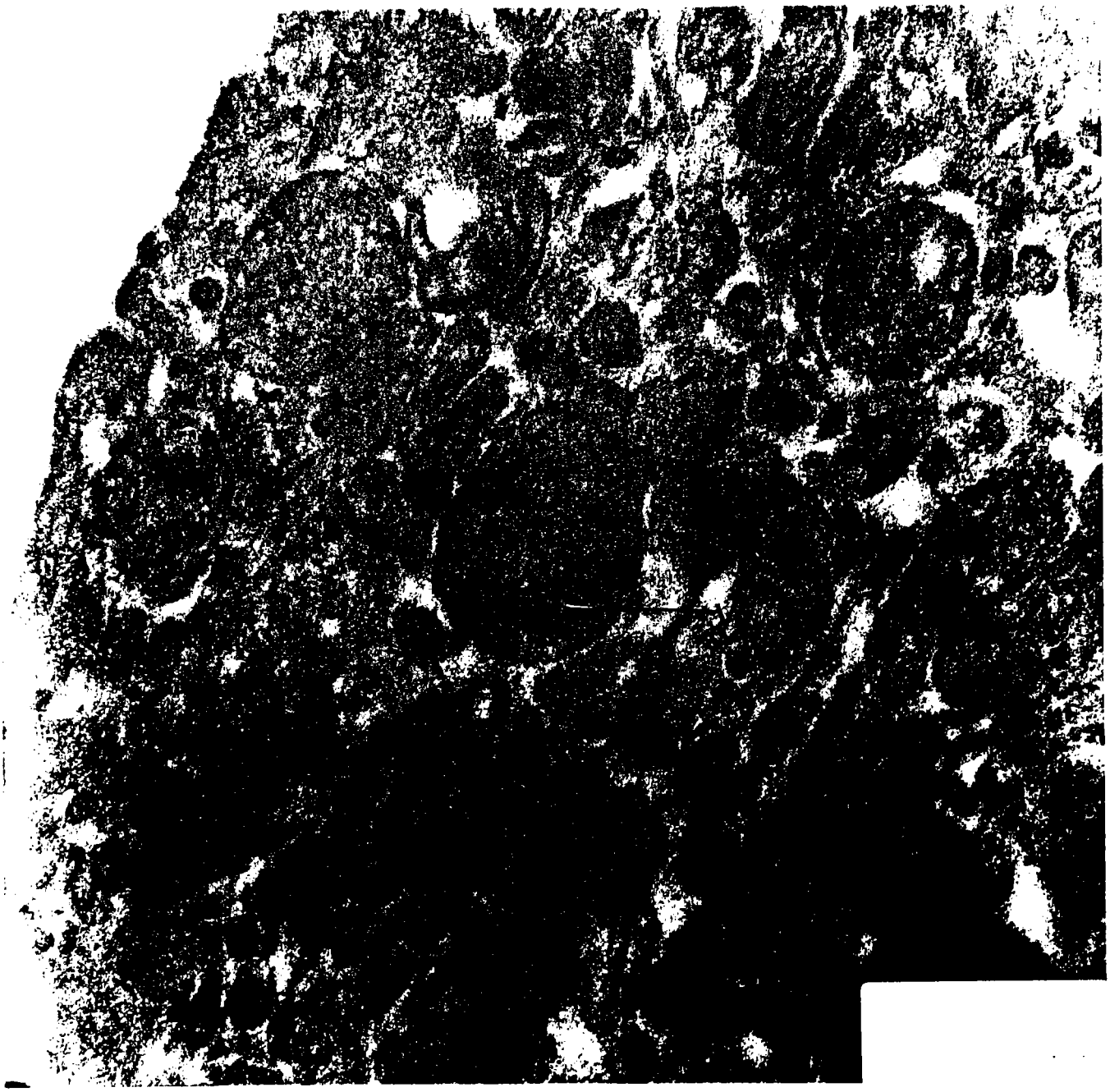
Le prélèvement de la fraction B est reproductible dans la mesure où les clichés au microscope électronique ont porté sur plusieurs échantillons de fraction A et de fraction B, et qu'il n'y a pas de contamination de l'une des fractions sur l'autre.



PHOTOGRAPHIE 15 - ELECTRONOGRAPHIE DE LA FRACTION SYNAPTOSOMALE A.

G = X 28000

Y = FRAGMENTS DE MYELINE



PHOTOGRAPHIE 16 - ELECTRONOGRAPHIE DE LA FRACTION SYNAPTOSOME B.

G = X 84000

S = SYNAPTOSOME

m = MEMBRANE PLASMIQUE

v = VESICULE SYNAPTIQUE

3.2.1.2. Détermination de l'activité ATPasique

- **Linéarité de la gamme étalon du dosage des phosphates inorganiques**

Les points représentés sur la figure 48 s'alignent de manière satisfaisante pour des concentrations en phosphate inorganique comprises entre 0,08 et 0,40 µ mole/ml. La relation linéaire entre ces points s'exprime par une droite d'équation Y = 4970 X + 22 (r = 0,999).

Pour nos essais, nous nous sommes toujours placés dans des conditions telles que la concentration de phosphate à mesurer soit comprise entre 0,08 et 0,40 µ mole/ml.

- **Evaluation de l'activité ATPasique des fractions A et B par rapport à l'homogénat**

L'activité ATPasique des membranes synaptiques des différentes fractions a été réalisée sur des synaptosomes congelés pendant 24 heures. Le temps d'incubation a été de 10 minutes.

Les résultats, exprimés en µ moles de phosphore inorganique (Pi) libéré/heure et /mg de protéines, sont consignés dans le tableau 29. Ils montrent un important enrichissement de la fraction B par rapport à la fraction A et surtout par rapport à l'homogénat.

TABLEAU 29 - ACTIVITE DE L'ATP ASE Na^+ et K^+ DEPENDANTE DANS LES FRACTIONS A ET B, COMPAREE A L'HOMOGENAT
n = 2

NATURE DES PREPARATIONS MEMBRANAIRES	ACTIVITE ATP ASIQUE NA^+,K^+ DEPENDANTE u moles de Pi/mg protéines/heure
HOMOGENAT	0,49 ± 0,02
FRACTION A	2,37 ± 0,33
FRACTION B	6,35 ± 0,42

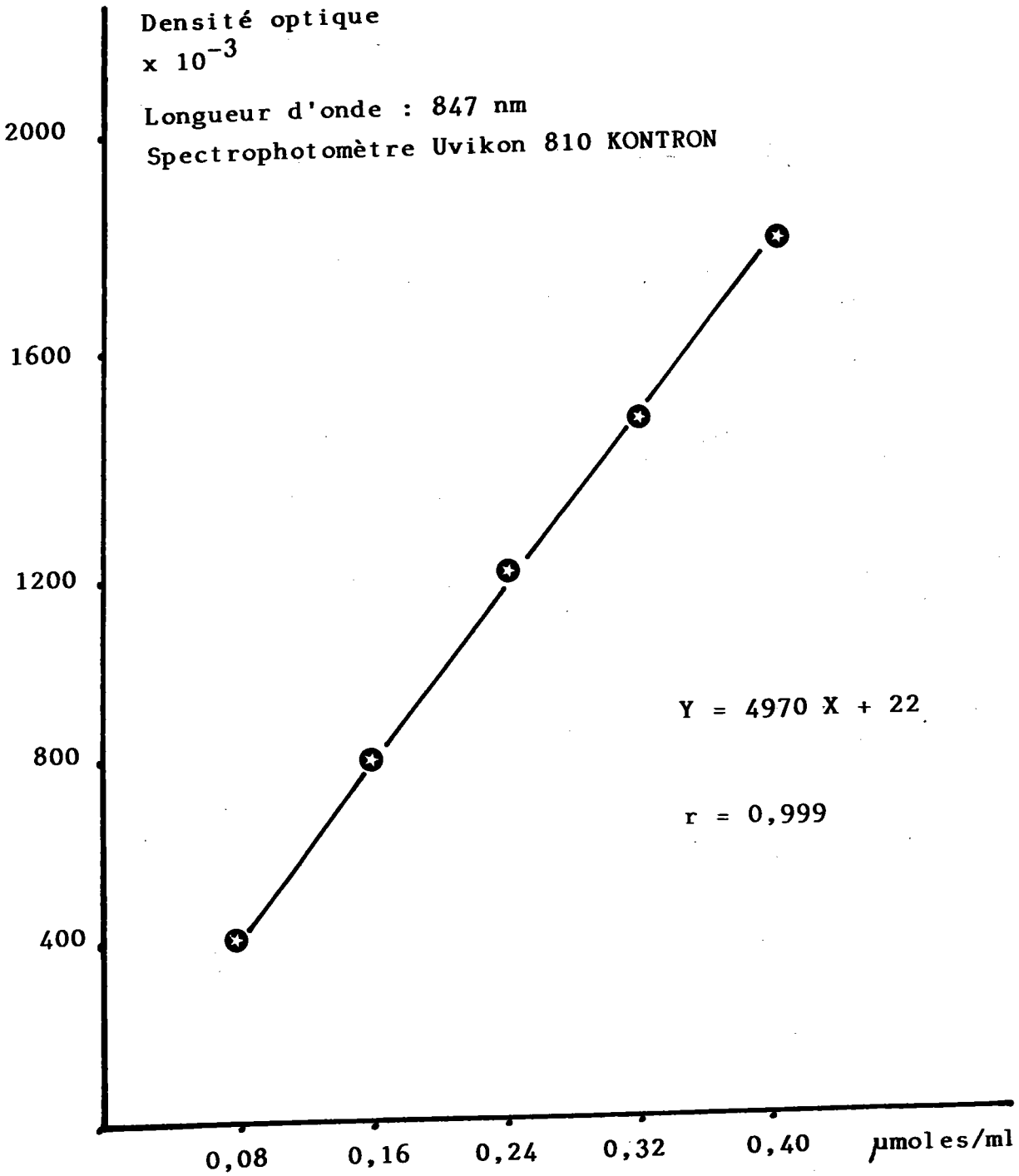


Fig. 48 - GAMME ETALON DU DOSAGE DES IONS PHOSPHATES INORGANIQUES DANS L'EVALUATION DE L'ACTIVITE ATP ASIQUE PAR LA METHODE DE FERARD (1986)

3.2.1.3. Dosage des protéines de la fraction synaptosomale B

- Linéarité de la gamme étalon

La figure 49 représente les moyennes et les écarts-types observés sur trois essais d'étalonnage réalisés dans les mêmes conditions, dans la même expérience (annexe).

Les points s'alignent de manière satisfaisante pour des concentrations de protéines comprises entre 10 et 50 µg/ml. La relation linéaire entre ces points s'exprime par une droite d'équation $Y = 2,137\ X - 1,367$ ($r = 0,999$; $P < 0.01$).

Pour nos essais, nous nous sommes toujours placés dans des conditions, telles que la concentration de protéines à mesurer soit comprise entre 10 et 50 µg/ml. On peut remarquer, pour chaque point, le faible écart-type des mesures.

3.2.2. Dosage des protéines de la fraction B

Pour réaliser toute notre étude sur l'évaluation de l'affinité des extraits d'*E. californica* pour les récepteurs aux benzodiazépines, trois isolements de membranes synaptosomales ont dû être réalisés et le dosage des protéines des trois fractions a été effectué le même jour.

L'équation de la droite d'équation nous permet de calculer la concentration x (µg/ml) de protéines contenues dans la fraction protéique aliquote.

Selon les conditions expérimentales décrites, la concentration en protéines C (mg/ml) de la fraction synaptosomale B peut être exprimée en fonction de x (C = f(x)) selon la relation : $C = \frac{x}{10}$ mg/ml

Les résultats présentés dans le tableau 30 révèlent un taux de protéines, pour les trois fractions synaptosomales isolées voisin de 4 mg/ml. Ce qui est en accord avec la littérature (Bernabe, 1986).

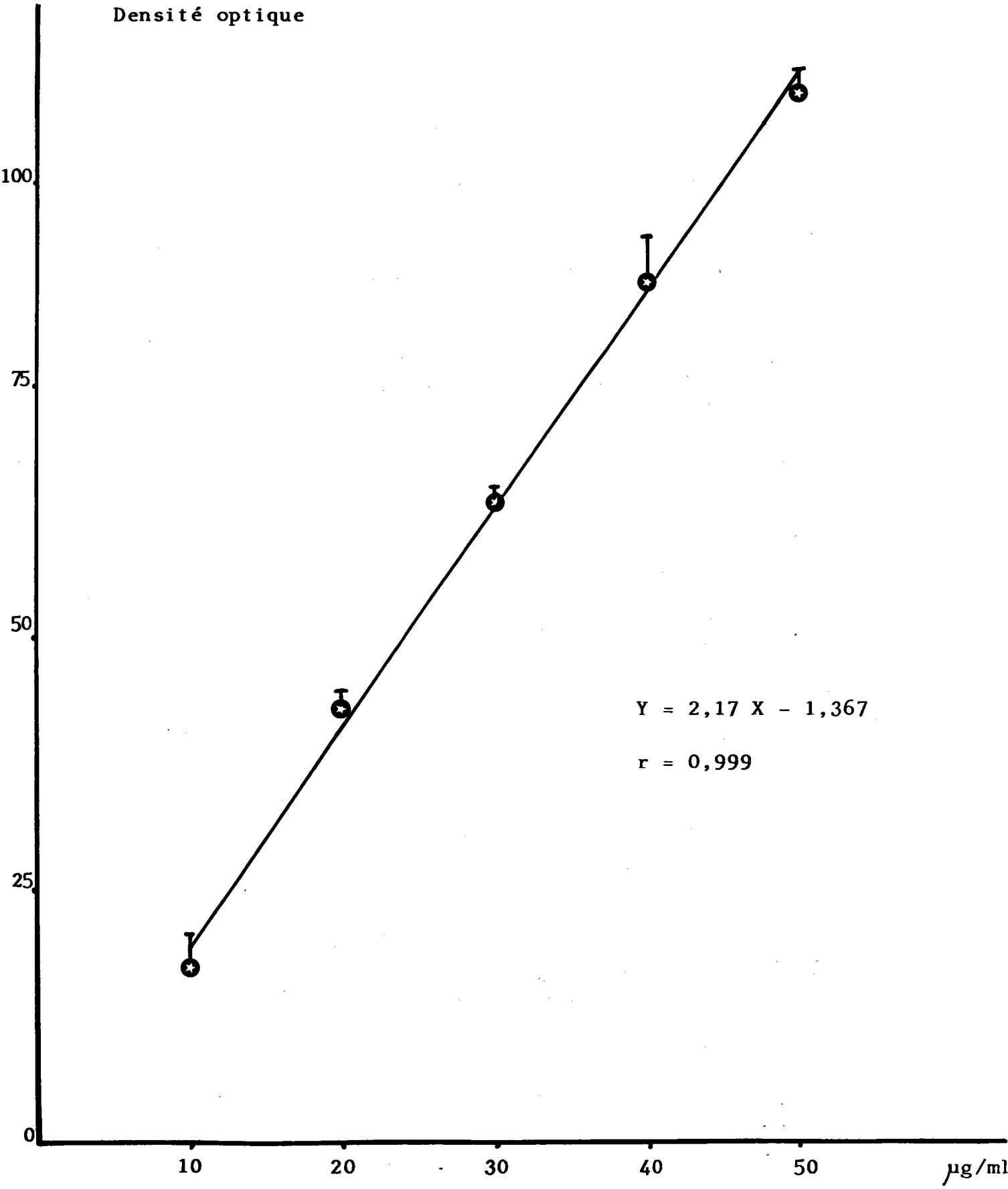


Fig. 49 - GAMME D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE LOWRY

TABLEAU 30 - DOSAGE DES PROTEINES DE LA FRACTION SYNAPTOSOMALE B

FRACTION	ESSAIS	DO 10^{-3}	DO ± E.S.	CONCENTRATION DE LA FRACTION SYNAPTOSOMALE C mg/ml ± E.S.
1	1	85	86,7 ± 1,5	4,1 ± 0,2
	2	87		
	3	88		
2	1	85	86,7 ± 1,5	4,1 ± 0,3
	2	87		
	3	88		
3	1	81	81,0 ± 1,0	3,8 ± 0,3
	2	82		
	3	80		

Ces résultats montrent la bonne reproductibilité de la concentration protéique de la fraction synaptosomale isolée à chaque manipulation.

3.2.3. Détermination du binding total (BT), du binding spécifique (BS) et du binding non spécifique (BNS)

3.2.3.1. Evaluation de la fixation du flunitrazépam tritié (ligand radioactif) sur les récepteurs des benzodiazépines (sites de liaison total : BT)

La mise en incubation d'une faible, mais constante, quantité de flunitrazépam tritié (0,2 µ mole/essai) avec une fraction synaptosomale définie par sa concentration en protéines et la mesure de la radioactivité fixée sur les membranes ont permis de quantifier les sites de fixation (spécifique + non spécifique = BT) des benzodiazépines des différents lots synaptosomaux isolés.

Les résultats, regroupés dans le tableau 31, laissent apparaître une variation importante entre la quantité de H_3 flunitrazépam fixée, représentée par la mesure de la radioactivité exprimée en cpm (BT) des différents lots de membranes. Par contre, la concentration en protéines met en évidence une bonne reproductibilité des résultats.

TABLEAU 31 - EVALUATION DE LA LIAISON (BINDING TOTAL, BT) du H_3 FLUNITRAZEPAM TRITIE SUR LES MEMBRANES SYNAPTOSOMALES ISOLEES DE CERVEAU DE RATS WISTAR

MEMBRANES D'ISOLEMENT N°	PROTEINES mg/Essai	H_3 FLUNITRAZEPAM LIE EN TOTALITE cpm/essai moyenne±E.S. n =3	H_3 FLUNITRAZEPAM LIE EN TOTALITE cpm/mg protéines
1	0,908	12 702 ± 543	13 979
2	0,805	15 966 ± 1283	19 829
3	1,025	26 281 ± 805	25 640
4	1,025	15 792 ± 995	15 406
5	0,950	15 394 ± 1378	16 204

3.2.3.2. Evaluation de la fixation du flunitrazépam tritié sur les récepteurs spécifiques (BS) et sur les récepteurs non spécifiques (BNS) des benzodiazépines

Lorsque l'on met en incubation, une quantité excédentaire ($0,5\ 10^{-2}$ g/essai) de diazépam non marquée (ligand froid), la radioactivité résiduelle mesurée montre que la totalité du H_3 flunitrazépam marqué n'a pas été déplacé (Tableau 32).

Cette radioactivité résiduelle matérialise l'existence de liaisons non spécifiques aux benzodiazépines (BNS) dans les membranes synaptosomales. Les résultats, consignés dans le tableau 31, montrent que les sites spécifiques représentent 92 à 96 % de la totalité des sites récepteurs aux benzodiazépines.

3.2.3.3. Etude du déplacement du flunitrazépam tritié par le diazépam froid

Les résultats, consignés dans le tableau 33, montrent que le ligand froid déplace le flunitrazépam à partir de la dose de 10^{-6} mg/essai, alors que le déplacement est de 95 % à la dose de $0,5\ 10^{-3}$ mg/essai. L'étude a été réalisée sur des homogénats de plusieurs rats réunis ensuite en un seul échantillon, afin d'éliminer les variations individuelles. Trois expériences ont été réalisées sur le même homogénat.

La relation effet/dose est de nature sigmoïde (Fig. 50) et l'ED 50 du diazépam, calculé après linéarisation de la relation effet/dose par la méthode de Liechtfield et Wiloxon, est de $8,4\ 10^{-4}$ mg/essai ($7,8\ 10^{-4}$ - $8,4\ 10^{-4}$) pour un risque à 5 %.

TABLEAU 32 - EVALUATION DES LIAISONS SPECIFIQUES ET NON SPECICIFIQUES DU FLUNITRAZEPAM TRITIE SUR LES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES DES MEMBRANES SYNAPTOSOMALES DE CERVEAU DE RATS WISTAR

MEMBRANES ISOLEES LOT N°	PROTEINES mg/essai	LIAISON NON SPECIFIQUE BNS		SITES NON SPECIFIQUES DANS LES MEMBRANES TENEUR % (BLANC) $\frac{BNS-b}{BS-b} \times 100$	LIAISONS SPECIFIQUES BS % BS = 100 - BNS%
		cpm/essai	cpm/mg protéines		
1	0,908	989 ± 120	1088	7,51	92,51
2	0,805	1115 ± 230	1384	6,71	93,31
3	1,025	1068 ± 148	1041	3,9	96,1
4	1,025	859 ± 445	838	5,2	94,81
5	0,950	1195 ± 67	158	8,42	91,58

TABLEAU 33 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DIAZEPAM NON MARQUE SUR LE DEPLACEMENT DU FLUNITRAZEPAM TRITIE

N = 3

CONCENTRATION EN DIAZEPAM mg/essai	LIAISON SPECIFIQUE AU FLUNITRAZEPAM TRITIE	
	EN cpm/mg PROTEINES ± E.S.	EN % DE LA LIAISON SPECIFIQUE TOTALE
$0,5\ 10^{-3}$	1858 ± 220	5,9
10^{-4}	4447 ± 310	14,0
$0,5\ 10^{-4}$	6802 ± 330	21,4
10^{-5}	17846 ± 805	56,1
$0,5\ 10^{-5}$	22172 ± 910	69,7
10^{-6}	31829 ± 1020	99,3
$0,5\ 10^{-6}$	31887 ± 980	99,6

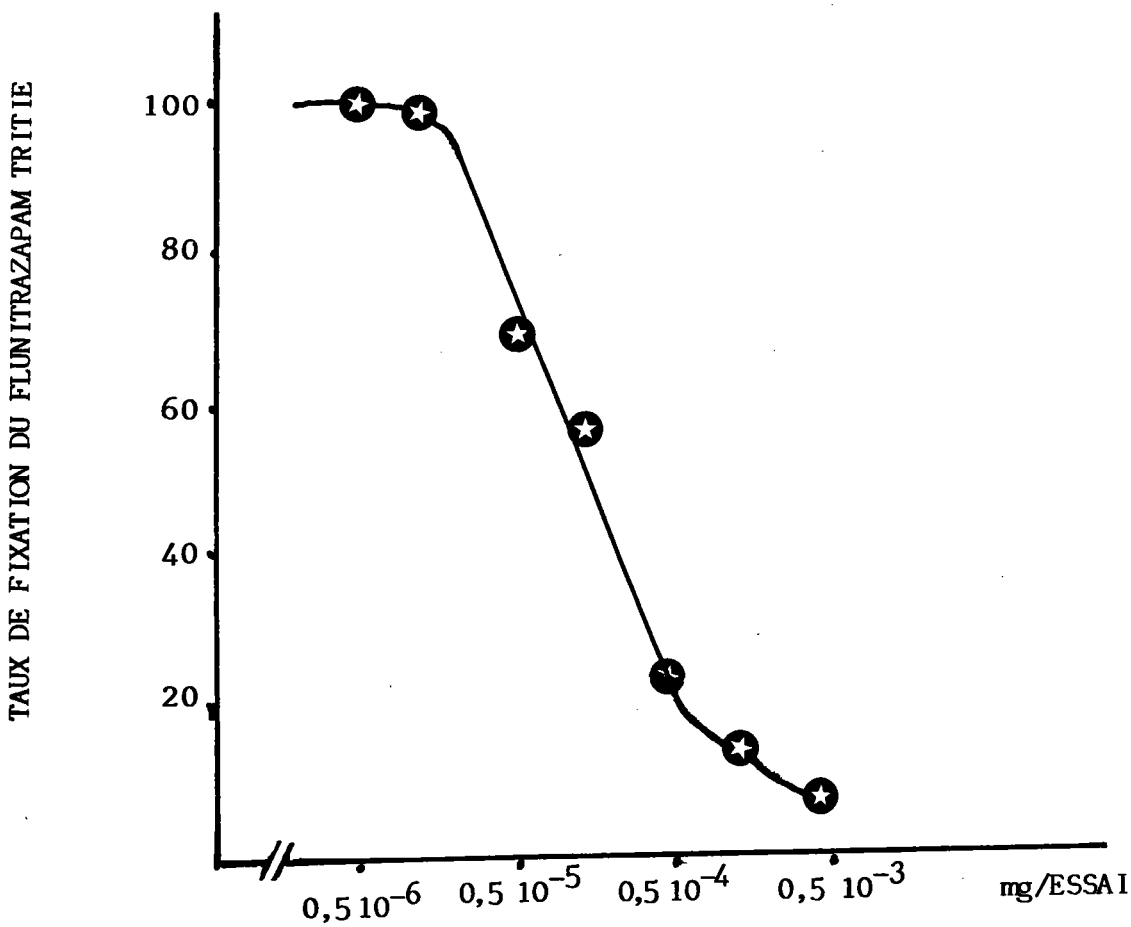


Fig. 50 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DIAZEPAM NON MARQUE SUR LA LIAISON DU FLUNITRAZEPAM TRITIE SUR LES SITES SPECIFIQUES DES BENZODIAZEPINES DES MEMBRANES SYNAPTOSOMALES DE CERVEAU DE RATS WISTAR

3.2.4. Evaluation de l'affinité de l'extrait aqueux RT 1095 d'E. californica sur les sites récepteurs aux benzodiazépines des membranes synaptosomales de cerveau de rats

Les premiers résultats obtenus après incubation d'E. californica (ligand froid) aux doses de 4 10^{-4} à 8 mg/essai sont consignés dans le tableau 34 et la figure 50. Pour cette expérience, nous avons utilisé des membranes synaptosomales dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Congélation à - 20° C pendant 48 heures
- Teneur en protéines de 1,025 mg/ml
- Liaison spécifique de 24556 cpm/mg protéines, soit 96,6 % de la liaison totale.

Aux doses les plus faibles (4 10^{-4} à 10^{-1} mg/essai), le tableau ne fait apparaître aucun déplacement du flunitrazépam tritié.

Par contre, de la dose de 4 10^{-1} à 8 mg/essai, E. californica déplace le flunitrazépam tritié de ses laisons spécifiques et cela de manière dose dépendante (Tableau 34). Ainsi, on remarque que 57 % de ligand marqué reste fixée sur les sites spécifiques lorsque la dose la plus élevée (8 mg/essai) d'E. californica est mise en incubation.

D'après ces premiers résultats, nous avons voulu tester des doses supérieures à 8 mg/Kg pour obtenir un déplacement du H_3 flunitrazépam supérieur à 50 % ; mais des difficultés de filtration des membranes synaptiques après incubation sont apparues. Dans ces conditions, la durée de filtration est trop longue et l'interprétation n'est plus possible.

TABLEAU 34 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'E. CALIFORNICA (RT 1095) SUR LE TAUX DE FIXATION DU FLUNITRAZEPAM TRITIE

E.CALIFORNICA mg/essai	LIAISON SPECIFIQUE DU FLUNITRAZEPAM TRITIE	
	EN cpm/mg DE PROTEINES ± E.S.	EN % DE LA LIAISON SPECIFIQUE TOTALE
8	13659 ± 581	55,7
4	16803 ± 544	68,5
1	21573 ± 1910	88
$4\ 10^{-1}$	24269 ± 694	99
10^{-1}	24257 ± 568	99
$4\ 10^{-2}$	26397 ± 1043	107,7
10^{-2}	25038 ± 308	102,1
$4\ 10^{-3}$	24821 ± 3783	101,3
2 10	25355 ± 1829	103,4
$4.\ 10^{-4}$	24786 ± 1282	101,1

Dans le tableau 35, nous avons regroupé les résultats d'une deuxième expérience réalisée sur un lot différent de membrane synaptosomale présentant les caractéristiques suivantes :

- Congélation à - 20° C pendant 48 heures
- Teneur en protéines de 1,025 mg/ml
- Liaison spécifique de 15973 cpm/mg de protéines, soit 92 % de la liaison totale

On constate un déplacement de la liaison spécifique du flunitrazépam tritié par E. californica aux doses de 1, 2, 4 et 8 mg/essai dans les mêmes proportions que lors de la première expérience (Tableau 35).

Un extrait de Poa sp qui ne présente pas d'action pharmacologique psychotrope a été employé comme témoin végétal "extraction" à forte dose (5,7 mg/essai).

Les difficultés de filtration sont apparues de manière plus importante qu'avec E. californica et nous n'avons pas pu tester des doses supérieures à 5,7 mg/essai. On remarque dans le tableau 35 qu'à cette dose, le flunitrazépam se trouve déplacé de manière importante (40 %). Dans cette expérimentation, l'incubation d'un mélange E. californica (à la dose de 4 et 8 mg/essai) - Poa sp. (à la dose de 5,7 mg/essai) avec une dose de diazépam qui déplace approximativement 50 % du flunitrazépam tritié (10^{-5} mg/essai ; 56 %) accentue fortement le déplacement du ligand marqué par rapport à celui induit, soit par E. californica seul, soit par le diazépam seul aux mêmes doses.

De la même manière, le mélange E. californica (4 et 8 mg/essai) - diazépam (10^{-5} mg/essai) déplace le ligand marqué fixé de 60 % et 63 %.

TABLEAU 35 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA (RT 1095), DU POA sp ET DES ASSOCIATIONS E. CALIFORNICA-POA sp ; POA sp-DIAZEPAM (10^{-5} mg/essai) SUR LE DEPLACEMENT DU H_3 FLUNITRAZEPAM DE CES SITES RECEPTEURS SPECIFIQUES

	LIAISON SPECIFIQUE DU FLUNITRAZEPAM TRITIE	
E. CALIFORNICA mg/essai	EN cpm/ mg DE PROTEINES ± E.S.	EN % DE LA LIAISON SPECIFIQUE TOTALE
8	8148 ± 529	55,3
4	9365 ± 588	63,5
2	11102 ± 245	75,4
1	11574 ± 251	78,6
POA sp mg/essai		
5,7	6645 ± 618	60
DIAZEPAM mg/essai		
10^{-5}	8024 ± 116	56
E. CALIFORNICA mg/essai + DIAZEPAM 10^{-5} mg/essai		
8	5475 ± 582	37,2
4	6127 ± 133	41,6
POAsp mg/essai + DIAZEPAM 10^{-5} mg/essai		
5,7	4646 ± 211	31

4- DISCUSSION

Après avoir mis en évidence les propriétés sédatives et anxiolytiques d'E. californica, les expérimentations avaient comme finalité la compréhension du mécanisme d'action et en particulier de préciser si l'activité pharmacologique des extraits d'E. californica avait pour support les sites récepteurs spécifiques des benzodiazépines.

Pour cela, nous nous sommes intéressés d'une part à une technique in vivo où nous avons tenté de bloquer les effets sédatifs et anxiolytiques d'E. californica par un antagoniste hautement sélectif des récepteurs aux benzodiazépines : le RO 15-1788 ; d'autre part, à une technique in vitro consacrée à l'étude de la liaison du H_3 flunitrazépam avec son récepteur spécifique et de l'affinité de l'extrait d'E. californica pour ce récepteur, c'est-à-dire son aptitude à s'y fixer et ainsi déplacer le ligand marqué.

La technique in vivo a clairement montré que les effets anxiolytiques d'E. californica sont antagonisés par le RO 15-1788 dans le test de la chambre claire/obscure, puisque le temps passé dans le compartiment clair des animaux traités avec E. californica + RO 15-1788 n'est plus significativement différent de celui des témoins (Fig. 44). Par contre, les effets sédatifs d'E. californica sont partiellement antagonisés par le RO 15-1788 dans le test de l'open-field (Fig.42,43) car le RO 15-1788 antagonise les effets d'E. californica sur la locomotion des animaux traités puisqu'il y a une différence significative entre les performances des animaux traités avec la plante et celles des animaux traités avec E. californica et le RO 15-1788. mais cela n'est plus vrai pour les redressements, car il n'y a plus de différence significative entre les animaux traités avec E. californica et ceux traités avec E. californica et le RO 15-1788. Ces résultats plaident en faveur de l'existence chez E. californica d'une affinité pour les sites récepteurs des benzodiazépines, bien que le RO 15-1788 semble présenter des effets propres à forte dose (10 mg/Kg).

Par ailleurs, des techniques in vitro très séduisantes, puisqu'elles rendent compte directement de l'affinité de molécules d'extraits végétaux pour les sites récepteurs des benzodiazépines, ne nous ont pas apporté les précisions attendues.

Dans un premier temps, l'étude du déplacement du flunitrazépam tritié, fixé sur ses récepteurs spécifiques, par une benzodiazépine non marquée (le diazépam) a montré que la méthode utilisée était fiable et reproductible puisque l'on a obtenu des résultats comparables avec plusieurs lots de membranes synaptosomales.

Puis l'étude du déplacement de la benzodiazépine marquée par l'extrait d'E. californica a montré que parmi la gamme des doses très large utilisée (de 8 à 4 10^{-3} mg d'extrait/essai, ce qui correspond, si l'on transpose aux doses utilisées dans les tests in vivo aux doses anxiolytiques et sédatives) ; seules les doses supérieures à 1 mg/essai déplacent le flunitrazépam marquée de ses sites de fixation, et cela de manière dose dépendante, puisque l'on obtient approximativement 50 % de déplacement à la dose de 8 mg/essai et 10 % à la dose de 1 mg/essai.

Cependant, un extrait de Poa sp. dénué d'activité pharmacologique psychotrope a également déplacé le flunitrazépam marquée de ses sites récepteurs (40 %). Il semble donc impossible dans ces conditions expérimentales de conclure que le déplacement du flunitrazépam tritié par E. californica soit en rapport avec l'affinité d'extrait de plante pour les sites récepteurs aux benzodiazépines.

Cela est conforté par le fait qu'aux doses d'extrait de plante (E. californica et Poa sp.) où les effets ont été observés, la filtration s'est avérée difficile et longue. Or, selon Braestrup et coll. (1977), Möhler et coll. (1977), une filtration trop longue peut entraîner un relargage du ligand marqué.

Les possibilités de l'utilisation de cette technique, mise au point pour l'évaluation de l'affinité pour les sites récepteurs des benzodiazépines de molécules pures, sont probablement limitées par l'apport de molécules inactives qui constituent une part importante de l'extrait d'E. californica, et qui finissent, soit par obstruer ou gêner la filtration, soit par donner des réponses non spécifiques.

Or, les extraits d'E. californica ont permi de déplacer approximativement 50 % du flunitrazépam fixé sans qu'il soit possible d'accroître ce déplacement, donc de déterminer la DE 50. Dans ces conditions, il serait nécessaire d'augmenter la concentration de l'extrait en molécules actives. Ainsi des techniques de fractionnement qui s'avèrent indispensables pour l'obtention d'une détermination significative d'une DE 50 feront l'objet d'un travail prochain.

C H A P I T R E I I I

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D'*E. CALIFORNICA* ADMINISTRE PAR VOIE ORALE

1. INTRODUCTION

Nous avons montré précédemment que l'extrait nébulisé d'E. californica présentait un profil d'activité du type des tranquillisants mineurs, à savoir les benzodiazépines. A forte dose (100 mg/Kg), il présente une activité sédative alors qu'à faible dose (25 mg/Kg), il révèle une activité anxiolytique. Ces différents effets sont la conséquence d'une administration des produits par voie intra-péritonéale qui représente la voie d'administration la plus couramment utilisée en screening pharmacologique. Aussi nous avons entrepris d'étudier l'influence d'E. californica sur différents paramètres comportementaux lorsque l'extrait est administré par voie orale chez la souris et chez le rat car, dans le cadre de nos recherches, cette voie d'administration est la plus adaptée aux médications.

2. ETUDE CHEZ LA SOURIS

2.1. INFLUENCE DE DIFFERENTS SOLVANTS SUR L'ACTIVITE PER OS D'E. CALIFORNICA

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'influence du nébulisat d'E. californica aux doses de 200, 400 et 800 mg/Kg, d'une part sur le temps d'endormissement et le temps de sommeil induit par le pentobarbital (35 mg/Kg) et, d'autre part sur l'induction du sommeil après traitement des animaux par une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg). Le clorazépate dipotassique (Tranxène®, Clin-Midy, Montpellier) est utilisé comme produit de référence.

Dans une deuxième expérience, nous avons vérifié l'influence du pH acide sur l'activité d'E. californica.

Dans une troisième série d'expériences, nous avons étudié l'influence de différents excipients sur l'activité de la plante vis à vis du sommeil induit par le pentobarbital (35 mg/Kg). Pour cela, nous avons utilisé trois excipients couramment employés en pharmacie galénique comme adjuvants : le propylène glycol, le polyethylène glycol 400, le labrafil et l'éthanol. Bien que l'éthanol possède ses propres effets sur le système nerveux central, nous avons utilisé cet excipient étant donné la place importante de la teinture mère parmi les formes pharmaceutiques actuellement commercialisées.

2.1.1. Matériel et méthodes

. Les animaux

Des souris mâles de la lignée hétérozygote Swiss (Janvier, Le Genest 53940) âgées de 7 à 9 semaines au moment du test sont groupées par 5 dans des cages standards en macrolon, 15 jours avant le test et sont alors maintenues dans une animalerie à température constante de 21° C ± 1° C, soumises à une alternance du cycle diurne et nocturne de 12 h et nourries et abreuvées ad libitum avec des croquettes M25(Extralabo) et de l'eau.

. **Les échantillons à tester**

Les extraits de plantes sont préparés selon des protocoles différents en fonction des excipients à utiliser :

- Le nébulisat (extrait hydroalcoolique, Laboratoires Vernin, Paris) et le clorazépate (Tranxène®, Clin Midy, Montpellier) sont simplement mis en solution dans de l'eau distillée.

- Les solutions alcooliques d'E. californica sont obtenues par dilution du nébulisat dans une solution d'éthanol à 10 % (V/V).

- La teinture mère (Laboratoire Lehning, Metz 57000), contenant 10 % (P/V) d'E. californica et 66 % (V/V) d'alcool, est diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une solution finale à la concentration désirée. L'alcool n'est pas éliminé puisque l'utilisation thérapeutique de ce produit se réalise dans les mêmes conditions.

- Pour les excipients hemi-synthétiques, le nébulisat est mis en suspension à l'aide d'un poter (Heidolph) pour obtenir une bonne homogénéisation.

. **Protocole expérimental**

a) **Dans la première expérience,** l'étude de la potentialisation du sommeil induit par le pentobarbital (35 mg/Kg), se réalise sur trois lots de souris recevant, 60 minutes avant le test, une injection per os d'E. californica (nébulisat) aux doses de 200, 400 et 800 mg/Kg (0,5 ml/50 g).

L'étude de l'induction du sommeil se réalise sur quatre lots de souris recevant pour deux d'entre elles, des doses d'E. californica (nébulisat) per os de 200 et 400 mg/Kg et pour les deux autres, des doses de clorazépate (Tranxène, Clin-Midy, Montpellier) de 5 et 20 mg/Kg (0,5 ml/50 g).

b) **Dans la deuxième expérience,** la veille du test, le nébulisat est mis en suspension dans une solution d'acide chlorhydrique (pH = 1,5) jusqu'au lendemain matin. Puis, cette solution est neutralisée (pH = 6,5) avec de la soude normale. Une solution témoin est préparée dans les mêmes conditions, sans extrait de plante.

30 minutes avant l'administration du barbiturique, deux groupes de lots composés de 10 souris reçoivent par voie IP à la dose de 400 mg/Kg, les extraits d'E. californica non traités et traités en milieu acide. Un lot témoin reçoit la solution témoin dans les mêmes conditions. l'activité globale des animaux, le temps d'endormissement et le temps de sommeil sont alors enregistrés. Le début du sommeil est pris en compte lorsque les souris acceptent la position en décubitus latéral ; le temps de réveil lorsque la souris quitte cette position après trois tentatives de remise en position initiale. Le temps d'endormissement est l'intervalle de temps entre l'injection de pentobarbital et l'apparition du sommeil. Le temps de sommeil est l'intervalle de temps entre le début du sommeil et le réveil.

c) **Dans la troisième expérience**, 60 minutes avant le test, les animaux reçoivent per os la plante en suspension dans l'excipient aux doses de 200, 400 ou 1000 mg/Kg (0,5 ml/50 g).

Des lots témoins reçoivent, dans les mêmes conditions per os, les échantillons témoins dont la composition en excipient correspond respectivement à celle de chacun des lots traités.

Au moment du test, les différents lots reçoivent par voie IP une dose de pentobarbital de 25 ou 35 mg/Kg (0,5 ml/50 g). Les temps d'endormissement et de sommeil sont alors enregistrés selon les critères définis précédemment.

. **Statistiques**

Pour les tests de potentialisation du sommeil barbiturique et de l'activitest, les performances des animaux traités sont comparées à celles des animaux témoins au moyen du test de l'analyse de variance, suivie du test de Newmann-Keuls ; alors que dans le test d'induction du sommeil, le nombre d'animaux endormis du lot témoin est comparé à l'aide du test du X^2 à ceux des lots traités.

2.1.2 Résultats

. Influence du nébulisat d'E. californica per os sur la narcose induite par le pentobarbital (35 mg/Kg) et sur l'induction du sommeil après administration d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital par voie I.P. (25 mg/Kg) chez la souris)

L'extrait nébulisé d'E. californica administré par voie orale ne modifie significativement ni le temps d'endormissement ni la durée du sommeil barbiturique aux doses de 200, 400 et 800 mg/Kg (Tableau 36).

Après administration d'une dose de 25 mg/Kg de pentobarbital, le nébulisat de la plante n'induit pas le sommeil chez la souris. Par contre, dans les mêmes conditions, le clorazépate aux doses de 5 et 20 mg/Kg induit significativement (test X^2) le sommeil chez les animaux traités avec la dose infra-hypnotique de pentobarbital (Tableau 37).

L'absence d'activité du nébulisat d'E. californica sur l'hypnose et sur l'induction du sommeil barbiturique, lorsqu'il est administré par voie orale, nous a amené à vérifier l'influence du pH acide de l'estomac sur l'activité du nébulisat par voie IP.

. Effet d'un milieu acide (Ph = 1,5) sur l'activité du nébulisat par voie IP, sur la durée du sommeil et le temps d'endormissement narcotique et sur l'activité globale de la souris Swiss (Activimètre)

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 38 et 39 et dans la figure 51. L'extrait d'E. californica lorsqu'il est non traité, ou traité par passage en milieu acide augmente significativement, à la dose de 400 mg/Kg le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique (Tableau 38) et diminue significativement l'activité globale des souris dans le test de l'activimètre (Tableau 39). Le passage en milieu acide n'a donc pas dégradé le/les principe(s) actif(s) de l'extrait et les effets pharmacologiques sont conservés.

TABLEAU 36 - INFLUENCE DE L'EXTRAIT NEBULISE D'E. CALIFORNICA ADMINISTRE PAR VOIE ORALE SUR LE TEMPS DE SOMMEIL ET SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL CHEZ LA SOURIS SWISS

PENTOBARBITAL mg/Kg	E. CALIFORNICA mg/Kg	N	TEMPS D'ENDORMISSEMENT SECONDES MOYENNES ± E.S.	P	TEMPS DE SOMMEIL SECONDES MOYENNES ± ES	P
35	0	19	294 ± 8	/	2619 ± 240	/
35	200	10	284 ± 14	NS	2875 ± 78	NS
35	400	10	268 ± 24	NS	3108 ± 235	NS
35	800	10	310 ± 20	NS	2671 ± 185	NS

N.S. : DIFFERENCE STATISTIQUEMENT NON SIGNIFICATIVE

TABLEAU 37- INFLUENCE DE L'EXTRAIT NEBULISE D'E.CALIFORNICA ADMINISTRE PAR VOIE ORALE, SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL CHEZ LA SOURIS SWISS

PENTOBARBITAL mg/Kg	E.CALIFORNICA mg/Kg	N	NOMBRE D'ANIMAUX ENDORMIS	% D'ENDORMISSEMENT	TEMPS DE SOMMEIL
25	0	10	0	0	/
25	200	10	0	0	/
25	400	10	0	0	/
/	CLORAZEPATE mg/Kg				
25	5	5	3	60 **	613 +350
25	20	5	5	100 ***	3099+960 *

** P< 0.01 *** P< 0.001

TABLEAU 38 - INFLUENCE D'E. CALIFORNICA NON TRAITE ET TRAITE AVEC L'ACIDE CHLORHYDRIQUE (pH = 1,5) SUR LE TEMPS D'ENDORMISSEMENT ET SUR LE TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (40 mg/Kg) PAR VOIE I.P.

E. CALIFORNICA mg/Kg	E. CALIFORNICA TRAITE EN MILIEU CHLORHYDRIQUE (pH=1,5) mg/Kg	N	TEMPS D'ENDORMISSEMENT SECONDES ± E.S	P	TEMPS DE SOMMEIL SECONDES ± E.S	P
0	0	10	226 ± 14	/	2176 ± 280	/
400	0	10	209 ± 15	N.S	3387 ± 390	
0	400	10	180 ± 10	N.S	5433 ± 575	0.01

N = NOMBRE DE SOURIS

TABLEAU 39 - EFFETS D'E. CALIFORNICA NON TRAITE ET TRAITE AVEC L'ACIDE CHLORHYDRIQUE (pH = 1,5) SUR L'ACTIVITE GLOBALE DANS LE TEST DE L'ACTIVIMETRE CHEZ LA SOURIS

E. CALIFORNICA mg/Kg	E. CALIFORNICA TRAITE AVEC L'ACIDE CHLORHYDRIQUE mg/Kg	N	ACTIVIMETRE 5 MINUTES ± E.S	P
0	0	10	946 ± 100	/
400	0	10	350 ± 63	0.01
0	400	10	322 ± 91	0.01

N = NOMBRE DE SOURIS

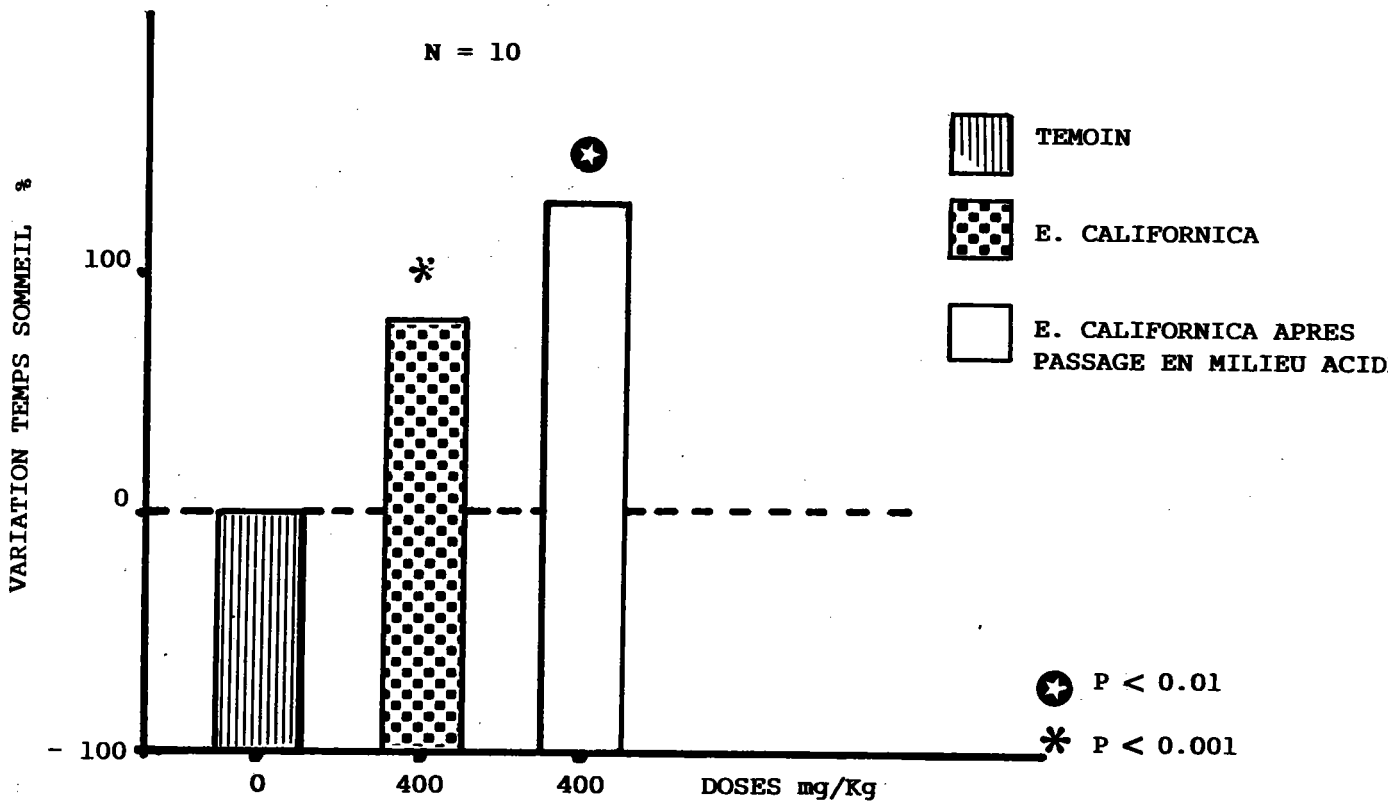


Fig. 51 - ACTION DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA NON TRAITE ET TRAITE EN MILIEU ACIDE CHLORHYDRIQUE PUIS NEUTRALISE PAR LA SOUDE, SUR LA DUREE DU SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (35 mg/Kg) CHEZ LA SOURIS (VOIE I.P.)

. Influence de différents excipients sur l'activité potentialisatrice du nébulisat d'E. californica administré per os, sur le sommeil induit par le pentobarbital (35 mg/Kg)

Ces expérimentations ont pour but de trouver un excipient qui améliorerait l'activité d'E. californica lorsqu'il est administré par voie orale.

Des lots de 10, 9 ou 5 souris reçoivent par voie orale une suspension d'E. californica dans un excipient sélectionné (éthanol, propylène glycol, polyéthylène glycol 400 et Labrafil M1944C) 30 minutes avant l'administration par voie IP de pentobarbital sodique (35 mg/Kg ; 0,5 ml/50 g).

Pour chacun des lots traités, un lot témoin reçoit la solution d'excipient dans les mêmes conditions.

Les résultats, regroupés dans le tableau 40, démontrent que seule E. californica à la dose de 1000 mg/Kg administrée per os et en suspension dans le labrafil présente une augmentation significative ($P < 0.001$). Par contre, en suspension dans l'éthanol, le propylène glycol et le polyéthylène glycol 400, ou sous forme de teinture-mère, les extraits administrés par voie orale, ne modifient pas la narcose barbiturique.

On remarque qu'une émulsion de polyéthylène glycol 400 ou de labrafil, administrée seule à l'animal, tend à diminuer la narcose induite par le pentobarbital à la dose de 35 mg/Kg, puisque seulement 80 % des animaux témoins dorment avec le polyéthylène glycol et 60 % avec le labrafil.

Pour confirmer l'activité du labrafil, nous avons vérifié sur un lot plus important d'animaux l'activité sédative de la plante lorsque l'extrait mis en suspension dans cet excipient est administré par voie orale. Pour cela, nous avons sélectionné le test d'induction du sommeil.

. Influence de l'excipient labrafil sur l'activité du nébulisat d'E. californica à la dose de 1000 mg/Kg, per os, sur l'induction du sommeil après administration d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg ; 0,5 ml/50 g)

Dans ces conditions expérimentales, les résultats présentés dans le tableau 41 démontrent que le nébulisat de la plante à la dose de 1000 mg/Kg, administré per os en suspension dans le labrafil (réf. : M, 1944C) induit significativement le sommeil des souris après traitement avec une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg). ces résultats confirment ceux qui avaient été obtenus avec le test de potentialisation du sommeil induit par le barbiturique (Tableau 40).

TABLEAU 40 - INFLUENCE DE DIFFERENTS EXCIPIENTS SUR L'ACTIVITE D'E. CALIFORNICA PER OS SUR LE TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (35 mg/Kg)

NEBULISAT mg/Kg	EXCIPIENT	N	SOURIS ENDORMIES %	TEMPS DE SOMMEIL 7 SECONDES ± ES
0	ETHANOL	10	100	3980 ± 1800
400		10	100	4300 ± 2100
0	PROPYLENE GLYCOL	10	100	2076 ± 272
1000		9	100	1837 ± 359
0	POLYETHYLENE GLYCOL 400	10	80	1034 ± 311
1000		10	70	1038 ± 380
0	LABRAFIL M1944C	5	60	225 ± 125
1000		5	100 *	1530 ± 357**

N = NOMBRE D'ANIMAUX ES = ERREUR STANDARD

* $P < 0.05$ (Test du X^2) ** $P < 0.001$ (Test de Student)

TABLEAU 41 - INFLUENCE DE L'EXCIPIENT LABRAFIL (M1944C) SUR L'ACTIVITE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA (1000 mg/Kg ; PO) SUR L'INDUCTION DU TEMPS DE SOMMEIL APRES ADMINISTRATION DE PENTOBARBITAL (25 mg/Kg, I.P.)

NEBULISAT D'E. CALIFORNICA mg/Kg	NOMBRE DE SOURIS	SOURIS ENDORMIES %
0	15	7
1000	19	47 *

$P < 0.01$ (Test du X^2)

2.1.3 Discussion

Les effets de plusieurs préparations galéniques d'E. californica sur la narcose induite par le pentobarbital ont été étudiés et sont résumés dans la figure 52. Si E. californica est administré par voie orale, il n'a aucun effet sur la durée du sommeil narcotique ; par contre après avoir testé plusieurs excipients, on constate un effet significatif d'induction et de potentialisation de la narcose barbiturique par la plante administrée per os lorsqu'elle est incorporée dans un excipient de type labrafil.

Sur la figure 53, nous avons représenté les effets comparés de la teinture mère et du nébulisat d'E. californica, lorsque ces deux extraits sont administrés par voie IP et par voie orale sur la narcose induite par le pentobarbital. On constate que la teinture mère à la dose de 200 mg/Kg, administrée chez la souris par voie orale, n'a pas d'effet sur la narcose barbiturique alors que par voie IP, elle augmente à la même dose le sommeil induit par le pentobarbital (35 mg/Kg). Ceci est également vrai pour le nébulisat. Par ailleurs, l'addition d'alcool au nébulisat à 400 mg/Kg n'améliore pas son absorption par voie orale. Nous n'avons pas testé la teinture mère des doses supérieures à 200 mg/Kg, car à cette dose l'alcool perturbe de manière importante le sommeil des animaux (Fig.53). Ces résultats ne concordent pas avec ceux rapportés dans la bibliographie sur l'action d'E. californica administrée chez l'homme par voie orale sous forme de teinture mère. Deux hypothèses peuvent être évoquées : soit les principes actifs sont dégradés au niveau de l'appareil digestif, soit ils ne sont pas absorbés.

Cette dégradation ne paraît pas être liée à l'action de l'acide gastrique, puisque le nébulisat d'E. californica traité avec l'acide chlorhydrique, conserve son action de potentialisation du sommeil narcotique. Cependant, d'autres enzymes digestives pourraient dégrader les principes actifs car le système digestif des rongeurs est fondamentalement différent de celui de l'homme. Le clorazépate, utilisé comme tranquillisant de référence, est par contre actif chez la souris par voie orale (Fig. 54).

Nous avons démontré que seul le labrafil utilisé comme excipient permettrait l'obtention d'une activité pharmacologique sur le sommeil induit par le pentobarbital (25 mg/Kg) par voie orale chez E. californica. Or la propriété lipophile du labrafil pourrait interférer avec le barbiturique. Il s'est donc avéré opportun de vérifier l'effet du labrafil sur l'activité per os du nébulisat d'E. californica au moyen d'autres tests pharmacologiques.

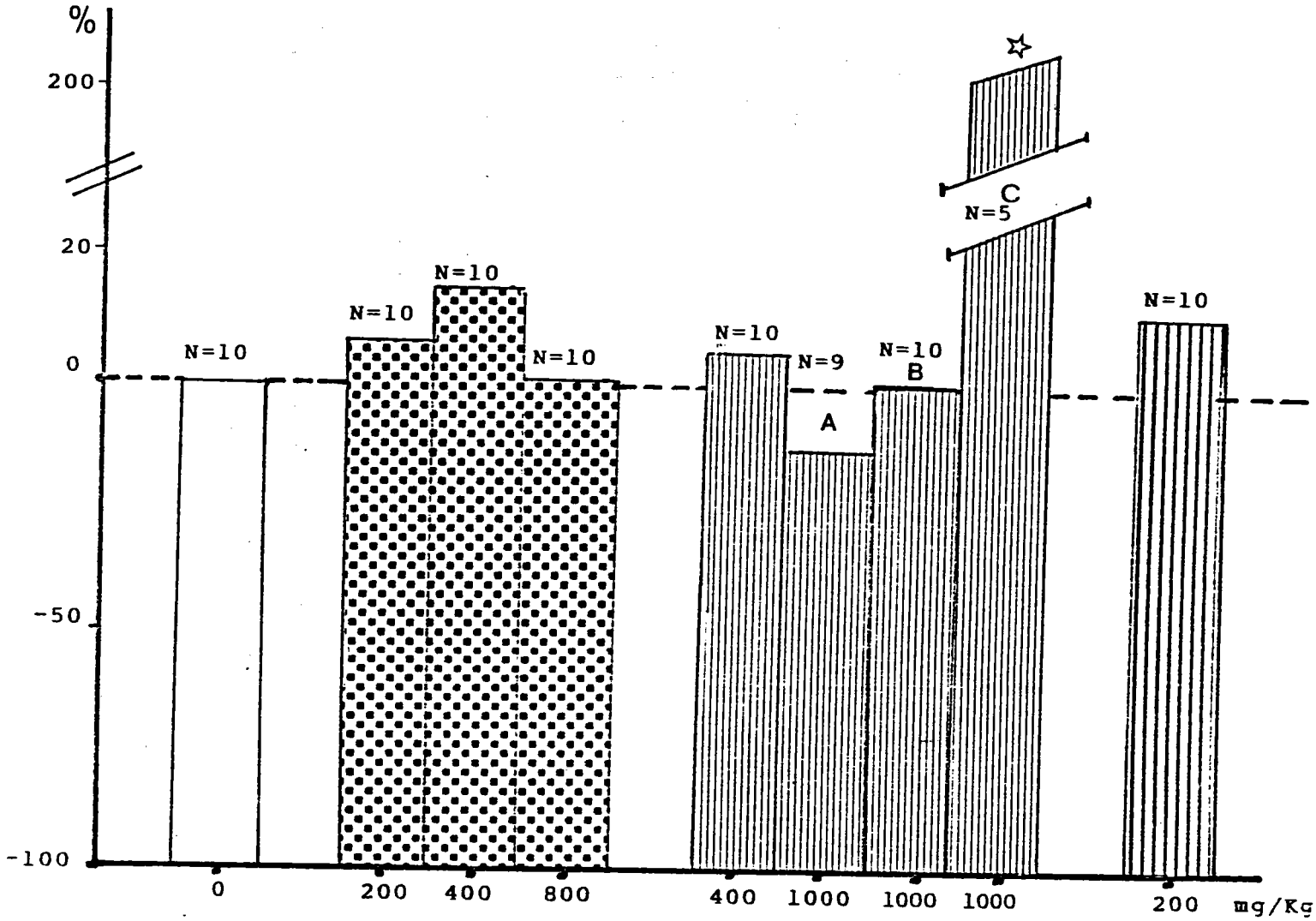


Fig. 52 - EFFET DE DIFFERENTES PREPARATIONS D'E. CALIFORNICA, PER OS, SUR LE TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (35 mg/Kg)

LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN POURCENTAGE DE VARIATION DU TEMPS DE SOMMEIL EN RAPPORT AUX TEMOINS RESPECTIFS.

$P < 0.001$

N = NOMBRE D'ANIMAUX

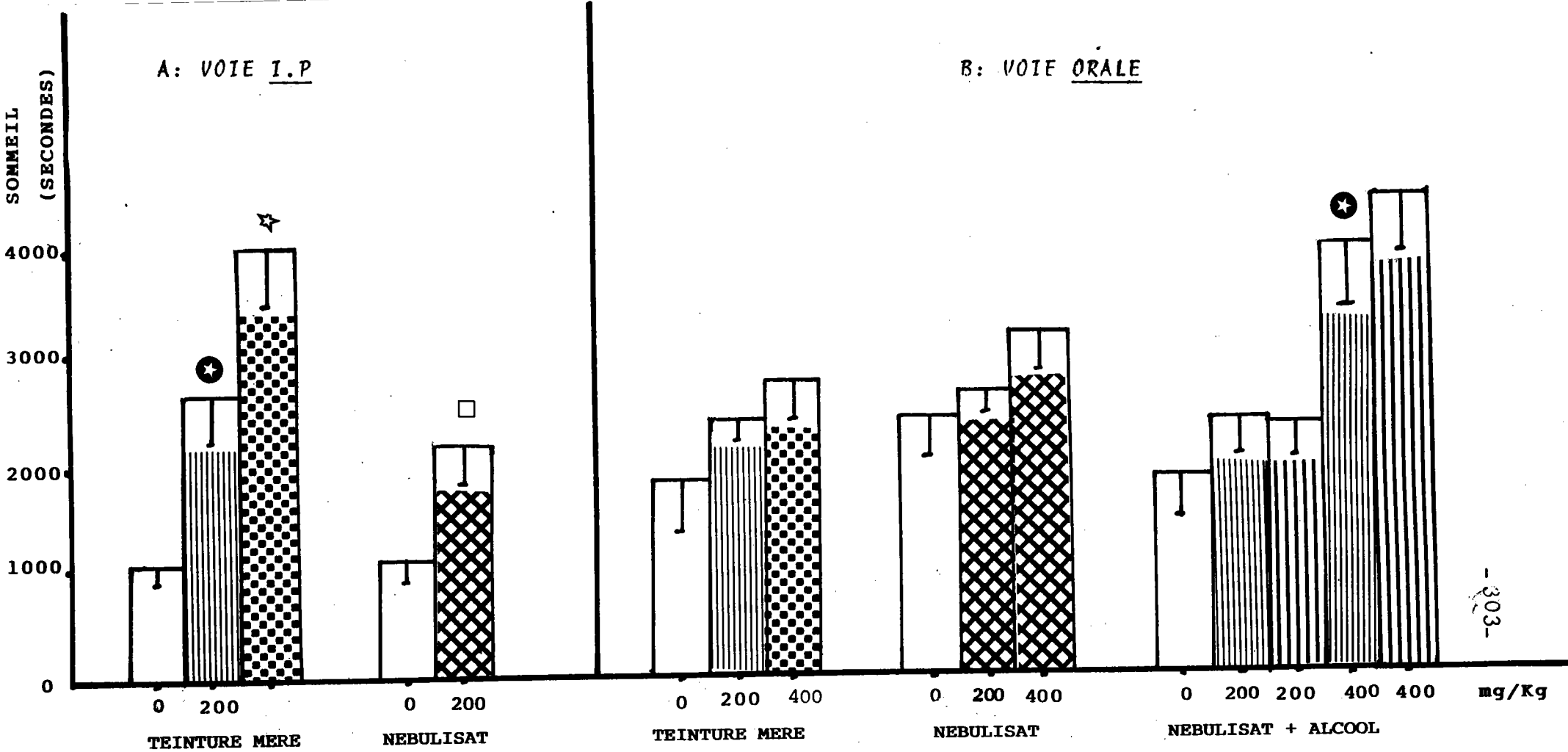
TEMOIN

NEBULISAT

NEBULISAT + EXCIPIENT

:Ethanol 10%
A :Propylène glycol
B :Polyéthylène glycol 400
C :Labrafil

TEINTURE MERE



TEMOIN NaCl 9 °/₀₀

TEMOIN ALCOOL

P < 0.05 (Témoin alcool/Témoin NaCl)

P < 0.05 (T.M./Témoin alcool)

TEINTURE MERE D'E. CALIFORNICA

NEBULISAT

NEBULISAT D'E. CALIFORNICA DANS L'ETHANOL

P < 0.01 (Nébulisat/Témoin NaCl)

Fig 53 - EFFETS COMPARES DE LA TEINTURE MERE ET DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA ADMINISTRES PAR VOIE I.P. ET PAR VOIE ORALE, SUR LE TEMPS DE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL (35 mg/Kg).

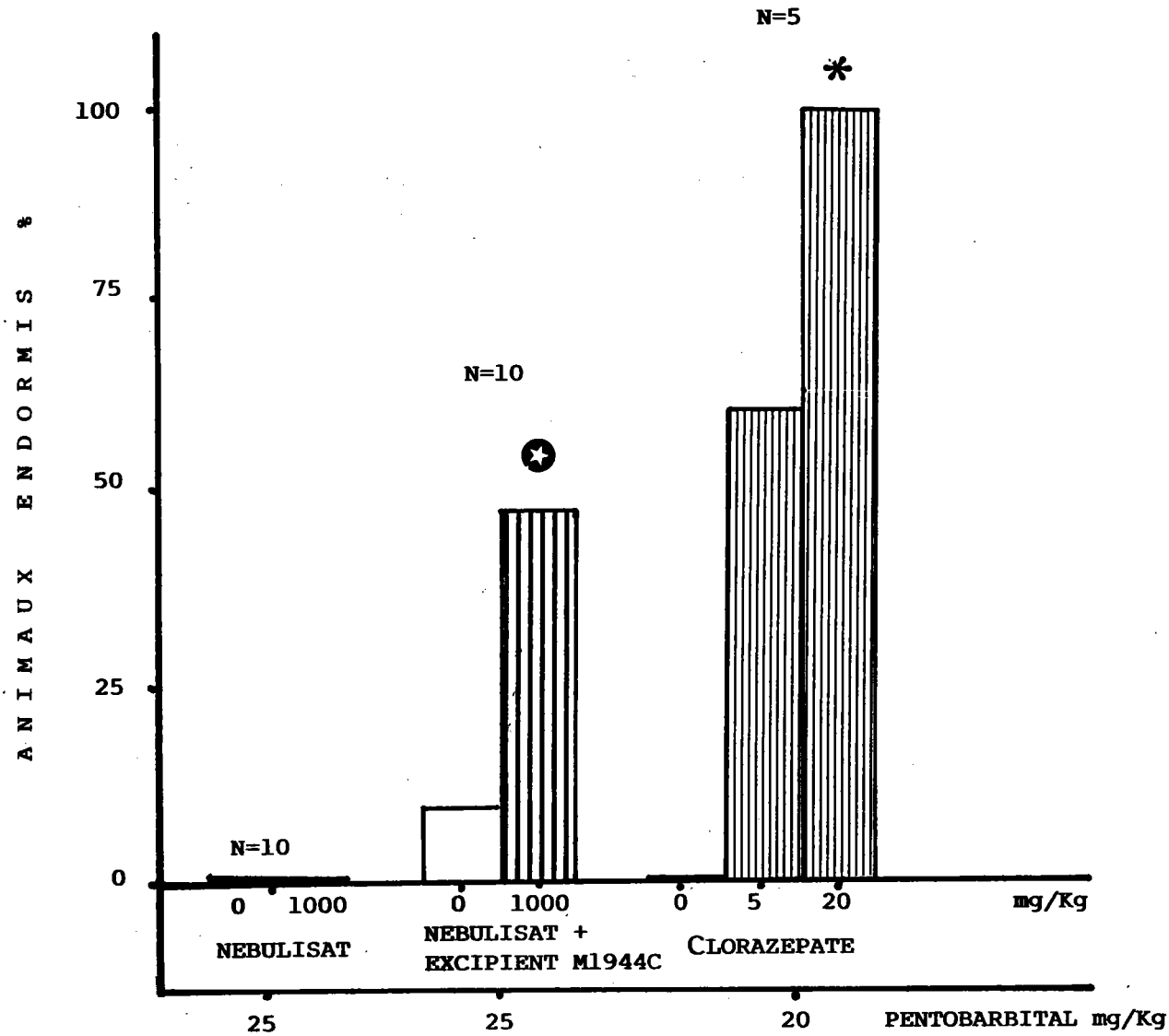


Fig. 54 - INFLUENCE COMPAREE DU CLORAZEPATE, DU NEBULISAT ET DU MELANGE NEBULISAT, LABRAFIL SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES ADMINISTRATIO D'UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL CHEZ LA SOURIS.

2.2. ETUDE DE L'EFFET DU LABRAFIL M1944C SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D'E. CALIFORNICA PAR VOIE ORALE

2.2.1. Le Labrafil

Définition : Le labrafil est constitué d'un glycéride polyoxyéthyléné glycolysé obtenu par alcoolyse partielle d'huile végétale naturelle (huile de noyaux), dont les caractéristiques sont les suivantes :

Nature : glycosides oleiques polyoxyéthylénés glycolysés

Couleur : jaune pâle

Consistance : liquide huileux

Indice d'acide : 2

Indice d'iode : 60 - 90

Indice de soponification : 145 - 175

Indice de peroxyde (mg d'O_2 actif/g) : 100

Teneur en eau : 0,05 %

Cendres sulfuriques : 0,05 %

HLB : 3/4

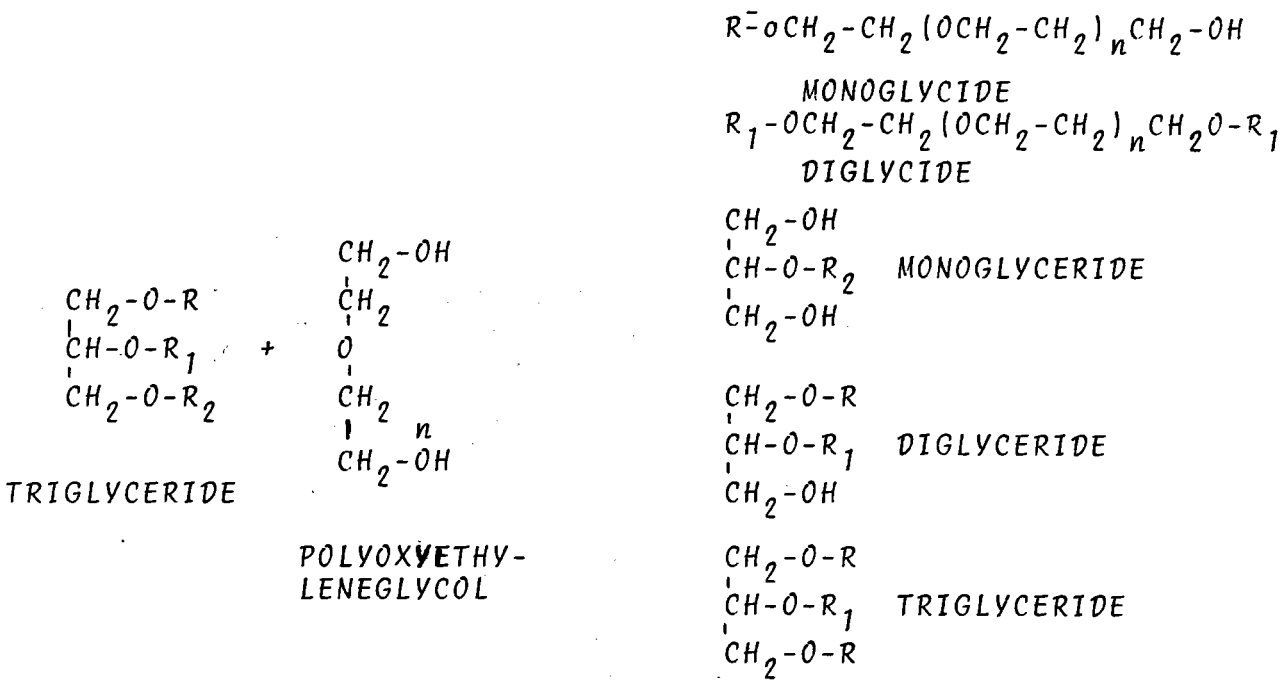
Solubilité : éthanol 96° : assez soluble
CHC13) très soluble
éther de pétrole)
huiles : soluble
eau : insoluble mais dispersable.

Hemi-synthèse : l'huile de départ est un triglycéride strictement lipophile. Une interestérification lui donne une hydrophilie étagée en faisant réagir sur les triglycérides des polyoxyéthylèneglycols obtenus par condensation de l'oxyde d'éthylène avec l'eau.

Cette interestérification déplace les chaînes grasses primitivement liées au glycérol par alcoolyse en libérant des groupements hydroxyles, d'où la formation simultanée de tri, di et monoglycérides, et de mono et dipolyglycides.

On obtient ainsi un spectre de produits parfaitement définis possédant à la fois un ou plusieurs groupements hydrophiles, et un ou plusieurs groupements lipophiles.

Le schéma de la réaction est le suivant :



Les groupements lipophiles sont représentés par les groupements CH et éventuellement les groupements CH_3 situés en bout de chaîne.

Les groupements hydrophiles sont représentés par les groupements

- carboxyle $-C\begin{matrix}=O\\ -O-\end{matrix}$
- hydroxyle -OH
- ponts éther-oxyde -O-

Toxicité et tolérance du labrafil : l'étude de la toxicité aiguë et chronique, ainsi que l'étude de la tolérance chez l'animal et chez l'homme permettent d'affirmer que les labrafils n'ont aucune toxicité et qu'ils sont parfaitement tolérés par les muqueuses (Gattefossé).

2.2.2. Matériel et méthodes

Choix des tests pharmacologiques

Notre choix s'est porté sur trois tests pharmacologiques que nous avons déjà largement utilisés pour démontrer l'effet sédatif du nébulisat d'*E. californica* par voie LP. : le test de l'activimètre, le test d'induction du sommeil et le test de l'open-field modifié.

La sélection du rapport concentration labrafil/plante, pour obtenir une activité pharmacologique optimale, a été effectuée sur le test de l'activimètre.

Protocole

Test de l'activimètre

Nous avons utilisé d'une part le protocole décrit au chapitre I et d'autre part, un protocole légèrement modifié en relevant les paramètres toutes les minutes pendant 10 minutes, et en dissociant le score obtenu pendant les 5 premières minutes de celui obtenu pendant les 5 dernières minutes.

Test de l'induction du sommeil (cf. Chap. 1, § 3.3.3.5.)

Test de l'openfield modifié

Comme dans le protocole décrit au chapitre I , les animaux témoins et les animaux traités sont introduits dans l'appareil et l'on enregistre pendant 10 minutes le nombre de carrés traversés et le nombre de séquences de toilettage. De plus, on détermine un nouveau paramètre défini comme étant l'habituation qui correspond à la différence entre la locomotion des cinq premières minutes et celle des cinq dernières minutes divisée par la locomotion totale et rapportée à 100.

Ce nouveau paramètre améliore la sensibilité au test. Ainsi une différence significative entre la locomotion des cinq premières minutes et celle des cinq dernières entre les animaux traités et les animaux témoins traduit une diminution de la locomotion plus prononcée dans le temps chez les animaux traités. Cela peut être interprété comme de la sédation, c'est-à-dire une moindre réactivité des animaux aux stimulis de l'environnement. On observe également une augmentation des toilettages correspondant à une réactivité aux stimulis internes car les toilettages apparaissent souvent lorsque les animaux sont habitués à la nouveauté.

Préparation des extraits

Les différents extraits d'E. californica sont dissouts dans l'eau ; le labrafil (phase huileuse) est ensuite incorporé dans la phase aqueuse. Le mélange est alors agité manuellement puis à l'homogénéisateur (poter) pendant 5 minutes. L'émulsion ainsi obtenue peut être administrée aux animaux par voie orale par gavage (0,5 ml/50 g) 6 à minutes avant les tests pharmacologiques.

Pour chacun des lots traités, un lot témoin reçoit, dans les mêmes conditions, un volume per os (0,5 ml/50 g) d'une émulsion d'eau et de labrafil ayant la même composition que le lot traité.

Deux types d'extraits d'E. californica ont été utilisés : d'une part le nébulisat, et d'autre part une digestion aqueuse référencée 5142-17, analogue au RT 1095, et dont l'activité pharmacologique a été vérifiée.

2.2.3 Résultats

- **Influence de la teneur en labrafil sur l'activité globale (activimètre) et sur l'effet d'E. californica (induction du sommeil) après injection de pentobarbital (25 mg/Kg)**

Les résultats sont regroupés dans le tableau 42 et montrent qu'E. californica administrée par voie orale, dans une émulsion de labrafil à 10 % (V/V) induit une diminution significative (test de Student) de l'activité globale et une induction significative du sommeil (test du X^2) après administration d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital de 25 mg/Kg. Dans les mêmes conditions, l'émulsion réalisée avec le labrafil à une concentration de 80 % (V/V) ne produit aucun effet statistiquement significatif.

TABLEAU 42 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN LABRAFIL SUR L'EFFET D'UNE EMULSION D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE GLOBALE (ACTIVIMETRE) ET SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES INJECTION DE PENTOBARBITAL (25 mg/Kg)

PRODUITS	LABRAFIL %	ACTIVITE GLOBALE 5 MINUTES	% SOURIS ENDORMIES	N
TEMOIN	10 %	1426 ± 121	20	10
NEBULISAT	10 %	902 ± 142 *	67 *	9
TEMOIN	80 %	874 ± 87	20	10
NEBULISAT	80 %	935 ± 143	0	10

* $P < 0.05$ N = NOMBRE D'ANIMAUX

- **Influence du labrafil sur l'effet de la digestion aqueuse d'E. californica 5142-17 sur l'activité globale (activimètre) et sur l'induction du sommeil après injection de pentobarbital (25 mg/Kg) chez la souris**

Afin d'améliorer la stabilité de l'émulsion, nous avons utilisé une teneur en labrafil de 20 % au lieu de 10 %.

Les résultats du tableau 43, A et B montrent que dans ces conditions opératoires, E. californica provoque une induction significative du temps de sommeil (43, A), mais ne modifie pas l'activité globale au bout de 5 minutes (43, B). Par contre, sur une période de 10 minutes, cette diminution est significative entre 5 et 10 minutes.

TABLEAU 43 (A et B) - INFLUENCE D'UNE EMULSION D'E. CALIFORNICA ET DE LABRAFIL (20 % V/V) ADMINISTREE PER OS (1000 mg/Kg) SUR L'ACTIVITE GLOBALE (ACTIVITEST) PENDANT 5 (A) ET 10 MINUTES (B) ET SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES INJECTION DE PENTOBARBITAL (25 mg/Kg)

A

PRODUIT	ACTIVITE GLOBALE 5 MINUTES	% SOURIS ENDORMIES	N
TEMOIN	789 ± 80	20	10
E. CALIFORNICA 1000 mg/Kg	763 ± 135	70 *	10

B

PRODUIT	ACTIVITE GLOBALE 0-5 MINUTES	ACTIVITE GLOBALE 0-10 MINUTES	ACTIVITE GLOBALE 5-10 MINUTES	% SOURIS ENDORMIES	N
TEMOIN	1586 ± 193	2852 ± 482	1253 ± 25	25	8
E. CALIFORNICA 1000 mg/Kg	1292 ± 141	2013 ± 278	721 ± 170*	56 *	9

* $P < 0.05$ N = NOMBRE D'ANIMAUX

. **Influence d'une émulsion d'E. californica (1000 mg/Kg per os) et d'un labrafil à la concentration de 20 % sur la locomotion totale, les toilettages et l'habituation dans la situation expérimentale de l'open-field modifié**

Les résultats rassemblés dans le tableau 44 montrent que la préparation d'E. californica administrée per os réduit de façon significative la locomotion totale des animaux ; alors que la différence entre les animaux traités et les animaux témoins, entre la locomotion des cinq premières minutes et celle des cinq dernières minutes est significativement augmentée. Ceci est encore vrai pour les toilettages.

TABLEAU 44 - INFLUENCE D'UNE EMULSION D'E. CALIFORNICA (1000 mg/Kg PER OS) ET DE LABRAFIL (CONCENTRATION 20 % V/V) SUR LA LOCOMOTION TOTALE, LE TOILETTAGE ET L'HABITUATION DANS LE TEST DE L'OPENFIELD MODIFIE

PRODUIT	LOCOMOTION TOTALE 10 MINUTES	TOILETTAGE	HABITUATION	N
TEMOIN	300 ± 20	0,30 ± 0,15	12,93 ± 3,35	10
E.CALIFORNICA NEBULISAT	198 ± 18***	3,10 ± 0,48	37,81 ± 10**	10

** $P < 0.02$ *** $P < 0.001$

2.2.4. Discussion

L'effet sédatif d'*E. californica* (lyophilisat) *per os* lorsqu'il est mis en suspension dans un excipient du type labrafil, a été confirmé puisque cette substance réduit les paramètres comportementaux dans les tests de l'activimètre et de l'open-field. Cependant, dans la deuxième expérimentation, l'effet sédatif d'une digestion aqueuse d'*E. californica* n'est obtenu que lorsque le test est réalisé pendant 10 minutes et l'effet est plus faible.

Par ailleurs, il semble qu'il soit nécessaire de tenir compte de la concentration du labrafil. En effet, si l'excipient est à une concentration élevée (80 % V/V), l'activité globale et l'induction du sommeil des animaux traités ne sont plus modifiées significativement et l'excipient pourrait avoir une activité intrinsèque tendant à réduire les paramètres.

Ces premiers résultats mettent en évidence qu'*E. californica* administré seul par voie orale, n'a pas d'effets pharmacologiques apparents chez la souris ; mais associé avec un excipient du type labrafil, elle présente une activité significative. La variation de l'intensité de l'effet peut s'expliquer soit par des problèmes d'absorption, soit par la caractère stressant de ce mode d'administration (voie orale par gavage) chez la souris qui perturbe, à lui seul, de façon importante le comportement des animaux témoins. Un nouveau protocole expérimental a été utilisé afin de vérifier ou d'infirmer l'inefficacité de l'extrait végétal *per os* chez les rongeurs. Pour cela, nous avons étudié l'influence de cet extrait sur l'activité locomotrice du rat en boîte de Skinner.

3. EFFET D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE ET MANIPULATOIRE CHEZ LE RAT EN BOITE DE SKINNER

Nous avons utilisé pour cette étude une technique d'enregistrement de l'activité locomotrice et manipulatoire en boîte de Skinner, utilisée au laboratoire de biologie du comportement de Nancy.

3.1. MATERIEL ET METHODES

Des boîtes de Skinner, normalement utilisées pour des tests de conditionnement opéran, sont constituées par des cages standard (42 x 28 x 24 cm) dans lesquelles les rats se déplacent librement, sans y subir de chocs lumineux. Deux pédales, constituées par des rectangles de plexiglass de 4 x 7 cm, ajoutées à la cage ne sont utilisées ici que pour enregistrer l'activité manipulatoire des animaux.

4 lots de 6 rats mâles OFA (Iffa Credo, L'Arbresle), d'un poids compris entre 300 et 350 g, abreuvés et nourris ad libitum (croquettes Extralabo, Provins) et maintenus dans une animalerie cyclée (12 h/12 h : la lumière s'éteint à 18 h et se rallume à 6 h), reçoivent un prétraitement d'E. californica mis en suspension, soit dans de l'eau distillée (400, 1000, 1600 mg/Kg ; 2 ml/Kg), soit dans une émulsion d'eau et de labrafil (80- 20 V/V) (1000 mg/Kg ; 2 ml/Kg) et administré par voie orale. Une heure trente minutes plus tard, le nombre d'unités franchies, représentées sur le plancher par des carrés, et le nombre d'appuis sur les pédales sont comptabilisés pendant 15 minutes. Les extraits d'E. californica utilisés sont des nébulisats.

Un lot témoin reçoit dans les mêmes conditions, soit de l'eau physiologique, soit une solution d'émulsion d'eau et de labrafil (80-20 V/V). La technique de gavage des rats est modifiée par rapport à celle utilisée pour les souris. En effet pour administrer les produits, nous nous servons de l'appareil présenté en figure 55 et de la technique décrite par Desor (1979).

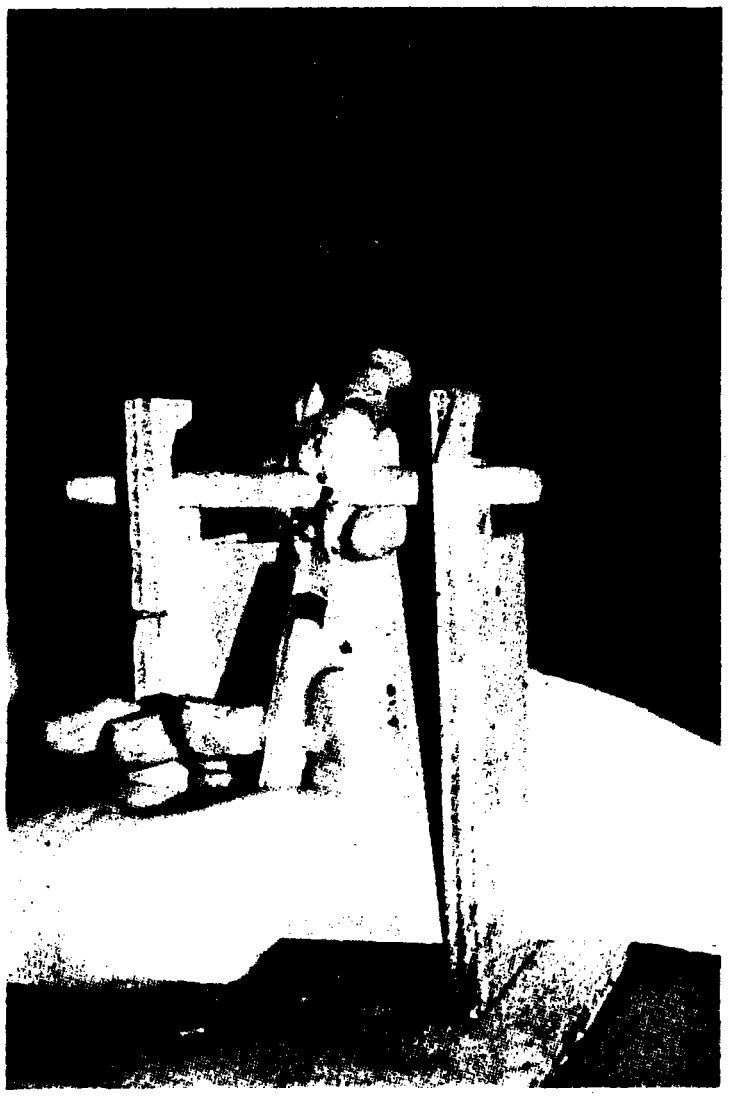


Fig. 55 -
GAVAGE PAR SONDE
INTRA-GASTRIQUE

Le rat est posé sur la table et on le recouvre jusqu'aux épaules d'un chiffon. On le soulève de la main gauche, tandis que de la main droite on rabat par devant les deux pans du chiffon. Les pattes antérieures de l'animal se trouvent ainsi emprisonnées. De la main droite, on force alors le bout du bâtonnet sur le côté de la bouche du rat. On l'engage dans la barre, derrière les incisives, et on le pousse jusqu'à ce que le trou soit positionné en face de la gorge de l'animal, la langue étant rejetée sur le côté à l'extérieur. On place alors l'animal dans l'appareil, de façon à ce que les extrémités du bâtonnet s'engagent dans les encoches prévues sur les montants. Une fois l'animal fermement maintenu dans cette position, on engage la sonde dans l'oesophage d'un mouvement très régulier jusqu'à ce que l'on sente que son extrémité arrive dans l'estomac. Le liquide est alors injecté régulièrement (environ 1 ml). Elle est ensuite retirée délicatement, et l'animal est replacé dans sa cage, l'ensemble de l'opération ne prend pas plus de 60 secondes. Il ne faut pas cependant mésestimer le stress qu'elle représente pour l'animal.

Les différentes valeurs moyennes entre les manipulations des pédales et l'activité locomotrice des animaux traités après administration des extraits végétaux sont comparées aux différentes moyennes des lots témoins par le test d'analyse des variances et le test "t" de Student.

3.2. RESULTATS

E. californica mis en suspension dans l'eau distillée et administré par voie orale n'a pas d'effet significatif (Test F, analyse de variance) sur la locomotion ou sur le nombre d'appuis des rats traités aux doses de 400, 1000 et 1600 mg/Kg en boîte de Skinner (Tableau 45). Par contre, lorsque la substance est incorporée dans une émulsion eau-excipient (80-20 % V/V) amphiphile (hydrophile et lipophile) du type labrafil M1944C à la dose de 1000 mg/Kg (Tableau 46), l'activité locomotrice est significativement diminuée (test "t" de Student) alors que le nombre des appuis sur les pédales n'est pas modifié.

TABLEAU 46 - INFLUENCE DU NEBULISAT D'E. CALIFORNICA, PER OS (1000 mg/Kg) MIS EN SUSPENSION DANS UNE EMULSION DE LABRAFIL (20 % V/V) SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE ET SUR LE NOMBRE D'APPUIS SUR LES PEDALES CHEZ LE RAT EN BOITE DE SKINNER

	TEMOINS EXCIPIENT LABRAFIL 20 % V/V N = 8	E. CALIFORNICA 1000 mg/Kg + LABRAFIL 20 % V/V N = 10
ACTIVITE LOCOMOTRICE ± E.S.	127 ± 32	89 ± 37 *
APPUIS SUR LES PEDALES	53 ± 17	49 ± 26

* $P < 0.05$ N= NOMBRE DE RATS

TABLEAU 45 - EFFET DOSE D'E. CALIFORNICA, PER OS MIS EN SUSPENSION DANS L'EAU DISTILLEE SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE ET LE NOMBRE D'APPUIS SUR LES PEDALES CHEZ DES RATS EN BOITE DE SKINNER

	TEMOINS H_2O DISTILLEE N = 11	E. CALIFORNICA mg/Kg		
		400 (N=5)	1000 (N=5)	1600(n=11)
ACTIVITE LOCOMOTRICE ± E.S.	132 ± 42	141 ± 72	143 ± 46	106 ± 56
APPUIS SUR LES PEDALES ± E.S.	59 ± 35	45 ± 23	75 ± 38	30 ± 13

N = NOMBRE DE RATS

3.3. DISCUSSION

Les résultats obtenus dans cette expérience sur l'activité per os d'E. californica chez le rat confirment ceux obtenus avec les souris et démontrent que l'extrait total de plante n'a aucun effet sédatif lorsqu'il est administré seul, par voie orale chez les deux espèces de rongeurs. Par contre, si l'on modifie la préparation galénique en incorporant le produit au sein d'une émulsion eau-labrafil (80-20 V/V), on améliore sensiblement l'absorption digestive du ou des principe(s) actif(s) de l'extrait.

Si la voie orale ne peut en aucun cas être remise en cause pour l'étude de substances chimiques pures, comme le clorazépate dipotassique, dont nous avons obtenu les effets pharmacologiques attendus par voie orale chez les petits rongeurs, il semble que ce modèle pharmacologique ne soit pas totalement adapté pour l'étude d'extraits végétaux complexes.

L'activité pharmacologique d'un extrait total de plante est souvent imputable à l'activité de plusieurs substances à structures simples ou souvent complexes, ou simplement complexées par des molécules volumineuses difficilement absorbées par la barrière digestive. Cela ne remet pas en cause une activité d'E. californica chez l'homme par voie orale où seule une étude chimique pourra apporter une réponse plus précise.

4. EFFET D'E. CALIFORNICA ADMINISTRE PAR VOIE RECTALE SUR LA DUREE DU SOMMEIL NARCOTIQUE

Nous avons émis l'hypothèse précédemment qu'E. californica ne pouvait pas être absorbé par la barrière digestive, c'est pourquoi nous avons voulu rechercher si l'extrait nébulisé, administré par voie rectale un effet sur la narcose barbiturique.

4.1. MATERIEL ET METHODES

Un lot de 10 souris Swiss (CESAL, Montmedy) d'un âge moyen de 7 à 9 semaines, reçoit par voie rectale le nébulisat d'E. californica à la dose de 800 mg/Kg 45 minutes avant l'administration par voie I.P. de pentobarbital (Abott, Levallois) à la dose de 35 mg/Kg. Un lot témoin reçoit de l'excipient dans les mêmes conditions.

Pour administrer l'extrait par voie rectale, une émulsion de solution aqueuse de l'extrait et d'excipient pour suppositoire a été réalisée à la température de 30° C. Cette émulsion a été versée (0,5 ml), avant refroidissement, dans des tubes collecteurs, ceux-ci servant de moules pour la fabrication des suppositoires.

4.2. RESULTATS

La figure 56 représente l'effet d'E. CALIFORNICA (nébulisat) administré à la dose de 800 mg/Kg par voie rectale sur la durée narcotique (pentobarbital 35 mg/Kg ; 0,5 ml/50 g). On constate que la durée du sommeil est augmentée de façon significative ($P < 0.05$, test F de l'analyse de variance).

E. californica est donc actif sur la narcose barbiturique lorsqu'il est administré par voie rectale, ce qui renforce l'idée qu'E. californica, administré par voie orale, est soit dégradé par les enzymes digestives au niveau gastrique et duodénal, soit que l'absorption se fait plus aisément au niveau intestinal à cause de l'existence possible de molécules difficilement absorbées par la barrière digestive du fait de leur taille importante.

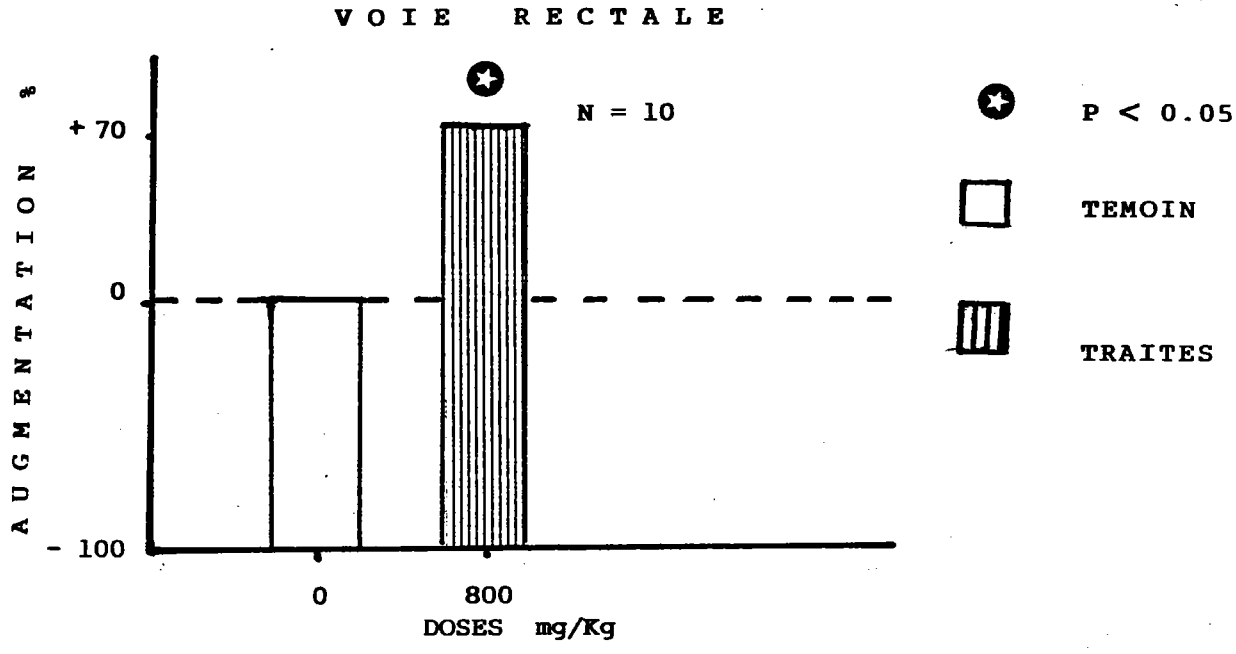


Fig. 56 - EFFETS D'E. CALIFORNICA (NEBULISAT) ADMINISTRE PAR VOIE RECTALE SUR LE SOMMEIL NARCOTIQUE

C H A P I T R E IV

MISE AU POINT D'UN PROCEDE D'EXTRACTION ET D'UNE FORME GALENIQUE ET ET ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'UN EXTRAIT INDUSTRIEL PILOTE

Les premiers travaux pharmacologiques que nous avons réalisés à partir d'un nébulisat d'E. californica obtenu après macération hydroalcoolique ont mis clairement en évidence les effets anxiolytiques et neurosédatifs doses dépendantes.

Le développement industriel d'E. californica dans le secteur pharmaceutique nécessite d'une part la mise au point d'un procédé d'extraction et d'une forme galénique et, d'autre part la maîtrise d'une source d'approvisionnement de plantes de qualité.

La mise au point d'une forme galénique nécessite plusieurs étapes :

La première étape est consacrée au choix du solvant d'extraction ; deux solvants ont été utilisés : l'eau et l'éthanol

La deuxième étape consiste à choisir un procédé de déshydratation (lyophilisation, nébulisation, dessiccation sur plaque chauffante)

Nous avons choisi la pharmacologie comme critère de sélection. En effet, tous les extraits fabriqués selon les différents protocoles seront étudiés chez l'animal afin de quantifier leurs effets, ce qui permettra de les classer.

La mise en culture d'E. californica dans nos régions, ainsi que la période de récolte, sont des facteurs qui peuvent modifier la composition chimique et aussi, par conséquent, l'activité pharmacologique.

Donc la mise au point de techniques de culture et de récolte se sont révélées indispensables. Deux types de semences, l'une française, l'autre d'origine américaine, ont été mis en cultures sur des sols identiques et sélectionnés pour être les plus proches possibles du biotope d'origine. Des récoltes ont été effectuées à la floraison et à la maturité des graines.

Après avoir défini les méthodes d'extraction, de déshydratation, les protocoles de culture et de récolte, nous réalisons un extrait pilote industriel sur lequel nous évaluerons la toxicité sur 14 jours et la cytotoxicité vis à vis des hépatocytes. Nous vérifierons ces effets anxiolytiques et sédatifs au moyen de 4 tests comportementaux qui ont été utilisés pour démontrer l'activité pharmacologique du nébulisat (test de la préférence néotique, test de l'escalier, test de l'enceinte claire/obscure et le test d'induction du sommeil).

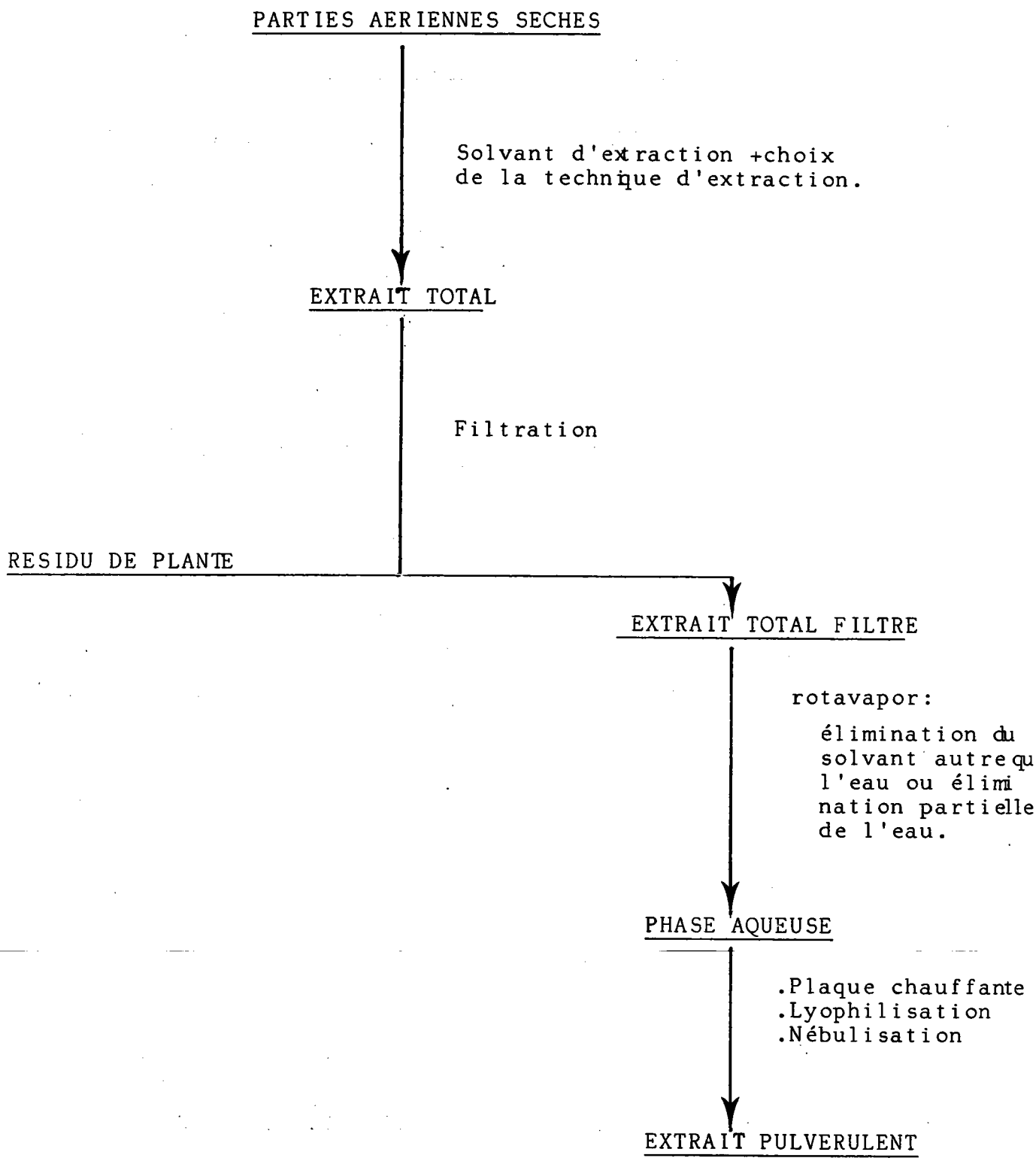


Fig. 57 - SCHEMA GENERAL D'EXTRACTION D'UN TOTUM D'E. CALIFORNICA

1. MISE AU POINT D'UNE FORME GALENIQUE

1.1. INFLUENCE DE DIFFERENTES PREPARATIONS DES EXTRAITS SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE

1.1.1. Préparation des extraits

Les extraits ont été réalisés pour une partir par notre laboratoire et pour l'autre partie par les laboratoires SANOFI, Toulouse).

Le principe de la technique d'extraction est présenté dans la figure 57 ; les techniques d'extraction, de concentration (lyophilisation, nébulisation, plaque chauffante) et les rendements sont regroupés dans le tableau 47 .

Tous les extraits, sauf le nébulisat, ont été réalisés à partir des parties aériennes de plantes cultivées dans le Maine-et-Loire (Procoherbes, Rochefort-Sur-Loire). les semences de qualité horticole sont obtenues par les producteurs. Les cultures sont sarclées à la main. Les semis ont été effectués en juin 1983 et la récolte en automne 1983. La plante coupée est séchée à une température de 40° C.

1.1.2. Contrôle pharmacologique de l'activité des extraits

1.1.2.1. Protocole expérimental

. Tests pharmacologiques

Deux tests pharmacologiques effectués chez la souris (C) ont été retenus. Le test de l'activimètre (mesure de l'activité globale des souris) et le test de l'induction du sommeil après traitement au pentobarbital. ces deux tests ont été décrits dans le Chapitre 1, § 3.1.2.1. et 3.3.3.5.

Les différents extraits sont administrés par voie I.P. à la dose de 400 mg/Kg (exprimée en équivalent de plante sèche).

TABLEAU 47 - EXTRACTION D' E. CALIFORNICA -

TECHNIQUES ET RENDEMENTS

Laboratoire SANOFI TOULOUSE

NATURE DE L'EXTRAIT	LIQUIDE D'EXTRACTION	VOLUME DE SOLVANT POUR 1 g DE PLANTE sèche	EXTRACTION	CONCENTRATION	RAPPORT 1 g D'EXTRAIT = PLANTE SECHE
extrait CPE aqueux ref. 30411	Eau purifiée	9 ml (+11 ml rinçage)	macération TA 7 jours	vide	6,6 g
extrait CPE alcoolique ref. 30412	Ethanol 60 % vol	9 ml (+11 ml rinçage)	macération TA 7 jours	vide	6,6 g
lyophilisat ref. 5142 5	Ethanol 60 % vol	10 ml	100° C 10 mn +44° C 12 h	rotatif vide puis lyophilisation	7,3 g
extrait alcoolique (type CPE) ref. 5142 8	Ethanol 60 % vol	9 ml (+11 ml rinçage)	macération TA 8 jours	rotatif vide + étuve vide	5,2 g
digestion aqueuse ref. 5142 6	Eau purifiée	8 ml	80° C 30 mn	rotatif vide + plaque chauffante	9,7 g
digestion alcoolique ref. 5142 7	Ethanol 60 % vol	8 ml	80° C 30 mn	rotatif vide + plaque chauffante	8,6 g

Laboratoire CSE (METZ)

nébulisat ref. T122/50749	Ethanol 70 % vol			vide + atomisation	5 g
lyophilisat ref. AREC 10	Ethanol 60 % vol	10 ml	100° C - 10 mn 44° C - 12 h	rotatif vide lyophilisation	4,5 g

. Analyse statistique

Les moyennes des activités des lots traités sont comparées globalement aux résultats des lots témoins à l'aide du test de l'analyse de variance, après vérification de l'homogénéité des variances ; puis les comparaisons deux à deux sont effectuées à l'aide du test de Newmann Keuls. Par contre, les pourcentages d'animaux endormis des lots traités sont comparés à ceux des lots témoins au moyen du test du X^2

1.1.2.2. Résultats et discussion

Les résultats présentés dans les tableaux 48 et 49 montrent que les différentes préparations obtenues par des procédés d'extraction à froid ne présentent aucune activité pharmacologique lorsqu'elles sont administrées à la dose de 400 mg/Kg, à la fois sur l'activité globale des animaux et après traitement d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique (25 mg/Kg), sur l'induction du sommeil. Par contre, les extraits obtenus par des procédés utilisant la chaleur, comme la digestion aqueuse (lot 5142-5), la digestion alcoolique (lot 5142-6), le lyophilisat (lot 5142-7 et le lot EC AREC 10) présentent une activité pharmacologique significative sur les deux tests utilisés. On constate que parmi les différentes préparations donnant une réponse positive, l'extrait obtenu par digestion aqueuse (lot 5142-6) présente les effets pharmacologiques les plus importants.

On retrouve donc l'effet sédatif d'E. californica, soit avec un lyophilisat réalisé dans notre laboratoire à partir d'un extrait hydro-alcoolique (Réf. AREC 10), soit avec un extrait aqueux deshydraté sur une plaque chauffante (Réf. RT 1095). Ces résultats laissent donc apparaître d'une part que l'éthanol n'est pas indispensable pour l'obtention d'un extrait actif et, d'autre part que la chaleur est par contre indispensable.

Les résultats enregistrés dans les deux tests pharmacologiques semblent montrer une activité moindre de l'extrait aqueux (lot 5142-6) par rapport à celle obtenue avec l'extrait hydro-alcoolique nébulisé ou lyophilisé (Tableaux 48 et 49). Toutefois, ces différences ne sont pas significatives et, pour des raisons de coût, l'extrait 5142-6 a été retenu comme extrait pilote. En effet, le mode d'extraction et de séchage sur plaque chauffante est beaucoup moins onéreux à l'échelle industrielle qu'un extrait hydroalcoolique lyophilisé ou nébulisé.

TABLEAU 48 - INFLUENCE DE DIFFERENTS EXTRAITS D'E. CALIFORNICA (E.C.) (400 mg/Kg I.P.) SUR LA MOTILITE DE LA SOURIS

PRODUITS	N	ACTIVITE PENDANT 5 MINUTES, MOYENNE ET ERREUR STANDARD	% VARIATION
TEMOIN	10	723 ± 50	/
E.C. 30411	10	700 ± 47	- 3
E.C. 30412	10	680 ± 60	- 6
E.C. 5142-5	10	588 ± 86	- 19
E.C. 5142-6	10	461 ± 47 *	- 36
E.C. 5142-7	10	554 ± 39 *	- 23
E.C. 5142-8	10	785 ± 76	+ 8
TEMOIN	10	1410 ± 73	/
EC.NEBULISAT	10	620 ± 24 *	- 50
TEMOIN	5	1298 ± 110 **	
E.C. AREC 10	5	893 ± 100	- 32

N = NOMBRE DE SOURIS

* $p < 0.05$
** $P < 0.01$

TABLEAU 49 - INFLUENCE DE DIFFERENTS EXTRAITS D'E. CALIFORNICA (E.C.) (400 mg/Kg I.P.) SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL CHEZ LA SOURIS TRAITEE PAR UNE DOSE INFRA HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (25 mg/Kg)

PRODUITS	N	ANIMAUX ENDORMIS %
TEMOIN	10	0
E.C. 30411	10	20
E.C. 30412	10	20
E.C. 5142-5	10	80 ***
E.C. 5142-6	10	80 ***
E.C. 5242-7	10	60 ***
E.C. 5 12-8	10	20
TEMOIN	10	20
NEBULISAT	10	100 ***
TEMOIN	5	20
E.C. AREC 10	5	100 ***

N = NOMBRE DE SOURIS

*** $P < 0.001$

1.2. INFLUENCE DE L'ORIGINE DES SEMENCES D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE

1.2.1. Culture, récolte et extraction

Les extraits ont été réalisés à partir de plantes d'E. californica cultivées par SEMPA-CHIMIE (SANOFI, Paris) dans le département de l'Aube. Les cultures ont été effectuées sur un sol sec, bien exposées. Les plants sont sarclés à la main et la récolte a été effectuée en septembre 1984, au moment de la floraison. L'échantillon 5142-13 provient de semences d'origine Vilmorin et l'échantillon 5142-14 de semences d'origine américaine.

Les parties aériennes ont été récoltées par une technique type luzerne à la floraison, puis séchées dans un four.

Les rendements et les solvants d'extraction sont résumés dans le tableau 50.

TABLEAU 50 - EXTRAITS DE PARTIES AERIENNES D'E. CALIFORNICA DE DEUX PROVENANCES DIFFERENTES

ORIGINE DES GRAINES	REF. DES EXTRAITS	LIQUIDE D'EXTRACTION	MODE D'EXTRACTION	CONCEN-TRATION	RENDEMENT 1 g EXTRAIT = x g PLANTE SECHE
VILLMO_RIN	5142-13	ALCOOL 60°	DIGESTION 80° C 30 mn	ROTATIF VIDE + PLAQUE	18
AMERICALNE	5142-14	ALCOOL 60°	DIGESTION 80° C 30 mn	ROTATIF VIDE + PLAQUE	17

1.2.2. Contrôle pharmacologique des extraits

1.2.2.1. Protocole expérimental

. Les tests pharmacologiques

Nous avons également retenu le test de l'activimètre (mesure de l'activité globale des animaux) et le test de l'induction du sommeil barbiturique pour mesurer les différences dans l'activité pharmacologique des deux extraits sur les souris (C).

. Analyse statistique

On utilise dans les mêmes conditions que précédemment (§ 1.2.1.3.) le test de l'analyse de variance suivi du test de comparaisons multiples de Newmann Keuls pour l'analyse des résultats observés dans l'activitest et le test du X^2 pour l'analyse des résultats observés dans le test de l'induction du sommeil.

1.2.2.2. Résultats et discussion

Les résultats sont regroupés dans le tableau 51.

Ils indiquent que les extraits hydroalcooliques des parties aériennes d'E. californica présentent une activité sédative significative sur la motilité des souris et induisent également de manière significative le sommeil des animaux traitées par le pentobarbital à la dose infra-hypnotique de 25 mg/Kg, et cela quelque soit l'origine des semences.

Une différence d'activité pharmacologique relevée uniquement dans le test de la motilité n'est pas significative et ne permet pas de hiérarchiser les performances de ces graines.

TABLEAU 51 - INFLUENCE DE L'ORIGINE DES SEMENCES D'E. CALIFORNICA (E.C.) (400 mg/Kg) SUR LA MOBILITE DE LA SOURIS ET SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES ADMINISTRATION D'UNE DOSE INFRA HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL

PRODUIT	N	ACTIVITE GLOBALE MOYENNE ± E.S. 5 MINUTES	DIMINUTION DE L'ACTIVITE %	N	TEMPS DE SOMMEIL (s') MOYENNE ± E.S.	SOURIS ENDORMIES %
NaCl 0,9 %	10	877 ± 25	/	6	0	/
E.C. 5142-13	10	231 ± 48 *	- 74	6	1099 ± 208	** 83
E.C. 5142-14	10	388 ± 79 *	- 56	6	1065 ± 218	** 83

** P 0.01 E.S. - ERREUR STANDARD N = NOMBRE D'ANIMAUX

1.3. INFLUENCE DE LA MATURITE DES DROGUES SUR L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D'E. CALIFORNICA

Pour préciser la période de cueillette, des extraits ont été réalisés avec les parties aériennes d'E. californica provenant de graines Vilmorin ou Américaine, et récoltées en septembre 1985, soit au moment de la floraison (E 5142.18 et E 5142.19), soit en fin de culture (maturation des siliques) (E 5142.20 et E 5142.21).

1.3.1. Extraction

Les quatre échantillons sont des extraits aqueux préparés par le laboratoire CPE (Chateauneuf-Sur-Charente) à partir de drogues fournies par SEMPA-CHIMIE (SANOFI, Toulouse). Les caractéristiques des extraits sont rassemblées dans le tableau 52.

TABLEAU 52 - EXTRACTION AQUEUSE D'E. CALIFORNICA : TECHNIQUE ET RENDEMENT - INFLUENCE DE L'ORIGINE DES SEMENCES ET DE LA MATURITE DES DROGUES

NATURE DE L'EXTRAIT	LIQUIDE D'EXTRACTION	EXTRACTION	CONCENTRATION	RAPPORT 1 g D'EXTRAIT = PLANTE SECHE
E 5142.18	EAU PURIFIEE	DIGESTION 80° C 30 MINUTES	ROTATIF VIDE + PLAQUE CHAUFFANTE	5,8
E 5142.19				8,1
E 5142.20				9,6
E 5142.21				9,7

1.3.2. Contrôle pharmacologique des extraits

1.3.2.1. Protocole expérimental

. Les tests pharmacologiques

Comme dans les expérimentations précédentes, notre choix s'est porté sur deux tests pharmacologiques largement utilisés pour démontrer l'effet sédatif d'E. californica : un test comportemental, le test de l'escalier et le test d'induction du sommeil après traitement au pentobarbital.

Les différents extraits sont administrés par voie I.P. aux souris (J), à la dose de 400 mg/Kg (exprimée en équivalent de plante sèche).

. Analyse statistique

Pour analyser statistiquement les résultats, nous avons utilisé, soit le test de Newmann Keuls, soit le test du X^2 dans les mêmes conditions que dans le § 1.2.3.

1.3.2.2. Résultats et discussion

Les résultats sont consignés dans le tableau 53. Ils indiquent que seuls les extraits préparés à partir des parties aériennes récoltées à la floraison ont présenté des effets sédatifs, puisqu'ils diminuent à la dose de 400 mg/Kg le nombre de redressements et le nombre des marches montées dans le test de l'escalier, et qu'ils induisent le sommeil chez les animaux traités avec une dose infra hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg).

TABLEAU 53 - INFLUENCE DE LA PERIODE DE RECOLTE D'E. CALIFORNICA SUR LA MOTILITE DE LA SOURIS ET SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES ADMINISTRATION D'UNE DOSE INFRA HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (25 mg/Kg)

PRODUIT REF. + (DOSES mg/Kg)	N	TEST DE L'ESCALIER				TEST D'INDUCTION	
		REDRESSEMENTS ± ES	VARIATION %	MARCHES MONTEES ± E.S.	VARIATION %	N	% SOURIS ENDORMIES
NaCl 0,9 %	10	33,4 ± 3,1	/	36,1 ± 2,6	/	10	30
E.5142.18 (400)	10	15,11 ± 3 **	- 54.8	21,4 ± 3,0 *	-40.7	9	77 **
E.5142.19 (400)	10	16,1 ± 2,8**	- 51.8	22,1 ± 3,0 *	-38.8	9	77 **
E.5142.20 (400)	9	28,4 ± 2,9	- 15	33,6 ± 2,7	-6.7	8	62 *
E.5142.21	9	31,7 ± 2,9	- 5.1	34,7 ± 2,8	-3.9	8	50

* $P < 0.05$
** $P < 0.01$
E.S. = ERREUR STANDARD
N = NOMBRE D'ANIMAUX

Les extraits préparés à partir des parties aériennes, récoltées en fin de culture ne modifient ni le nombre de redressements, ni le nombre de marches montées dans le test de l'escalier. Par contre, ils semblent induirent -mais de manière modérée- le sommeil des animaux traités avec une dose infra hypnotique de pentobarbital (Tableau 53). Un tel effet sur l'hypnose barbiturique est couramment interprété comme un effet sédatif. Toutefois, si nous n'avons pas observé de sédation dans le test de l'escalier, c'est probablement parce qu'elle est trop faible pour apparaître dans un test contraignant comme le test de l'escalier.

Cette expérience nous a donc permis de prendre la décision de récolter les drogues en période de floraison.

Ainsi, les trois expériences précédentes nous ont permis de sélectionner, pour la réalisation de l'extrait pilote par l'industrie pharmaceutique, la digestion aqueuse comme procédé d'extraction (Tableaux 47 et 48), et la chaleur (plaque chauffante) comme procédé d'élimination du solvant (Tableaux 47 et 48), et le stade de la floraison comme période de récolte (Tableau 52), quelle que soit l'origine des graines utilisées pour la production des plantes (Vilmorin ou américaine) (Tableau 50). La toxicité aiguë et les propriétés pharmacologiques de la préparation industrielle pilote seront vérifiées, quantifiées et comparées à celles du nébulisat. L'extrait sera alors référencé pour la suite du travail **RT 1095**.

2. ETUDE D'UNE PREPARATION INDUSTRIELLE PILOTE : LE RT 1095

L'extrait 1095 a été préparé en utilisant de la drogue d'E. californica constituée par les parties aériennes. Les plantes sont cultivées par SEMPA-CHIMIE (SANOFI, Paris) à partir de semences vannestes (Vilmorin). La récolte des plantes s'est effectuée au moment de la floraison et par une technique du type luzerne. La fabrication de l'extrait a été réalisée à l'échelle d'essais industriels (100 Kg) par le laboratoire CPE (Chateauneuf-Sur-Charente).

2.1. ETUDE DE LA TOXICITE

2.1.1. Toxicité aiguë

2.1.1.1. Matériel et méthode

. Le protocole expérimental

Des lots de 10 souris (J) (5 mâles et 5 femelles) reçoivent l'extrait aqueux d'E. californica par voie I.P. aux doses de 1, 4, 8, et 16 g/Kg. La mortalité, ainsi que les effets sur le comportement (activité, démarche, convulsion, tremblement) sur l'aspect extérieur (fourrure, peau, yeux, oreilles, dents) et sur certaines fonctions (respiration, selles, urines) sont relevés après 15 minutes, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h et tous les jours pendant une durée de 14 jours.

Le poids corporel de chaque souris est mesuré quotidiennement.

2.1.1.2. Résultats

Les résultats consignés dans les tableaux 54 et 55 montrent que l'extrait aqueux d'E. californica administré par voie I.P. n'induit aucune mortalité jusqu'à la dose de 16 g/Kg, que ce soit chez les souris mâles ou chez les souris femelles.

L'enregistrement des paramètres généraux montre que tous les animaux traités avec les 4 doses d'E. californica présentent une baisse importante de l'activité, des yeux fermés et une contraction importante des flancs, alors que tous les autres paramètres semblent normaux pour tous les animaux. Cela a été observé pour les quatre premières heures suivant l'injection du produit. Dès le premier jour, tous les paramètres sont redevenus normaux et cela jusqu'au quatorzième jour.

TABLEAU 54 - TOXICITE AIGUE CHEZ LA SOURIS MALE PAR VOIE I.P. , APRES ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT AQUEUX RT 1095 D'E. CALIFORNICA.

N = 5 A = ACTIVITE T = FLANCS CONTRACTES YF = YEUX FERMES N = NORMAL

E. CALIFORNICA REF. : RT 1095 g/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	168	-	-	-	155	160	162	163	165	168	170	172	172	171	179	179	180	183
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													
4	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	166	-	-	-	159	160	161	164	165	167	171	173	176	175	180	181	182	
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													
8	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	161	-	-	-	145	154	157	160	162	163	165	168	165	162	168	169	170	
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													
16	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	168	-	-	-	153	156	160	162	165	171	172	173	174	174	181	182	185	
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													

TABLEAU 55 - TOXICITE AIGUE CHEZ LA SOURIS FEMELLES PAR VOIE I.P. , APRES ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT AQUEUX RT 1095 D'E. CALIFORNICA. N = 5

A = ACTIVITE T = FLANCS CONTRACTES YF = YEUX FERMES N = NORMAL

E. CALIFORNICA REF. RT 1095 g/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	140	-	-	-	135	136	137	139	141	140	142	145	146	145	148	152	154	156
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													
4	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	137	-	-	-	130	137	135	138	142	144	144	144	145	146	145	-	155	158
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													
8	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	143	-	-	-	128	138	141	142	145	150	150	150	149	152	153	155	157	
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													
16	MORTALITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	POIDS CUMULE DES 5 SOURIS	144	-	-	-	127	136	138	140	140	142	145	146	145	146	153	155	157	158
	CARACTERES GENERAUX	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	A↓ T YF	← N →													

L'évolution pondérale laisse apparaître une diminution du poids pendant le premier jour, autant chez la souris mâle que chez la souris femelle ; puis l'évolution du poids devient normale jusqu'au quatorzième jour.

Il semble donc que la toxicité de l'extrait aqueux (RT 1095) soit minime et encore plus faible que celle du nébulisat puisqu'il n'a pas provoqué de mortalité par voie I.P. jusqu'à la dose de 16 g/Kg, alors qu'à cette dose 80 % des animaux traités par voie I.P. avec le nébulisat sont morts (cf. Chapitre 1, § 2).

2.1.2. Cytotoxicité

Il nous est apparu opportun de vérifier que l'extrait aqueux destiné à l'industrie pharmaceutique ne présente pas de cytotoxicité sur les cellules hépatiques.

Quelque soient les mécanismes d'activation du toxique, les phénomènes terminaux se traduisent toujours par des manifestations cytolytiques. Dans ces conditions, le dosage de la lactico deshydrogénase (LDH), de l'alanine aminotransférase (ALAT, GPT) et de l'aspartate amino transférase (ASA, GOT) qui sont des marqueurs physiologiques classiques de la cytolyse, peut rendre compte de l'impact toxique de l'extrait aqueux RT 1095.

La LDH reflète la viabilité de l'hépatocyte, alors que l'alat et l'ASAT reflète plus l'état des endomembranes.

Nous avons utilisé la technique des hépatocytes isolés mise au point dans notre laboratoire par Arvis (1985) et Joyeux (1987).

2.1.2.1. Matériel et méthodes

. Animal

Rats mâles Sprague-Dawley (Iffa-Credo) d'un poids compris entre 200 à 250 g nourris (croquettes M25C Extralabo) et abreuvés ad libitum.

. **Matériel**

Les produits utilisés ont été les suivants : collagénase (Sigma), milieu minimum de Eagle (Flow Laboratory), acide trichloroacétique (Prolabo), kit LDHOpt. Réf. 543039 (Boehringer), kit GPTOpt. Réf. 161071 (Boehringer), kit GOTOpt. Réf. 158178 (Boehringer), Spectrophotomètre UVIKON 810 KONTRON.

. **Technique d'isolement des hépatocytes**

L'animal est anesthésié au pentobarbital sodique (Abott, Clin Midy) à la dose de 60 mg/Kg par voie I.P., puis hépariné à raison de 1 ml/Kg (héparine 50 Fournier 5000 UI) selon la même voie d'injection et placé dans une enceinte thermostatée à 37° C $\pm$ 1° C.

L'isolement des hépatocytes est réalisé selon la technique de Berry et Friend (1969), modifiée par Seglen (1976).

Lorsque l'action dissociatrice de l'enzyme est jugée suffisante, le foie est excisé, la capsule de Glisson délicatement retirée et les cellules mises en suspension par agitation douce.

Une filtration sur tamis de soie de maille décroissante jusqu'à 68 um permet d'éliminer les fractions tissulaires non dissociées. Une centrifugation (50 g x 2 mn) suivie de deux décantations-lavages sont alors effectuées, le culot cellulaire étant remis en suspension dans un milieu minimum d'Eagle (MEM). Le comptage est réalisé sur une cellule de Malassez. La viabilité est appréciée par le test d'exclusion du bleu Trypan.

Le rendement est de l'ordre de 3 à 5.10^8 cellules et la viabilité initiale supérieure à 90 %.

Des fractions aliquots de 4 ml de suspension (1 million de cellules/ml) sont réparties dans des Erlenmeyer de 25 ml recouverts de parafilm, maintenu à 37° C au bain-marie sous agitation (60 oscillations/min), chaque échantillon est gazé individuellement par un mélange 0^2 /CO^2 (95 % / 5 %).

Les dosages sont effectués après 30 minutes d'incubation puis 60 minutes.

. Déterminations biochimiques

Les fuites enzymatiques de LDH, d'ASAT et d'ALAT sont déterminées à l'aide de kits Boehringer, les résultats sont exprimés en mUI/10^6 cellules.

. Traitements statistiques

Le test de Cochran est utilisé pour vérifier l'homogénéité des variances, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test "t" de Student.

2.1.2.2. Résultats et discussion

. Etude de la toxicité

Les résultats sont consignés dans le tableau 56.

Au terme de 60 minutes d'incubation, aucun mouvement enzymatique n'est mis en évidence. Le dosage de la lactico deshydrogénase, de l'alanine amino transférase (ALAT = GPT) et l'aspartate amino transférase (ASAT = GOT) donne des valeurs restant dans les limites de celles des témoins, à la dose de 5 mg de plante sèche par ml de suspension. Cette dose représente 5 fois la dose maximale utilisée couramment au laboratoire lors de la recherche d'un éventuel effet pharmacologique d'un extrait végétal.

Des doses supérieures risquant de faire apparaître des manifestations toxiques inhérentes au modèle utilisé et dont l'extrapolation sur les conséquences in vivo serait délicate.

TABLEAU 56 - INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX RT 1095) SUR LE TAUX DE LDH, ALAT, ASAT D'HEPATOCYTES DE RATS FRAICHEMENT ISOLES. L'INTOXICATION DE L'EXTRAIT EST DE 60 MINUTES ET LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN mUI/10 ^{6} CELLULES

	LDH	ASAT	ALAT
TEMOIN 60'	529 672 693 631 ± 89	160 178 181 173 ± 11	80 43 44 56 ± 21
Eschscholzia cal. extrait aqueux 5 mg/ml	634 611 659 635 ± 24	169 126 160 152 ± 23	69 36 40 48 ± 18
Eschscholzia cal. extrait aqueux 1 mg/ml	696 694 702 697 ± 4	209 154 127 163 ± 42	46 41 37 41 ± 5

2.2. ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'UNE PREPARATION INDUSTRIELLE : LE RT 1095

2.2.1. Matériel et méthode

La quantité d'extrait pesé est dissoute dans de l'eau physiologique NaCl 0,9 %. Comme les doses sont toujours exprimées en équivalent plante sèche, les pesées se feront selon les rendements transmis par le laboratoire SANOFI (Toulouse) : à savoir qu'1 g d'extrait RT 1095 correspond à 10 g de plante sèche.

. Tests comportementaux

Pour vérifier l'activité pharmacologique de l'extrait RT 1095, le choix s'est porté sur quatre tests comportementaux qui ont largement mis en évidence les effets anxiolytiques et sédatifs du nébulisat, à savoir le test de préférence néotique (souris L), le test de l'escalier (souris J), le test de l'enceinte claire/obscure (souris L) et le test d'induction du sommeil (souris J) (cf. Chapitre I, § 3.1.2.2.).

. Analyse statistique

La préférence néotique des souris de chacun des lots est analysée statistiquement par le test du signe. Les moyennes des redressements et des unités franchies des lots traités (locomotion) sont comparées globalement aux résultats des lots témoins, par le test de l'analyse de variance après vérification de l'homogénéité des variances, puis les comparaisons deux à deux sont effectuées à l'aide du test de comparaison multiple de Duncan.

Pour les tests de l'escalier et de l'enceinte claire/obscure, les comparaisons deux à deux sont effectuées à l'aide du test de comparaison multiple de Newmann-Keuls.

Les calculs de la DI 50 d'E. californica en ce qui concerne les redressements et la locomotion dans le test de la préférence néotique et le calcul de l'ED 50 d'E. californica dans le test d'induction du sommeil sont effectués selon la méthode de Liechtfield et Wilcoxon (1949).

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Propriétés sédatives et anxiolytiques

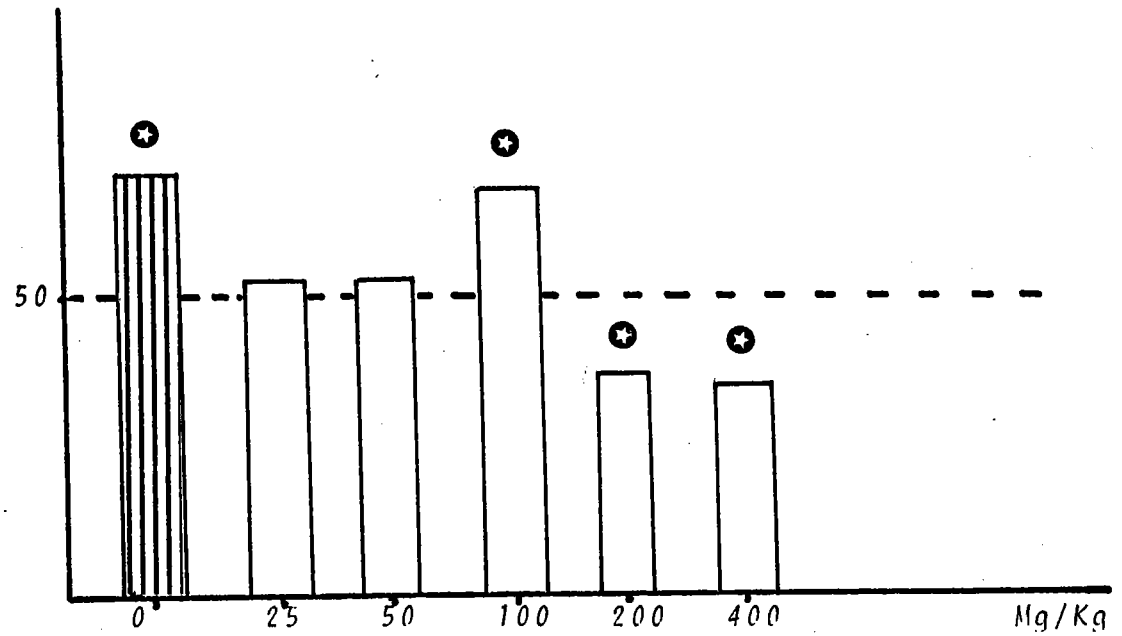
- Test d'exploration d'un milieu nouveau

Les résultats sont présentés dans les figures 58 et 59.

La figure 58 représente, en pourcentage et en fonction des doses, la préférence marquée par les différents groupes de souris pour le milieu nouveau pendant la durée totale du test (10 minutes). Les animaux témoins et ceux traités avec la dose d'E. californica (RT 1095) de 100 mg/Kg ont tendance à marquer une préférence significative (test du signe) pour le milieu nouveau. Les animaux traités avec les doses de 25 et 50 mg/Kg ne marquent pas de différence pour aucun des deux milieux et les souris traitées avec les doses fortes d'E. californica (200 et 400 mg/Kg) ont tendance à marquer une préférence significative pour le milieu familier.

La figure 59 représente le nombre total d'unités franchies (A) et de redressements (B) effectués par les différents groupes expérimentaux durant toute la durée du test (10 minutes). On constate que les performances des différents groupes expérimentaux diffèrent de façon significative (analyse de variance). L'extrait RT 1095 réduit de façon significative le niveau de l'activité locomotrice et le nombre de redressements réalisés par les souris à partir de la dose de 100 mg/Kg, et cela de façon dose dépendante.

La DI 50 est de 151mg/Kg(148 -154) en ce qui concerne la locomotion, ce qui est légèrement supérieur à la valeur trouvée sur le nébulisat (124,9 - cf. Chap. 1, § 3.1.3.2.) et de 108mg/Kg(106 -109) en ce qui concerne les redressements.



TEMOIN ✪ $P < 0.05$

E. californica

Fig.58 EFFETS D' E. CALIFORNICA SUR LA PREFERENCE NEOTIQUE. EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES, EN ORDONNEE LES PERFORMANCES.

N = 12

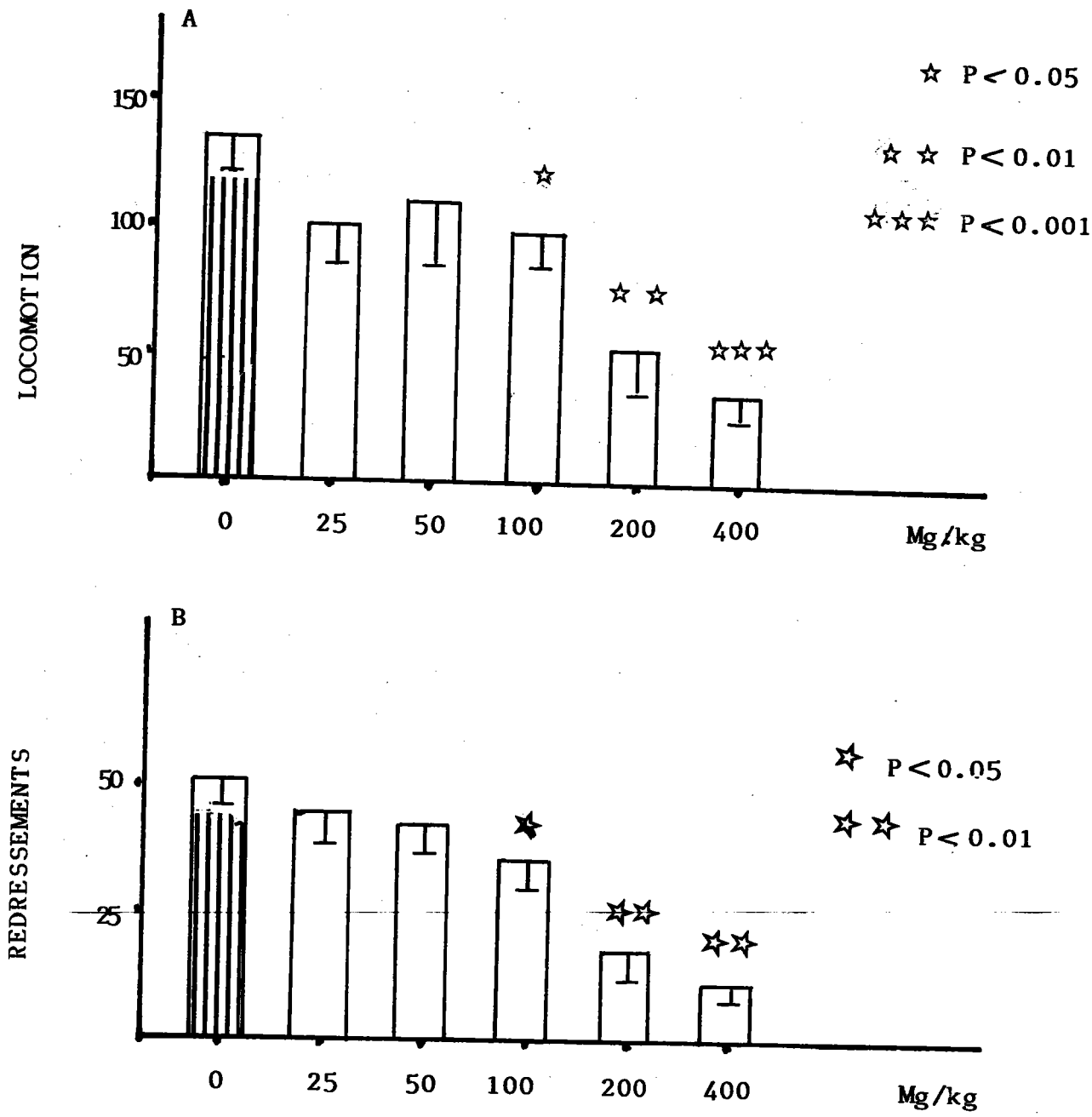


Fig. 59 EFFETS D'E. CALIFORNICA SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE ET LES REDDRESSEMENTS DANS LE TEST DE LA PREFERENCE NEOTIQUE.

EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES D'E. CALIFORNICA, EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS STANDARS DU NOMBRE DES UNITES FRANCHIES (LOCOMOTION ,A) ET DES REDRESSEMENTS (B)

▥ TEMOIN

□ E. CALIFORNICA

- **Test de l'escalier**

Les résultats regroupés dans la figure 60 représentent les moyennes et les erreurs standards du nombre total de redressements (R) et du nombre total de marches montées (C) durant les 5 minutes du test. On constate qu'il n'y a aucune modification des deux paramètres enregistrés chez les animaux traités avec les doses d'extrait RT 1095 de 12,5 et de 50 mg/Kg. En revanche, à la dose intermédiaire de 25 mg/Kg, le nombre de marches montées est significativement supérieur à celui enregistré pour les témoins.

A la dose de 100 mg/Kg, le nombre de marches montées et le nombre de redressements sont significativement diminués.

- **Test de l'enceinte claire/obscure**

Les résultats regroupés dans la figure 61 représentent les moyennes et les erreurs standards du temps passé par les animaux dans la chambre claire pendant 5 minutes en fonction des doses. On constate que les animaux traités avec la dose d'extrait RT 1095 de 25 mg/Kg, demeurent plus longtemps dans la chambre claire que les souris témoins ou les souris traitées avec la dose de 12,5 mg/Kg.

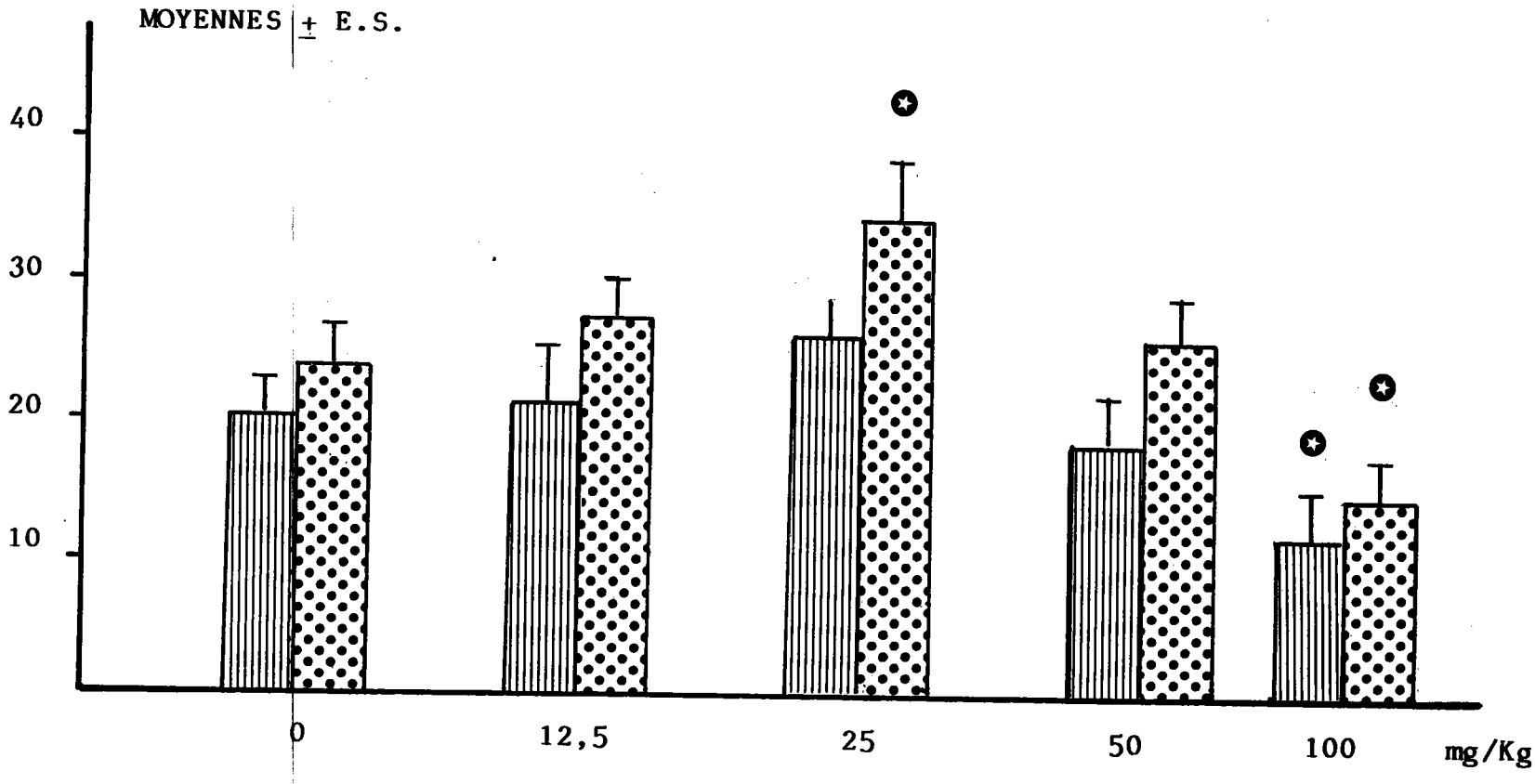


Fig. 60 - EFFETS DE L'EXTRAIT RT 1095 D'E. CALIFORNICA SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS DANS LE TEST DE L'ESCALIER.

EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES, EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS-STANDARDS DU NOMBRE DE REDRESSEMENTS (R) ET DE CELUI DE MARCHES MONTEES (C).

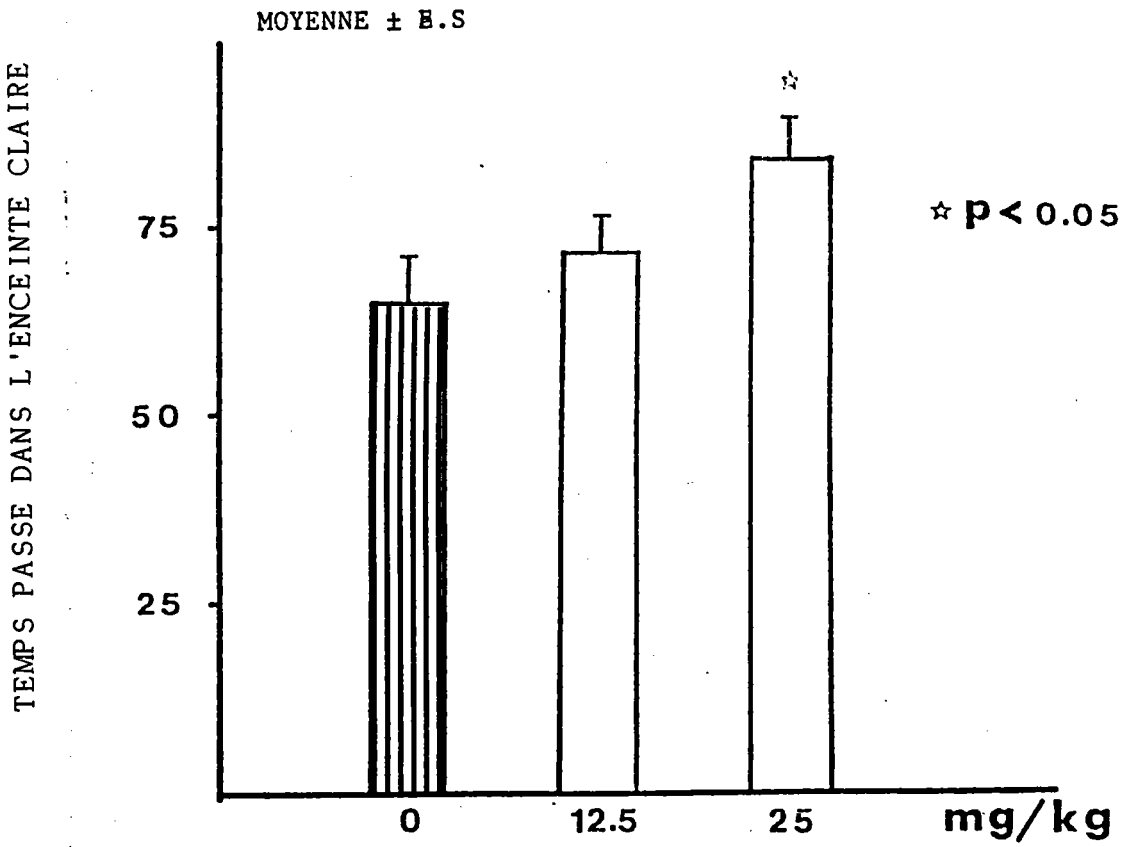


Fig. 61 - EFFETS DE L'EXTRAIT RT 1095 D'E. CALIFORNICA SUR LA DUREE DE SEJOUR DES ANIMAUX DANS LA CHAMBRE CLAIRE (TEST DE L'ENCEINTE CLAIRE/OBSCURE EN ABSCISSE FIGURENT LES DOSES EXPRIMEES EN mg/Kg ; EN ORDONNEE LES MOYENNES ET LES ERREURS STANDARDS DU TEMPS PASSE DANS LA CHAMBRE CLAIRE.

2.2.3.2. Effet de l'extrait RT 1095 et du clorazépate dipotassique sur l'induction du sommeil des souris traitées par une dose unique infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg)

. Protocole expérimental

Onze groupes d'animaux, chacun constitué de 20, 10 ou 5 souris Swiss, sont prétraités soit par du clorazépate dipotassique (Tranxène®, Clin-Midy, Montpellier) aux doses respectives de 1, 5, 10 et 20 mg/Kg, soit par l'extrait RT 1095 d'*E. californica* aux doses de 25, 50, 100, 200, 400 et 800 mg/Kg par voie IP, 30 minutes avant l'injection de pentobarbital (Nembutal®, Abbott), à la dose de 25 mg/Kg. Un lot témoin reçoit du NaCl 0,9 % dans les mêmes conditions. On enregistre le nombre et le pourcentage d'animaux endormis. Les résultats des différents groupes sont comparés entre eux par le test du X^2.

. Résultats

Les résultats obtenus et reportés dans le tableau 56 permettent de mettre en évidence une induction significative du sommeil par le clorazépate à partir de la dose de 5 mg/Kg ($P < 0.01$, 60 % d'animaux endormis). Cet effet inducteur du sommeil est fonction de la dose , puisqu'à 10 mg/Kg, 100 % des animaux sont endormis.

Par ailleurs, ces résultats montrent également que l'extrait RT 1095 induit significativement le sommeil à partir de la dose de 100 mg/Kg ($P < 0.01$, 50 % d'animaux endormis). Comme précédemment pour le clorazépate, cet effet inducteur du sommeil est fonction de la dose , puique l'on remarque que les pourcentages d'animaux endormis sont de 50 %, 65 %, 85 % et 90 % aux doses croissantes de 100, 200, 400 et 800 mg/Kg.

L'ED 50, correspondant à la dose d'*E. californica* qui induit le sommeil chez 50 % des animaux, est de 106 mg/Kg (105-108). La linéarité de la droite a été validée pour un risque de 5 %.

TABLEAU 56 - EFFET DE L'EXTRAIT RT 1095 ET DU CLORAZEPATE SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL DES SOURIS TRAITEES PAR UNE DOSE UNIQUE INFRA HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL (25 mg/Kg)

E. CALIFORNICA LOT RT 1095 mg/Kg	CLORAZEPATE DIPOTASSIQUE mg/Kg	N	NOMBRE D'ANIMAUX ENDORMIS	% D'ANIMAUX ENDORMIS	P
0	0	20	1	5	/
25	0	10	0	0	N.S.
50	0	10	3	30	N.S.
100	0	20	10	50	0.01
200	0	20	13	65	0.0001
400	0	20	17	85	0.001
800	0	20	18	90	0.001
0	1	10	1	10	N.S.
0	5	10	6	60	0.01
0	10	10	10	100	0.001
0	20	5	5	100	0.001

P = SIGNIFICATIVITE DU TEST (X^2)

N = NOMBRE D'ANIMAUX

N.S. = NON SIGNIFICATIF

2.2.3. Discussion

Les effets psychotropes de nature sédative et anxiolytique de l'extrait d'E. californica RT 1095 ont été confirmés. A faible dose (25 mg/Kg), on a constaté un effet anxiolytique du fait de l'augmentation du nombre des redressements et des marches montées dans le test de l'escalier (Fig.60) et une augmentation du temps de séjour dans la chambre claire (Fig. 61). Par contre, à forte dose (100 mg/Kg et plus) on a constaté un effet sédatif par une diminution significative de la locomotion et des redressements dans le test de la préférence néotique (Fig. 59) par une diminution du nombre des redressements et des marches montées dans le test de l'escalier (Fig. 60), et par une nette induction du sommeil après administration d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg, voie IP). Dans le dernier test (Tableau 56 , la comparaison avec le clorazépate nous a permis de constater que l'extrait de plante à la dose de 200 mg/Kg avait le même effet inducteur que la substance de référence à la dose de 5 mg/Kg. Par contre en doublant la dose de plante, l'effet inducteur du sommeil est moindre par rapport à celui obtenu en doublant la dose de clorazépate ; ce qui tend à montrer que la sédation obtenue avec E. californica est nettement moins importante que celle obtenue avec le clorazépate.

Les effets sédatifs et anxiolytiques comparatifs du nébulisat et de l'extrait RT 1095 vis-à-vis des quatre tests comportementaux utilisés ont été rassemblés dans le tableau 57.

On remarque que dans le test de la préférence néotique, l'effet sédatif est dose dépendante, aussi bien pour l'extrait nébulisé que pour l'extrait RT 1095. Cependant, cet effet semble plus important pour l'extrait nébulisé puisque son seuil de significativité apparaît dès la dose de 50 mg/Kg alors qu'il n'apparaît qu'à la dose de 100 mg/Kg pour l'extrait RT 1095. Ceci est vérifié à la dose de 300 mg/Kg où les résultats sont supérieurs à ceux obtenus à la dose de 400 mg/Kg pour l'extrait aqueux RT 1095. Cette différence est encore visible dans le test de l'induction du sommeil où à 400 mg/Kg, 100 % des animaux sont endormis avec l'extrait nébulisé, alors que seulement 85 % des animaux dorment avec l'extrait RT 1095.

Par contre, à 25 mg/Kg, le test de la chambre claire/obscure nous révèle que les deux extraits augmentent significativement, le temps passé dans l'enceinte claire, ce qui démontre un effet anxiolytique (Fig. 61) ; mais dans cette expérimentation, l'activité de l'extrait aqueux RT 1095 est plus nuancée.

Cela est encore vrai dans le test de l'escalier, mais seulement pour le paramètre "marches montées". En effet, aucune modification significative des redressements n'a été démontrée (Fig. 60).

Ces expériences confirment les effets anxiolytiques et sédatifs d'E. californica. Les activités pharmacologiques des deux extraits sont voisines, même si on observe parfois quelques différences non significatives.

TABLEAU 57 - COMPARAISON ENTRE LES RESULTATS OBTENUS A DIFFERENTES DOSES AVEC L'EXTRAIT NEBULISE ET L'EXTRAIT RT 1095 SUR DIFFERENTS TESTS COMPORTEMENTAUX ET INDUCTEURS DE SOMMEIL. LES DIFFERENTES VALEURS REPRESENTENT LES VARIATIONS PAR RAPPORT AUX TEMOINS.

EXTRAITS / TESTS PHARMACOLOGIQUES		DOSES	% D'AUGMENTATION OU DE DIMINUTION EN COMPARAISON DES TEMOINS	
			NEBULISAT	RT 1095
PREFERENCE NEOTIQUE	LOCOMOTION	25	- 7,5	- 26
		50	- 28,3	- 19,8
		100	- 43,4	- 31.3
		150	- 51,0	/
		200	/	- 61.4
		300	- 79,2	/
		400	/	- 72.2
ESCALIER	MARCHES MONTEES	25	+ 26,4	+ 30,15
		50	+ 20,9	+ 8,4
		100	0	- 31,4
		150	- 50,55	/
	REDRESSEMENTS	25	+ 48,2	+ 28,40
		50	+ 27	- 9,88
		100	+ 7	- 24,5
		150	- 49	/
CHAMBRE CLAIRE/ OBSCURE	TEMPS SECONDES	12,5	+ 7,30	+ 10,8
		25	+ 19	+ 29,5
INDUCTION DU SOMMEIL	% ANIMAUX ENDORMIS	400	100	85

P<0.05 P<0.02 P<0.01 P<0.001

C H A P I T R E V

PROFILS CHIMIQUES

SEPARATION ET ANALYSE PHARMACOLOGIQUE D'EXTRAITS ET RESIDUS D'EXTRACTION

L'étude bibliographique (cf. Deuxième Partie) n'a révèlé que peu de travaux sur la composition chimique d'E. californica. Parmi la littérature existente, aucune référence ne mentionne de démarche systématique permettant de définir, de décrire et d'inventorier les différents groupes chimiques présents chez E. californica, les études chimiques sont principalement orientées vers les alcaloïdes dont la composition semble être bien connue (cf. Deuxième partie). De plus quelques travaux isolés ont mis en évidence la présence de carotenoïdes et de flavonosides dans les pétales, d'hétérosides cyanogénétiques des les parties aériennes, de nitrate de potassium en grande quantité et des acides organiques (acide fumarique, acide malique) dans la plante entière.

L'étude pharmacologique d'un extrait hydro-alcoolique du commerce nous a permis de démontrer les propriétés anxiolytiques et sédatives d'E. californica . Ces propriétés semblent correspondre à celles des tranquillisants mineurs (benzodiazépines). Ces mêmes propriétés ont été également vérifiées sur un extrait industriel pilote référencé RT 1095 (cf. Chapitre 4). C'est ainsi que les études chimiques des deux extraits ont été entreprises dans le but de vérifier trois objectifs.

Tout d'abord, vérifier l'absence de composés toxiques. En effet, il a été signalé dans la bibliographie la présence dans les racines et les graines d'un alcaloïde : la sanguinarine et dans la plante entière de dérivés cyanogénétiques (cf. Deuxième partie). A part ses effets toxiques à très forte dose sur le rythme cardiaque comme la plupart des alcaloïdes, la sanguinarine provoque au niveau oculaire un glaucome qui peut entraîner une cécité irréversible (Dyke, 1979). Les dérivés cyanogénétiques, atoxiques par eux-mêmes, le deviennent en libérant de l'acide cyanhydrique après hydrolyse dans l'organisme. Nous avons voulu vérifier si les deux extraits ne renferment aucun de ces composés.

Puis tenter d'établir des profils chimiques afin de rechercher dans les deux extraits la présence de différents groupes chimiques selon les données bibliographiques qui ont guidé notre travail. Cette recherche permet de mettre en évidence d'une part, les substances minérales classiques et d'autre part des principes organiques tels que des polyphénols, des alcaloïdes, des acides aminés, des acides organiques et des saponosides. Cette étude est réalisée soit au moyen de techniques de caractérisation simple, soit au moyen de techniques chromatographiques et spectrophotométriques.

La finalité du travail est de pouvoir comparer l'extrait hydro-alcoolique du commerce avec l'extrait aqueux industriel pilote par rapport aux profils chromatographiques obtenus et définir ainsi les deux extraits grâce à des marqueurs.

Enfin, le troisième objectif est de pouvoir mettre en évidence une éventuelle fraction active dont l'extraction et le fractionnement sont menés en parallèle avec la pharmacologie permettant ainsi de déterminer la part de responsabilité de certains groupes chimiques dans l'activité des extraits.

1. LES EXTRAITS

L'étude chimique a été réalisée, d'une part sur l'extrait hydro-alcoolique du commerce (nébulisat) provenant de la plante entière (cf. Chapitre 1, § 4) et d'autre part sur l'extrait aqueux industriel pilote obtenu à partir des parties aériennes d'E. californica (référence : RT1095) (cf. Chapitre 4 § 2).

2. RECHERCHE DES COMPOSES TOXIQUES : LA SANGUINARINE ET LES DERIVES CYANOGENETIQUES

2.1. RECHERCHE DE LA SANGUINARINE

Cette recherche a été réalisée après extraction des alcaloïdes totaux et la présence ou l'absence de sanguinarine a été appréciée par chromatographie sur couche mince (C.C.M) contre un témoin sanguinarine (réf. sarsynthèse réf. : 0700)

2.1.1. Matériel et méthodes

2.1.1.1. Extraction des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été extraits selon le schéma de la figure 62.

Pour l'extraction, on utilise respectivement 200 mg de nébulisat du commerce et 100 mg de la préparation RT1095, ces quantités correspondent à 1 gramme de plante sèche.

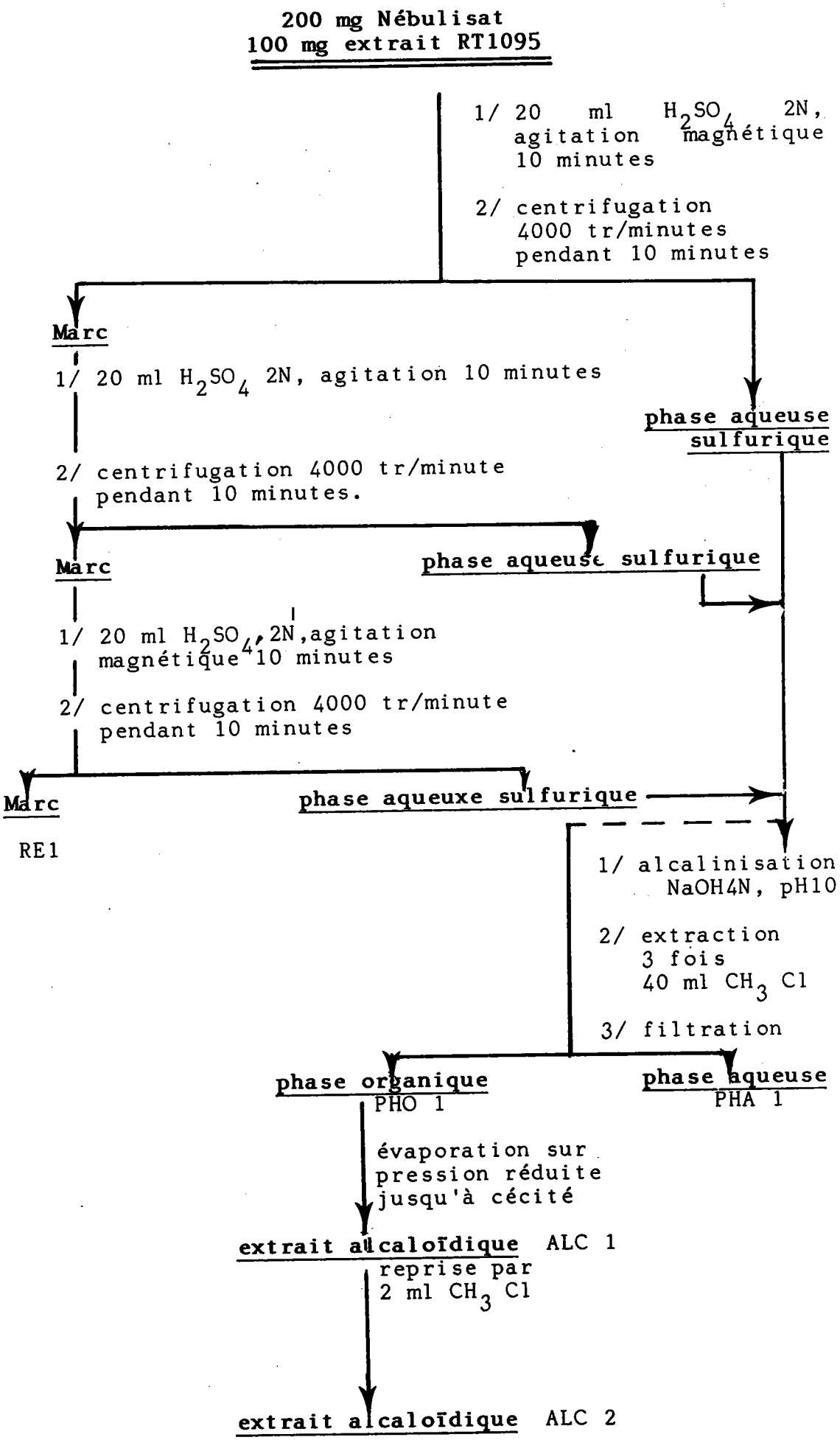


Fig. 68 - SCHEMA EXTRACTIF DES ALCALOIDES

2.1.1.2 Chromatographie sur couche mince

- support : plaque de silice Kieselgel G 60 (MERCK,ART.5721)

- solvant de migration : Benzène, éthanol, amoniaque (80 : 20: 2 V/V)

- révélateur : réactif de Draggendorf (Wagner, 1983, réactif 11A).

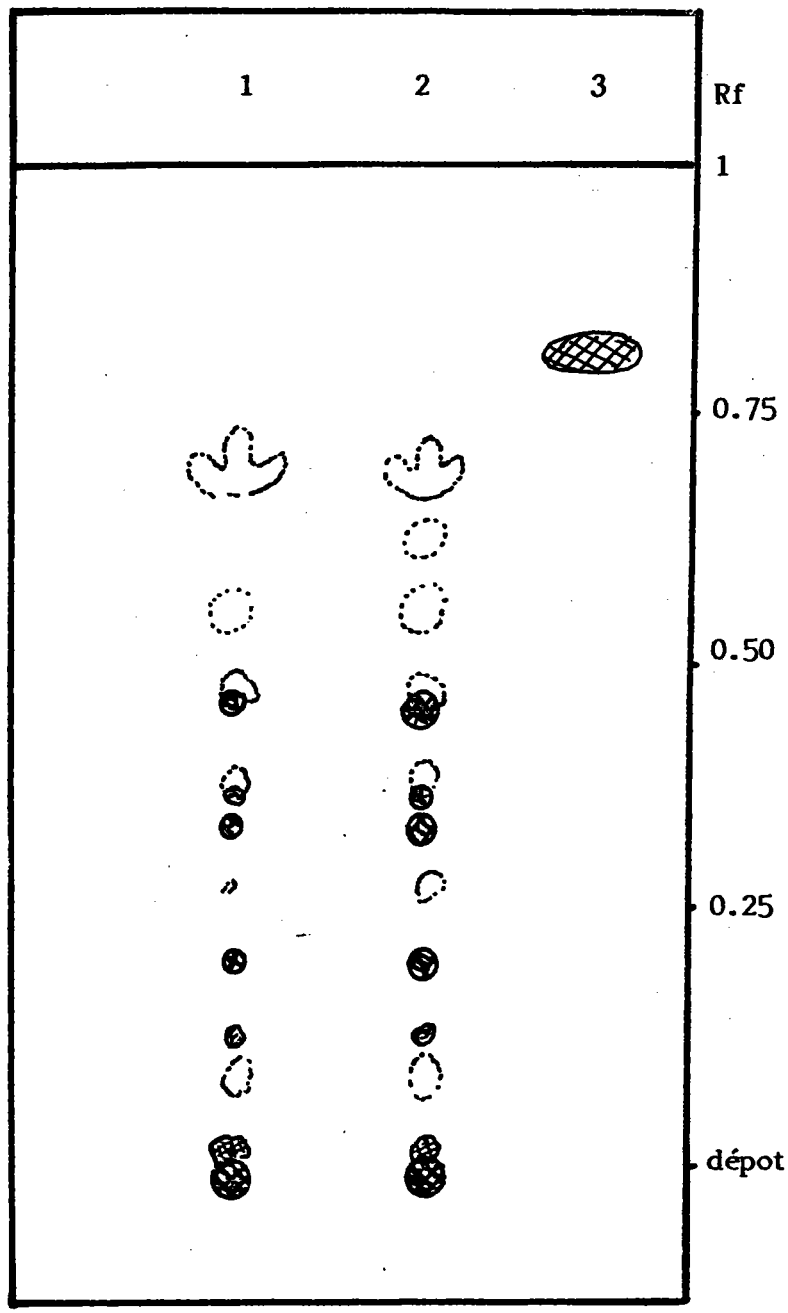
- dépots : extraits et sanguinarine
  10 et 20 µl des solutions ALC de chacun des deux extraits et 10 µl d'une solution à 4 % de sanguinarine sont déposées à 2 cm de la base de la plaque.

- durée de migration : 45 minutes, le front de solvant se situe à environ 12 cm de la ligne de dépôt. Température 20° C

- révélation : le solvant est pulvérisé sur les plaques sèches. Les taches oranges marquant la présence des alcaloïdes apparaissent instantanément.

2.1.2. Résultats

Après révélation au réactif de Draggendorf le profil chromatographique (Fig. 63) laisse apparaître une tache importante de couleur orange et de Rf voisin de 0,8 pour le témoin sanguinarine, mais aucune tache ne se révèle à ce Rf avec les extraits ALC2, ce qui permet de conclure à l'absence de cet alcaloïde dans les deux préparations.



bleu : U.V.

orange : réactif de DRAGGENDORF

Fig. 63 - CHROMATOGRAMME SUR PLAQUE DE SILICE (C.C.M.) DES ALCALOIDES D'E. CALIFORNICA, REVELATION AU REACTIF DE DRAGGENDORF
1) EXTRAIT AQUEUX RT 1095 - 2)EXTRAITS HYDRO ALCOOLIQUES (NEBULISAT)- 3) SANGUINARINE

2.2. RECHERCHE DE DERIVES CYANOGENETIQUES

2.2.1. Matériel et méthodes

Les dérivés cyanogénétiques ont été recherchés directement sur les deux extraits à l'aide du papier picro-sodé de Guignard (Paris, 1965). Le cyanure de potassium (Prolabo, art 26.800 294) est utilisé comme substance de référence.

La réaction de caractérisation s'effectue par un changement de coloration du papier picro-sodé au contact de l'acide cyanhydrique libéré lors de l'hydrolyse des hétérosides cyanogénétiques par l'acide chlorhydrique et le toluène à la température de 35° C.

Une petite quantité des produits est placée dans un tube à essai, avec quelques gouttes d'une solution diluée d'HCl et quelques gouttes de toluène. Un papier picro-sodé humide est fixé à l'intérieur du tube à l'aide d'un bouchon, puis l'ensemble est placé dans une étuve à 35° C pendant 12 heures. Une coloration rouge du papier picro-sodé indique une réaction positive.

2.2.2. Résultats

Aucun changement de coloration n'a été observé dans les tubes renfermant les extraits, ce qui permet de conclure à l'absence de dérivés cyanogénétiques dans ces deux extraits. Par contre, une coloration rouge a été observée avec le tube renfermant le cyanure de potassium, permettant ainsi de valider cette technique.

2.2.3. Discussion

L'analyse chromatographique sur couche mince et la réaction d'identification sur papier picro-sodé ont montré que l'extrait hydro-alcoolique nébulisé du commerce et l'extrait aqueux (Réf. : RT 1095) d'*E. californica* ne renferment pas de sanguinarine ni de dérivés cyanogénétiques, alors que ces substances ont été trouvées dans la plante entière (Gertig, 1965 ; Hegnauer, 1969 ; Valen, 1978).

L'absence de ces composés toxiques est en accord avec l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux puisqu'aucune manifestation toxique n'a été mise en évidence, même à forte dose (cf. Chapitre 4, § 2).

3. RECHERCHE DE DIFFERENTS GROUPES CHIMIQUES

La finalité de cette étude est de déterminer la présence de différents groupes chimiques au moyen de réactions d'identification, d'établir des profils chromatographiques dans le but de comparer l'extrait aqueux (Réf : RT 1095) à l'extrait hydro-alcoolique nébulisé et de définir des marqueurs chimiques grâce aux images chromatographiques obtenues.

Dans un premier temps, il paraissait judicieux d'établir un profil chromatographique après révélation par un réactif général, mettant en évidence de nombreuses substances à propriétés réductrices. Puis dans un deuxième temps, cette étude a porté sur la recherche des éléments minéraux et organiques (tannins, acides aminés, alcaloïdes, saponosides, flavonosides) décrits en bibliographie .

3.1. RECHERCHE DE SUBSTANCES REDUCTRICES

Cette étude s'effectue par chromatographie sur couche mince en révélant les taches au moyen d'un réactif général des substances réductrices (anisaldéhyde acide phosphomolybdique en milieu méthanolique).

3.1.1. Matériel et méthodes

- Support :

  plaque de silice Kieselgel G 60 Merck art. : 5721

- Solvant de migration :

  acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau (78:7:7:18 V/V)

- Révélateur :

anisaldéhyde (Merck art. 805796)	0,11 ml
acide phosphomolybdique à 10 % dans le méthanol (Prolabo)	0,25 ml
acide sulfurique concentré (Prolabo)	1,13 ml
acide acétrique (Prolabo)	2,25 ml
Méthanol (Merck)	22 ml

- Solutions analysées :

Les solutions ont été réalisées par dissolution de 200 mg de l'extrait du commerce (nébulisat) ou 100 mg de l'extrait aqueux (Réf : RT 1095) dans 10 ml d'une solution hydro-alcoolique à 60°, ce qui correspond à une concentration équivalente en plante sèche à 1 g dans 10 ml.

- Dépot des échantillons : 20 µl de chacune des solutions à analyser et déposée à 2 cm de la base de la plaque.

- Migration : 45 minutes ce qui correspond à une migration du solvant sur une distance approximative de 15 cm.

-
Révélation : La plaque de silice, après séchage complet est observée sous U.V. à une longueur d'onde de 366 nm puis le réactif est pulvérisé.

La plaque est alors placée dans une étuve à 120° C pendant 10 minutes.

3.1.2. Résultats

L'observation de la plaque sous U.V. à une longueur d'onde de 366 nm (Fig. 64) laisse apparaître peu de différence entre les deux extraits. Le profil chromatographique se caractérise par la présence de taches dont 3 de fluorescence bleues (Rf. : 0,17 - 0,57 - 0,93) et 3 taches de fluorescence brunes (Rf. : 0,82 - 0,84 - 1).

Les deux chromatogrammes sont comparables, seule la tache de fluorescence bleue (Rf. : 0,57) est absente dans l'extrait aqueux RT 1095.

Après révélation au réactif à l'anisaldéhyde, on obtient un profil chromatographique différent de celui obtenu après observation sous U.V. Ce profil laisse apparaître peu de différence entre les deux extraits. Le chromatogramme de l'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) se caractérise par la présence de deux taches importantes dont l'une est colorée en rose (Rf. : 0,17) et l'autre colorée en jaune (Rf. : 0,73) et d'autre taches moins importantes dont deux sont de couleur rose pâle (Rf. : 0,35- 0,46), deux de couleur gris vert (Rf. : 0,25 - 0,28) et une tache grise (Réf : 0,05). Dans le chromatogramme de l'extrait aqueux, la tache de coloration grise (Rf. : 0,05) et la tache de coloration gris vert de Rf. : 0,28 sont absentes.

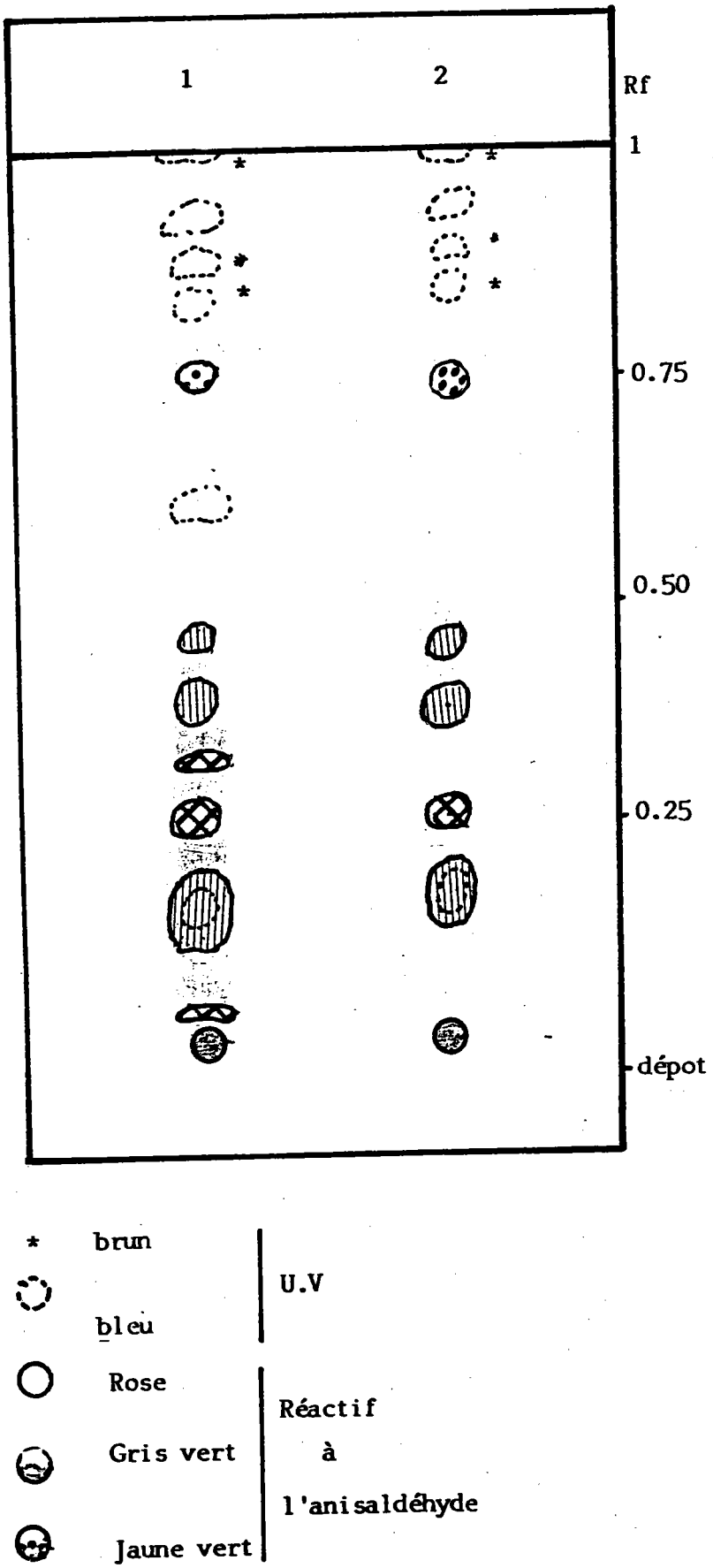


Fig. 64 - CHROMATOGRAMME SUR PLAQUE DE SILICE (C.C.M.) DES SUBSTANCES REDUCTRICES D'E. CALIFORNICA : OBSERVATION SOUS U.V. A 366 n PUIS REACTIF ANISALDEHYDE 1) EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT) 2) EXTRAIT AQUEUX RT 1095

3.2. RECHERCHE DE SELS MINERAUX

Les éléments minéraux ont été recherchés et dosés à partir d'une solution aqueuse des deux extraits par spectrophotométrie de flamme pour les ions Na^+ et K^+ par colorimétrie pour les chlorures et le Ca^{++}.

3.2.1. Matériel et méthodes

80 mg d'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) et 40 mg d'extrait aqueux (Réf. 1095) sont solubilisés dans 10 ml d'eau distillée, ce qui corespond à une concentration équivalente en plante sèche de 400 mg/10 ml.

Les deux solutions sont centrifugées avant le dosage à 10 000 tours par minute et cela pendant 10 minutes (centrifugeuse Kontron LC 1000). Les deux surnageants serviront aux dosages du sodium, du potassium, du calcium et des chlorures.

Le dosage proprement dit est réalisé au moyen de l'automate R.A. 1000 (Kontron, Suisse).

La teneur en éléments minéraux est calculée en gramme pour 100 grammes de plante sèche. Ces mêmes éléments ont été également dosés dans l'eau distillée ayant servi à la solubilisation des extraits.

3.2.2. Résultats et discussion

Les résultats consignés dans le tableau 58 ne montrent pas de différence dans la teneur en sels minéraux des deux extraits. On remarque une concentration en potassium très élevée (2 %), ce qui est en accord avec la bibliographie (Paris, 1965 ; Andary, 1975). Cette forte concentration en potassium pourrait être responsable des contractions des flancs observées chez les animaux traités par voie I.P.

TABLEAU 58 - CONCENTRATION DU NEBULISAT ET DE L'EXTRAIT AQUEUX RT 1095 D'*E. CALIFORNICA* EN ELEMENTS MINERAUX EXPRIMES EN g POUR 100 g DE PLANTE SECHE

ELEMENTS MINERAUX / EXTRAITS	Na^+ g/100g	K^+ g/100g	Cl^- g/100g	Ca^{++} g/100g
NEBULISAT	0,172	1,95	0,262	0,1
EXTRAIT AQUEUX RT 1095	0,172	1,852	0,350	0,1

3.3. RECHERCHE DE SUBSTANCES ORGANIQUES

3.3.1. Recherche des tannins

Les tannins sont des substances à structure polyphénolique non azotée, solubles dans l'eau, l'alcool et l'acétone mais peu soluble dans l'éther et le chloroforme. Dans les plantes les tannins existent à l'état de complexe (tannoïdes) ou combinés à des sucres (tanozides) et se classent en deux catégories principales.

- les tannins hydrolysables : esters d'acides phénols et d'oses ou tannins galliques.
- les tannins non hydrolysables : tannins condensés ou tannins catéchiques.

Ces deux structures sont solubles dans l'eau et sont précipitées de leur solution aqueuse par les sels de métaux lourds (Cu^{++}, Fe^{++}, Mg^{++}, Pb^{++}, Zn^{++}) par contre, le mélange de Stiasny (formol chlorhydrique) ne précipite que les tannins catéchiques.

La mise en évidence dans les deux extraits de tannins catéchiques et galliques sera realisée aprés précipitation au moyen du réactif de Stiasny et par chromatographie sur couche mince après révélation au trichlorure de fer.

3.3.1.1. Matériel et méthodes

* Réaction de précipitation

. Recherche de tannins catéchiques

- Réactif de Stiasny : Formol à 30 % 2 volumes
  acide chlorhydrique concentré 1 volume
- Extraits : 200 mg d'extrait hydro-alcoolique (nébulisat)

  et 100 mg d'extrait aqueux (Réf. : RT 1095) sont solubilisés dans 10 ml d'eau distillée, ce qui correspond à une concentration équivalente en plante sèche de 1 gramme/10 ml.

A un volume de la solution aqueuse d'extrait, on ajoute un volume égal de réactif de Stiasny. L'ensemble est porté au bain marie (température inférieure à l'ébulition pendant une demi-heure). L'apparition de flocons roses indique la présence de tannins catéchiques.

. Recherche de tannins galliques.

- Reactif au chlorure ferrique : chlorure ferrique (Prolabo) Réf. 24214295) 100 mg
  eau distillée 10 ml

- Acétate de sodium (Prolabo Réf. : 27648294)

On débarrasse le précipité de la solution précédente par la filtration. Le filtrat obtenu est saturé par de l'acétate de sodium. Aprés ajout de quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1%, une coloration bleue noire indique la présence de tannins galliques

* Chromatographie sur couche mince

- support : plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck art. : 5721)

- solvant de migration : Formiate d'éthyle,acide formique,eau (80:10:10 V/V)

- solution à analyser : Extraits il s'agit des solutions précédentes préparées pour la recherche de tannins catéchiques et galliques

- témoin : solution éthanolique à 1 % d'un mélange de catéchine et d'épicatéchine

- solution de révélation : a) solution aqueuse à 10 % de chlorure ferrique (Prolabo Réf. : 24214295) (Wagner, 1983 ; réactif NO 14)

  b) Réactif vanilline chlorhydrique : solution de vanilline 10 % dans de l'acide chlorhydrique concentré

- dépôt des échantillons : 40 µl de chacune des solutions à analyser et de la solution témoin sont déposés à 2 cm de la base de la plaque. On dépose les mêmes échantillons sur deux plaques différentes pour deux révélations différentes

- migration : La migration des deux plaques est effectuée pendant 30 minutes. Dans ces conditions, le front de solvant se situe à environ 10 cm de la ligne de dépôt.

- révélation : On pulvérise la solution de chlorure ferrique sur l'une des deux plaques sèches. L'apparition de taches bleu noirâtre est alors instantanée. La solution de vanilline chlorhydrique est pulvérisée sur l'autre plaque que l'on place ensuite dans une étuve à une température de 100° C pendant 5 minutes.

3.3.1.2. Résultats et discussion

* Réaction de précipitation

Aprés l'ajout de réactif de Stiasny, aucun précipité n'a été obtenu avec les deux extraits d'E. californica. Par contre, après filtration le chlorure ferrique colore le filtrat en bleu noirâtre ce qui prouve l'absence de tannins catéchiques et la présence de tannins galliques dans les deux extraits.

* Chromatographie sur couche mince

Aprés pulvérisation de la solution de chlorure ferrique (a), on obtient un profil chromatographique (Fig. 65 a) qui est identique pour les deux extraits. Les chromatogrammes se caractérisent par la présence de deux taches colorées en bleu noirâtre (Rf. : 0,1) semblables quant à leur position et leur intensité.

Par contre, le chromatogramme de la solution témoin (catéchine et épicatéchine) ne met en évidence qu'une seule tache (Rf. : 0,70) également colorée en bleu noirâtre.

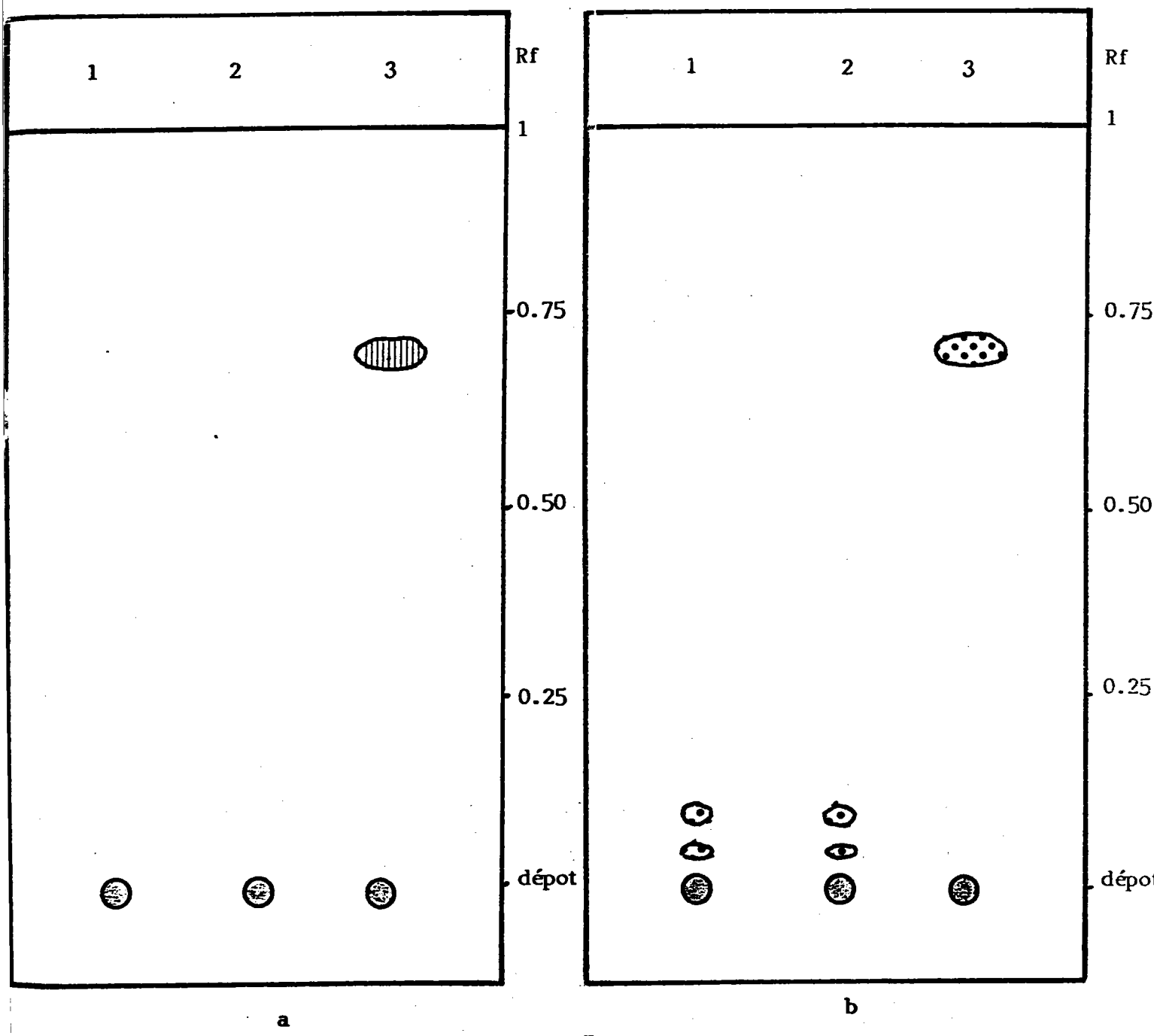


Fig. 65 - CHROMATOGRAMME SUR PLAQUE DE SILICE (C.C.M.) DES TANNINS. REVELATION : REACTIF AU PERCHLORURE DE FER (a) ET A LA VANILLINE SULFURIQUE (b).

1) EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT) 2) EXTRAIT AQUEUX RT 1095 3) MELANGE DE CATECHINE ET D'EPICATECHINE.

Après révélation à la vanilline chlorhydrique, le chromatogramme (Fig. 65 b), les deux extraits ne laissent apparaître aucune tache visible. Au contraire, celui de la solution témoin met en évidence une tache colorée en rose et située à un Rf. de 0,70.

Ces résultats confirment ceux obtenus après la réaction de précipitation de Stiasny et montrent que les deux extraits d'E. californica ne contiennent pas de tannins catéchiques mais seulement des tannins galliques en faible quantité.

3.3.2. Recherche des alcaloïdes par chromatographie sur couche mince (C.C.M)

3.3.2.1. Matériel et méthode

Les extraits alocaloïdiques ALC1 décrits précédement (cf. § 2.1.1.1.) ont été analysés selon les conditions chromatographiques décrites au § 2.1.1.2.

Après séchage, les chromatogrammes sont observés sous U.V. à une longueur d'onde de 366 nm, puis révélés avec le réactif de Draggendorf. Une pulvérisation d'une solution à 10 % d'acide sulfurique concentré dans l'éthanol permet d'intensifier la coloration des taches.

3.3.2.2. Résultats et discussion

L'observation de la plaque sous U.V. à une longueur d'onde de 366 nm (Fig. 66) laisse apparaître peu de différence entre les deux extraits. Le profil chromatographique du nébulisat est caractérisé par la présence de 7 taches de fluorescence bleue (Rf. : 0,10 - 0,25 - 0,36 - 0,45 - 0,55 - 0,67 - 0,73). Les deux chromatogrammes sont comparables. Seules certaines des taches du chromatogramme de l'extrait aqueux (Réf. RT 1095) semblent présenter une fluorescence légérement moins importante (Rf : 0,10 - 0,25 - 0,48). Et la tache fluorescente de Rf : 0,67 est absente.

Après pulvérisation du réactif de Draggendorf, on obtient un profil chromatographique différent de celui obtenu après observation sous U.V. Ce profil chromatographique ne fait pas apparaître de différence qualitative entre les deux extraits. Les deux chromatogrammes sont caractérisés par la présence de 7 taches orangées (Rf : 0 - 0,007 - 0,15 - 0,2 - 0,30 - 0,36 - 0,45).

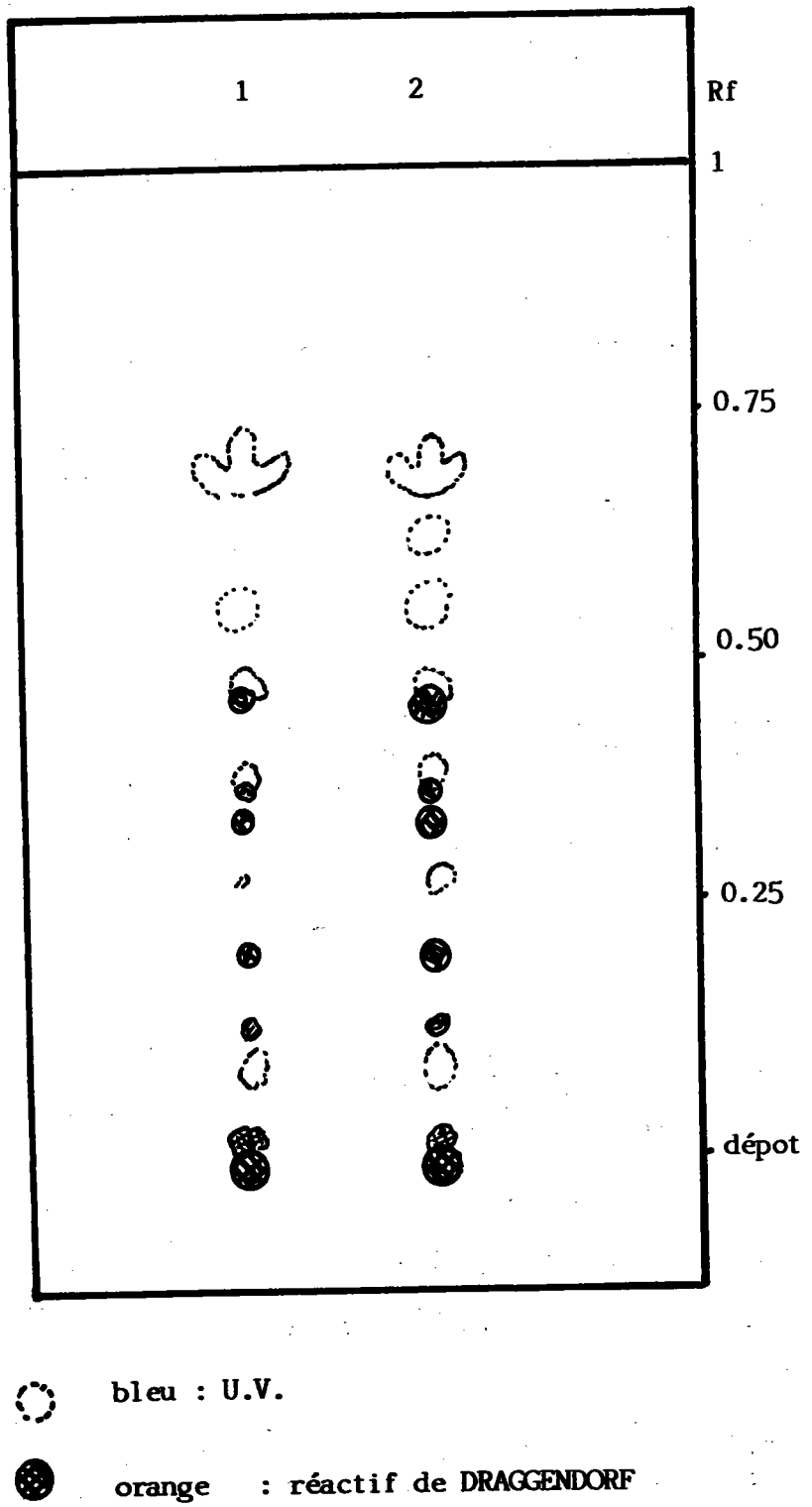


Fig. 66 - CHROMATOGRAMME SUR PLAQUE DE SILICE (C.C.M.) DES ALCALOIDES ; REVELATION AU REACTIF DE DRAGGENDORF - 1) EXTRAIT AQUEUX RT 1095 2) EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT)

On remarque que plusieurs de ces taches sont superposées à celles observées sous U.V. (Rf : 0,36 - 0,45) . Les dimensions et l'intensité des taches du chromatogramme de l'extrait aqueux sont toutes moins importantes que celles observées dans le chromatogramme de l'extrait hydro-alcoolique.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'extrait aqueux RT 1095 contient moins d'alcaloïdes totaux que l'extrait hydro-alcoolique (nébulisat).

3.3.3. Recherche de flavonosides par chromatographie sur couche mince (C.C.M.)

3.3.3.1. Matériel et méthodes

- support : plaque de silice kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck, Réf. 5721)
- solvant de migration : Acétate d'éthyl, butanone, acide formique, eau (50 : 30 : 10 : 10 V/V)
- révélateur : solution d'ester éthylamino-diphényl borique à 1 % dans le méthanol (réactif de NEU. Wagner et coll., 1982 voir N° 28)
- solutions analysées :
  - . Extraits : 200 mg d'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) et 100 mg d'extrait aqueux (Réf. : RT 1095) sont solubilisés dans 10 ml d'alcool à 60°, ce qui correspond à une concentration équivalente en plante sèche de 1 gramme/10 ml.
  - . Témoin : solution à 1 % dans l'éthanol de quercétine (sarsynthèse art. 0066) et de rutine (sarsynthèse art. 0080)
- dépôt des échantillons : 10 µl de chacune des solutions à analyser sont déposés à 2 cm de la base de la plaque de silice.
- migration : elle est effectuée pendant 30 minutes, ce qui correspond à une migration du solvant sur une distance approximative de 10 cm.

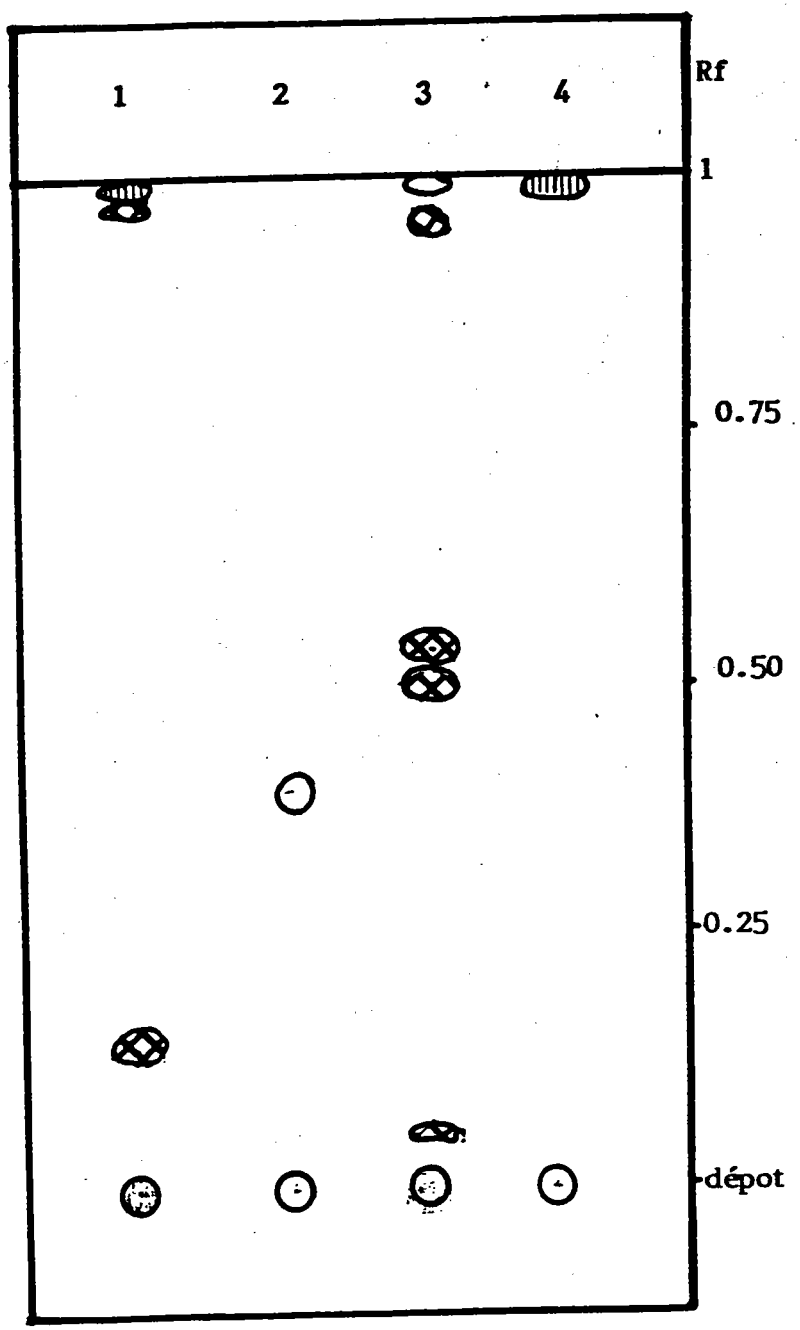


Fig. 67 - CHROMATOGRAMME SUR PLAQUE DE SILICE (C.C.M.) DES FLAVONOIDES D'E. CALIFORNICA. REVELATION : REACTIF DE NEU ; OBSERVATION SOUS U.V. 366 nm. 1) EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE 2) RUTINE 3) EXTRAIT AQUEUX RT 1095 4) QUERCETINE

Jaune

réactif de NEU puis U.V.

brun

- révélation : après séchage de la plaque, le réactif de NEU. est pulvérisé puis l'on observe les chromatogrammes sous U.V. à une longueur d'onde de 366 nm.

3.3.3.2. Résultats et discussion

L'observation de la plaque sous U.V. à une longueur d'onde de 366 nm (Fig. 67) laisse apparaître deux taches fluorescentes jaunes pour les témoins quercétine (Rf=1) et rutine (Rf=042) par ailleurs, cette observation met en évidence une différence importante entre les deux extraits.

Le profil chromatographique de l'extrait hydro-alcoolique se caractérise par la présence de trois taches dont l'une a une fluorescence jaune et a le même Rf que la quercétine (Rf=1) et deux taches de fluorescence brune (Rf = 0,15 - 0,95). Par contre, le profil chromatographique de l'extrait aqueux (Ref. RT 1095) se caractérise par la présence de 5 taches dont l'une a également la même fluorescence jaune et le même Rf que la quercétine (Rf=1) et quatre taches de fluorescence brune (Rf= 0,06 - 0,45 - 0,48 - 0,91). Ces résultats montrent que les deux extraits contiennent de la quercétine et pas de rutine, ce qui est en contradiction avec Hegnauer (1969) qui a mentionné sa présence dans les pétales d'E. californica.

Les taches fluorescentes brunes mises en évidence par le réactif de NEU n'ont pu être identifiées ou référencées à des substances décrites dans la bibliographie.

3.3.4. Recherche d'acides organiques par chromatographie sur couche mince (Mortier, 1972)

3.3.4.1. Matériel et méthodes

- support : plaque de silice kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck, art. : 5721)

- solvant de migration : Toluène, formiate d'éthyl, acide formique (50 : 40 : 10 V/V)

- révélateur :

on utilise un réactif des fonctions acides (réactif de SCHWEPPE, 1959).

. solution aqueuse à 10 % de glucose :	20ml
. Solution éthanolique à 10 % d'aniline	20 ml
. n-Butanol	80 ml

-solution à analyser :

- extraits : 200 mg d'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) et 100 mg d'extrait aqueux (Réf. : RT 1095) sont solubilisés dans 10 ml d'alcool à 60°.

  Ce qui correspond à une concentration équivalente en plante sèche de 1 gramme /10 ml.

- témoin : solutions standards à 1 % dans l'éthanol d'acide citrique, d'acide glycolique, d'acide malique, d'acide fumarique et d'acide lactique (Merck).

- dépôt des échantillons :

  10 µl de chacune des solutions à analyser sont disposés à 2 cm de la base de la plaque de silice.

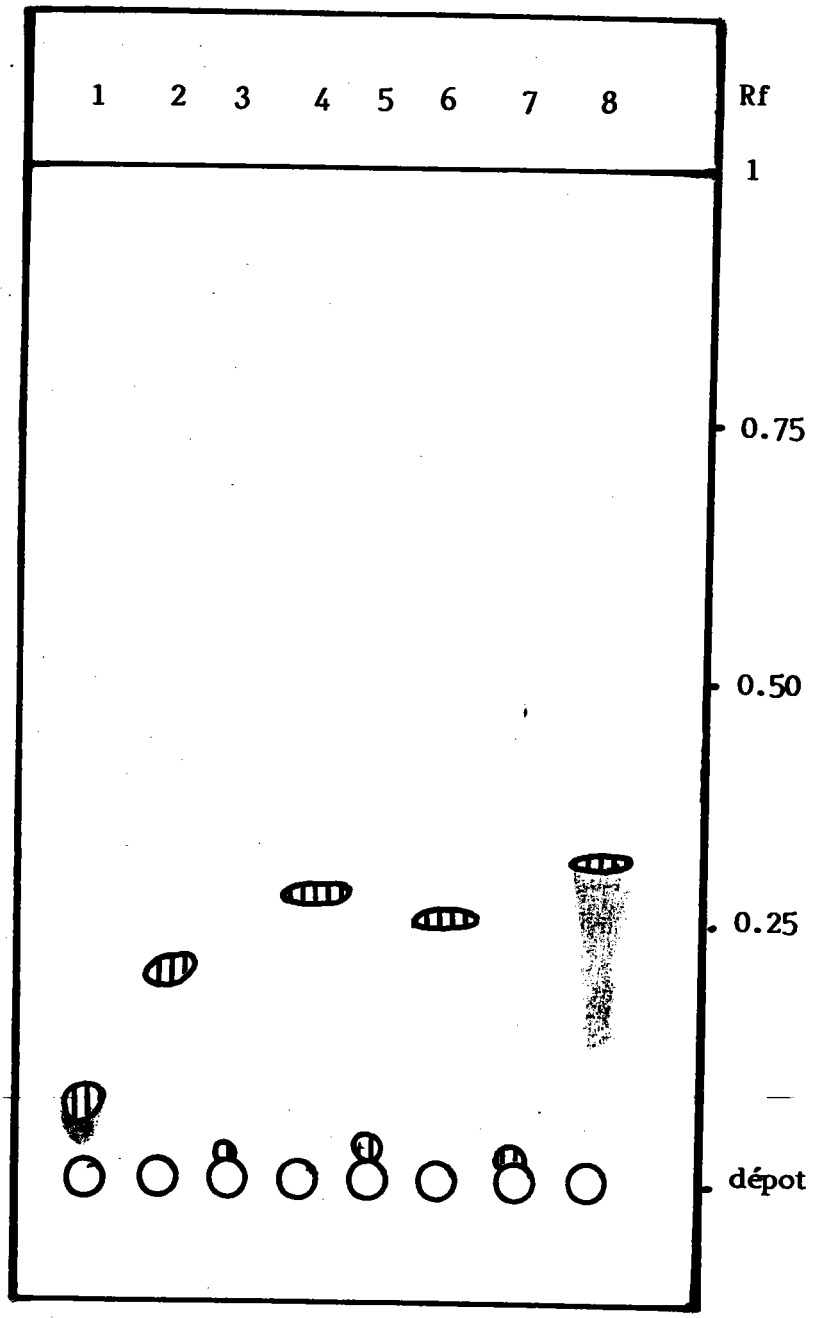
- migration : elle est effectuée pendant 40 minutes, ce qui correspond à une migration du solvant sur une distance approximative de 10 cm.

- révélation : Le réactif de SCHWEPPE est pulvérisé sur la plaque sèche que l'on place ensuite dans une étuve à une température de 110° C pendant 10 minutes.

3.3.4.2. Résultats

Après révélation au réactif de SCHWEPPE les profils chromatographiques des solutions témoins se caractérisent par la présence de taches de couleur brune (Fig. 68) (acide malique (5), Rf = 0,065 ; acide citrique (1), Rf = 0,11 ; acide glycolique (2), Rf = 0,22 ; acide lactique (6), Rf = 0,28 ; acide succinique (4), Rf = 0,30 ; acide fumarique (8), Rf = 0,35).

L'observation de la plaque laisse apparaître un chromatogramme (Fig. 68) identique pour les deux extraits. Leur profil chromatographique (3-7) se caractérise par la présence d'une seule tache de couleur brune correspondant à l'acide malique (Rf = 0,065).



brun : réactif de Schweppe

Fig. 68 - CHROMATOGRAMME SUR PLAQUE DE SILICE (C.C.M.) DES ACIDES ORGANIQUES D'E. CALIFORNICA ; REVELATION : REACTIF DE SCHWEPP 1) ACIDE CITRIQUE 2) ACIDE GLYCOLIQUE 3) EXTRAIT AQUEUX RT 1095 4) ACIDE SUCCINIQUE 5) ACIDE MALIQUE 6) ACIDE LACTIQUE 7) EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT) 8) ACIDE FUMARIQUE

3.3.5. Recherche des acides aminés libres

3.3.5.1. Chromatographie sur couche mince (Wagner et coll., 1983)

*** Matériel et méthode**

- support : plaque de silice Kieselgel G 60 sans fluorescence (Merck, art. 5.721),

- solvant de migration : n-butanol, acétone, acide acétique, eau (35 : 35 : 10 : 20 V/V).

- solution de révélation :

ninhydrine (Merck, art. 6.762)	30 mg
acide acétique (Prolabo)	0,3 ml
n-butanol (Prolabo)	10 ml

- solution à analyser : 200 mg d'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) et 100 mg d'extrait aqueux (RT 1095) sont solubilisés dans 10 ml d'éthanol à 60°, ce qui correspond à une concentration équivalente en plante sèche de 1 gramme/10 ml,

- dépôt des échantillons : 10 µl de chacune des solutions a analyser sont déposés à 2 cm de la base de la plaque de silice,

- migration : On réalise une migration sur une distance approximative de 10 cm (90 minutes),

- révélation : Le réactif à la ninhydrine est pulvérisé sur la plaque sèche que l'on place ensuite dans une étuve à une température de 120° C pendant 10 minutes. L'apparition d'une tache rose violacée indique la présence d'acides aminés excepté pour la proline et l'hydroxyproline qui se colore en jaune.

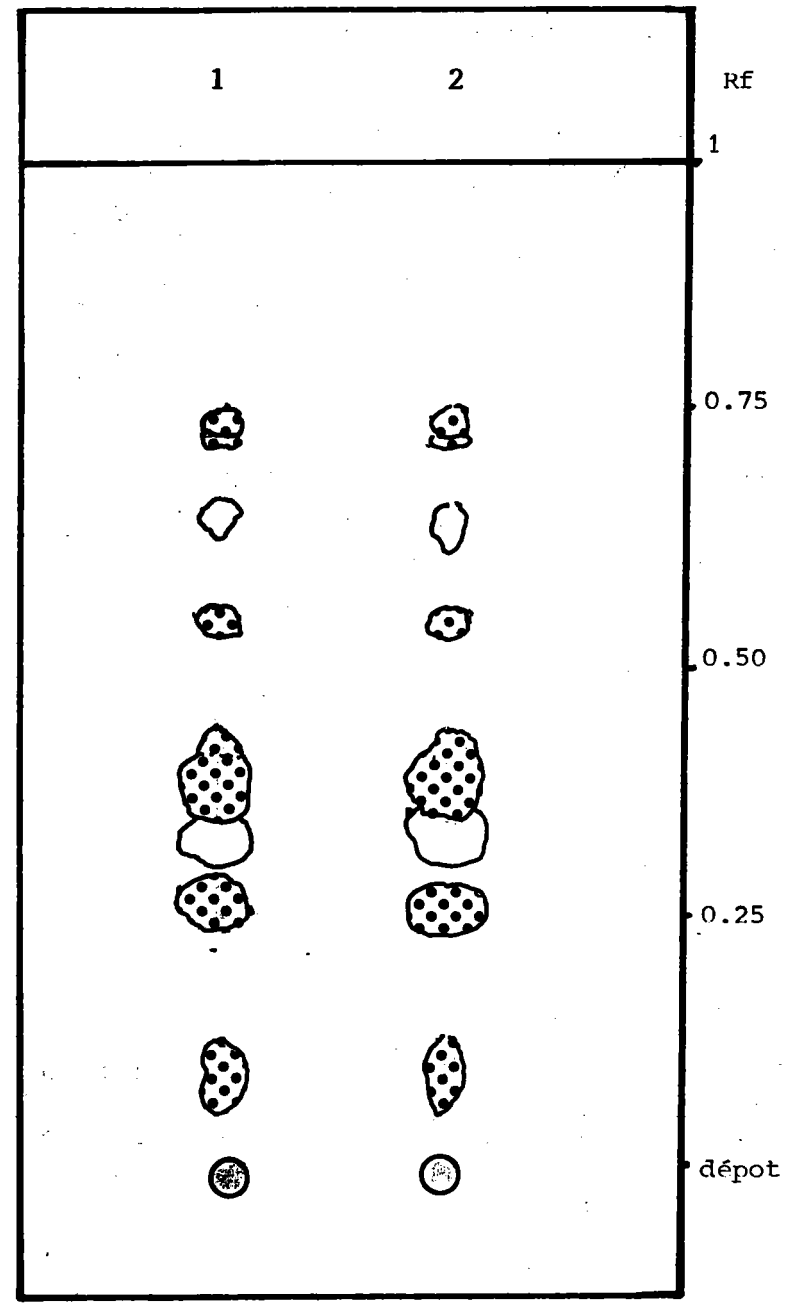


Fig. 69 - CHROMATOGRAMME SUR PLAQUE DE SILICE (C.C.M.) DES ACIDES AMINES LIBRES D'E. CALIFORNICA 1) EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT) 2) EXTRAIT AQUEUX RT 1095

*** Résultats et discussion**

Après révélation du réactif à la ninhydrine, on obtient un profil chromatographique (Fig. 69) pour les deux extraits. Le chromatogramme des deux extraits est caractérisé par la présence de 5 taches roses (Rf = 0,10 - 0,26 - 0,39 - 0,54 - 0,74) et de 2 taches jaunes (Rf = 0,33 - 0,65). Les résultats nous permettent de conclure que les extraits d'E. californica contiennent des acides aminés à l'état libre.

Toutefois, ce système chromatographique monodimentionnelle ne permet pas de séparer tous les amino acides. Nous avons vérifié et identifié dans l'extrait hydro-alcoolique du commerce (nébulisat), les acides aminés présents à l'état libre au moyen d'un analyseur automatique.

3.3.5.2. Analyse des amino-acides libres par analyseur automatique

a) Généralités

La technique est inspirée de la chromatographie liquide haute pression par échangeurs d'ions.

Le support solide utilisé est une résine échangeuse de cations conditionnée en colonne de verre. A la surface de la résine sont fixés des groupements sulfonates (SO_3^-) qui constituent les sites d'échange des cations. Des ions mobiles appelés contre-ions (Na^+ , Li^+) de signes opposés à ceux des ions sulfatés assurent l'électronégativité et ainsi la stabilité de la résine.

En milieu acide (pH < pKa des acides aminés) l'espèce chimique cationique prédomine, et les différents acides aminés peuvent être fixés sur la résine échangeuse de cations.

Lorsque l'on élue les acides aminés fixés sur la résine avec des solutions tampons de pH croissant, on observe que l'élution s'effectue dans l'ordre croissant des pKa des acides aminés. Cette technique nécessite la prise en compte de différents facteurs comme la force ionique, et la température de la colonne qui peuvent influencer largement la séparation des amino-acides.

La solution de l'échantillon à analyser est injectée dans l'appareil sous un micro-volume en tête de colonne, le pH de la solution de dissolution de l'échantillon est alors inférieur à 2,5. A ce pH, tous les acides aminés sont sous la forme cationique et seront fixés sur les sites réactifs de la résine cationique.

Une séquence bien déterminée d'éluants (solutions tampons) de pH et de force cationique croissant parcourent alors la colonne, déplaçant ainsi progressivement les formes cationiques vers les formes anioniques.

b) Détection des acides aminés

Les acides aminés sont mélangés à un réactif spécifique, la ninhydrine (2,2 dihydroxy indane 1,3 dione) à 125° C pour former un complexe coloré qui peut être détecté par spectrophotométrie d'absorption.

L'acide aminé est dégradé en dioxyde de carbone et en aldéhyde, il se forme de l'amoniaque naissant qui réagit avec la ninhydrine pour constituer un complexe coloré en bleu.

Un acide aminé primaire forme un complexe qui absorbe à 570 nm alors qu'un acide aminé secondaire forme un complexe qui absorbe à 440 nm.

c) Matériel et méthodes

* L'appareil chromatographique

Les analyses se réalisent sur un analyseur automatique BIOTRONIK LC 5001.

La séparation des acides aminés s'effectue dans une colonne renfermant une résine échangeuse de cations.

L'appareil se compose de :

- un programmateur LC BT 0110
- une unité de contrôle de température BT 0210
- une unité de contrôle de pompe BT 0510
- un spectrophotomètre BT 0310 à deux longueurs d'onde fixées (570 nm et 440 nm), utilisables séparément ou en sommation.
- une cabine de réfrigération permettant le stockage à + 4° C des échantillons et des différents tampons.
- une colonne de séparation entourée de deux unités de chauffage.
  Dimension de la colonne : 3,2 x 400 mm
  Type de résine : BTC F
  Hauteur du lit de résine : 130 mm
- une précolonne
  Dimension : 6 x 85 mm
  Type de résine : BTC F
  Hauteur du lit de résine : 25 mm
- une bobine de réaction où se réalise la formation du complexe ninhydrine-acide aminé
- un intégrateur SHIMADZU CR1B

* Réactifs

- Tampons d'élution

Système tampon	Concentration Li^+ (normalité)	Concentration citrate (normalité)	pH
A	0,10	0,0685	2,70
B	0,12	0,0685	3,00
C	0,18	0,0685	3,35
D	0,40	0,67	3,95
E	1,40	0,0176	3,50

L'appareil se compose de :

- un programmateur LC BT 0110
- une unité de contrôle de température BT 0210
- une unité de contrôle de pompe BT 0510
- un spectrophotomètre BT 0310 à deux longueurs d'onde fixées (570 nm et 440 nm), utilisables séparément ou en sommation.
- une cabine de réfrigération permettant le stockage à + 4° C des échantillons et des différents tampons.
- une colonne de séparation entourée de deux unités de chauffage.
  Dimension de la colonne : 3,2 x 400 mm
  Type de résine : BTC F
  Hauteur du lit de résine : 130 mm
- une précolonne
  Dimension : 6 x 85 mm
  Type de résine : BTC F
  Hauteur du lit de résine : 25 mm
- une bobine de réaction où se réalise la formation du complexe ninhydrine-acide aminé
- un intégrateur SHIMADZU CR1B

* Réactifs

- Tampons d'élution

Système tampon	Concentration Li^+ (normalité)	Concentration citrate (normalité)	pH
A	0,10	0,0685	2,70
B	0,12	0,0685	3,00
C	0,18	0,0685	3,35
D	0,40	0,67	3,95
E	1,40	0,0176	3,50

- Un étalon externe (P.ANB : BENSON COMPANY USA).
  L'étalon renferme 35 acides aminés titrant 0,1 micromole par ml.
- Réactif ninhydrine
  Ninhydrine (Merck, réf. 6.762) : 20 g
  Méthylcellusolve (Merck) : 750 ml
  Tampon acétate pH 5,51 : 250 ml
  Titan III (Merck) : 5 ml
  Solution aqueuse à 10 % d'acide sulfosalicylique
  Tampon de dilution : solution de citrate de lithium (1,40N, pH=5,25)

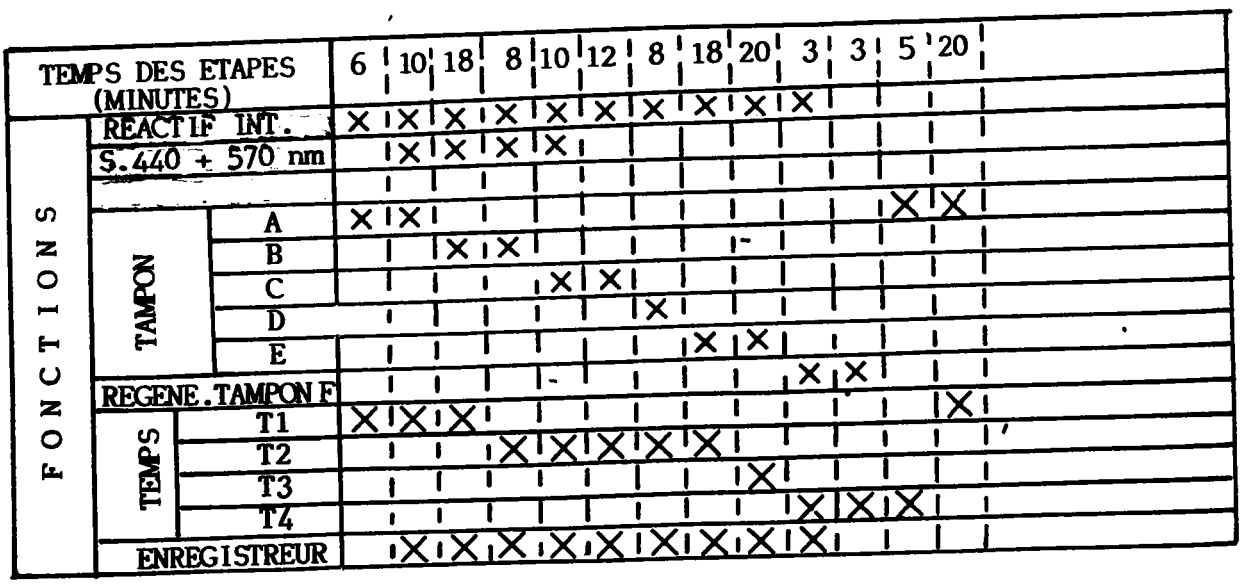
* Conditions chromatographiques

- Unité de température de la colonne
  Gradient 30 secondes / 1° C
  Température de la colonne : T1 = 32° C
  T2 = 50° C
  T3 = 58° C
  T4 = 70° C

  Température de la bobine de réaction : 125° C

- Pompes
  - Flux des tampons : 0,29 ml/mn
  - Flux du réactif : 0,65 x 0,29 ml/mn

* Programme chromatographique



* Préparation des échantillons

Les protéines à haut poids moléculaire peuvent obturer partiellement la colonne chromatographique et dégrader rapidement le profil chromatographique en bloquant l'élution des acides aminés. Pour éviter cet inconvénient, il est nécessaire de déprotéiniser la solution au moyen de l'acide trichloracétique à 10 %.

200 mg de l'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) sont dissous dans 10 ml d'eau distillée.

200 µl d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés à 800 µl de la solution hydro-alcoolique. Le mélange est laissé au repos pendant 30 minutes à basse température (4° C), puis est centrifugé à 3000 tours/minute pendant 15 minutes.

* Analyse chromatographique

On dilue au demi l'échantillon à analyser avec le tampon citrate de dilution.

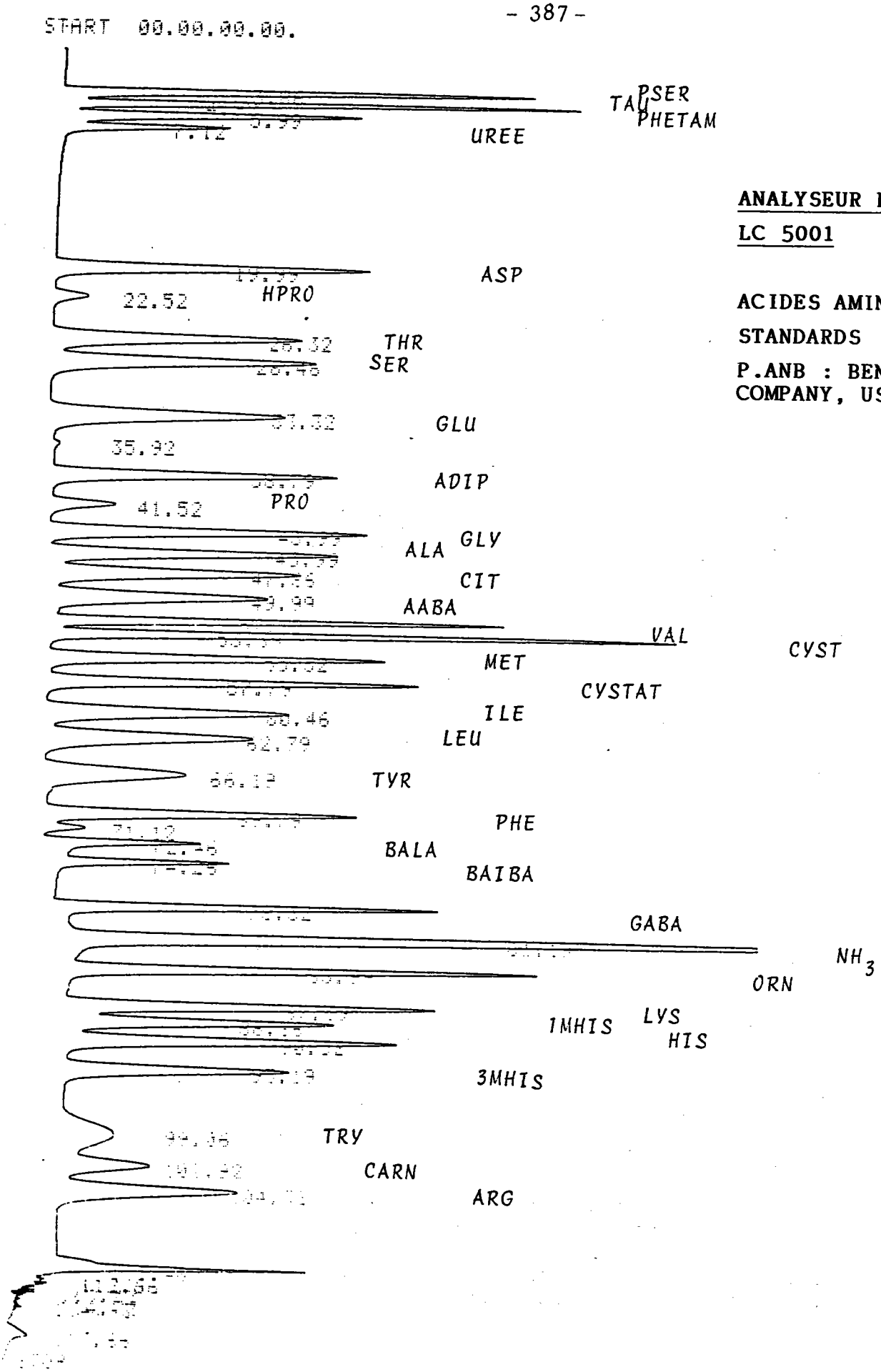
On injecte 50 µl de l'échantillon déprotéinisé dans l'analyseur.

L'analyse chromatographique est réalisée selon le programme décrit précédemment.

d) Résultats

Les chromatogrammes obtenus (Fig. 70, 71) permettent de recenser 23 acides aminés à l'état libre dans l'extrait alcoolique d'E. californica (Tableau 59).

Parmi ces acides aminés, 6 d'entre eux sont présents en grande quantité, principalement l'hydroxyproline, la thréonine, la sérine, la citrulline, la méthionine et le gaba. D'autres susbtances aminées provenant du métabolisme (NH_3 et urée) se trouvent également en quantité importante.



ANALYSEUR BIOTRONIK
LC 5001

ACIDES AMINES
STANDARDS
P.ANB : BENSON
COMPANY, USA

Fig. 70 - CHROMATOGRAMME DE 35 ACIDES AMINES STANDARDS

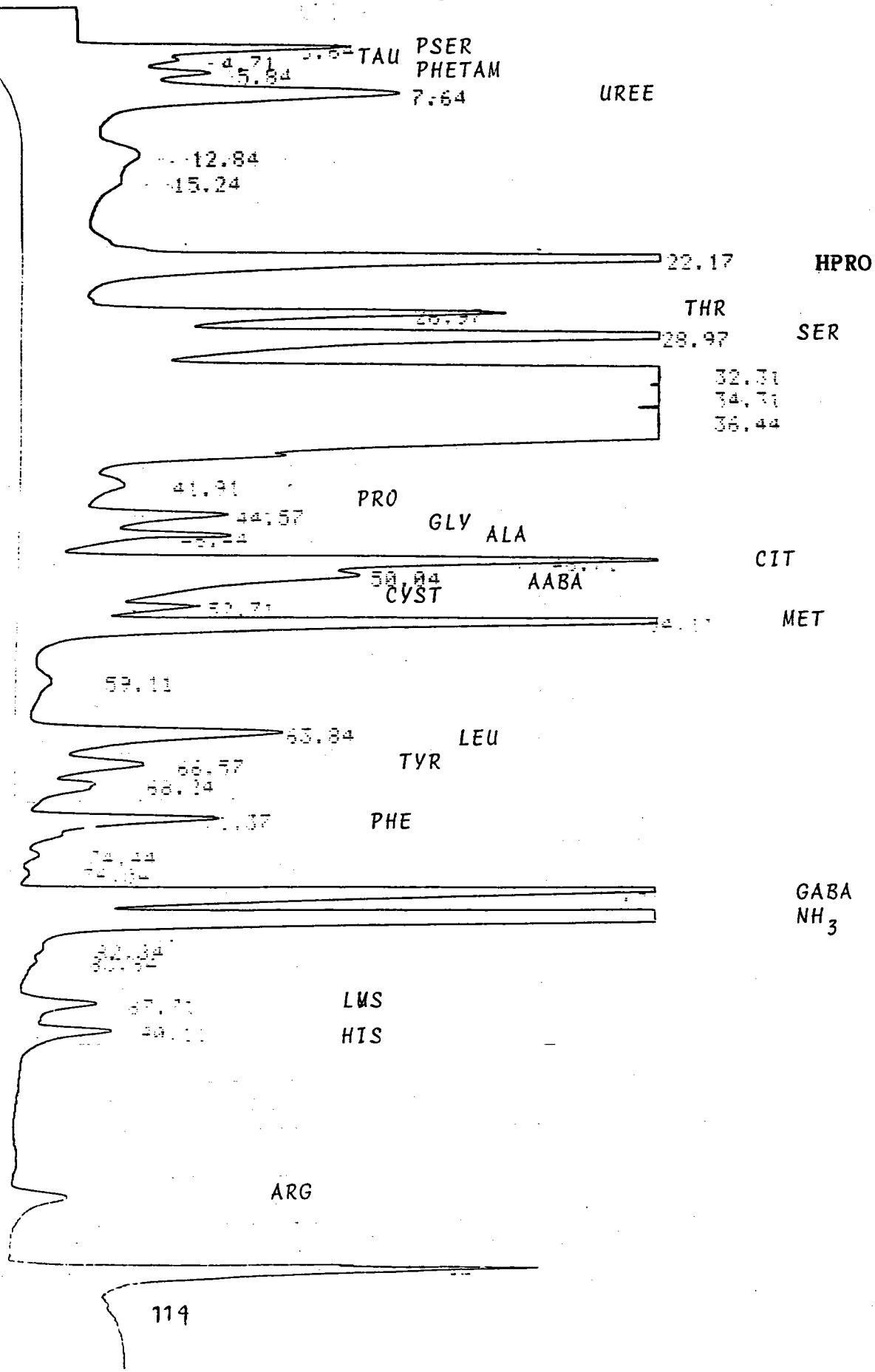


Fig. 71 - CHROMATOGRAMME DES ACIDES AMINES LIBRES DE L'EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT) D'E. CALIFORNICA

TABLEAU 59 - ACIDES AMINES PRESENTS DANS L'EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE D'E. CALIFORNICA

Acides aminés	Présence (X) Absence (–)
Phosphosérine	X
Taurine	X
Phosphoéthanolamine	X
Urée	X
Acide aspartique	–
Hydroxyproline	X
Thréonine	X
Sérine	X
Asparagine	–
Acide glutamique	–
Glutamine	–
Acide amino-adipique	–
Proline	X
Glycine	X
Alanine	X
Citrulline	X
Acide aminobutyrique	X
Valine	X
Cystine	X
Méthionine	X
Cystathionine	–
Isoleucine	–
Leucine	X
Tyrosine	X
Phenylalanine	X
β alanine	–
Acide β amino-isobutyrique	X
Gaba	X
Ammoniaque	X
Ornithine	–
Lysine	X
1- méthylhistidine	–
Histidine	X
3-méthylhistidine	–
Tryptophane	–

Les pics situés entre la sérine et la proline (Rf = 32,31 - 34,31 - 36,44 minute) ne correspondent à aucun des acides aminés témoins et n'ont pu, de ce fait, être identifiés.

3.3.6. Recherche des saponosides

3.3.6.1 Matériel et Méthodes

Cette recherche a été conduite selon la méthode de la pharmacopée française (1965) par évaluation de l'indice de mousse.

200 mg d'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) et 100 mg d'extrait aqueux (Réf. RT 1095) sont solubilisés dans 10 ml d'eau distillée, ce qui correspond en équivalent de plante sèche à 1 gramme/ 10 ml.

A partir de ces deux solutions, on réalise une série de dilution dans des tubes à essais (160 x 16 cm). On agite les tubes dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. On laisse au repos 15 minutes et l'on mesure la hauteur de la mousse. Si la hauteur est inférieure à 1 cm, l'indice est inférieur à 100.

3.3.6.2. Résultats

Aucun des tubes n'a présenté une mousse persistante après un repos de 15 minutes.

L'indice de mousse est donc inférieur à 100 et l'on peut conclure à l'absence de saponosides dans les deux extraits.

3.4. CONCLUSION

Ces résultats permettent de constater que l'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) et l'extrait aqueux industriel pilote (Réf. RT 1095) ont une composition chimique proche l'une de l'autre.

Le profil chimique est caractérisé par la présence d'une forte teneur en potassium (2 %), d'un grand nombre d'alcaloïdes (plus important d'un point de vue quantatif dans l'extrait hydro-alcoolique que dans l'extrait aqueux) et d'un grand nombre d'acides aminés à l'état libre nécessaires au métabolisme des alcaloïdes.

Les deux extraits d'E. californica semblent renfermer une quantité relativement importante de substances à propriété réductrice mis en évidence par le réactif à l'anisaldéhyde. Par contre, nous n'avons pas trouvé de tannin catéchique et très peu de tannins galliques.

Le réactif de NEU a révélé la présence de quercétine dans les deux extraits mais pas de rutine.

Par contre ce réactif permet la mise en évidence d'un plus grand nombre de composés dans l'extrait aqueux que dans l'extrait hydro-alcoolique nébulisé.

Les dérivés cyanogénétiques et la sanguinarine, connus pour leur toxicité respective, semblent être absents. Il en est de même pour les saponosides.

Selon les substances chimiques que nous venons de mettre en évidence, nous avons cherché à déterminer, d'une part au moyen de la chromatographie préparative sur plaque de silice à isoler une fraction active et d'autre part, à définir le rôle des alcaloïdes et des substances réagissant au réactif à la ninhydrine (acides aminés et peptides) dans l'activité pharmacologique des deux extraits.

Si les deux recherches n'apportent pas de réponses précises nous tenterons d'extraire le principe actif du résidu d'extraction des alcalöides par différents solvants de polarité croissante.

4. RECHERCHE DE LA FRACTION ACTIVE

4.1 FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (C.C.M.)

4.1.1. Matériel et méthodes

a) Chromatographie préparative sur couche mince

On réalise deux plaques de chromatographie exactement dans les mêmes conditions, une seule sera révélée pour déterminer les Rf. de référence des différentes taches.

- support : plaque de silice Kieselgel G 60 préparée par nous-mêmes.
  45 g de silice (Merck, art. 7731) sont mélangés à 90 g d'eau puis étalés sur des plaques de verre et sur une épaisseur de 0,25 mm.
  Les plaques sont laissées à température ambiante pendant 1 heure puis placées à l'étuve à 120° C pendant 2 heures.

- solvant de migration : acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau (68 : 7 : 7 : 18 V/V.

- réactif de révélation :

anisaldéhyde	0,11ml
acide phosphomolybdique à 10 % dans le méthanol	0,25ml
	1,13ml
acide sulfurique concentré	2,25ml
méthanol	22 ml

b) Test pharmacologique

Nous avons choisi le test de l'escalier pour mettre en évidence un effet sédatif éventuel de chacun des extraits. La description et le protocole opératoire de ce test ont été effectués au chapitre 1 § 1.

Pour réaliser le test, les extraits obtenus après chromatographie préparative sont évaporés à sec sous pression réduite (Rotavapor, 40° C) et repris par une quantité suffisante d'eau physiologique afin d'obtenir une solution aqueuse titrant 8 % (800mg/10ml) en équivalent de plante sèche.

On a choisi une dose élevée afin de palier aux éventuelles pertes de principes actifs pouvant intervenir à chaque manipulation. Chacune des solutions est administrée par voie IP (0,5ml/50g) 30 minutes avant le test.

Les performances des animaux traités sont comparées à celles des animaux témoins au moyen des tests statistiques réalisés précédemment.

4.1.2. Résultats

a) Chromatographie préparative

Le profil chromatographique est représenté dans la figure 72. On distingue trois groupes principaux de taches dont un de couleur rose et vert ayant un Rf. de 0,16 et deux groupes de couleur gris verdâtre ayant un Rf. respectif de 0,50 et 0,9. Cela permet de définir 7 extraits différents (Fig. 72).

b) Influence des différents extraits d'E. californica (800 mg/kg) sur les redressements et le nombre de marches montées dans le test de l'escalier

Les résultats sont consignés dans le tableau 60. Ils mettent en évidence une diminution significative des deux paramètres enregistrés pour l'extrait 1 qui correspond à la ligne de dépôt des échantillons et une diminution significative uniquement du paramètre redressement pour l'extrait 3 qui correspond au groupe de taches situé au Rf. de 0,16 .

Toutefois, l'effet sédatif de chacun des deux extraits (1-3) est moins important que lors de l'administration de l'extrait total nébulisé (cf. Chapitre 1 § 2).

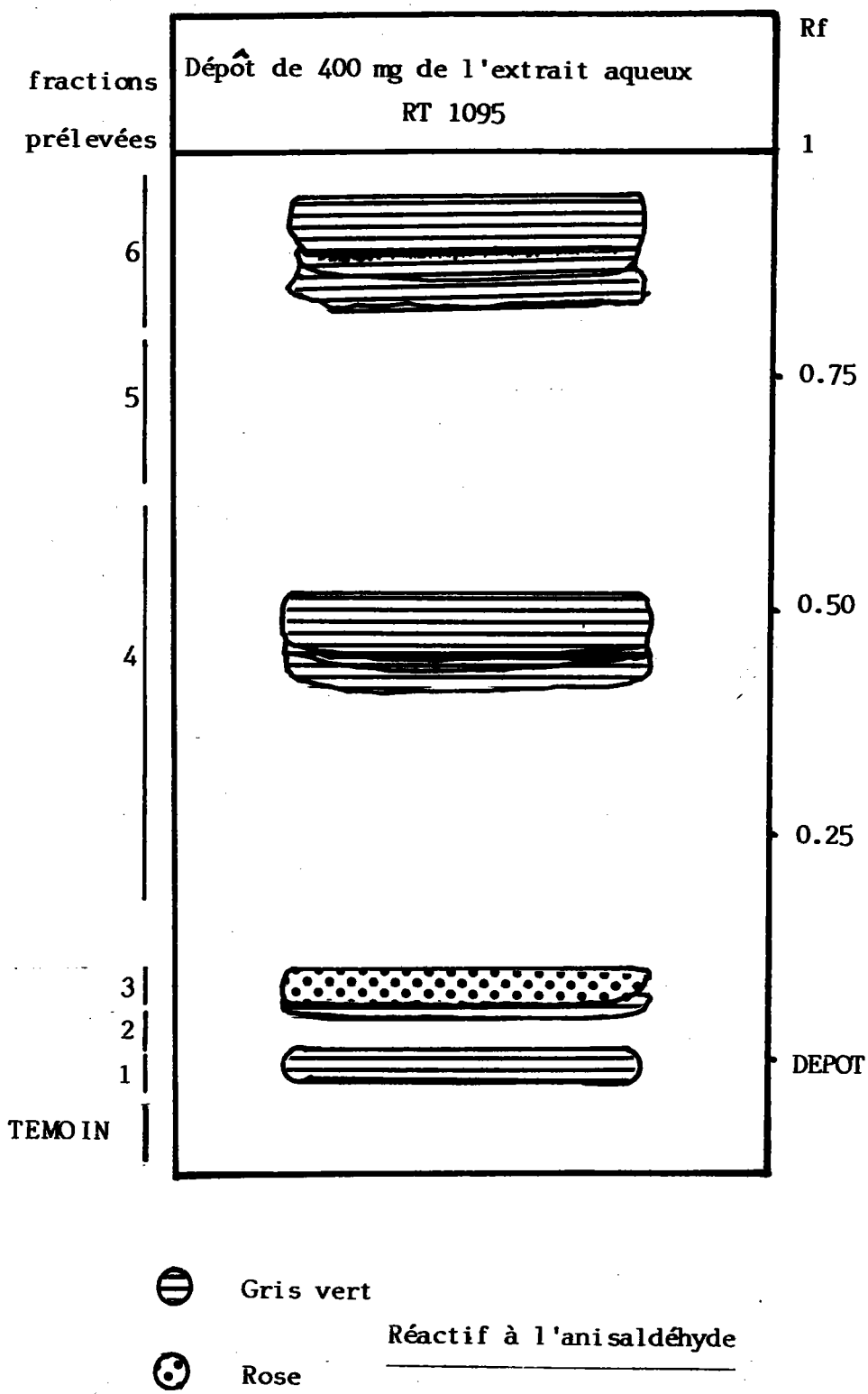


Fig. 72 - CHROMATOGRAMME PREPARATIF DE L'EXTRAIT AQUEUX RT 1095

TABLEAU 60 : INFLUENCE DE DIFFERENTS EXTRAITS (1, 2, 3, 4, 5 et 6) D'E. CALIFORNICA , VOIE I P (0,5 ml/50 g) SUR LES REDRESSEMENTS ET LES MARCHES MONTEES DANS LE TEST DE L'ESCALIER (800 ml/Kg)

N = 5

EXTRAITS / PARAMETRES	Témoin	1	2	3	4	5	6
REDRESSEMENTS ± E.S.	31,6 ± 8,9	20,3 ± 6,9	32,4 ± 14,6	19,20 ± 8,7	26,7 ± 12	28,4 ± 10	25,3 ± 15
VARIATION/ TEMOIN %	/	** - 35,8	+ 2,5	** - 39,2	- 15,5	-10,12	- 20
MARCHES MONTEES ± E.S.	28,6 ± 5,8	19,3 ± 7,6	29 ± 14	24,2 ± 13	28,5 ± 18	27 ± 7	23 ± 13
VARIATION/ TEMOIN %	/	* - 32,5	+ 1,4	- 15,4	- 0,01	- 0,06	- 19,6

* P<0.05 ** P<0.01

Il semble donc que l'activité soit partagée dans les deux fractions, ce qui supposerait qu'E. californica renferme plusieurs substances actives. par ailleurs, si l'on additionne les effets des deux extraits, il semble que l'activité soit partiellement perdue au cours des différentes manipulations de fractionnement.

4.2. EFFET DU TOTUM ALCALOIDIQUE SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS DANS DIFFERENTS TESTS PHARMACOLOGIQUES

4.2.1. Matériel et méthode

4.2.1.1. Extraction des alcaloïdes

La méthode est celle utilisée au paragraphe 2.1.1.1. Toutefois, la fraction alcaloïdique ALC1 est reprise ici par de l'acide chlorhydrique, soit par de l'acide sulfurique afin d'obtenir des sels d'alcaloïde correspondants (chlorhydrates ou sulfates) solublent en milieu acqueux et facilement utilisables pour l'expérimentation pharmacologique. Pour chacun des extraits, la présence des alcaloïdes a été vérifiée par C.C.M. selon la technique précédemment décrite. L'absence d'alcaloïdes dans le résidu RE1 à également été vérifié.

4.2.1.2. Les extraits

Les alcaloïdes obtenus précédemment sous la forme de sulfate ou de chlorhydrate sont redissous dans une solution de NaCl 0,9 %.

4.2.1.3. Les tests pharmacologiques

Nous avons utilisé les tests de la préférence néotique, de l'activi-mètre, et d'induction du sommeil après traitement par une dose infra-hypnotique (25 mg/kg, voie I P) décrits dans le chapitre 1.

Des lots de 10 souris (C) reçoivent par voie I P d'une part, les extraits d'alcaloïdes sous la forme chlorhydrate ou sulfate aux doses de 200 et 400 mg/kg (test de la préférence néotique) ou 400 et 800 mg/kg (test de l'activi-mètre et d'induction du sommeil) et, d'autre part, l'extrait hydro-alcoolique du commerce (nébulisat) utilisé comme produit de référence. Les performances entre les animaux témoins et les animaux traités sont comparées à l'aide des tests statistiques utilisés précédemment (chapitre 1).

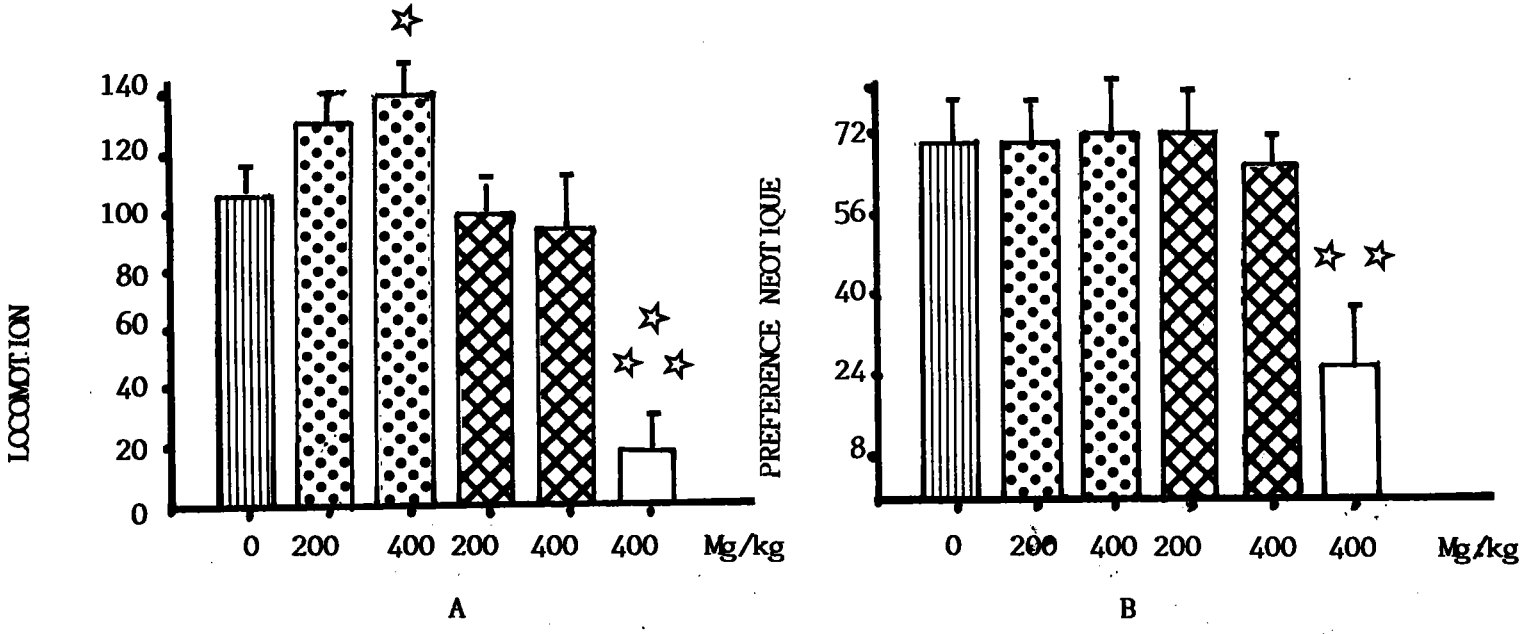


Fig. 73 - EFFET DES EXTRAITS ALCALOIDIQUES, ALC 1, SUR LA PREFERENCE NEOTIQUE ET LA LOCOMOTION DES SOURIS INTRODUITES DANS LE TEST D'EXPLORATION DU MILIEU NOUVEAU.

EN ABSCISSE SONT MENTIONNEES LES DIFFERENTES DOSES (mg/Kg).

EN ORDONNEE SONT PORTEES LES MOYENNES ET LES ERREUR-STANDARDS DES UNITES FRANCHIES (A) ET LA PREFERENCE POUR LE NOUVEAU (%) (B)

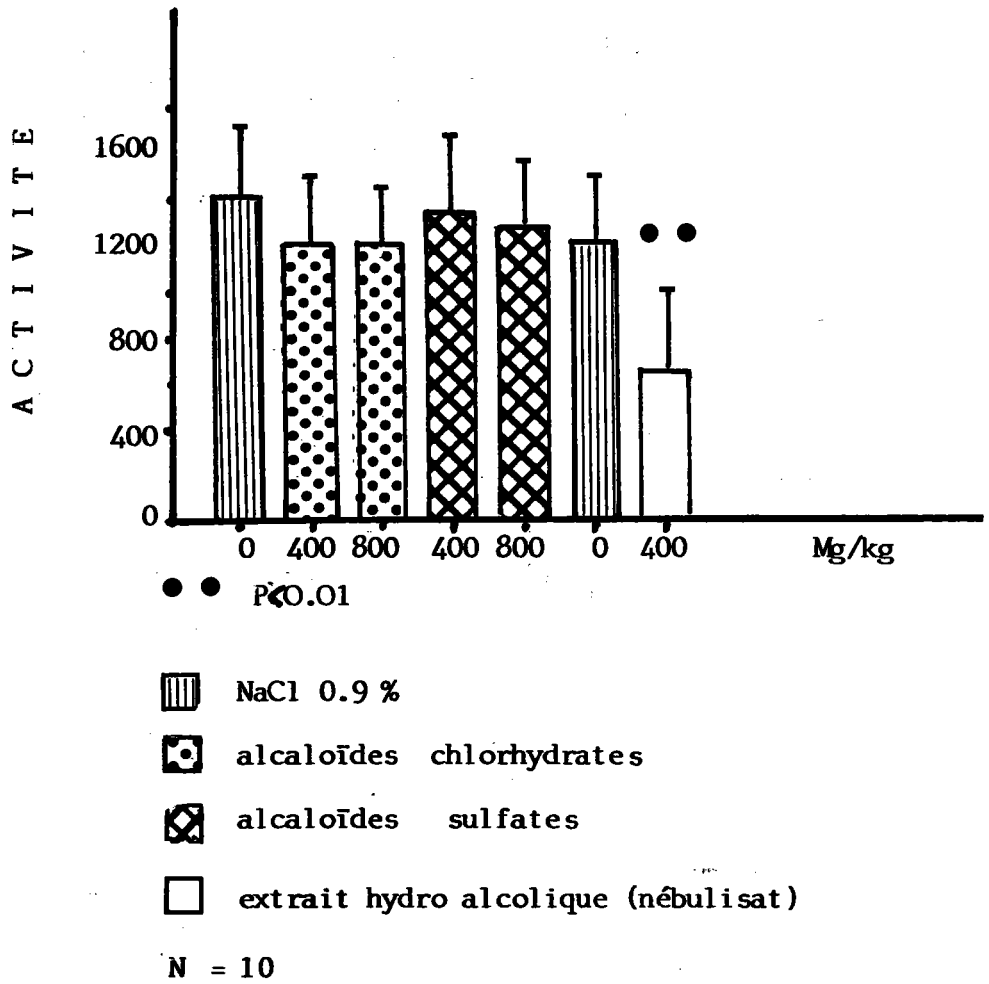


Fig. 74 - EFFET DES EXTRAITS ALCALOIDIQUES, ALC1, SUR L'ACTIVITE DES SOURIS INTRODUITES DANS L'ACTIVI-TEST.

EN ABSCISSE SONT MENTIONNEES LES DIFFERENTES DOSES (mg/Kg).

EN ORDONNEE, SONT REPRESENTEES LES MOYENNES ET LES ERREUR-STANDARDS DE L'ACTIVITE.

TABLEAU 61 - INFLUENCE DES EXTRAITS ALCALOIDIQUES D'E. CALIFORNICA SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES UN PRETRAITEMENT D'UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL SODIQUE (25 mg/Kg)

N = 5

NEBULISAT mg/Kg	EXTRAIT ALCALOIDIQUE mg/Kg		NOMBRE D'ANIMAUX ENDORMIS	TEMPS DE SOMMEIL SECONDES ± E.S.
0	TEMOIN	0	1	/
0	SULFATE	400	2	/
0		800	0	/
0	CHLORHYDRATE	400	1	/
0		800	1	/
400	/		5 *	2537 ± 710

* $P < 0.01$

TABLEAU 62 - INFLUENCE DU RESIDU D'EXTRACTION DES ALCALOIDES (RE1) D'E. CALIFORNICA SUR L'INDUCTION DU SOMMEIL APRES UN PRETRAITEMENT D'UNE DOSE INFRA-HYPNOTIQUE DE PENTOBARBITAL SODIQUE (25 mg/Kg)

N = 5

NEBULISAT mg/Kg	RESIDU D'EXTRACTION DES ALCALOIDES (RE1)	NOMBRE D'ANIMAUX ENDORMIS	TEMPS DE SOMMEIL SECONDES ± E.C.
0	0	1	/
0	200	2	1500 ± 850
0	400	4 *	2210 ± 800
400	0	5**	2537 ± 710

* $P < 0.01$ ** $P < 0.05$

4.2.2. Résultats et discussion.

Les résultats regroupés dans les figures (73, 74) et dans le tableau (61) montrent que les extraits d'alcaloïdes sous la forme chlorhydrate ou sulfate ne modifient pas le comportement des animaux introduits dans le test de la préférence néotique, ni dans le test de l'activi-mètre et n'induisent pas le sommeil des animaux traités avec une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg). Par contre, dans ces trois tests l'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) de référence a montré un effet sédatif important. Il semble donc que les alcaloïdes d'E. californica, dans nos conditions expérimentales, ne soient pas responsables de l'activité sédative.

4.3 EFFET DU RESIDU D'EXTRACTION DES ALCALOIDES (RE1) SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS INTRODUITE DANS LE TEST DE L'OPEN-FIELD ET DE L'ACTIVI-METRE ET SUR LA POTENTIALISATION DU SOMMEIL

4.3.1. Matériel et méthodes

4.3.1.1. Le résidu d'extraction RE1

Le résidu d'extraction (RE1) obtenu précédemment est remis en suspension dans une solution de NaCl 0,9 %.

4.3.1.2. Les tests pharmacologiques

Nous avons utilisé les tests de l'open-field modifié, de l'activi-mètre et d'induction du sommeil après traitement par une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique (25 mg/kg, voie IP), décrits dans le chapitre 1.

Des lots de 10 souris (C) reçoivent par voie I P d'une part, le résidu d'extraction RE1 aux doses de 200 et 400 mg/Kg et, d'autre part l'extrait hydro-alcoolique du commerce (nébulisat) utilisé comme produit de référence, à la dose de 200 mg/kg.

Les performances des animaux traités sont comparées à celles des animaux témoins au moyen des tests statistiques utilisés précédement (cf. Chapitre 1).

4.3.2. Résultats et discussion

Les résultats regroupés dans la figure (75) et dans le tableau 62, montrent que le résidu d'extraction RE1 administré aux doses de 200 et de 400 mg/kg, diminue significativement le nombre de redressements et la locomotion des animaux introduits dans le test de l'open-field (figure 75), la motilité des souris introduites dans l'activi-mètre (figure 75) et induit le sommeil des animaux traités avec une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique (25 mg/kg, voie IP).

A la dose de 200 mg/kg le résidu solide n'a pas modifié le comportement des animaux dans les tests de l'activi-mètre et d'induction du sommeil.

Après avoir isolé les alcaloïdes de l'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) d'E. californica, on peut conclure que l'effet sédatif d'E. californica ne peut être imputable aux alcaloïdes et que la fraction active demeure dans le résidu d'extraction RE1.

Nous avons voulu vérifier, au travers d'un test pharmacologique (test de la préférence néotique), si les précurseurs des alcaloïdes (acides aminés et peptides, dont on a constaté leur présence en grand nombre dans l'extrait hydro-alcoolique) étaient responsables de l'activité d'E. californica.

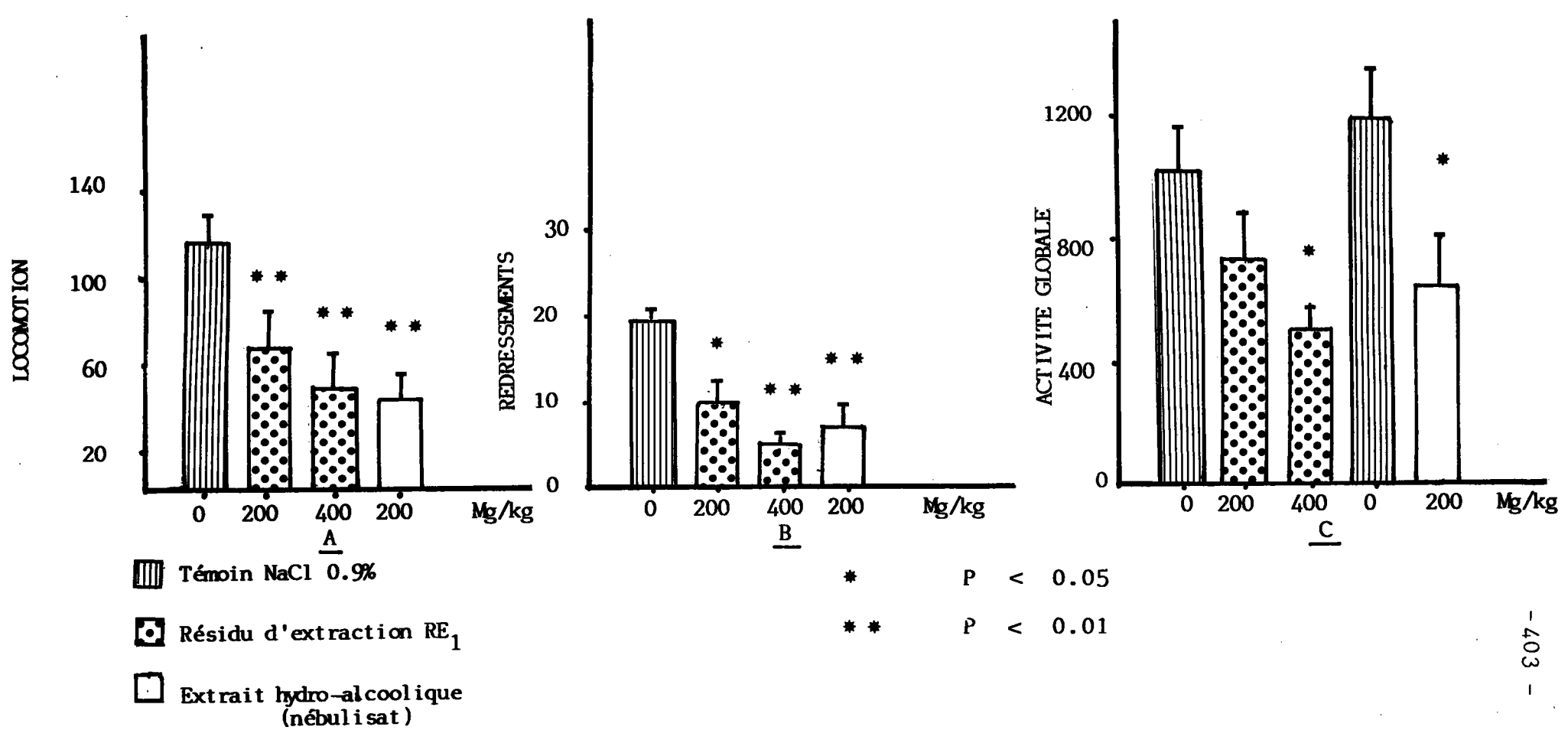


Fig. 75 - INFLUENCE DU RESIDU D'EXTRACTION ET DE L'EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT) SUR LA LOCOMOTION, LES REDRESSEMENTS ET L'ACTIVITE GLOBALE DES SOURIS INTRODUITES DANS L'OPEN-FIELD (A et B) ET DANS L'ACTIVI-METRE (C).

4.4. EFFET DES ACIDES AMINES SUR LE COMPORTEMENT DE LA SOURIS INTRODUITE DANS LE TEST DE LA PREFERENCE NEOTIQUE

4.4.1. Extraction des acides aminés

4.4.1.1. Solution à analyser

200 mg d'extrait hydro-alcoolique (nébulisat) sont dissous dans 10 ml d'une solution aqueuse d'HCL (pH = 2) ce qui correspond à 1 g d'équivalent plante sèche dans 10 ml d'eau distillée.

4.4.1.2. Protocole expérimental

Le principe est identique à celui mentionné pour l'analyse en chaîne automatique (cf. § 3.3.5.2.), mais ici le protocole diffère par le fait que les acides aminés sont fixés sur une résine cationique (Amberlite IR 120, Hohm et Haase, Suisse) puis élués par une solution d'ammoniaque 4N.

- 8 g de résine sont mélangés à de l'eau distillée pendant 6 heures permettant l'hydratation des particules puis sont conditionnés dans une colonne en verre (15 mm de diamètre x 60 cm).

- La résine doit être conditionnée sous la forme H^+ . Pour cela on fait passer un flux de HCl 2N (5 fois le volume de la résine, 2 ml/minutes), puis on lave par de l'eau distillée jusqu'à un pH de la solution d'écoulement de 5.

- La solution de l'échantillon à analyser (pH = 2) est placée en tête de colonne et l'on fait passer un éluant acide (pH = 2) afin de fixer les acides aminés sur la résine. La fraction de l'échantillon non retenu sur la colonne visualisée par sa coloration brune est récupérée et constitue la fraction NR.

- Les amino-acides sont élués de la colonne par une solution d'ammoniaque 4N (fraction R). La présence d'acides aminés a été vérifiée par chromatographie sur couche mince selon le protocole du paragraphe 3.3.5.1.

4.4.2. Le test pharmacologique

4.4.2.1. Matériel et méthodes

* Les extraits

Extrait hydro-alcoolique (nébulisat) : 30mg d'extrait sont mis en solution dans 10 ml d'eau distillée, ce qui correspond à une concentration en équivalent de plante sèche de 150 mg/10 ml.

Fraction NR et R : On prélève une quantité suffisante de ces deux extraits et l'on complète à un volume de 10 ml avec de l'eau physiologique pour obtenir une concentration équivalente en plante sèche de 150 mg/10 ml.

* Protocole expérimental

Nous avons utilisé le test de la préférence néotique décrit dans le Chapitre 1. On enregistre les redressements totaux, la locomotion totale et la préférence néotique globale (10 minutes).

4.4.2.2. Résultats et discussion

Les résultats sont présentés dans la figure 76. Ils mettent en évidence une diminution significative de l'activité locomotrice totale ainsi que des redressements totaux et de la préférence néotique globale chez les animaux traités avec l'extrait hydro-alcoolique et l'extrait NR à la dose de 150mg/kg. Par contre, les substances retenues sur la résine n'ont pas modifié le comportement des animaux placés dans l'enceinte d'exploration. On peut donc conclure que les précurseurs des alcaloïdes ne sont pas responsables de l'activité de l'extrait hydro-alcoolique d'E. californica.

Nous avons tenté d'extraire cette fraction active à partir du résidu solide RE 1 à l'aide de plusieurs solvants d'extraction de polarité décroissante.

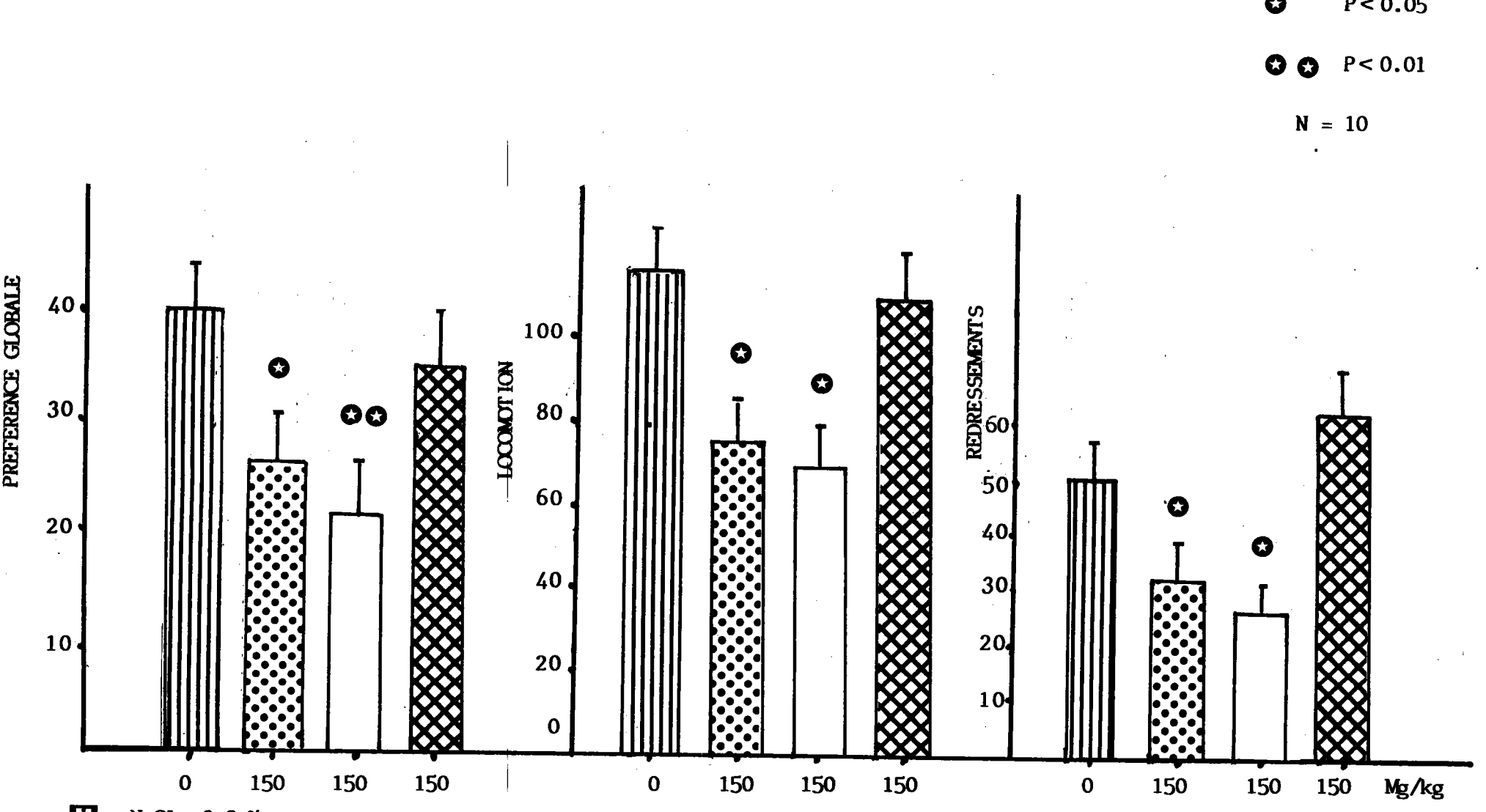


Fig. 76 - INFLUENCE DE L'EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE (NEBULISAT) ET DES FRACTIONS RETENUES (ACIDES AMINES, R) ET NON RETENUES (N R) SUR LA COLONNE CATIONIQUE, SUR LA PREFERENCE GLOBALE, LA LOCOMOTION ET LES REDRESSEMENTS DES ANIMAUX INTRODUITS DANS LE TEST DE LA PREFERENCE NEOTIQUE

4.5. EFFETS DES EXTRAITS ET DES RESIDUS SOLIDES OBTENUS PAR EXTRACTION A PARTIR DU RESIDU SOLIDE RE1 AVEC 3 SOLVANTS DE POLARITE DECROISSANTE

4.5.1. Matériel et méthodes

4.5.1.1. Technique d'extraction (Fig. 77)

Les résidus solides RE2 - RE3 - RE4 sont également redissous par une quantité définie d'eau physiologique.

Des feuilles de Poa sp. sont soumisent au même protocole extractif que précédemment pour constituer des témoins extractions.

4.5.1.2. Le test pharmacologique

Nous avons choisi le test de l'activimètre.

Des lots de 5 ou de 10 souris (C) reçoivent par voie IP, soit des extraits (PHA2 - PHA3 ou PHA4), soit les résidus RE2 - RE3 ou RE4 aux doses de 400 ou de 2000 mg/kg.

La dose de 2000 mg/kg a été choisie pour palier éventuellement à un faible rendement de l'extraction. Les performances des lots traités sont comparées à celles des lots témoins au moyen des tests statistiques utilisés précédemment (cf Chapitre 1).

4.5.2. Résultats et discussion

Les résultats sont regroupés dans la figure 78 .

On constate qu'aucun extrait (chloroformique, acétonique ou méthanolique) ne présente d'activité significative sur le comportement des animaux traités introduits dans l'activimètre. Par contre, les différents résidus d'extraction RE2 - RE3 et RE4 diminuent significativement l'activité de ces animaux à la dose de 2000 mg/kg, toutefois à la dose de 400 mg/kg, seul le résidu RE2 (chloroformique) est efficace.

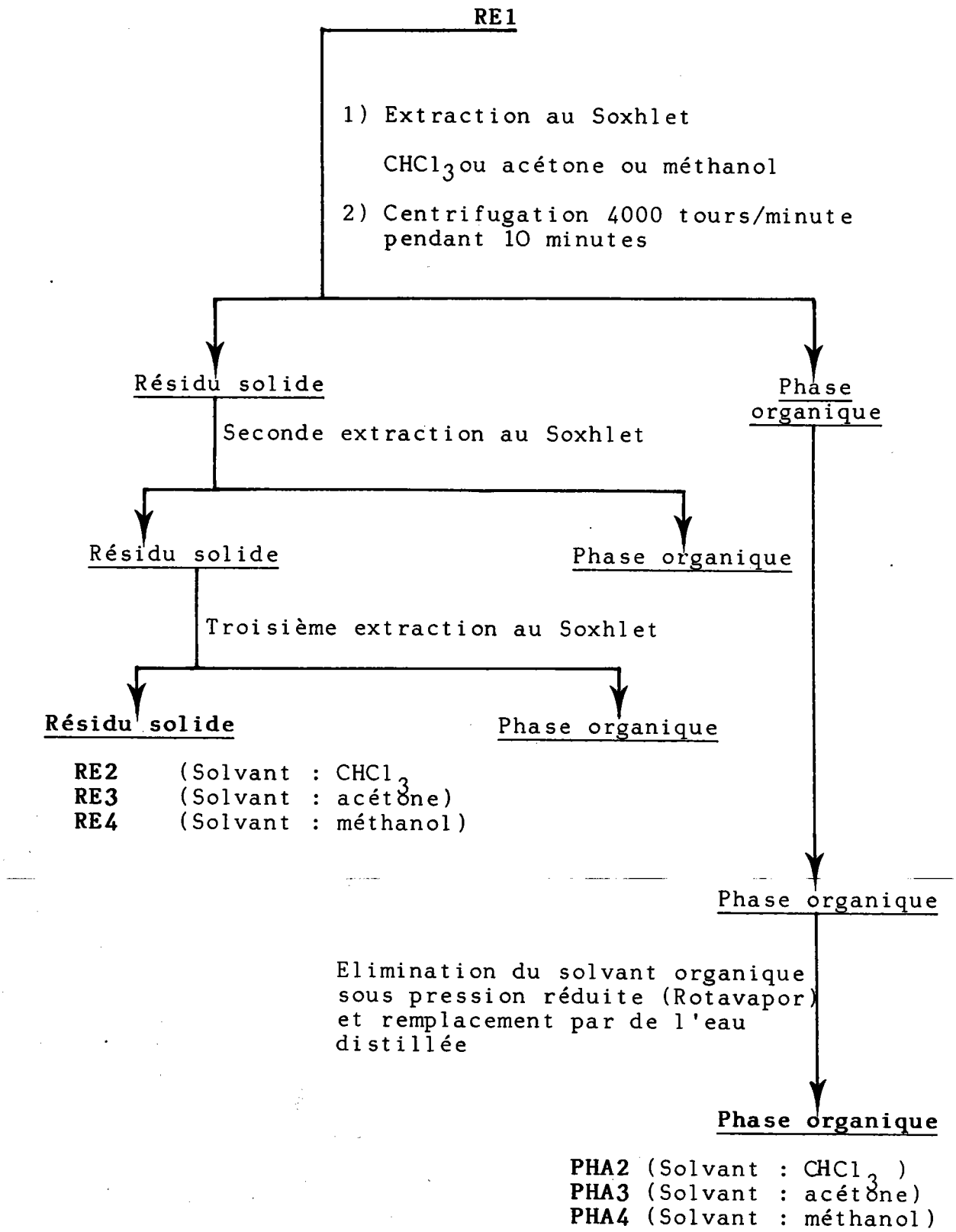


Fig. 77 - **SCHEMA EXTRACTIF D'UNE SUBSTANCE ACTIVE AU MOYEN DE 3 SOLVANTS DE POLARITE DECROISSANTE**

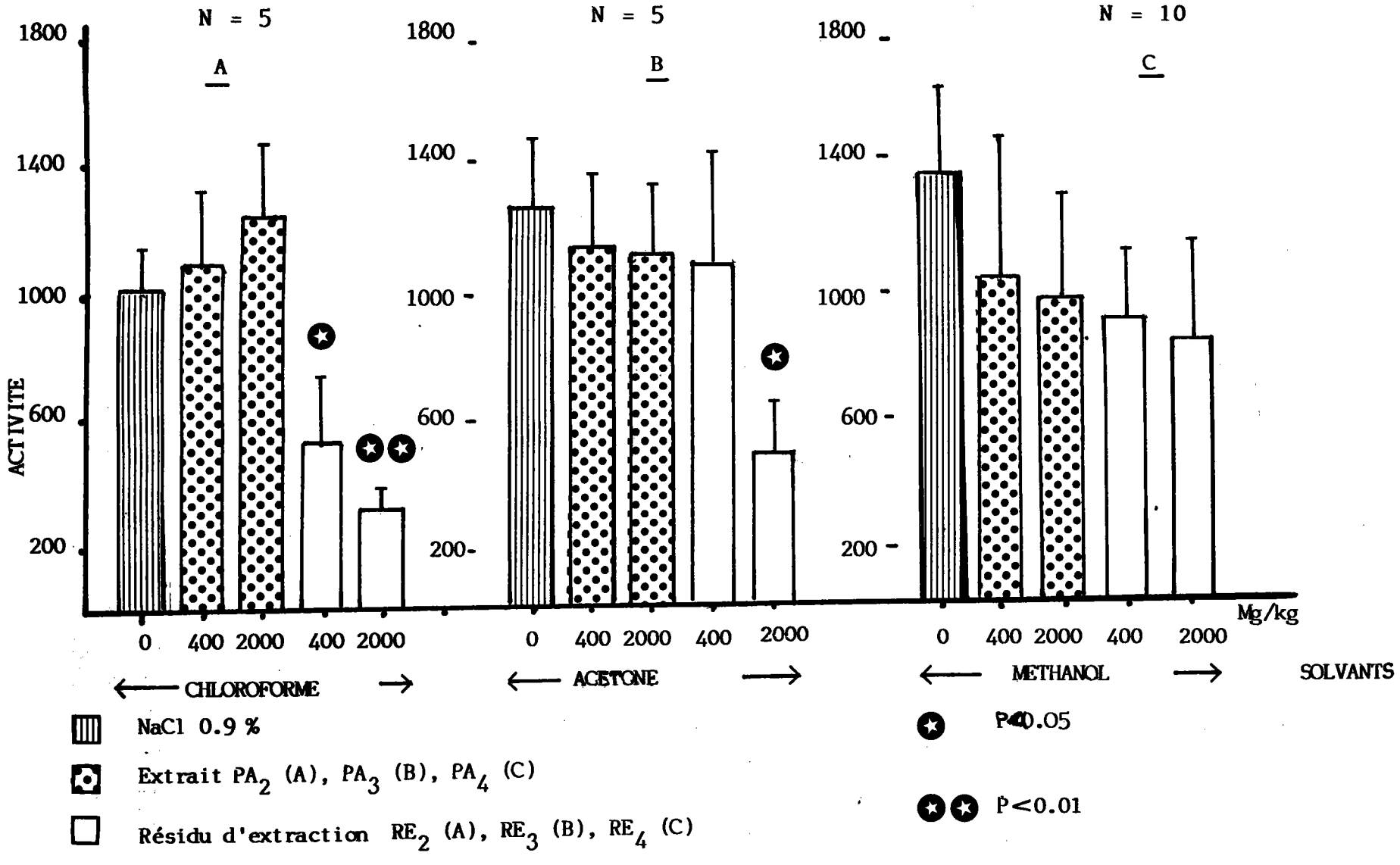


Fig. 78 - INFLUENCE DE DIFFERENTS EXTRAITS (PA_2-PA_3-PA_4) ET RESIDUS D'EXTRACTION (RE_2-RE_3-RE_4) SUR L'ACTIVITE GLOBALE DES ANIMAUX PLACES DANS LE TEST DE L'ACTIVI-METRE

Par comparaison avec les performances des animaux traités avec l'extrait hydro-alcoolique (nébulisat), on constate que la totalité de l'activité a été retrouvée dans le résidu RE2 (chloroformique) à la différence des extraits et résidus d'extraction obtenus avec l'acétone où la presque totalité de l'activité semble avoir été perdue.

En ce qui concerne l'extraction par le méthanol, la tendance des résultats semble montrer que l'on retrouve une partie de l'activité au niveau du résidu RE4 et une partie au niveau de l'extrait PHA4.

CONCLUSION

La phytothérapie impliquées dans les médecines dites "douces" et les secrets de la médecine traditionnelle et des tradipraticiens intéressent depuis plusieurs années les organismes publics de santé et les grands laboratoires pharmaceutiques. C'est dans cet esprit, et du fait de la constante progression de la consommation des médicaments psychotropes, que nous avons été amenés à réaliser un travail d'évaluation pharmacologique et chimique d'une Papaveraceae typique des régions désertiques de Californie, traditionnellement utilisée comme sédatif : Eschscholzia californica Cham.

Il est étonnant de constater la pauvreté des données bibliographiques concernant la pharmacologie de cette espèce, alors que son utilisation en médecine occidentale s'est développée depuis plus de quinze ans sous différentes formes galéniques.

Par une approche scientifique originale, une expérimentation à partir du totum, nous avons tenté d'objectiver l'activité pharmacologique traditionnelle d'E. californica à partir d'un extrait préparé dans l'esprit de la tradition, à l'aide de techniques pharmacologiques et chimiques contemporaines.

* * *

Dans un premier temps, notre objectif a consisté à situer E. californica dans son contexte taxinomique, à préciser les caractères d'identification botanique et à réaliser les coupes histologiques des organes.

Dans le cadre de cette étude botanique, nous avons rapporté selon les informations collationnées dans la bibliographie spécialisée, les caractères du genre ESCHSCHOLZIA qui appartient à la famille Papaveraceae et dont toutes les espèces se trouvent concentrées dans les zones désertiques de l'Ouest des Etats-Unis.

Nous avons remarqué que ce genre botanique était récent (fin du 18ème siècle) et que 112 espèces étaient décrites à la fin du 19ème siècle. Toutefois, après que Greene (1905) ait constaté que des espèces identiques possédaient des noms vernaculaires différents selon les régions d'identification, la plupart des flores américaines ne mentionnent plus que 12 espèces d' Eschscholzia . Les informations recueillies dans la flore des états du Pacifique nous ont permis de

répertorier 7 espèces d'Eschscholzia dont l'espèce typique : Eschscholzia californica Cham. Pour chacune de ces espèces, nous avons rapporté les caractères botaniques, les synonymes connus et les différentes variétés.

L'étude botanique approfondie de l'espèce typique (Eschscholzia californica Cham.) a permis de confirmer tous les caractères spécifiques du genre et d'établir, d'une part les coupes histologiques de la tige, des feuilles et de la racine et, d'autre part de définir les éléments caractéristiques de la poudre. Enfin, cette étude botanique a caractérisé l'espèce californica au sein du genre Eschscholzia par la présence d'un réceptacle constitué de deux rebords, de graines à facettes abondamment réticulées irrégulièrement, et de deux feuilles tripennatifides atteignant le niveau des fleurs.

Dans un deuxième temps, l'étude chimique bibliographique nous a permis de caractériser l'espèce E. californica comme faisant partie de la famille des Papaveraceae par la présence d'un grand nombre d'alcaloïdes appartenant à 6 groupes différents. A quoi s'ajoutent des substances toxiques comme la sanguinarine dans les racines (alcaloïdes) et la linamarine dans les parties aériennes (dérivé cyanogénétique).

Les indications traditionnelles de la littérature mentionnent les propriétés psychotropes de nature sédative d'Eschscholzia californica. Quelques études toxicologiques rapportent la faible toxicité de la teinture mère.

Dans un troisième temps, nous avons dans le cadre de notre travail personnel déterminé le profil pharmacologique d'Eschscholzia californica et mis au point un extrait industriel pilote.

L'étude pharmacologique a été effectuée sur un extrait hydro-alcoolique nébulisé du commerce ; et la mise au point d'un extrait industriel a consisté à définir les conditions de culture et de récolte et à optimiser les systèmes de solvants d'extraction et de déshydratation.

Ce sont les indications thérapeutiques traditionnelles qui nous ont guidé dans le choix des tests pharmacologiques avec pour finalité de confirmer ou d'infirmer la tradition.

PROPRIETES SEDATIVES ET ANXIOLYTIQUES

Propriétés sédatives

E. californica a présenté chez la souris des propriétés psychotropes de nature sédative, mises en évidence par une diminution des activités comportementales à partir de la dose de 150 mg/Kg par voie I.P. Le niveau de la locomotion a été réduit aussi bien dans le test non contraignant (test d'exploration du milieu nouveau) que dans les tests contraignants (test de l'actographe, test de l'activimètre). Nous avons alors remarqué que si l'animal est placé de force par l'expérimentateur dans une enceinte inconnue, la diminution de l'activité locomotrice apparaissait avec les fortes doses, c'est-à-dire 100 mg/Kg et plus (test de l'activimètre ; DI 50 de 276 mg/Kg (271-279) tandis que, lorsque l'animal est libre d'explorer ou non un milieu nouveau (test d'exploration d'un milieu nouveau), l'action sédative sur la locomotion apparaît déjà dès la dose de 50 mg/Kg (DI 50 de 125 mg/Kg (123-127).

Cet effet a pu être interprété comme une réduction du niveau d'activation du système nerveux central ; ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un effet dépresseur du système nerveux central d'E. californica. Par ailleurs, le test de l'actographe a révélé que la sédation est maximale 30 minutes après l'injection de 400 mg/Kg et qu'elle se maintient pendant une heure.

Dans le test de l'escalier, l'effet sédatif d'E. californica (DI 50 = 136mg/Kg (135-137)en ce qui concerne les redressements, 150mg/Kg (149-152)en ce qui concerne les marches montées)® a été comparé à celui du clorazépate dipotassique (Tranxène®) (DI 50 = 15,5 mg/Kg (15,3-15,8) en ce qui concerne les redressements et 22,5 mg/Kg (22,2-22,8) en ce qui concerne les marches montées).

Propriétés anxiolytiques

A faible dose (25 mg/Kg) E. californica augmente les redressements et les marches montées dans le test de l'escalier, le temps de séjour dans l'enceinte claire (test de l'enceinte claire/obscure) et les redressements dans le test de l'open-field modifié. Ces résultats ont été interprétés comme un effet desinhibiteur du comportement des animaux placés de force dans les différentes enceintes. De

même E. californica à la dose de 25 mg/Kg a pour effet de hâter la pénétration des souris dans le compartiment nouveau (test d'exploration du milieu nouveau) et, bien que ce test ne soit pas contraignant, l'effet néophobique créé transitoirement au début du test nous a permis de conclure également à un effet désinhibiteur. Celui-ci, obtenu de manière comparable avec les benzodiazépines à faible dose, peut être interprété comme un effet anxiolytique.

INFLUENCE DE L'EXTRAIT D'E. CALIFORNICA SUR LE SOMMEIL INDUIT PAR LE PENTOBARBITAL ET LE BARBITAL

L'extrait hydro-alcoolique nébulisé d'E. californica, potentialise le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique à partir de la dose de 100 mg/Kg (80 %) et cela de manière dose-dépendante jusqu'à la dose de 800 mg/Kg (200 %). Il induit également le sommeil (400 mg/Kg) chez les souris traitées avec une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique (25 mg/Kg) de façon comparable à l'induction du sommeil obtenue avec une benzodiazépine de référence : le clorazépate dipotassique à la dose de 20 mg/Kg.

L'augmentation du temps de sommeil consécutive à un prétraitement d'E. californica à faible dose (10, 50 mg/Kg) de 6 jours, 3 jours, 1 jour et 30 minutes en comparaison à la potentialisation du sommeil après un prétraitement unique de 30 minutes avait suggéré qu'E. californica pourrait avoir un site d'action au niveau hépatique ; de plus, le pentobarbital est hydroxylé au niveau hépatique par le système cytochrome P 450 en un métabolite inactif. En fait, l'extrait d'E. californica potentialise également le temps de sommeil induit par un autre barbiturique à voie métabolique différente : le barbital. La potentialisation par E. californica du sommeil induit par les deux barbituriques indique que son site d'action est central.

Cette première étude pharmacologique a confirmé les indications traditionnelles d'Eschscholzia californica en tant que sédatif.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'alors nous a laissé penser qu'E. californica présentait un profil pharmacologique proche de celui des tranquillisants mineurs. Cependant, nous nous sommes demandés si ce profil ne pouvait pas s'apparenter à un autre groupe de psychotropes puisque la littérature mentionne des effets semblables -sédatifs et/ou anxiolytiques- avec des neuroleptiques, des antidépresseurs, des anti-histaminiques et certains analgésiques.

RECHERCHE D'UN EFFET NEUROLEPTIQUE - ANTIDEPRESSEUR - ANTI-HISTAMINIQUE, ANALGESIQUE, ANTICONVULSIVANT ET MYORELAXANT

Un screening pharmacologique nous a permis de montrer que l'extrait d'E. californica ne présente pas d'effet cataleptique à forte dose (200 et 800 mg/Kg), ni d'hypothermie importante et durable. A faible dose (25 mg/Kg) et à forte dose (400 mg/Kg), aucun effet protecteur vis à vis de la toxicité de groupe induite par le tartrate d'amphétamine n'a été constaté. Or, un neuroleptique est caractérisé par l'ensemble de ces effets, ce qui nous a conduit à rejeter l'hypothèse d'un tel effet.

L'absence d'effet neuroleptique a pu être confirmé dans deux autres expérimentations : dans le test de la préférence néotique, l'extrait d'E. californica n'a pas antagonisé l'effet anxiogène de la metamphétamine (1 mg/Kg) vis à vis de la préférence néotique ; les stéréotypies induites par le tartrate d'amphétamine n'ont pas été inhibées par l'extrait végétal, alors qu'un neuroleptique de référence : la chlorpromazine, les a diminuées de 38 % à la dose de 20 mg/Kg. En revanche, l'extrait d'E. californica a prolongé l'effet du tartrate d'amphétamine sur les stéréotypies (+ 68 % à 200 mg/Kg et + 78 % à 800 mg/Kg). Cet effet a déjà été observé avec les benzodiazépines.

L'extrait d'E. californica n'a pas d'effet antidépressseur : l'hypothermie, le ptosis et l'akinésie induite par un neuroleptique -la réserpine- n'a pas été antagonisé par l'extrait, ni aux doses moyennes de 50, 100 ou 200 mg/Kg, ni aux fortes doses de 400 et 800 mg/Kg.

Nous avons étendu notre étude aux effets cholinergiques de l'oxotrémorine, puisque les antidépresseurs sont réputés avoir des effets anticholinergiques et là non plus E. californica n'a pas montré d'effet antidépresseur aux doses de 200 et 800 mg/Kg, puisqu'il ne s'est pas opposé ni aux tremblements, larmoiements, ni à la salivation induites par la substance cholinergique, alors que dans la même expérience, l'imipramine a partiellement antagonisé l'ensemble des effets.

L'extrait d'E. californica ne présente pas d'effet anti-histaminique vis à vis des contractions de l'iléon de cobaye induites par une dose d'histamine voisine de la DE 50.

Les expérimentations effectuées sur la recherche d'effets analgésiques centraux (plaque chauffante) et périphériques (test du whriting) n'ont pas permis de révéler un effet analgésique central de l'extrait d'E. californica, mais il est vrai qu'à la dose de 400 mg/Kg, administrée par voie I P , E. californica a supprimé les contractions induites par le stimuli nociceptif d'origine chimique, mais cet effet n'est pas dose-dépendant et n'a pas été antagonisé par la naloxone (1 mg/Kg) ; ce qui tendrait à prouver un effet analgésique de type périphérique. Il n'a pas été possible de préciser si cet effet était dû à une action spécifique sur les structures périphériques directement impliquées dans l'élaboration de la douleur, ou si cette propriété dépend en réalité de son action sédative centrale.

Ces résultats sont à rapprocher des utilisations traditionnelles d'E. californica qui mentionnent son emploi en tant que calmant des maux dentaires et de ventre.

Dans un dernier screening pharmacologique, nous avons montré que, contrairement aux tranquillisants mineurs classiques -les benzodiazépines-, E. californica ne présente pas d'effet anticonvulsivant vis à vis du pentétrazol à faible dose (25 mg/Kg), à moyenne dose (200 mg/Kg) et à forte dose (800 mg/Kg). E. californica n'a pas modifié le comportement des animaux dans le test du Rota-Rod (équilibration) aux doses testées de 100 à 800 mg/Kg ; par contre à forte dose (800 mg/Kg) l'extrait végétal a réduit le tonus musculaire chez 50 % des animaux dans le test de la traction. Ces résultats mettent en évidence un très faible effet myorelaxant qui n'est pas comparable à celui obtenu avec le clorazépate dipotassique.

En revanche, les expérimentations sur la fréquence cardiaque chez la souris et sur l'hypothermie chez la souris et le rat ont montré un profil pharmacologique d'E. californica proche de celui des tranquillisants mineurs, c'est-à-dire une diminution faible et fugace de la température corporelle 30 minutes après administration de l'extrait végétal. Cet effet est moins important chez le rat que chez la souris, et une diminution du rythme cardiaque en fonction du temps des animaux placés dans une situation aversive et traités avec E. californica à la dose de 150 mg/Kg. Dans des conditions stressantes, E. californica n'a pas modifié la pression artérielle mesurée par voie non sanglante.

L'ensemble des résultats a donc mis en évidence un profil pharmacologique du type sédatif-anxiolytique, mais atypique par comparaison à celui des benzodiazépines.

ETUDE IN VIVO ET IN VITRO DE L'AFFINITE D'E. CALIFORNICA SUR LES SITES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES

L'étude in vivo a montré que l'effet anxiolytique à faible dose (25 mg/Kg) d'E. californica, mise en évidence dans le test de l'enceinte claire/obscure par une augmentation du temps passé dans la chambre claire, était totalement bloqué par un antagoniste hautement spécifique des récepteurs aux benzodiazépines : le RO 15-1788 (1 mg/Kg). Lorsque l'on tente de bloquer les effets sédatifs d'E. californica dans le test de l'open-field, le RO 15-1788 à la dose de 10 mg/Kg antagonise la diminution de l'activité locomotrice des souris traitées ; par contre l'antagonisme n'est que partiel pour les redressements. Ces résultats plaident en faveur de l'existence chez E. californica d'une affinité pour les sites récepteurs aux benzodiazépines, bien que le RO 15-1788 semble présenter des effets propres à forte dose (10 mg/Kg) mis en évidence dans le test de l'open-field.

Nous avons tenté de mettre au point une technique de binding permettant la détermination de l'affinité de molécules végétales sur les sites récepteurs des benzodiazépines. Cette technique étudie le déplacement d'une benzodiazépine préalablement fixée sur des sites récepteurs de synaptosomes de cerveau de rat.

Dans une première expérience, l'étude du déplacement du flunitrazépam tritié, fixé sur ses récepteurs spécifiques par une benzodiazépine non marquée (le diazépam) a montré que la méthode mise au point dans notre laboratoire était reproductible et fiable.

Dans l'étude in vitro, E. californica a déplacé à forte dose approximativement 50 % du flunitrazépam fixé. L'effet dose n'a pu être étudié puisque nous n'avons pas pu augmenter les doses en raison de difficultés de filtration apparues à la dose de 80 mg/Kg/essai (équivalent en plante sèche). Plusieurs expérimentations ont montré que le Poa sp., inactif sur le système nerveux central, pouvait à fortes concentrations également déplacer le flunitrazépam des sites récepteurs et perturber également la filtration.

Ceci nous a permis de définir les limites de la technique de binding. Il nous a semblé que les possibilités de l'utilisation d'une technique in vitro, mise au point pour l'évaluation de l'affinité pour les sites récepteurs aux benzodiazépines de molécules pures, sont probablement

limitées par l'apport de molécules inactives constituant une part importante de l'extrait d'E. californica. La concentration dans des proportions importantes du/des principe (s) actif(s) dans l'extrait par une technique de fractionnement appropriée permettrait de diminuer l'apport des molécules inactives et d'obtenir une relation dose effet significative.

MISE AU POINT D'UN PROCEDE D'EXTRACTION ET D'UNE FORME GALENIQUE

Notre intention de développer E. californica dans le secteur pharmaceutique a nécessité d'une part la mise au point d'un procédé d'extraction et d'une forme galénique et, d'autre part la maîtrise de techniques de culture et de récolte.

Nous avons réalisé plusieurs extraits en utilisant soit l'eau, soit l'éthanol comme solvant et différents procédés d'extraction (macération, digestion, percolation) et de dessiccation (plaque chauffante, vide, lyophilisation).

L'étude pharmacologique des différentes préparations a montré que seuls les extraits obtenus par des procédés utilisant la chaleur, comme la digestion aqueuse, la digestion alcoolique, sont actifs (diminution de l'activité globale des animaux traités (400 mg/Kg) et placés dans l'activimètre et induction du sommeil chez les animaux traités par une dose infra-hypnotique de pentobarbital). Par ailleurs, le rôle du solvant est peu important car les extraits aqueux ou hydro-alcooliques sont tout deux pharmacologiquement actifs.

L'extrait obtenu par digestion aqueuse et deshydraté au moyen d'une plaque chauffante présente les effets pharmacologiques les plus importants. ce qui nous a conduit à sélectionner le mode d'extraction pour la réalisation de l'extrait pilote.

Des extraits obtenus à partir de parties aériennes cultivées à l'aide de semences américaines ou Villemorin ont des effets sédatifs identiques dans le test de l'activimètre (diminution de la motilité, 400 mg/Kg) et dans le test d'induction du sommeil.

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE D'E. CALIFORNICA ADMINISTRE PAR VOIE ORALE

La première partie de notre expérimentation ayant montré qu'E. californica présentait un effet anxiolytique à faible dose et un effet sédatif à forte dose lorsqu'il est administré par voie I P , nous nous sommes attachés à retrouver ces effets lorsque l'extrait végétal est administré par voie orale. Cette voie d'administration est plus aisée pour les médications, par contre pour un screening pharmacologique de substances psychotropes chez l'animal, la voie orale perturbe en traitement aigu le comportement des souris, rendant l'interprétation des résultats plus difficile.

Dans ces conditions E. californica, administré par voie orale n'a aucun effet sur la durée du sommeil induit par le pentobarbital, aussi bien chez la souris que chez le rat. On a montré que cette inactivité n'était pas due à une destruction du/des principes(s) actif(s) par l'acide gastrique puisque le nébulisat d'E. californica traité avec l'acide chlorhydrique conserve son action de potentialisation du sommeil. L'inactivité est probablement le fait d'une mauvaise absorption du produit, ou à une dégradation enzymatique digestive, car par voie rectale nous avons retrouvé, chez la souris, l'effet inducteur du sommeil d'E. californica à la dose de 800 mg/Kg après traitement d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg).

Un premier screening pharmacologique utilisant plusieurs excipient couramment utilisés en pharmacie galénique a permis d'en sélectionner un : le labrafil (M 1944C), susceptible d'améliorer l'absorption de l'extrait d'E. californica par voie orale.

Mis en suspension dans un excipient du type labrafil dans une proportion de 80/20 V/V, E. californica à la dose de 1000 mg/Kg diminue l'activité globale des animaux traités et placés dans l'activimètre, et la locomotion des animaux traités et placés dans l'open-field. Ce même traitement augmente le nombre de toilettages et l'habituation des animaux introduits dans l'open-field. On retrouve approximativement 50 % de l'activité sédative de l'extrait hydro-alcoolique administré par voie I P.

L'étude pharmacologique des extraits obtenus à partir de plantes arrivées à des stades de maturité différente, a montré que seules les préparations obtenues à partir des parties aériennes récoltées à la floraison ont présenté des effets sédatifs, puisqu'ils diminuent à la dose de 400 mg/Kg le nombre de redressements et le nombre de marches montées dans le test de l'escalier et qu'ils induisent le sommeil après traitement d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg).

Une étroite collaboration avec les producteurs nous a permis de réaliser une première culture d'E. californica dans le département de l'Aube sur une étendue de 2 hectares (Photo 1). Les drogues ont été récoltées en juin 1986 pour réaliser une préparation industrielle pilote, Réf. : RT 1095.

L'étude toxicologique n'a révélé aucune toxicité aiguë chez la souris et n'a pas mis en évidence de cytotoxicité sur hépatocytes isolés de rat.

A faible dose (25 mg/Kg) l'extrait RT 1095 a montré un effet anxiolytique puisqu'il augmente le nombre de redressements et de marches montées dans le test de l'escalier et augmente le temps de séjour dans l'enceinte claire (test de l'enceinte claire/obscure).

A fortes doses (100 mg/Kg, et plus), l'extrait RT 1095 révèle un effet sédatif par une diminution de la locomotion et des redressements dans le test de la préférence néotique, par une diminution du nombre de redressements et de marches montées dans le test de l'escalier et par une nette induction du sommeil après administration d'une dose infra-hypnotique de pentobarbital (25 mg/Kg).

Un bilan comparatif des effets pharmacologiques de l'extrait RT 1095 et du nébulisat n'a pas mis en évidence de différence importante.

ETUDE CHIMIQUE ET RECHERCHE DE LA FRACTION ACTIVE

Les travaux pharmacologiques ayant mis en évidence une activité psychotrope de nature sédative à forte dose, et anxiolytique à faible dose chez E. californica Cham., nous nous sommes attachés dans une première étape à caractériser, au moyen de réactions chimiques ou de profils chromatographiques, les principaux constituants d'E. californica et, dans une deuxième étape, nous avons tenté de situer cette activité au sein du totum.

L'étude chimique a été effectuée d'une part, sur l'extrait hydro-alcoolique nébulisé, qui a été utilisé pour démontrer l'activité sédative et anxiolytique d'E. californica et, d'autre part, sur l'extrait aqueux industriel pilote : RT 1095.

Les études chromatographiques sur couche mince ont mis en évidence des profils comparables pour les deux extraits et ont révélé la présence d'un grand nombre d'alcaloïdes, d'un acide organique : l'acide malique, d'une quantité importante d'acides aminés libres réagissant au réactif à la ninhydrine, de quelques flavonoïdes et d'un nombre important de substances à propriétés réductrices, révélées par le réactif à la vanilline-sulfurique.

La comparaison des profils chromatographiques des alcaloïdes à montré que l'extrait aqueux RT 1095 renfermait approximativement les mêmes alcaloïdes que le nébulisat, mais en quantité moindre.

D'une part, l'absence de sanguinarine mise en évidence par l'analyse chromatographique d'une substance témoin et, d'autre part, l'absence de dérivés cyanogénétiques démontrés par la réaction au papier picrosodé, ont permis de vérifier que les deux extraits sont dépourvus de ces deux substances toxiques.

L'étude des acides aminés du nébulisat a conduit à l'identification de 23 acides aminés libres.

La double réaction de Stiasny et du perchlorure de fer a mis en évidence l'absence de tannins catéchiques, mais la présence de tannins galliques dans les deux extraits.

La recherche de la fraction active et le fractionnement du totum ont été effectués sur le nébulisat et menés en parallèle avec la pharmacologie.

L'isolement des alcaloïdes totaux au moyen d'une double extraction en milieu aqueux, puis organique, et l'étude pharmacologique des extraits obtenus ont montré que les alcaloïdes, bien que caractéristiques de l'espèce botanique, ne sont pas le support de l'activité d'E. californica Cham. puisque seul le résidu d'extraction débarrassé des alcaloïdes a diminué à la dose de 400 mg/Kg le nombre de redressements, la locomotion des animaux introduits dans le test de l'open-field, la motilité des souris introduites dans l'activimètre et induit le sommeil des animaux traités avec une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique.

Nous avons alors isolé les acides aminés totaux considérés comme les précurseurs métaboliques des alcaloïdes sur une colonne échangeuse de cations. L'étude pharmacologique a mis en évidence des propriétés sédatives (test de la préférence néotique) dans la fraction non retenue sur la résine, c'est-à-dire ne renfermant pas les acides aminés.

A partir du résidu d'extraction des alcaloïdes, il n'a pas été possible d'extraire le/les principe(s) actif(s) au moyen de différents solvants de polarité croissante, puisque l'activité pharmacologique s'est toujours retrouvée dans le résidu d'extraction.

Les premiers résultats n'ayant pu mettre en évidence le/les principe(s) actif(s), la chromatographie sur couche mince préparative avait donc pour but d'isoler une fraction active. Six fractions ont ainsi été obtenues et deux d'entre elles ont présenté une activité sédative (test de l'escalier, test de l'induction du sommeil) non équivalente pour chacune des deux fractions à l'extrait total, mais qui semblent être complémentaires.

Ce qui nous a conduit à supposer que le nébulisat renfermait plusieurs substances actives.

* * *

Les études ainsi menées sont à notre connaissance les premières concernant Eschscholzia californica Cham. Elles ont confirmé les indications traditionnelles en mettant en évidence chez l'animal un effet sédatif à forte dose (100 mg/Kg) et un effet anxiolytique à faible dose (25 mg/Kg) sans que cet effet ne soit imputable à une activité de type neuroleptique, antidépressive, anti-histaminique ou analgésique central. Cet effet s'apparente à celui des tranquillisants mineurs de type clorazépate dipotassique (benzodiazépines).

L'extrait d'E. californica n'est actif par voie orale qu'après association avec un excipient approprié.

La mise au point d'un extrait industriel pilote ouvre la voie du médicament mais des études complémentaires, conformes à la législation en cours, s'avèrent encore nécessaires.

Enfin, l'étude chimique n'a pas permis d'identifier le/les principe(s) actif(s). Aussi, un screening chromatographique, selon un protocole systématique, devrait rapidement répondre à cette question.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMS L., 1964,
Flora of the Pacific States, 223-225,
UNIVERSITY PRESS (eds), Stanford, California.

ADAM E. et E. MAZAZZI, 1956,
Four component analgesic synergism,
Arch. Int. Pharmacodyn., 107, 322-334.

ALBRECHT R., 1972,
Quelques aspects des processus biochimiques intervenant au niveau des enzymes microsomales hépatiques,
Thérapie, XXVII, 751-771.

ALLES G.A., 1952,
A comparative study of the pharmacology of action cryptopine alkaloid,
J. Pharm., 104, 253-263.

ANDARY C., 1975,
Contribution à l'étude botanique, chimique et pharmacologique d'Orobanche rapum-genistae Thuill. (Orobanchacées),
Thése de doctorat en pharmacie, Université de Montpellier 1, faculté de Pharmacie, 336 p.

BABBINI M., N. MONTANARO, P. STROCCHI et M. GAIARDI, 1971,
Enhancement of amphetamine induced stereotyped behavior by benzodiazepines,
Europ. J. Pharmacol., 13, 330-340.

BAILLON H., 1876,
Dictionnaire de botanique, T2, 580 p. HACHETTE (ed.)

BALDACCI R., 1984,
Contribution à l'utilisation en médecine de ville d'Eschscholtzia californica,
Phytothérapie, 9, 31-32.

BARKER L.A., 1985,
Regional variation in the sensitivity of longitudinal smooth muscle to histamine at H1 receptors in guinea pig ileum and colon,
Br. J. Pharmacol., 85, 377-381.

BARKER L.A., 1981,
Histamine H1 and muscarinic récéptor antagonist activity of cimétidine and tiotidine in the guinea pig isolated ileum,
Agents Actions, II, 699-705.

BARKER L.A. et J. EBERSOLEB, 1982,
Histamine H2 receptors on guinea pig ileum myenteric plexus neurons mediate the release of contractile agents,
J. Pharmacol., 221, 69-75.

BARKER L.A. et L.B.HOUGH, 1983,
Selectivity of 4- methylhistamine at H1 and H2 receptors in the guinea pig isoleted ileum,
Br. J. Pharmacol., 80, 65-71.

BELZUNG C., R. MISSLIN, E. VOGEL, R.H. DODD et G. CHAPOUTHIER, 1987,
Anxiogenic effects of méthyl B carboline-3-carboxylate in the light/dark choice situation,
Pharmacologie biochem. And behav., 28, 29-33.

BENOIST J.M., 1975,
Données neurophysiologiques sur le mécanisme de l'action analgésique de la morphine,
Rev. méd., 16, 263-275.

BENOIST J.M. et J.L. MISSET, 1979,
Antalgiques,
dans : Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique, 2, 1049-1091,
GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL, (Eds.),
Expansion Scientifique Française, Paris.

BERNABE J., 1986,
Etude in Vitro des récepteurs aux benzodiazepines,
D.E.A. de toxicologie, Centre des Sciences de l'environnement de Metz, 113 p.

BESSON J.M., 1977,
Effet de la morphine sur la transmission des messages nociceptifs au niveau médullaire,
Act. Pharmacol., 29, 119-141.

BESSON J.M. et D. LE BARS, 1980,
Neurophysiologie de la douleur et niveau d'intervention possible des endomorphines,
dans : Quovadis, (161-173), Muyard J.P., R. Roncucci, (Eds.),
Clin Midy, Montpellier.

BEZANGER-BEAUQUESNE L., M. PINKAS, M. TORCK et F. TROTIN, 1980
Plantes médicinales des régions tempérées ,117-118,
MALOINE (ed.), Paris.

BIDET D. et J.C. GAIGNAULT, 1984,
Récepteurs biologiques et recherche de molécules actives : exemple des récepteurs aux benzodiazépines,
L'actualité chimique, octobre, 17-30.

BOISMARE F., G. STEICHENBERGER, et P. LECHAT, 1967,
Effet potentialisateur comparé exercé par différents neuroleptiques vis à vis de l'action de quelques hypnotiques chez la souris,
Thérapie, XXII, 1317-1321.

BOISSIER J.R., 1961.
Tentative de pharmacologie prévisionnelle dans le domaine des neuroleptiques. Action centrale et adrénolytique de la N. Pipérazine,
Archs. int. Pharmacodyn.,133, 29-49.

BOISSIER J.R. et P. SIMON, 1966,
Etude pharmacologique prévisionnelle d'une substance psychotroppe,
Thérapie, XXI, 799-818.

BOISSIER J.R., C. DUMONT, R. RATOUIS, 1971,
Etude pharmacologique d'un nouvel antidépresseur tricyclique,
Thérapie, XXVI, 459-479.

BOISSIER J.R., P. SIMON, M. ZACZINSKA et J. FICHELLE, 1972
Etude psychopharmacologique experimentale d'une nouvelle substance psychotrope, la 2- ethylamino 6- chloro 4- methyl 4- phenyl 3- 1 benzoxazine,
Thérapie, XXVII, 325-338.

BONETTI E.P., L. PIERI, R. CUMIN, R. SCHAFFNER, M. PIERI, M.R. GIAMZU, R.K.M. MÜLLER et W. HAEFELY, 1982,
Benzodiazepine antagonist RO 15-1788 : Neurological and behavioral effects,
Psychopharmacology, 78, 8-18.

BOSE B.C., A.Q. SAIFI et S.K. SHARMA, 1963,
Chemical and pharmacological studies on Argemone mexicana,
J. Pharm. Sci., 52(12), 1172-1175.

BOURIN M., M. PONCELET, R. CHERMAT, et P. SIMON, 1983,
The value of the réserpine test in psychopharmacology
Arzneimittel forschung, 33(II), 8, 1173-1176.

BOURIN M., A.J. PUECH, P. CHERMAT, L. DOARE, M. PONCELET et P. SIMON, 1981,
Profils psychopharmacologiques des nouveaux antidépresseurs comparés aux antidépresseurs classiques,
Encéphale., 7, 235-242.

BRAESTRUP C. et F. SQUIRES, 1977,
Specific benzodiazépine réceptors in rat brain charactérized by high affinity 3H diazépam binding,
Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (9), 3805-3809.

BREHM H., 1878,
Le monde des plantes, 3,
dans : merveille de la nature, 123-125, BAILLERES J.B. (Ed.),
Paris.

CARVALHO LP., P. VENAULT, M.C. POTIER, R.H. DODD, C.L. BROWN, G. CHAPOUTHIER et J. ROSSIER, 1986,
3-(Methoxycarbonyl)- amino-B- carboline, a selective antagonist of the sedative effects of benzodiazepines,
Europ. J. Pharmacol., 129, 323-332.

CHAIRMAN E.G.V., H.M. BURDET, W.G. CHALONER, V. DEMOULIN, P. HIEPKO, J. MAC NEIL, R.D. MEIKLE, D.H. NICOLSON, R.C. ROLLINS et P.C. SILVA, 1983,
International code of botanical nomenclature.

CHAPOUTIER G., 1987,
Des molécules pour la mémoire,
La recherche, (192), 1258-1260.

CHARLES E. et H.H. BARTLETT, 1920,
Rutin, the flavon pigment of Eschscholtzia californica Chamisso,
J. Biol. Chem., 61, 496-499.

CHENEY R.H., 1963,
Therapeutic potential of Eschscholtzia californica herba,
Quart. J. Crud. Drugs., 3, 413-416.

CHIU T.H. et H.C. ROSENBERG, 1983,
Multiple conformational states of benzodiazepine receptors,
Trends in Pharmacol. Sci., 4(8), 348-350.

CLARCK C., 1978,
Systematic studies of Eschscholtzia californica,
Systematic Botany., 3(4), 374-385.

CLARK C. et J.A. JERNSTEDT, 1978,
Systematic studies of Eschscholzia (Papaveraceae). II. Seed coat microscuplturing,
Systematic Botany, 3(4), 386-402.

COSTA E. et A. GUIDOTTI, 1979,
Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines,
Ann. Rev. Pharmacol. toxicol., 19, 531-545.

COSTA E., A. GUIDOTTI, C.C. MAO et A. SURIA, 1975,
New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines,
Life sciences, 17, 167-186.

COSTA E., A. GUIDOTTI, 1976,
A gaba hypothesis for the action of benzodiazepine,
In : gaba in nervous system function, 413-426, ROBERTS E., T.N. CHASE, D.B. TOWER, (Eds.), Raven Press, New York.

COSTA E., A. GROPPETTI et M.K. NAIMZADA, 1972,
Effects of amphétamine on the turnover rate of brain catécholamine and motor activity,
Br. J. Pharmacol., 44, 742-752.

COURVOISIER, 1956,
J. Clin. Exp. Psychopath., 17, 25-37.

CRAWLEY J.N. et L.G. DAVIS, 1982,
Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains,
Brain res. bull., 8, 609-613.

CRAWLEY J.N. et U.K. GOODWIN, 1980,
Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines,
Pharmacol. Biochem. Behav., 13, 167-170.

DANNEBERG P., R. BAUER, K. BOKE-KUHN, W. HOEFKE, F.J. KUHN, E. LEHR et A. WALLAND, 1986,
General pharmacology of brotizolam in animals,
Arzneim.- Forsch./Drug Res., 36(1), 540-586.

DANTZER R., 1977,
Behavioral effects of benzodiazepines,
Biobehav. Rev., 1, 71-86.

DAVIS W.M., 1962,
Day-night periodicity in pentobarbital responses of mice and the influence of psychological conditions,
Experientia 18, 235-236.

DE CARVALLO L.P., P. VENAULT, M.C. POTIER, R.H. DODD, C. BROWN, G. CHAPOUTIER et J. ROSSIER, 1986,
3-(Methoxycarbonyl)-amino-B-carboline,a selective antagonist of the sedative effects of benzodiazepine,
Europ. J. Pharmacol., 129, 323-332.

DE DEYN P.P. et R.L. MAC.DONALD, 1987,
CGS 9896 and ZK 91296 but not CGS 8216 and RO 15-1788, Are pure benzodiazepine receptor antagonists on mouse neurons in culture,
J. Pharmacol. Exp. Ther., 242(1), 48-55.

DELAVEAU P., 1984,
Eschscholtzia de californie,
Actualités pharmaceutiques, 208, 33-34.

DINGEMANSE J. et D.D. BREIMER, 1984,
Benzodiazepine receptors,
Pharmacy int., 5, 33-36.

DUKA T, M. ACKENHEIL, J. NODERER, A. DOENICKE et R.DOROW, 1986,
Changes in noradrenaline plasma levels and behavioural responses induced by benzodiazepine agonists with the benzodiazepine antagonist RO 15-1788,
Psychopharmacology, 90, 351-357.

DUNHAM N.W. et T.S. MIYA, 1956,
J. Amer. Pharm. Assoc., 46, 208-209.

DUTEIL J., F.A. RAMBERT, J. PESSONNIER, R. GOMBERT et E. ASSOUS, 1979,
A possible L.adrénergic mechanism for drug induced hyperactivity,
Eur. J. Pharmacol., 59, 121-123.

DYKE S.F., 1979,
Les pavots peuvent-ils causer la cécité?,
Act. Chim.,10,24-26.

ENGLER A. et K. PLANTL, 1891,
Die naturlichen pflanzen familien, 3, 137-143, Verlag von Wilhelm Engelmann (ed.), Berlin.

FEDDE F. et A. ENGLER, 1909,
Das Pflanzenreich.Papaveraeae,Hypecoideae et Papaveroideae,
Das Pflanzenreich.(ed.) Leipzig Verlag von Wilhelm Engelmans,
144 - 153.

FERARD J.F., 1986,
Aspect de la toxicologie et de la biosorption du cadmium chez l'algue Chlorella vulgaris,
Thèse d'état ES Sciences, Université de Metz, Centre des Sciences de l'environnement, 222 p.

FILE S. E., 1976,
A comparison of the effects of ethanol and chlordiazepoxide on exploration and its habituation,
Physiol. Psychol., 4, 529-532.

FILE S.E. et S. PELLOW, 1986,
Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist: RO 15-1788,
Psychopharmacology., 88, 1-11.

FILE S.E. et S. PELLOW, 1987,
Behavioral pharmacology of minor tranquillizers,
Pharmac. Ther., 35, 265-290.

FLEURENTIN J., 1983,
Repertoire des pharmacopées traditionnelles du YEMEN et étude pharmacologique de deux espèces à propriétés hépatorénales: Crepis rueppellii et Anisotes trisulcus,
thèse doctorat d'état ES - Sciences pharmaceutique. Nancy 1.

FLEURENTIN J., C. HOEFLER, A. LEXA, F. MORTIER et J.M. PELT, 1986,
Hepatoprotective properties of Crepis rueppellii and Anisotes trisulcus: Two traditonal medecinal plants of YEMEN,
J. Ethnopharm., 16, 105-111.

FREMY E., 1882,
Encyclopédie chimique., DUNODE (Ed.), Paris.,

FRIEDMAN A.H. et C.A. WALKER,
Circadian rhytms in rat mid-brain and caudate nucleus biogenic amine levels,
J. Physiol., 197, 77-85.

GARNIER G., L. BEZANGER BEAUQUESNE et G. DEBRAUX, 1961,
Ressources médicinales de la flore Française, 485-487, VIGOT Frères (Ed.), Paris.

GEE K.W., W.D. HORST, R. O'BRIEN, H.I. YAMAMURA, 1982,
"High affinity inhibition of (3H)-flunitrazepam binding to brain benzodiazepine receptors by CGS 9896, a novel pyrazoloquinoline receptors"
Biochem. biophys., RES. comm., 105, 457-465.

GEE K.W. et H.I. YAMAMURA, 1982,
Regional heterogeneity of benzodiazepine receptors at 37°c: An in vitro study in various regions of the rat brain,
Life Sci., 31, 1939-1945.

GELLER I. et J. SEIFTER, 1960,
The effects of meprobamates, barbiturates, amphetamine and promazine on experimentally-induced conflict in the rat,
Psychopharmacologia, 1, 482-492.

GENEVES L., 1962,
Manipulation de botanique, 52, DUNOD (Ed.),Paris.

GERARDY J., 1982,
Psychopharmacologie du gaba,
J. Pharm. Belg., 37, 435-441.

GERTIG H., 1965,
Alkaloidy maku kalifornijskiego,
Act. Polon. Pharmac., 21(1), 59-64.

GERTIG H., 1965,
Alkaloidy maku kalifornijskiego,
Act. Polon. Pharmac., 22(3), 271-279.

GERTIG H., 1965,
Alkaloidy maku kalifornijskiego,
Act. Polon. Pharmac., 22(4), 359-372.

GERTIG H., 1965,
Alkaloidy maku kalifornijskiego,
Act. Polon. Pharmac., 22(5), 443-448.

GLENN A., 1954,
Alkaloids from sanguinaria canadensis and their influence on growth of phymatotrichum omnivorum,
Plant.Physiol., 377-380.

GODIN Y., L. HEINER, J. MARK et P. MANDEL, 1969,
Effects of di-n-propylacetate, an anticonvulsive compound,on gaba metabolism,
J. Neurochem., 16, 869-873.

GOURET C., R. SERCOMBE, J.A. COSTON, P. BOUVET et G. RAYNAUD, 1973,
Profil psychopharmacologique d'un antidepresseur potentiel appartenant à la série de l'hydroxymethyl 5 oxazolidinone 2 ,
Therapie, 28, 1197 - 1215.

GOURET C. et J. THOMAS, 1973,
Test du ptosis a la réserpine chez la souris,
Fiche technique n° 30,
J.Pharmacol., 4(3), 401-404.

GRAY E.G. et V.P. WHITTAKER, 1960,
The isolation of synaptic vesicles from the central nervous sustem,
Physiological society, 9, 35-37.

GRAY E.G. et V.P. WHITTAKER, 1962,
The isolation of nerve endings from brain: an electron - microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation,
J. Anat., 96, 79-88.

HAEFELY.W., 1983a,
Antagonists of benzodiazepines,
L'encephale, IX, 143B-150B.

HAEFELY W., 1983b,
The biological basis of benzodiazepine actions,
J. Psychoactive drugs., 15 (1-2), 19-38.

HAEFELY W., 1985,
Pharmacology of benzodiazepines antagonists,
Pharmacopsychiatry, 18, 163-166.

HAGER H., 1973,
Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis,4, 831-832,
Springer verlag (Ed.), Berlin, Heidelberg, New York.

HALL C.S., 1934,
Emotional behavior in the rat:1.Defecation and urination as measure of individual differences in emotionality,
J. comp. psychol., 18, 385-403.

HALLIWELL G., R.M. QUINTON et F.E. WILLIAMS,1964,
A comparison of imipramine, chlorpromazine and related drugs in various tests involving automatic function and antagonism of reserpine,
Brit. J. Pharmacol, 23, 330-350.

HAMET R., 1933,
Antagonisme de la chélidonine et de l'adrenaline,
C.R.Acad.Sci.Biol., 112, 31-34.

HANZLICK P.J., 1920,
The pharmacology of chelidonin.,
J. Amer. med. assn., 75, 1324-1325.

HARVEY S.C., 1975,
Hyptnotics and sedatives,
in pharmacological basis of therapeutics, 17, 345-374,
GOODMANN A.G., L.S. GILMAN, (Eds.) Mac millan, New York.

HENDERSHOT L.C. et J. FORSAITH, 1959,
J. Pharmacol., 125, 237.

HENRY T.A., 1924,
Papavers alcaloids, tome I, 2 ème édition Ed. Paris., 247-253.

HO I.K. et R.A. HARRIS, 1981,
Mechanism of action of barbiturates,
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21, 85-111.

HUNKELER W., H. MOHLER, L. PIERI, P. POLC, E.P. BONETTI, R. CUMIN, R. SCHAFFNER et W. HAEFELY, 1981,
Selective antagonist of benzodiazepines,
Nature, 290, 514-516.

INDEX KEWENSIS,.
Plantarum phanerogarum,
2, 1893,729 p.
Sup. 3, 1901-1906, 72 pp; Sup. XI, 1941-1950.

JOHNSTON G.A.R. et M. WILLOW, 1982,
GABA and barbiturate receptors,
in : More about receptors, 111-114, LAMBLE J.W. (Ed.),
Elsevier Biomedical Press., New York.

JORI A., A. BIANCHETTI, et P.E. PRESTINI, 1970,
Relations between barbiturate brain levels and sleeping time in various experimental conditions,
Biochem. Pharmacol., 19, 2687-2694.

KEANE P.E., J. SIMIAND et M. MORRE, 1984,
The quinolines PK 8165 and PK 9084 possess benzodiazepine-like activity in vitro but not in vivo,.
Neuro Sciences letters., 45, 8993p.

KEMPF E., P. MANDEL, A. OLIVERIO et S. PUGLISI-ALLEGRA, 1982,
Circadian variations of noradrénaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine in specific brain areas of C 57BL/6 and BALB/C mice.
Brain Res., 232, 472-478.

KERHARO J. et J.G. ADAM, 1974,
La pharmacopée Sénégalaise traditionnelle, 623-625, VIGOT Freres (Ed.), Paris.

KOSTOWSKI W., E. MALATYNSKA , A. PLAZNIK , W. DYR et W. DANYSZ, 1986,
Comparative studies on antidepressant action of alprazolam in different animal models,.
Pol. J. Pharmacol. Pharm., 38, 471-481.

LANHERS M.C., I. BERTRAND, J FLEURENTIN, P.R. LEHR et J.M. PELT, 1986,.
Influence of Anisotes trisulcus and Crepis rueppellii extracts on sites of bile formation in the rat,
Arzneim. Forsch./Drug Res., 5(1) ,826-829.

LAPIERRE Y.D., 1979,
Nooanaleptiques,
Dans :Pharmacologie clinique: bases de la thérapeutique. 2, 1709-1719, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),
Expansion Scientifique Française, Paris.

LAPIN I.P., 1962.
Qualitative and quantitative relations between the effects of imipramine and chlorpromazine on amphétamine group toxicity,
Psychopharmacologia, 3, 413-422.

LAURENT J.P., 1980,
Mécanisme d'action et effets pharmacologiques des benzodiazépines,
Med. et Hyg.,38,4018-4024.

LECRUBIER Y., R. SERCOMBE, J.A. COSTON, P. BOUVET et G. RAYNAUD, 1979,
Neuroleptiques,
dans : Pharmacologie clinique, Bases de la thérapeutique, 2, 1651-1673, GIROUD J.P., G. MAHE et G. MEYNIEL (Eds.), Expansion Scientifique Française, Paris.

LIM R.K.S., F. GUZMAN,D.W. RODGERS, K. GOTO, C. BRAUN, G.D. DICKERSON et R.J. ENGLE, 1964,
Site of action of narcotic and non narcotic analgesics determined by blocking bradykinin evoked visceral pain,
Arch. int. pharmacodyn., 152, 25-58.

LIPPA A.S.R., D. NASH et E. GREENBLATT, 1979,
Pre-clinical neuropsychopharmacological testing procedures for anxiolitics drugs,
in : Anxiolitics, 41-81, FIELDING S. et H. LAL (Eds.), Pergamon press, New York.

LITCHFIELD J.T. et F. WILCOXON, 1949,
A simplified method of evaluating dose effect experiments,
J. Pharmacol., 96, 99-113.

LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951,
Protein mesurement with the Folin phénolreagent,
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

MANSKE R.H.F. et K.H. SHIN, 1966,
The alkaloïds of papaveraceous plants: Anew alkaloïd, Eschscholtzidine and his structure,
Can. J. Chem., 44, 1259-1260.

MANSKE R.H.F. et K.H. SHIN K., 1964,
The alkaloïds of papaveraceous plants: Eschscholtzia californica Chamisso,
Can. J. Chem., 43, 2180-2189.

MASHI P., 1983,
Etude analytique par méthodes chromatographiques d'extraits d'E. californica,
D.E.S.S. de controle des médicaments, Chatenay-Malabry, 110 p.

MASSON S.T., 1979,
Central noradrénergic cholinergic interaction and locomotor behavior,
Eur. J. Pharmacol., 56, 131-137.

METCALFE C.R. et L. CHALK, 1950,
Anatomy of the dicotyledons, 74-78,
The Clarendon Press (Ed.), Oxford.

MILLER L.G., D.J. GREENBLATT et R.I. SHADER, 1987,
Benzodiazepine réceptor binding: influence of physiologic and pharmacologic factors,
Biopharm. drug disposition, 8, 103-114.

MISSLIN R. et PH. ROPARTZ, 1976,
Effets du di-n-dipropylacetate sur la fréquence cardiaque et l'émotivité de la souris,
C.R. Acad. Sci. Paris, 282, 1541-1543.

MISSLIN R. et PH. ROPARTZ, 1981,
Effects of methamphétamine on novelty seeking behavior by mice,
Psychopharmacologie, 75, 39-43.

MISSLIN R., 1982,
Contribution à l'étude des conduites néotiques chez la souris, thèse Sciences, Université louis pasteur, Strasbourg.

MISSLIN R. et PH. ROPARTZ, 1981,
Effects of methamphétamine on novelty seeking behavior by mice,
Psychopharmacologie, 75, 39-43.

MISSLIN R. et M. CIGRANG, 1984,
Rôle des vibrisses dans le contrôle des réponses aux stimulations nouvelles chez la souris.
Biol. et Behav., 9, 184-191

MISSLIN R., F. HERZOG, B. KORCH et PH. ROPARZ, 1982
Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-adrenal response in the mouse.
Psychoneuroendocrinology, 7, 217-221

MISSLIN R., PH. ROPARTZ et L. JUNG, 1983
Impairment of responses to novelty and its antagonism by neuroleptis in mice.
Psychopharmacology, 82, 113-117

MISSLIN R., PH. ROPARTZ et P. MANDEL, 1975
Etude comparée des effets du di-n-propylacetate et de l'oxazepam sur l'activité spontanée et conditionnée de la souris,
C.R. Acad. Sci. Paris, 281, 1175-1178.

MISSLIN R., PH. ROPARTZ et P. MANDEL, 1976,
Action of di-n-propylacetate on the spontaneous and acquired behaviour in goldfish, mice and rats,
Pharmacol. Biochem. Behav., 4, 643-646.

MÖHLER H. et T. OKADA, 1977,
Properties of 3H-Diazépam binding to benzodiazépine receptors in rat cerebral cortex,
Life Sciences.,20, 2101-2110.

MÖHLER H., 1982,
Benzodiazepine receptors : Are there endogenous ligands in the brain ?
In : more about receptors current reviews in biomedecine, 2, 105-110, Lamble J.W., (Ed.), Elsevier Biomedical, Press, New York.

MOLINENGO R. et H. STEINBERG, 1970,
The staircase maze' and the simple 'staircase' in the analysis of the psychopharmacological action of CNS depressant,
Pharmacology, 4, 169-178.

MORRE N. et P. KEANE, 1983,.
Le site de liaison des benzodiazépines est-il un récepteur?,
L'encéphale,IX, 125-130.

MORTIER F., 1972.
De l'intéret thérapeutique de certains acides organiques aliphatiques constituants de diverses drogues à réputation hépatorénales et en particulier de Cynara scolymus (L.),
Thèse de doctorat de pharmacie , Nancy, 200 p

MULLER W.E., 1987,
The benzodiazepine receptor, 4, 52-113,
Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne.

MUNZ P.A. et D.D. KECK, 1959,
A california flora,
University of california Press BERKELEY , Los Angeles, 196-198.

NORDBERG A., G. WAHLSTROM, 1977,
Effect of long-TERM forced oral barbital administrationon endogenous acetylcholine in different regions of rat brain.,
Eur.j pharmacol.43,237-242.

NORDGREN I., G. LUNDGREN et B. KARLEN,1987,.
Effects of diazepam on muscarinic acethylcholine receptor binding in vivo and on oxotremorine induced tremor and hypothermie in mice,
Pharmacol. Toxicol., 60, 258-261.

OKAMOTO M., 1978,
Barbiturates and alcohol: Coparative overviews on neurophysiology and neurochemistry,
in Psychopharmacology: A generation of progress, 1575-1590,
LIPTON M.A., A. DIMASCIO, K.F. KILLAM (Eds.), New York Raven.

OLSEN R.W., 1982,
Drug interactions at the gaba receptor ionophore complex,:
A. Rev. Pharmac. Toxic,
22, 245-277.

PALMER L., G. LUNDGREN et B. KARLEN, 1980,
A method using L.hyoscyamine for the study of muscarinic acethylcholine receptor binding in vivo,
Pharmacol. and Toxicol., 60, 54-57.

PARIS R.R, H. MOYSE, 1971,
Précis de matière médicale, 1, 2, 3, 416 p, 511 p, 509 p,
JANOT M.M., Masson (Eds.), Paris.

PASSOUANT P. et M. BILLARD, 1978,
Hypno-sédatifs,
in: :Thérapeutique médicale, 226-233,FABRE J.(Ed.) .Médecine Science Flamarion, Paris ,

PELLOW S. et S.E. FILE, 1984,
Multiple sites of action for anxiogenic drug: Behavioural, electrophysiological and biochemical correlations,
Psychopharmacol., 83, 304-315.

POLC P. et W. HAEFELY, 1976,
Effects of two benzodiazepines, Phenobarbitone and baclofen on synaptic transmission in the cat cuneate nucleus,
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 294, 121-131.

POLC P., H. MOHLER et W.E. HAEFELY, 1975,
The effect of diazepam on spinal cord activity: Possible sites and mechanism of action,
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 284, 319-337.

POLC P., E.P. BONETTI, R. SCHAFFNER et W. HAEFELY, 1982,
A three state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist RO 15-1788, benzodiazepine tranquillizers, B-carbolines and phenobarbitone,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. pharmacol.,321,260-264.

PORSOLT R.D., A. LENEGRE, I. AVRIL, S. LANCRENON, L. STERU et G..DOUMONT, 1987,
Psychopharmacological profile of new cognition enhancing agent exifone in the mouse,.
Arznein. Forsch./ Drug res,.37(1), 4, 388-393.

PRIVAT A., 1980,
Substance P et analgésie,
dans Quovadis, 147-159, MUYARD J.P. et RONCUCCI R. (Eds.),
Clin Midy, Montpellier.

RAFFAITIN F. et H. CUCHE, 1983,
Les benzodiazepines: Perspectives pharmacologiques,
L'information psychiatrique, 59(5), 733-743.

RAMBERT F.A., J. PESSONNIER, J.E. DE SEREVILLE, A. POINTEAU et J. DUTEIL, 1986,
Profil psychopharmacologique original de l'Adrafinil chez la souris,
J. Pharmacol., 77, 37-52.

REMMER H., 1972,
Induction of drug metabolizing enzyme system in the liver,
Europ. J. Clin. Pharmacol., 5,116-136.

RICHARDS J.G. et H. MÖHLER, 1984,
Benzodiazepine receptors,
Neuropharmacol., 23(2B), 233-242.

ROLLAND A., 1984,
Standardisation des différents paramètres influents sur le temps de sommeil induit par le pentobarbital sodique chez la souris Swiss,
D.E.A. de toxicologie, Université de Metz, C.S.E., 49p.

ROLLAND A., 1987,
Composition chimique de Eschscholzia californica Cham.(Papaveracées).
Phytotherapy, 22, 18-23.

ROQUES B.P., 1980,
Différentiation des récepteurs morphiniques,
dans : Quovadis? 88-106, MUYARD J.P., R. RONCUCCI (Eds.), Clin Midy, Montpellier.

ROTH S.H., 1979,
Physical mechanisms of anesthesia,
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 19, 159-178.

ROTH S.H., K.S. TAN et J. TOOTH, 1983,
Neuronal membranes can distinguish between structural differences of barbiturates,
Proc. West. Pharmacol. Soc., 26, 243-246.

RUBIN B., M.H. MALONE, M.H. NAUGH et J.C. BURKE, 1957,
Biossay of rauwolfia roots an alkaloids,
J. Pharm. Exp. Thérap., 120, 125 -136.

RUCKEBUSCH Y. et L. BUENO, 1983,
La naloxone: Pharmacologie et intérêt thérapeutique,
Rev. Med. Vét., 134, 77-82.

RUSHTON R. et H. STEINBERG, 1966,
Combined effect of chlordiazepoxide and dexamphetamine on activity of rats in an unfamiliar environment,
Nature, 211, 1312-1313.

SALLE J. et M. BRUNAUD, 1968,
Un nouveau myorelaxant: Le tetrazepam(4.261 CB),.
VI international congress of the C.I.N.P. Tarragona, April , 443-445.

SAMANIN R., A. JORI, S. BERNASCONI, E. MORPUGO et S.GARATTINI, 1977,
Biochemical and pharmacological studies on amineptine(S 1694) and (+) amphetamine in the rat,
J. Pharm. Pharmac., 29, 555-558.

SANOFI, 1968,
Tranxène,
Dossier technique, 30 p.

SATO J., K. ITO, M. SATO, T. AIMOTO, R. KIMURA et T. MURATA, 1979,
Effect of acetazolamide on sleeping time induced with barbiturates in mice: Possible relationship between barbiturate sleep and brain carbonic anhydrase activity,
J.Pharm. Dyn., 2, 133-140.

SATO J., E. OWADA, K. ITO, et T. MURATA, 1980,
Effect of acetazolamide on barbiturate-induced sleeping time in mice: II. Effect on barbiturate levels in the plasma and brain,
Chem. Pharm. Bull., 28(2), 645-647.

SCHMITT H. et H. SCHMITT, 1966,
Valeur de la pharmacologie prévisionnelle dans le domaine des antidépresseurs dérivés de l'iminodibenzyle,
Thérapie, XXI, 653-674.

SCHMITT H., 1973,
Eléments de Pharmacologie,
FLAMMARION (Ed.) Médicale, Paris, 282 p.

SCHMITT J., P. COMOY, M. SUQUET, J. BOITARD, J. LE MEUR, J.J. BASSELIER, M. BRUNAUD et J. SALLE, 1967,
Sur un nouveau myorelaxant de la classe des benzodiazépines: Le tétrazepam,
Bull. Chim. Thérap., 4, 254-259.

SCHWEPPE H., 1959,
in: Paper chromatographie in der botanik, Sringer verlag, Heidelberg, 82.

SEEL V.H., H. STIEDA et G. PEPLAU, 1939,
Pharmakologische und klinische untersuchungen deutscher arzneipflanzen,
Hippokrates, 50, 1281-1287.

SEIFEN E. et R.J. ADAMS, 1979,
Sanguinarine : A positive inotropic alkaloïd wich inhibits cardiac Na+, K+ A.T.P.ase,
Eur. J. Pharmacol., 60, 373-377.

SHANNON H.E. et S. HERLING, 1983,
Discriminative stimulus effects of diazepam in rats evidence for maximal effect,
J. Pharmacol. Exp. Ther., 227, 160-166.

SHARMA R. et K.K. NANDA, 1976,
Effect of photoperiod on growth and development of Eschscholtzia californica Chamisso,
Indian J. Plant Physiol., 19 (2), 202-206.

SIEGMUND J. , 1957,
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 119, 453.

SIEST G., A.M. BATT et M.M. GALTEAU, 1981,
Mesurement and biochemical evaluation of enzyme induction.
in Organ-Directed toxicity chemicals and mechanism., 147-159,
BRON S.F. et D.S. DAVIES (Eds.), Pergamon Press Oxford, New York.

SIMLER S., L. CIESIELSKI, M. MAITRE, H. RANDRIANARISOA, et P. MANDEL, 1973,
Effects of sodium n-d-propylacetate on audiogenic seizures and brain gamma-aminobutyric acid level,
Pharmacology, 22, 1701-1708.

SIMON P. et L. COLONA, 1979,
Antidepresseurs,
dans: Pharmacologie clinique : Bases de la thérapeutique,1633-1649, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.),Expansion Scientifique Francaise, Paris.

SIMON P., R. CHERMAT, L. DOARE, M. BOURIN et R. FARINOTTI, 1982,
Interactions imprévues de divers psychotropes avec les effets du barbital et du pentobarbital chez la souris,
J. Pharmacol., 13(2),241-252.

SIMON P., 1985,
Interactions hypnotiques-psychotropes: Quelques aspects de pharmacologie expérimentale,
J. Pharmacol., 16(1), 1-5.

SLAVIK J. et L. SLAVIKOVA, 1955,
Alkaloïde des kalifornischen kappen-mohns.(Eschscholtzia californica Chamisso),
Czechoslov. Chem. Commun., 20, 27-31.

SLAVIK J. et L. SLAVIKOVA, 1961,
Über alkaloïde aus dicrasnostigma lactucoïdes,
Czechoslov. Chem. Commun., 26, 1839-1844.

SLAVIK J. et J. DOLEJS, 1973,
The constitution of Escholinine and the identity of escholine with magnoflorine,
Czechoslov-.Chem. Commun., 38, 3514-3520.

SLAVIK J., V. NOVAK et L. SLAVIKOVA, 1975,
Alkaloïds from Eschscholtzia lobbii greene,
Czechoslov. chem. Commun., 41, 2429-2432.

SLAVIKOVA L. et J. SLAVIK, 1965,
Über die alkaloïde von drei arten der gattung Eschscholtzia und über die konstitution DES neuen alkaloïde :l'Eschscholamine,
Czechoslov. Chem. Commun., 31, 3362-3371.

SOULIMANI R., 1987,
Recherche d'un effet histaminique ou antihistaminique d'extraits végétaux sur l'iléon de cobaye,
D.E.A. de toxicologie, Université de Metz, C.S.E., 104 p.

SPENCER P.S.T., 1966,
The antagonism of oxotrémorine effects in the mouse by thymoanaleptics,
Life Sciences., 5, 1015 - 1023.

SPETH R.C., A. GUIDOTTI et H.I. YAMAMURA, 1980,
The pharmacology of the benzodiazepines,
in : Neuropharmacology of central nervous system and behavioral disorders, 11, 243-283, PALMER G.C. (Ed.), Academic Press. New York.

Benzodiazepines receptors in rat brain,
Nature, 266, 732-734.

SWAIN J. et J.B. HARBORNE, 1979,
Phytochemistry,
Int. J. Plant. Biochem., 18(2), 303-309.

TATEOKA Y., T. KIMURA, K. WATANABE, I. YAMAMOTO et I.K. HO, 1987,
Potentiation of barbiturate - induced substituted derivatives of phenobarbital, amobarbital and thiopental in mice,
Chem. Pharm. Bull. 35(2), 778-794.

TETAU M. et C. BERGERET, 1972,
Eschscholtzia californica T.M. dans l'insomnie,.
Cahier de biothérapie, 35, 225-226.

TETAU M., C. BERGERET. et D. JEANNES, 1971,
Un phytothérapique précieux dans le traitement de l'insomnie: Eschscholtzia californica T.M. ,Etude botanique , pharmacologique, toxicologique et clinique.
Cahier de biothérapie, 8, 206-212.

THIEBOT M.H. et P. SOUBRIE, 1983,
Behavioral pharmacology of the benzodiazepines,
in : "The benzodiazepines", 67-91,
COSTA E., (Ed.), Raven press. New York.

THONBURG J.F. et K.E. MOORE, 1973,
The relative importance of dopaminergique and noradrenergique neuronal systems for the stimulation of locomotor activity induced by amphétamine and other drugs,
Neuropharmacology, 12, 853-866.

TIEN TUNG P., H.K. FANG, L.K. TAO, C.L. YUN, C.C. HUA et S.C. YU., 1977,
Protective action of schizandrine B on ;hépatique injury in mice,
Chinese médical J., 3(3), 173-180.

TREIT D., 1985,
Animal models for the study anti anxiety agents : A review
Neuroscience et Behav. 9, 203-222.

UNGER J., 1981,
Les plantes sédatives et calmantes,
Act. Pharmac., 182, 38-40.

VAN STEENBRUGGHE A., 1981,
Action d'Eschscholtzia dans le traitement de l'angoisse et l'insomnie,
III ème Congrè international : Les plantes médicinales.

VESELL E.S., 1968,
Genetic and environmental factors affecting hexobarbital induced sleeping time in mice,
Fedn. Proc., 27, 349-355.

WAROT D., C. ADVENIER, P. ETEVENON et J.R. BOISSIER, 1979,
Hypnotiques,
dans : Pharmacologie clinique : Bases de la thérapeutique, 2, 1591-1618, GIROUD J.P., G. MATHE et G. MEYNIEL (Eds.), Expansion Scientifique Française, Paris.

WEISS R.F., 1980,
Vierte uberarbeitate und ergazte auflage lehrbuch der phytotherapie, in Hippokrates verlag, Stuttgart.

WINTER C.A., 1948,
The potentiating effect of antihistaminic drugs upon the sédative action of barbiturates, 7-11.

WITTLE J.A., 1980,
Effect of sanguinarine on ventricule refractorisness,
Resz. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.2, 377-380.

WORMS P., J.P. KAN, A. PERIO, C.G. WERMUTH, K. BIZIERE et R. RONCUCCI, 1986,
Profil pharmacologique original, la minaprine : comparaison avec six antidépresseurs de référence,
J. Pharmacol., 17(2), 126-138.

WRIGHT S., 1973,
Physiologie appliquée à la médecine, Flammarion Médecine Sciences (Ed.), Paris, 606 p.

ZBIERSKA J. et Z KOWALEWSKI, 1979,
Wlasciwosci przeciwnowotworowe antybiotyczne metylojodku chelidoniny,
Herba Polonica., 25, 209-217.

ZBIERSKA J. et Z KOWALEWSKI, 1980,
Wlasciwosci przeciwnowotworowe antybiotyczne metlenku chelidoniny,
Herba Polonica., 26, 61-66.

A N N E X E 1

* ETUDES CLINIQUES

* ACTION PARADOXALE

* STATISTIQUES CONCERNANT L'EFFICACITE D'E. CALIFORNICA POUR COMBATTRE L'INSOMNIE

OBSERVATIONS CLINIQUES.

TETAU ET BERGERET.

- Observation n°1

"Mme H.J...., 72 ans, souffre d'insomnie depuis plusieurs années. De longue date hypertendue (maxima évoluant entre 25 et 18 selon la bonne réussite des traitements), le contexte psychique est mauvais : fond dépressif avec idées de culpabilité évoluant en poussées obsessionnelles paroxystiques, phobies associées.
Mme H.J.... ne trouve le sommeil qu'après la mise en place d'un, quelquefois deux suppositoires de Butobarbital. Elle s'endort après minuit pour se réveiller à 5 heures.
Nous connaissons bien Mme H.J.... que nous traitons depuis 6 ans pour cette hypertension artérielle essentielle et pour l'état nerveux par des méthodes biothérapiques variées : Homéopathie, Organothérapie diluée et dynamisée, Phytothérapie.. Mais à notre grand regret tous nos efforts ont échoué pour arrêter la prise du barbiturique dont il existe des signes d'intolérance, en particulier prurit. Même d'autres somnifères de nature chimique différente, mais tout aussi puissants sont restés sans résultat.
Or, la prescription à titre expérimental d'Eschscholtzia T.M. apporte la solution du problème, à notre grand surprise, vu l'ancienneté des troubles et étant données les propriétés pharmacodynamiques d'Eschscholtzia qui, rappelons le, n'est pas un somnifère au sens habituel du terme.
En effet, ayant vu Mme H.J.... à notre consultation d'octobre 1971, nous lui prescrivons en dehors du traitement indiqué pour son état vasculaire :

Eschscholtzia T.M. (1 flacon de 90 cc)
75 gouttes à prendre au coucher dans un peu d'eau.

Mme H.J...., revue un mois plus tard, nous informe alors que grâce à ce médicament elle peut enfin s'endormir sans butobartital. Elle s'endort quelques minutes plus tard pour se réveiller vers 5 heures du matin.
De temps à autres, certes, quand cette dame est particulièrement énervée, surtout à la suite de difficultés familiales, elle est à nouveau obligée de recourir au barbiturique. Mais alors que sa consommation mensuelle était de 30 à 40 suppositoires, elle n'en a eu besoin que de 6.
Nous continuons depuis 9 mois à prescrire à cette patiente Eschscholtzia T.M. à des doses variants entre 50 et 150 gouttes quotidiennes. Les bons résultats se sont maintenus. L'action spécifique d'Eschscholtzia est aisément vérifiable : en supprimant le médicament durant 1 mois, Mme H.J... ne dort plus. En revanche le mari de Mme H.J...., âgé de 75 ans, insomniaque lui aussi, moins atteint toutefois que son épouse, se révèle rebelle à la médication, même à la dose de 150 gouttes".

OBSERVATION N° 2

"Mme Léonie B..., 71 ans, est une femme maigre, au teint coloré, aux gestes saccadés. Elle est agitée de tics, logorrhéique, congestive. Elle nous consulte deux à trois fois l'an pour son état nerveux, et notamment son insomnie. Celle-ci consiste en un réveil à 3 heures du matin, après un endormissement facile. Mais de ce réveil au petit matin, Mme B... ne se rendort pas, et passe sa nuit dans un état d'agitation anxieuse, qui la laisse épuisée et dépressive le lendemain.
Lachesis, Arsenicum, Ignatia prescrits tour à tour en haute dilution, entraînent périodiquement une bonne amélioration de cet état anxieux et dépressif. Ils sont accompagnés d'un drainage hépato-rénal et intestinal, chez une malade dont l'examen clinique et la biologie sont normaux.
Seule persiste l'insomnie, mieux tolérée mais épuisante. Mme B... s'adonne de temps à autre à une cure de courte durée de somnifères classiques qui la font, dit-elle, dormir, mais lui laissent un lendemain asthénique et l'esprit embrumé. Valeriana T.M. et Passiflora T.M. sont sans effet. Je lui prescris en janvier 1972, Eschscholtzia T.M., 50 gouttes au coucher, à répéter en cas de besoin lors de ce réveil de 3 heures du matin.
Revue le mois suivant, la malade me signale qu'après quelques jours où la répétition de la prise est nécessaire, elle dort assez bien de 22 heures à 6 heures du matin, avec 50 gouttes d'Eschscholtzia T.M. au coucher.
Le remède lui est reconduit pour 3 mois, avec la mission de baisser la posologie de 10 gouttes en 10 gouttes pour trouver elle même la dose efficace suffisante. Je revois récemment Mme B..., qui accompagne son mari venu me consulter. Elle est satisfaite de son sommeil obtenu avec 20 à 30 gouttes le soir, suivant les jours, d'Eschscholtzia T.M. Et même ayant oublié son remède lors des vacances de Pâques, cette période s'est assez bien passée, ce qui encourage la malade à adopter une posologie discontinue d'Eschscholtzia. Je l'encourage à ce traitement au long cours par périodes de 2 à 3 jours par semaine, étant donné le bon résultat, et l'absence de réactions secondaires, comme de toxicité du remède".

TETAU, BERGERET, ET JEANNES.

- Observation n°3 -

"Mme L.T..., 63 ans, fleuriste, souffre depuis plusieurs mois d'insomnie d'endormissement. Le soir, elle se couche fort raisonnablement vers 11 heures mais ne s'endort pas avant 2 ou 3 heures du matin. Elle se réveille à 6 heures complètement épuisée. Le sommeil est agité avec de nombreux cauchemars. Cette insomnie paraît liée à une série de chocs affectifs, deuil en particulier, subis dans la famille.
Mme L.T... présente un contexte dépressif avec anxiété obsessionelle, crises de larmes et fatigue profonde qui ne facilite pas la tâche du médecin. Elle se plaint d'angoisses diurnes avec palpitations, sensations de malaises intenses rendant le travail difficile. Cet état justifie la prescription de nombreux tranquillisants,

qui ont permis la récupération d'un certain calme, mais au détriment de la lucidité, ce dont notre patiente se plaint. Elle ne veut plus entendre parler de chimiothérapie et a recours à nous pour que nous lui établissions ce qu'elle appelle "un traitement naturel".
L'examen clinique est normal, pas d'amaigrissement. Pas de signes thyroïdiens, léger tremblement émotionnel sans signification endocrinienne ou neurologique. Le bilan cardio-vasculaire est rassurant. L'auscultation est normale. Le pouls est à 80 par minute. Tension artérielle 15-8. E.C.G. : rien à signaler. Le laboratoire n'apporte rien de significatif. Légère anémie rouge à 4.200.000 globules rouges. Globules blancs : 5.800. Vitesse de sédimentation: 5 mn la 1ère heure.
Urée : 0,40 g. Glycémie : 1,05 g. Cholestérol : 2,5 g. Nous décidons d'établir un traitement phytothérapeutique en utilisant Eschscholtzia californica teinture-mère, de façon à réamorcer un sommeil physiologique. Mais nous décidons d'associer, compte-tenu des facteurs dépressifs et anxieux, Tilia bourgeons macérat glycériné 1ère décimale dont les propriétés tranquillisantes et l'activité corticodiencéphalique sont maintenant bien connues des médecins phytothérapeutes. Nous supprimons la chimiothérapie.
Nous prescrivons donc :

- Prendre dans un peu d'eau :
  . à midi et au dîner :
  30 gouttes de Tilia bourgeons mac.glyc.1D
  1 flacon 60 cc.

  . au coucher :
  50 gouttes d'Eschscholtzia californica T.M.
  1 flacon 60 cc.

Le premier mois, amélioration notable de Mme L.T... Les angoisses de la journée disparaissent. Le moral est meilleur, le moi plus tonique. Les crises de larmes se raréfient. La fatigue s'atténue. Surtout, Mme L.T... s'endort vers minuit, une heure après avoir gagné son lit. En revanche elle se réveille toujours vers 6 heures du matin et sa fatigue est encore profonde.
Etant donné cette nette amélioration, le même traitement est reconduit durant deux mois, à la même posologie.
A la consultation suivante, on constate que l'état psychique de Mme L.T.... continue à s'améliorer. Pas d'angoisses, pas d'anxiété, pas de larmes. Le sommeil est normal. Mme L.T... s'endort 1/2 heure après le coucher, elle ne se réveille qu'après 7 heures du matin. Une nuit reposante de 8 heures de sommeil est donc récupérée.
La patiente, en se réveillant, se sent bien reposée, pleinement lucide et assume de façon parfaite son activité professionnelle.
Durant les mois qui suivent nous diminuons progressivement les doses de Tilia et d'Eschscholtzia californica T.M. jusqu'à les supprimer totalement en 5 mois environ. Mme L.T... garde sommeil et psyché bien équilibrés".

- Observation n° 1

"Monsieur L.C..., 55 ans, me fut adressé par une amie pour une "desintoxication" médicamenteuse. La liste des produits qu'il avait absorbés et absorbait encore lors de notre première entrevue était impressionnante :

- QUITAXON 10 mg : 3 par jour
- SERESTA 50 mg : 3 par jour
- CARBONATE DE LITHIUM 0,25 : 3 par jour
- MEPRONIZINE : 2 comprimés le soir
- BINOCTAL : 2 comprimés le soir
- TRANXENE 10 : 3 gélules le soir.

Bien qu'intolérant à un tel traitement, bien que souffrant autant de son angoisse que des effets secondaires induits par toutes ces drogues (neuroleptiques, anxiolytiques, antidépressives, correctrices, somnifères, stimulantes) la moindre réduction de l'une ou de l'autre déclenchait de telles recrudescences de l'angoisse, de telles manifestations somato-psychiques spectaculaires que je me sentis prise au piège (les amies vous font des cadeaux parfois..). Bref sa haine des médicaments n'avait d'égale que sa peur vis à vis d'eux, même des plus anodins.

Aucune dose homéopathique, aucun oligo-élément (surtout s'il s'appelait Lithium), aucun extrait végétal, fût-il du tilleul, n'avait grâce à ses yeux.
Il fallut négocier, argumenter, rationnaliser, séduire, supplier, expliquer pour réduire milligramme par milligramme ses drogues et les remplacer par des doses utiles et suffisantes d'oligo-éléments, de phyto-aromathérapie et d'homéopathie conjuguées.
Mais il restait le sommeil, dernier bastion d'une longue évolution mentale, spirituelle, psychothérapique.
La confiance était née avec l'amitié. Nous négociâmes ce reste de chimiothérapie qu'il mettait un point d'honneur à combattre, tant l'assurance d'une parfaite guérison devait, pour lui, passer par cette dernière et terrifiante épreuve.
Eschscholtzia californica T.M. vint à notre secours :

50 gouttes avant le dîner
150 gouttes, voire 200 au coucher !
et parfois 100 la nuit.
Je n'était point trop fière de l'abreuver ainsi de tous ces alcaloïdes dont les noms me trottaient dans la tête...
Enfin au bout de six mois seulement le sommeil devint régulier, paisible et réellement réparateur. Alors sans m'en avertir l'ami L.C..... supprima d'un seul coup (il savait bien que je n'aurais pas été d'accord) toutes ses gouttes d'Eschscholtzia.
Il s'était guéri de toutes ses drogues, y compris de celle-là, sans phénomène de manque, sans assuétude, avec un beau courage.
Oui il dort bien maintenant. Pas absolument tout le temps. Comme tout le monde la vie se charge de le secouer".

- Observation n° 2

"Mme T.... a maintenant 47 ans. C'est une insomniaque de longue date, 20 ans au moins : depuis que sa mère atteinte d'un cancer du sein l'a quittée, suivant de près le décès de son père...
Insomnie "pure" si j'ose dire, uniquement d'endormissement. Il n'existe aucun hypnotique dont elle n'ait épuisé successivement l'action, surdosages y compris !
Mais si l'endormissement est difficile, que dire du réveil ? Le "petit matin blême" se situe aux alentours de 9-10 voire 11 heures où elle commence à émerger après plusieurs bols de café "serré" des brumes anxio-barbituro-hypnotiques.
Que faire ?
Le teint est jaunâtre, la paupière plutôt frippée, le découragement évident.
Voilà bien 5 années que je vois Mme T.... plus ou moins régulièrement.
Schématiquement, la "tactique" a été la suivante :

- Suppression des anxiolytiques dans la journée (le Diazepam n'étant plus réservé qu'aux "coups durs").

- Et remplacement par les sédatifs végétaux en association :

. aromathérapie : Néroli
. phytothérapie : Tilia
Crataegus
Mélisse

- Les oligo-éléments Lithium en particulier, dont les doses n'excédèrent jamais 0,0972 g/jour

- Le soir évidemment tout se complique !
avant dîner et après dîner 3 gélules à base de plantes sédatives et hypnotiques suivantes (en titrex ou nébulisats) :

. Tilia
. Passiflora incarnata
. Valeriana officinalis
. Crataegus oxyacantha
. Eschscholtzia californica

titrex aa 0,05 g

Pour 1 gélule n°6 par jour

- Et par séries alternées :

. ou des suppositoires de bulbinum 9CH
. ou des ampoules de sérotonine 7CH et zone limbique 7CH
. ou des gouttes d'Eschscholtzia en T.M. 150...200

Et nous sommes arrivées elle et moi, cahin-caha à un demi Rohypnol, parfois sans, jamais plus dépasser un et demi.
Ce n'est pas vraiment glorieux mais la santé en général est meilleure :

l'asthénie a régressé, le lever se fait relativement facilement, entre 7 H 30 et 8 H 30, l'activité intellectuelle s'est beaucoup améliorée (cours supérieurs d'anglais et d'espagnol), le teint est plus frais.
Elle est très contente, moi beaucoup moins.
Madame T.... n'a jamais voulu s'astreindre ni à l'apprentissage de la relaxation, ni entreprendre une psychothérapie et encore moins une psychanalyse...
Alors 20 ans après..... Eschscholtzia....".

- Observation n° 3 -

"Monsieur T... 40 ans. Grand, mince, brun, élégant, plus timide que froid, plus inhibé qu'hautain, consulte au decours de sévères difficultés conjugales. Un divorce tumultueux étire la procédure sur plus de 3 ans. Son sommeil, pourtant, pâtit moins que son insertion professionnelle diurne durant toute cette période.
Mais au dernier acte, alors que la bataille, et entre époux et par avocats interposés, se durcit à propos de la garde des enfants et de l'inévitable pension alimentaire, Monsieur T.... se plaint de sérieuses difficultés nocturnes : bien qu'épuisé il retarde l'heure du coucher : à peine allongé son anxiété redouble, mille pensées obsédantes l'assaillent... à peine endormi, le voilà déjà éveillé, en proie à l'angoisse, se voyant à jamais séparé de ses adorables fillettes... Ses réveils ne sont guère plus glorieux... ne doit-il pas se lever à l'instant même où le repos tant cherché l'apaise enfin ?
Un traitement homéopathique, une relaxation, l'avaient pourtant aidé correctement tout au long de cette difficile période.
Je décidai donc d'y adjoindre seulement Eschscholtzia au coucher, 150 gouttes dans un verre d'eau à renouveller en cas d'éveil la nuit.
Cette prescription simple a suffi pour passer le cap le plus difficile de ce divorce orageux".

- Observation n° 4 -

"Mademoiselle B.... 60 ans.
Cette charmante, délicate et bien jolie demoiselle occupait un poste important d'une grande entreprise lorsqu'elle vint me consulter pour la première fois. Une telle douceur, un teint si frais, un ton si mesuré, des yeux si bleus, étonnés, candides presque, cachaient-ils donc une main de fer dans un gant de velours et des nerfs d'acier sous cette fragile enveloppe ?
Oui jusqu'alors....
Mais de profonds bouleversements au sein de sa société, le départ imminent à la retraite de son supérieur hiérarchique direct avaient entamé les ressources mentales et le sommeil de Mademoi-

selle B.... plus que les tribulations pourtant hautes en couleurs, de 30 ans de collaboration étroite avec un patron créatif, certes supérieurement intelligent, mais colérique et exigeant.
Tout cela ne l'avait même pas griffé d'une ride....
Maintenant hélas, Mademoiselle B... ne dormait plus.... enfin ne dormait plus bien : endormissements difficiles, cauchemars, réveils anxieux teintés d'amertume avaient eu raison en quelques mois de cette énergique petite personne.
Bien entendu, elle ne supportait aucun des hypnotiques largement dispensés de façon banale en de telles circonstances.
30 gouttes d'un sédatif doux (Crataegus oxyacantha) matin, midi, 18 heures, calmèrent déjà d'émotives et gênantes palpitations.
Eschscholtzia californica T.M., 100 gouttes dans 1/2 verre d'eau au coucher, eurent raison de son mauvais sommeil en moins de huit jours :

- "cauchemars terminés, palpitations absentes, endormissements parfaits" m'annonça-t-elle triomphante, à la consultation suivante; puis elle ajouta toute rougissante :

- "Mais Docteur, je garde la bouteille sur la table de nuit.. on ne sait jamais, n'est ce pas ?".
Bien que son sommeil ne lui causât plus de soucis, malgré tous les remaniements professionnels auxquels elle dut s'adapter, la même bouteille d'Eschscholtzia californica veilla à son chevet plus d'un an !"..

- ACTION PARADOXALE D'E. CALIFORNICA

L'étude d'Eschscholtzia ne saurait être complète sans souligner de très rares cas paradoxaux dus à ce végétal qui peut induire une insomnie totale ou partielle avec hyperactivité psychomotrice et absence de fatigue.
Eschscholtzia partage avec Tilia cette action paradoxale tout à fait exceptionnelle, mais connue également pour certains médicaments allopathiques : Gardénal ®, Valium ® par exemple.
Voici 3 observations communiquées par le Docteur Michel MARY, à propos d'Eschscholtzia :

. 1er cas

Malade de 26 ans, insomnie d'endormissement avec réveil vers 3 heures du matin. Echec de l'acupuncture (4 séances espacées de 8 jours).
Prescription : prendre le soir à distance du dîner et un peu avant le coucher 3 gélules de

{ Eschscholtzia californica 0,05 g
{ Aerosil

Dès la première prise, état d'éveil et de vigilance de 22 heures à 7-8 heures, puis épuisé, va se coucher et a 8 heures de sommeil.

. 2e cas

Malade de 71 ans. Insomnie d'endormissement et plusieurs réveils nocturnes. Angoisse diurne.
Acupuncture efficace mais effet ne durant jamais plus d'une dizaine de jours.
Prescription : Eschscholtzia californica T.M.
60 gouttes matin et soir
150 gouttes au coucher

Passe sa nuit, dès la première prise, à faire son ménage.
Très fatiguée le jour suivant avec impossibilité de s'endormir avant 1 heure du matin. S'endort avec la sensation d'épuisement. Réveils fréquents, ensuite reprises brutales de très vives cervicalgies et de l'état vertigineux.
La tentative est renouvelée les 2 jours qui suivent avec le même résultat.
Le 4e jour prise d'un Noctran ®. Disparition des cervicalgies et retour à l'état antérieur quant aux pseudo-vertiges.

. 3e cas : malade suivie au dispensaire de COLOMBES.

Malade d'environ 55 ans. Spasmophilie très diversifiée dans ses manifestations.

Eschscholtzia californica T.M.
50 gouttes x 2 dans la journée
100 gouttes au coucher

Dès les premières prises matinales état de surexcitation, de "super" angoisses.
Une nouvelle tentative 15 jours plus tard donne les même résultats.
Pour cette malade un tel effet paradoxal avait été noté avec le Valium ® .

Un début d'explication de ce phénomène paradoxal peut être trouvé dans la physiologie du sommeil décrite au début de la thèse. Sur certains terrains particuliers, très réactifs et instables, la freination par des sédatifs ou sympathicolytiques du système ergotrope serait responsable, par le biais des interactions neurovégétatives, (système sympathique et parasympathique, d'un emballement réciproque de ces systèmes et réponse en hyperfonctionnement en fin de chaîne.

Statistiques concernant l'efficacité d'Eschscholtzia californica pour combattre l'insomnie

- **Etude des Drs TETAU et BERGERET (1972)**

Une étude clinique, sans précision du nombre de cas, de TETAU et BERGERET (affirme qu'Eschscholtzia est efficace dans 60% des insomnies à la dose de 20 à 50 gouttes de T.M. le soir au coucher,

à renouveler au besoin au cours de la nuit (ceci pour une clientèle de ville). Par ailleurs, d'après ces mêmes auteurs, ce médicament n'entraîne pas plus de toxicité que d'accoutumance.

- **Etude du Dr BALDACCI**

. Les statistiques de BALDACCI (91) font état de 86% de très bons et bons résultats (14% d'échecs) aux doses de 1 à 2 grammes de nébulisat.
Reprenons cette étude qui a porté sur 60 cas de clientèle de ville dont deux enfants, 38 femmes et 20 hommes.
Le but recherché a été l'amélioration des troubles du sommeil :

- insomnie d'endormissement
- réveils fréquents
- insomnie de la 2e partie de la nuit
- confort du sommeil

Ces troubles du sommeil étaient tous d'origine fonctionnelle, sans aucun support organique; et quand chez le malade il y avait une maladie organique, celle-ci n'avait pas de rapport avec le trouble du sommeil.
L'anxiété et la sénescence ont été les deux causes principales retrouvées.
Dans 20 cas, les troubles du sommeil n'avaient jamais été traités.
Dans les 40 autres cas, il y avait déjà prescription de somnifères, d'anxiolytiques (essentiellement des benzodiazépines), d'antidépresseurs, ou les trois associés.
L'Eschscholtzia a été utilisé uniquement sous forme de nébulisat, et au départ à la dose uniforme de 2 g chez l'adulte (2 gélules à 0,5 g de nébulisat au dîner et au coucher) et de 0,50 g chez les deux enfants d'une dizaine d'années (une gélule au coucher). Il s'agit du nébulisat commercialisé sous le nom d'Extrénorm par les laboratoires "l'Expansion aromatique française".

Quels sont les résultats obtenus dans les 60 cas considérés, l'utilisation s'étant faite pendant une durée de six mois ?

1 - Nous considérons d'abord les 20 cas pour lesquels les troubles du sommeil n'avaient jamais été traités :

- Il y a eu 12 résultats excellents avec disparition de la difficulté d'endormissement, et retour à un sommeil calme et paisible sans cauchemar, d'une durée moyenne de 6 à 8 heures sans réveil.

- Il y a eu 6 bons résultats, avec une durée d'endormissement moyenne de 1/4 d'heure, quelques réveils nocturnes mais avec ré-endormissement sans difficultés.

- Il y a eu 2 échecs avec abandon rapide de la thérapeutique.

2 - Nous considérons ensuite les 40 autres cas qui étaient déjà traités pour troubles du sommeil :

- Il y a eu 14 résultats excellents, avec suppression totale de la thérapeutique antérieure (il s'agissait chaque fois d'une monothérapie par une benzodiazépine) et retour à un sommeil normal sous Eschscholtzia dans un délai de 1 à 3 mois.
Les 7 autres cas continueront à prendre Eschscholtzia, mais à la dose réduite de 1 g, soit deux gélules au coucher.

- Il y a eu 20 résultats moyens avec diminution, voire suppression d'une partie seulement de la thérapeutique antérieure. La suppression a porté habituellement sur la benzodiazépine, jamais de façon très significative sur l'antidépresseur tricyclique.

- Il y a eu 6 échecs qui sont intéressants à détailler :

. 4 prenaient du Valium ®. A noter que dans les résultats excellents ou moyens, aucun patient ne prenait du Valium ®. Il semblerait donc qu'il soit difficile, voire impossible de remplacer le Valium ® par Eschscholtzia, mais le petit nombre de cas ne permet pas de conclure.

. Le 5e échec était sous traitement neuroleptique.

. Le 6e cas n'est pas un véritable échec, car il s'agissait d'une patiente sous antidépresseur tricyclique, benzodiazépine, barbituriques et neuroleptiques.
Dans un premier temps, la patiente a réussi en conservant l'antidépresseur tricyclique et la benzodiazépine, tout en prenant 3 g d'Eschscholtzia (3 gélules au dîner, 3 gélules au coucher) et en diminuant progressivement, à supprimer en deux mois les barbituriques et le neuroleptique (il s'agissait d'un comprimé d'Eunoctal ® et de 100 mg de Nozinan ® Embonate).
Toutefois la reprise des neuroleptiques a été nécessaire depuis, mais il semble qu'elle ait été sevrée définitivement des barbituriques.

3 - Globalement sur les 60 cas considérés il y a :

- 26 résultats excellents, soit 43%
- 26 résultats bons, soit 43%
- 8 échecs, soit 14%.

Cette statistique se rapporte à une clientèle de ville, rurale et semi-rurale.

Le Docteur BALDACCI (91) affirme l'action certaine, efficace et constante d'Eschscholtzia sur les troubles du sommeil, mais le meilleur résultat est celui de l'amélioration de la qualité du sommeil.
Tous les patients, sans aucune exception, ont vu disparaître leurs cauchemars, leur agitation nocturne et ont retrouvé le confort dans le rêve.

- **Etude du Dr VAN STEENBRUGGHE**

Les statistiques du Docteur Anne VAN STEENBRUGGHE (95) portent sur une clientèle de neuropsychiatrie et sont réalisées à partir d'une étude de 240 cas (étude longitudinale sur 4 ans).

Depuis 4 ans elle a essayé Eschscholtzia quasi-systématiquement dans les cas d'insomnies qui lui étaient présentés. La dose utilisée étant de 50 à 150 gouttes de T.M. ou de 3 à 6 gélules de nébulisat à 0,5 g, au coucher, sans discrimination du mode d'insomnie, qu'elle soit d'endormissement, globale, partielle, du milieu de la nuit, avec des éveils nocturnes fréquents, ou du matin.
Le dépouillement de 240 dossiers sur 4 ans a permis une étude clinique intéressante d'Eschscholtzia.
Les échecs d'abord, lui ont paru particulièrement significatifs. Eschscholtzia s'est avéré totalement inefficace au décours des maladies mentales graves avec insomnie (20 cas) :

- psychoses maniaco-dépressives
- mélancolies
- états délirants plus ou moins anciens
- états démentiels ou de déficits intellectuels plus ou moins avancés.

Par contre, chez les anxieux, dans les dystonies neuro-végétatives, l'étude systématique des résultats montre :

- Pas d'action d'Eschscholtzia sur l'insomnie du matin des déprimés ou des intoxiqués (42 cas)

- Une action peu significative sur les insomnies du milieu de la nuit (37 cas)

- Par contre chez les sujets se plaignant d'excès de rêves et (ou) de cauchemars, Eschscholtzia s'est avéré excellent (10 cas), bon (7 cas), assez bon (5 cas), nul (8 cas).

Mais les meilleurs résultats ont été obtenus dans les insomnies d'endormissement.
Ce type d'insomnie dû à l'angoisse ou l'anxiété réagit très bien aux médicaments de type : Valium (ND) , Librium (ND) , Tranxène (ND) , Seresta (ND) etc... et à Eschscholtzia californica (dans 49 cas nous avons obtenu de bons et très bons résultats, dans 28 autres des résultats partiels et 12 échecs).
L'apport d'Eschscholtzia a permis progressivement de diminuer les somnifères et dans 36 cas de les supprimer totalement.

Au dépouillement de ces 240 dossiers, on a en pourcentage : 53,3% d'échecs, 21,7% de très bons à bons résultats et les 36 cas de sevrage complet, réalisant évidemment le résultat idéal pour un psychothérapeute !, soit 15%.
L'étude de la qualité du sommeil, tel qu'il est décrit par les patients, permet de le définir à travers eux comme : calme et paisible, reposant, sans cauchemar, plus allongé dans le temps.
Non moins intéressante est l'étude du réveil où, contrairement à l'éveil après absorption d'hypnotiques, les malades notent spontanément l'absence de troubles de l'attention, de la concentration. Associations intellectuelles et vitesse de stimuli ne sont pas modifiées et, par ailleurs, ils notent encore une diminution nette de l'anxiété du matin.

TABLEAU RECAPITULATIF :

. ACTION D'ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA SUR 240 CAS D'INSOMNIE (95)

	ECHECS	RESULTATS POSITIFS		
		+	++	+++
MALADIES MENTALES GRAVES	20			
INSOMNIES DU MATIN	42			
INSOMNIES DU MILIEU DE LA NUIT	37			
REVES ET CAUCHEMARS	8	5	7	8
INSOMNIES D'ENDORMISSEMENT	12	←→ 2	8	49
SEVRAGE DES HYPNOTIQUES				36

Si nous traduisons en pourcentage les résultats obtenus, nous obtenons :

- Echecs : 53,3%. Résultats très moyens : 10%
- Bons et très bons résultats : 21,7%
- Sevrage complet des hypnotiques : 15%.

Ce qui au total ne porte les résultats positifs qu'à 36,7%.
Ce pourcentage relativement modeste peut s'expliquer par la lourdeur des patients pris en charge en neuro-psychiatrie (les prescriptions se situant dans un éventail de doses à mi-chemin entre celles de TETAU et BERGERET (92) et celles de BALDACCI (91) : de 150 gouttes à 300 gouttes de T.M. et de 3 à 6 gélules de nébulisat dosées à 0,05 g).

Quant aux effets paradoxaux, rares mais ponctuels, ils méritent d'être connus et cités tout en signalant leur réversibilité rapide et l'absence d'effets secondaires ultérieurs.

A N N E X E II

ETUDE TOXICOLOGIQUE

DE L'EXTRAIT AQUEUX RT 1095

T O X I C I T E A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E. C	1	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	-	-	-	30	31	31	32	32	33	34	34	34	34	35	35	36	36
2	E. C	1	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	32	-	-	-	30	31	32	32	33	33	33	33	33	34	33	35	36	36
3	E. C	1	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	34	-	-	-	32	33	33	33	33	34	34	34	34	34	35	35	36	36
4	E. C	1	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	35	-	-	-	33	34	34	34	35	35	36	36	36	36	36	37	37	38
5	E. C	1	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	34	-	-	-	30	31	32	32	32	33	33	35	35	35	36	37	37	37

SOURIS Swiss ♂.
POIDS 35g
AGE 9 semaines

DATE 3.09.88
HEURE 15h30
MANIP. ROLLAND

PRODUIT E. californica.
REF. RT 1095.
FORME pauche

TOXICITE AIGUE

SYMPTOMATOLOGIE		HEURES				JOURS														SIGNES CUMULES	REMARQUES
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	↘	3↘	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		→ activité normale
	DEMARCHE	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		C : contraction
	CONVULSION	-	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		- absence
	CARACTERE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		N : normal
	TREMBLEMENT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		F : Fermé
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	F	F	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37°C	38°C	35°C	36°5	37°1	37°5	37°4	37°3	37°9	37°6	37°5	37°8	37°4	37°8	37°6	37°6	37°8	37°6		
	MORTALITE CUMULEE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

SOURIS Suisse ♂ DATE 3-09-76 PRODUIT E. californica extrait R.T. 1095

POIDS 35 g. HEURE 15h-30 REF. RT 10.95

AGE 9 semaines MANIP. ROLLAND FORME poudre

→ : Normal
↘ : diminution
— : absence
C : contraction

1 g/Kg

TOXICITE AIGUE

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	–	–	–	31	31	31	32	33	34	35	35	36	35	36	36	36	–
2	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	32	–	–	–	30	31	31	32	32	33	34	34	34	34	35	36	36	–
3	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	–	–	–	32	32	32	33	33	33	34	34	35	35	36	36	36	–
4	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	34	–	–	–	33	33	33	33	33	33	33	34	35	35	36	36	36	–
5	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	34	–	–	–	33	33	34	34	34	34	34	35	35	35	36	36	36	–

SOURIS Swiss ♂

POIDS 35g.

AGE 9 Semaines

DATE 3.09.88

HEURE 15h30

MANIP. ROLLAND

PRODUIT E. calefucia

REF. RT 1095

FORME Poudre

TOXICITE AIGUE

SYMPTOMATOLOGIE		HEURES				JOURS														SIGNES CUMULES	REMARQUES
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	↘	3↘	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		
	DEMARCHE	C	C	C	C	-	-	-	—	-	—	-	-	-	-	-	-	-	-		
	CONVULSION	-	—	-	-	-	-	-	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	CARACTERE	—	-	-	-	-	—	-	—	—	-	—	-	-	-	-	-	-	-		
	TREMBLEMENT	—	-	—	—	-	-	-	-	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.	-	-	-	-	-	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	F	F	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37°C	38°C	35°C	36°5	37°	37°3	37°4	37°3	37°4	37°6	37°5	37°7	37°9	37°8	37°	37°6	37°8	37°6		
MORTALITE CUMULEE		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

SOURIS Swiss ♂ DATE 3-09-86 PRODUIT E. californica extrait R.T. 1095

POIDS 35 g. HEURE 15h-30 REF. RT 10.95

AGE 9 semaines MANIP. ROLLAND FORME poudre

→ : Normal
↘ : diminution
— : absence
C : contraction
N : Normal

4g/Kg

T O X I C I T E A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E.C	8	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	32	–	–	–	29	31	32	33	33	34	34	34	33	32	33	33	33	–
2	E.C	8	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	32	–	–	–	29	30	30	31	32	32	33	34	33	32	33	34	34	–
3	E.C	8	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	–	–	–	30	32	33	33	33	33	33	34	33	33	34	34	35	–
4	E.C	8	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	32	–	–	–	29	31	32	33	33	33	34	34	34	33	34	34	34	–
5	E.C	8	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	32	–	–	–	28	30	31	31	32	32	32	33	33	33	34	34	34	–

SOURIS Swiss ♂

POIDS 35 g.

AGE 9 semaines

DATE 3.09.88

HEURE 15h30.

MANIP. ROLAND

PRODUIT E. californica.

REF. RT 1095.

FORME Poudre.

T O X I C I T E A I G U E

	SYMPTOMATOLOGIE	HEURES				JOURS												SIGNES CUMULES	REMARQUES
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	↘	3↘	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		
	DEMARCHE	C	C	C	C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
	CONVULSION	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
	CARACTERE	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
	TREMBLEMENT	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37°C	35°C	37°C	36°5	37°	37°5	37°5	37°5	37°4	37°6	37°5	37°8	37°9	37°8	37°9	37°8	37°8	37°6		
	MORTALITE CUMULEE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

SOURIS Swiss ♂ DATE 3-09-86 PRODUIT E. californica extrait R.T. 1095

POIDS 35 g. HEURE 15h-30 REF. RT 10.95

AGE 9 semaines MANIP. ROLLAND FORME poudre

→ : Normal
↘ : diminution
– : absence
C : contraction
N : Normal.
F : Ferme

8g/Kg

T O X I C I T E A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS												
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	34	-	-	-	31	32	33	33	34	35	35	35	35	35	36	36	37	-
2	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	-	-	-	30	30	31	32	33	35	35	35	35	35	36	36	37	-
3	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	-	-	-	30	31	31	32	32	33	34	35	35	35	36	36	36	-
4	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	-	-	-	30	31	32	32	33	34	34	34	35	35	36	36	37	-
5	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	33	-	-	-	30	31	32	32	32	33	33	33	33	33	35	36	36	-

SOURIS Souss ♂

POIDS 35 g.

AGE 9 semaines

DATE 3-09-88

HEURE 15h30

MANIP. ROLLAND

PRODUIT E. californica.

REF. AT 1095.

FORME pouche.

T O X I C I T E A I G U E

	SYMPTOMATOLOGIE	HEURES 1/4	1	2	4	JOURS 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	SIGNES CUMULES	REMARQUES
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	↘	3↘	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		
	DEMARCHE	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	CONVULSION	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	CARACTERE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	TREMBLEMENT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	F	F	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37°C	38°C	38°C	36°5	37°	37°3	37°4	37°3	37°4	37°6	37°5	37°7	37°9	37°8	37°6	37°8	37°8	37°6		
	MORTALITE CUMULEE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

SOURIS Suisse ♂ DATE 3-09-86 PRODUIT E. californica extrait R.T. 1095

POIDS 35 g. HEURE 15h-30 REF. RT 10.95

AGE 9 semaines MANIP. ROLLAND FORME poudre

→ : Normal
↘ : diminution
— : absence
C : contraction

1 6 g / Kg

TOXICITE AIGUE

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E.C ~~1g/l~~	1	MORTALITE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			POIDS	28	-	-	-	26	26	27	28	29	29	30	31	31	30	31	32	32	33
2	E.C	1	MORTALITE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			POIDS	28	-	-	-	28	28	28	29	29	28	28	29	29	29	30	31	31	31
3	E.C	1	MORTALITE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			POIDS	27	-	-	-	25	26	26	26	27	27	28	28	28	28	28	29	30	31
4	E.C	1	MORTALITE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			POIDS	29	-	-	-	27	27	27	27	27	27	27	27	28	28	29	29	30	30
5	E.C	1	MORTALITE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			POIDS	28	-	-	-	29	29	29	29	29	29	29	30	30	30	31	32	32	32

SOURIS Souris ♀

POIDS 35g.

AGE 9 semaines

DATE 3-09-86

HEURE 15h30

MANIP. ROLLAND

PRODUIT E. californica . extrait RT1095

REF. RT1095 1g/Kg.

FORME Poudre.

TOXICITE AIGUE

	SYMPTOMATOLOGIE	HEURES				JOURS														SIGNES CUMULES	REMARQUES
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	→	9 ↘ 17 →	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		↘ diminution d'activité
	DEMARCHE	C	C	C	C	3 C 17 N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		— : absence
	CONVULSION	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		C : contraction
	CARACTERE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		N : Normal
	TREMBLEMENT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		F : Fermé
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.																				
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	F	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37,2	34,5	35,5	37,6	37,5	37,6	37	37,5	37,3	37,4	37,5	37,6	37,4	37,4	37,5	37,4	37,4	37,5		
	MORTALITE CUMULEE																				

SOURIS Swiss ♀ DATE 3-09-86 PRODUIT Poudre

TOXICITE AIGUE

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	27	–	–	–	26	27	27	27	28	27	27	28	29	29	30	31	31	31
2	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	"
			POIDS	28	–	–	–	27	27	27	27	27	27	27	28	28	28	29	29	30	30
3	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	"
			POIDS	27	–	–	–	26	26	27	28	28	28	29	29	29	28	29	29	30	31
4	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	26	–	–	–	25	25	25	26	27	27	28	28	28	28	29	30	30	31
5	E.C	4	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	29	–	–	–	28	28	28	28	28	28	28	29	29	29	29	30	30	30

SOURIS Souris ♀

POIDS 35g

AGE 9 semaines

DATE 3-09-86

HEURE 15h30

MANIP. ROLLAND

PRODUIT E. californica AT 1095.

REF. AT 1095.

FORME Poudre

4 g/Kg.

T O X I C I T E A I G U E

	SYMPTOMATOLOGIE	HEURES				JOURS														SIGNES CUMULES	REMARQUES
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	→	9 ↘ 17 →	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		↘ diminution d'activité
	DEMARCHE	C	C	C	C	3 C 17 N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		— : absence
	CONVULSION	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		C : contraction
	CARACTERE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		N : Normal
	TREMBLEMENT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		F : Fermé
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.																				
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	F	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37°2	34°3	35°	36°9	37°1	37°5	37°4	37°5	37°6	37°9	37°5	37°4	37°3	37°6	37°5	37°2	32°7	37°2		
	MORTALITE CUMULEE																				

T O X I C I T E A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS												
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E.C	8	MORTALITE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
			POIDS	28	-	-	-	25	27	27	28	28	29	29	29	28	29	30	30	30	-
2	E.C	8	MORTALITE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
			POIDS	28	-	-	-	25	27	28	28	29	30	30	30	30	30	30	31	32	-
3	E.C	8	MORTALITE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
			POIDS	29	—	-	-	26	28	29	29	30	31	31	31	31	31	31	32	33	-
4	E.C	8	MORTALITE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
			POIDS	28	-	-	-	25	27	28	28	29	30	30	30	30	31	31	31	31	-
5	E.C	8	MORTALITE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
			POIDS	30	—	-	—	17	29	29	29	29	30	30	30	30	31	31	31	31	-

SOURIS Swiss ♀
POIDS 35g.
AGE 9 semaines

DATE 03.04.86
HEURE 15h30
MANIP. ROLLAND

PRODUIT E. californica
REF. RT 1095
FORME Poudre.

TOXICITE AIGUE

	SYMPTOMATOLOGIE	HEURES				JOURS														SIGNES CUMULES	REMARQUES
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	→	9 ↘ 17→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		↘ diminution d'activité
	DEMARCHE	C	C	C	C	3 C 17 N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		— : absence
	CONVULSION	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		C : contraction
	CARACTERE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		N : Normal
	TREMBLEMENT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		F : Fermé
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.																				
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	F	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37,2	33,9	34°	35°	37,2	36,9	37,5	37,6	37,1	37,4	37,5	37,6	57,5	37,6	37,5	37,4	37,9	37,6		
	MORTALITE CUMULEE																				

T O X I C I T E A I G U E

N°	PRODUIT	DOSE mg/Kg	PARAMETRES	HEURES				JOURS													
				1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	30	-	-	-	27	28	29	29	29	29	30	30	29	29	30	31	31	31
2	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	29	-	-	-	26	27	28	29	29	30	30	30	30	30	31	31	31	31
3	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	28	-	-	-	25	27	27	28	28	29	30	30	30	30	32	32	33	33
4	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	28	-	-	-	24	27	27	27	27	27	28	28	28	29	30	31	32	32
5	E.C	16	MORTALITE	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
			POIDS	28	-	-	-	24	27	27	27	27	27	27	28	28	28	29	29	29	30

SOURIS Souris Suisse

POIDS 35g.

AGE 9Semaines

DATE 3.09.88

HEURE 15h 30

MANIP. ROLLAND

PRODUIT E. californica.

REF. AT 10 95.

FORME Poudre.

TOXICITE AIGUE

	SYMPTOMATOLOGIE	HEURES				JOURS														SIGNES CUMULES	REMARQUES
		1/4	1	2	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
COMPORTEMENT	ACTIVITE	↘	↘	↘	→	9 ↘ 17→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→		↘ diminution d'activité
	DEMARCHE	C	C	C	C	3 C 17 N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		— : absence
	CONVULSION	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		C : contraction
	CARACTERE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		N : Normal
	TREMBLEMENT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		F : Fermé
ASPECT EXTER.	ETAT NUTRIT.																				
	FOURRURE	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	PEAU	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	YEUX	F	F	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	OREILLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DENTS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	MUQUEUSES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
FONCTIONS	RESPIRATION	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	DIGESTION																				
	SELLES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	URINES	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
	CARDIO-VASC.																				
	TEMPERATURE (sonde rectale)	37°2	33°9	34°	34°9	36°9	37°2	37°2	37°1	37°3	37°4	37°3	37°4	37°	37°4	37°6	37°3	39°4	37°3		
	MORTALITE CUMULEE																				

COMPOSITION CHIMIQUE DE ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA CHAMISSO (PAPAVERACÉES)

La composition chimique d'Eschscholtzia californica chamisso est classée selon les groupes chimiques suivants : alcaloïdes des groupes de la pavine, protopinè, N-benzophenanthridine, aporphine, protoberberine et benzyl tetrahydroisoquinoleine ; carotenoïde ; dérivés cyanogénétiques.

Chemical composition of Eschscholtzia californica chamisso have been classified according to the following chemical groupes. Alkaloids (pavine, protopine, N-benzophenantridine. Aporphine, protoberberine and benzyl tetrahydroisoquinoleine), carotenoid and cyanogenetics compounds.

MOTS CLÉS

Eschscholtzia californica alcaloïdes, composition chimique.

ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA (Papaveracées), originaire de Californie et du Nord de l'Amérique centrale (Nouveau Mexique) (Bezanger - Beauquesne, 1980), est une plante herbacée annuelle atteignant une taille de 30 à 60 cm de hauteur. La plante est rarement bisannuelle ou vivace, elle doit son nom à un botaniste Russe : Eschsholtz (1793-1831) qui l'a découverte au début du XIX[e] siècle.

La plante se développe spontanément dans les sols secs et sablonneux aux pourtours des zones désertiques grâce à ses racines profondes. Aujourd'hui E. californica forme des populations denses s'étendant du bord ouest des déserts du Mojave et du Sonora, aux côtes pacifiques californiennes (Brehm, 1978). Cependant, sa souplesse écologique lui a permis de s'adapter dans des régions tempérées et E. californica se rencontre fréquemment comme plante d'ornementation, en raison de la couleur jaune d'or de ses pétales, dans des pays comme la France (Eschscholtzie, Pavot de Californie, globe du soleil), l'Angleterre (California Poppy), l'Allemagne (Kalifornisches Mohn), l'Italie (Papavero di california), l'Espagne (Anapola de California), la Turquie (Kalifornıya hashasi), la Hollande (Yound Papaver). L'espèce E. californica présente deux sous espèces selon son origine : l'espèce E. californica ssp -california et E. californica ssp Mexicana (Clark, 1978). La racine est profonde et renflée, la tige, ascendante et légèrement cannelées est de couleur glauque. Les feuilles sont stipulées et alternes et les fleurs formées de quatre pétales disposées en deux verticilles de deux pétales alors que les deux sépales sont soudés (Baillon, 1876 ; Deysson, 1979 ; Tutin et coll., 1964).

Traditionnellement, E. californica a été utilisé par les indigènes et les premiers colons de Californie comme produit alimentaire en utilisant les feuilles cuites. Mais cette espèce fut également utilisée pour ses vertus thérapeutiques notamment : en usage interne comme analgésique, pour lutter contre les maux de dents et pour diminuer la lactation, et en usage externe sous forme de cataplasme contre les ulcères (Cheney, 1964).

Actuellement, les parties aériennes d'E. californica sont prescrites sous forme de teinture, d'infusion ou de décoction à la dose de 1 à 5 grammes par jour pour ses propriétés sédatives, calmantes et analgésiques. En France, des formes galéniques diverses réalisées à partir des parties aériennes séchées sont indiquées dans les troubles du sommeil et comme sédatif. En Allemagne, E. californica est utilisée dans les neuropathies de l'enfant et dans l'anurésie nocturne. En Europe et au Nord-Ouest des Etats-Unis la plante est prescrite comme somnifère en particulier chez l'enfant atteint de coqueluche, usage d'autant plus intéressant que cette espèce végétale ne présenterait pas d'effet secondaire à composante dépressive ou d'accoutumance.

COMPOSITION CHIMIQUE

Ce sont les alcaloïdes qui ont été principalement étudiés et en particulier par des auteurs Polonais (Gertig, 1965), Tchechoslovaque (Slavik et Slavikova, 1955) et Américaine (Manske, 1960).

A. ROLLAND[a], J. FLEURENTIN[a], F. MORTIER[b] et J.M. PELT[a,c]

a : Laboratoire de Pharmacognosie, Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, 1, rue des Récollets, (57000 Metz, France).

b : Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de Nancy ; 5, rue Albert Lebrun, (54000 Nancy, France)

c : Institut Européen d'Ecologie, (57000 Metz, France)

A. - LES ALCALOÏDES

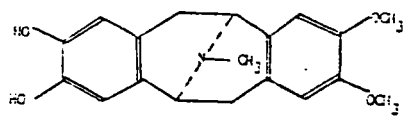
Les racines renferment 1,62 % d'alcaloïdes essentiellement sous forme cristallisée alors que les parties aériennes n'en referment que 0,29 % dont 37 % sous forme cristallisée.

Les alcoloïdes totaux peuvent être extraits soit à partir des racines, soit à partir des parties aériennes par extraction en phase benzenique après alcalinisation à la potasse de la plante broyée (Gertig, 1964, 1965). Les différents groupes d'alcaloïdes sont alors séparés par des extractions fractionnées soit en phase organique, soit en phase aqueuse (Gertig, 1964, 1965). La biosynthèse des alcaloïdes peut varier selon les zones climatologiques et les conditions écologiques (Manske, 1950 ; Brindejonc, 1911).

Six groupes d'alcaloïdes ont été répertoriés.

1) Groupe de la Pavine

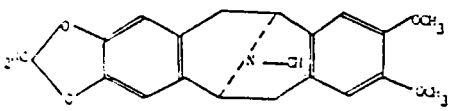
Bisnorargémonine : $C_{19}\ H_{21}\ NO_4$
Masse molaire : 327 ;
Point de fusion 254°C.
Solubilité : Ethanol, chloroforme, éthylacétate.
Cette structure a été trouvée dans les racines (Slavik et Slavikova, 1970).



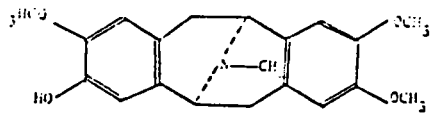
Eschscholtzine : $C_{19}\ H_{17}\ NO_4$
Masse molaire : 323 ;
Point de fusion 246°C.
Solubilité : Ethanol, chloroforme, éthylacétate.
La structure rencontrées dans la plante entière est spécifique du genre (Manske, 1964, 1965).



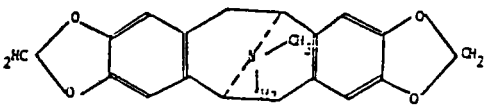
Eschscholtzidine : $C_{20}\ H_{24}\ NO_4$
Masse molaire : 329 ;
Point de fusion : 230°C.
Solubilite : Ethanol, chloroforme, ethylacetate.
La structure rencontrée dans la plante entière est spécifique du genre (Manske, 1966).



Norargemomine : $C_{20}\ H_{23}\ NO_4$
Masse molaire : 341.
Solubilite : Ethanol, chloroforme, ethylacetate.
La structure a été identifiée dans les racines (Slavik, 1970).

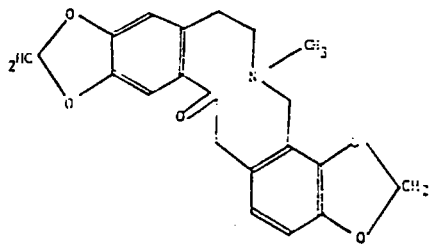


Californidine : $C_{20}\ H_{20}\ NO_4$
Masse molaire : 338.
La structure a été identifiée dans les parties aériennes (Slavik 1969, 1973).



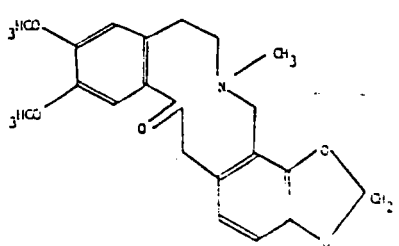
2) Groupe de la protopine.

Protopine ou Fumarine : $C_{20}\ H_{19}\ NO_5$
Masse molaire : 353,36 ;
Point de fusion : 208°C.
Solubilité dans l'Ethanol et l'Ether.
La structure a été identifiée dans la plante entière (Henry, 1924, Slavik, 1955, 1965, Manske, 1964) mais sa teneur est plus importante dans les racines (Slavik, 1955) ; c'est un alcaloïde classique de la famille des papaveracées.



La protopine est toxique et provoque chez la grenouille une bradycardie qui n'est pas inversée par l'atropine. La systole est légère et incomplète avec une diastole prolongée. Aux fortes doses, les contractions deviennent irrégulières avec fibrillation ventriculaire. (Kerharo et Adam, 1974). Selon Molokhova et coll. 1973, la protopine présente des propriétés antisérotonine et anti-inflammatoire.

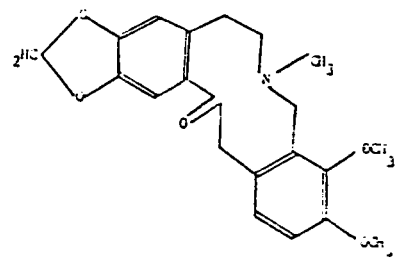
Cryptopine : $C_{21}\ H_{23}\ NO_5$
Masse molaire : 369.40 ;
Point de fusion : 218°C.
Solubilité : Ethanol, chloroforme.
La structure a été identifiée dans la plante entière (Manske, 1964).



La cryptopine réduit le rythme respiratoire par une action centrale et provoque une arythmie cardiaque pouvant aboutir à un arrêt cardiaque en diastole (Heatcote 1924).

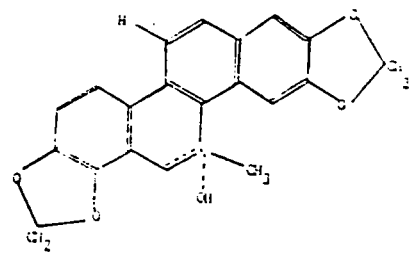
α et β allocryptopine : $C_{21}\ H_{23}\ NO_5$
Masse molaire : 369,40 ;
Point de fusion : 160°C.
L'α allocryptopine est présente uniquement dans les parties aériennes en très faible quantité (0,04 %) alors que la allocryptopine n'est présente que dans les racines à une teneur de 1,07 % (Slavik, 1955, 1965).
L'allocryptopine peut exister chez les végétaux soit sous la forme qui est la seule pharmacologiquement active, soit sous la forme inactive (Slavik, 1955, 1965).

L'α allocryptopine ralentit les mouvements cardiaques chez le rat et la grenouille tout en prolongeant la systole, par contre elle induit une bradycardie chez le chat et le lapin à la dose de 10-20 mg/kg (Alles, 1952). L' allocryptopine possède une action directe sur le myocarde qui n'est pas inversée par l'atropine, l'acétylécholine, ou la pilocarpine.



Groupe du N-Benzophenanthridine : à noyau isoquinoleine et naphtatalène.

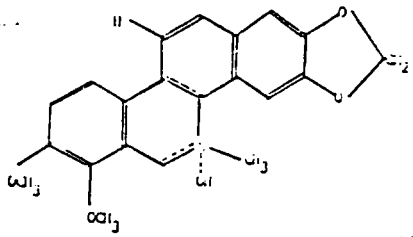
Sanguinarine : $C_{20}\ H_{15}\ NO_5$.
Masse molaire : 349,33 ;
Point de fusion : 212°C.
Solubilité : Ethanol, Ether, Chloroforme.
Cette structure a été identifiée dans les racines à la dose 0,03 % (Gertig, 1965).



Selon Dyke (1979) la sanguinarine présente une activité inotrope positive et serait responsable de nombreux cas de cécité causés par un glaucome chronique ; la sanguinarine interviendrait sur la libération de la prostaglandine F2, principalement hormone responsable du contrôle de la pression interne de l'œil (Hakim in Dyke, 1979). La sanguinarine a des propriétés antifongique (Vichkanova et Adgina, 1971).

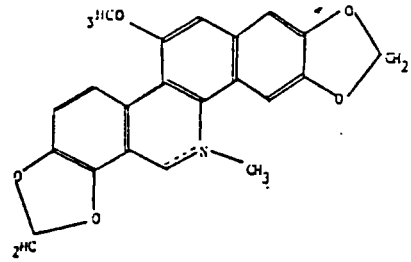
Chelerythrine : $C_{21}\ H_{19}\ NO_5$
Masse molaire : 365,37 ;
Point de fusion : 207°C.

Solubilité : Ethanol, Ether, Chloroforme.
Cette structure a été identifiée dans les racines (0,08 %) (Henry, 1924).

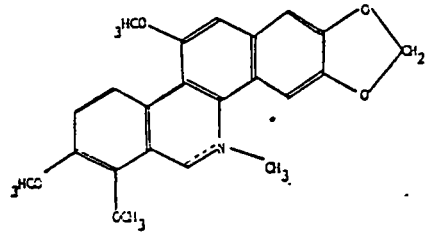


La chélérythrine est douée de propriétés antitumorales (Vichkanova, 1971).

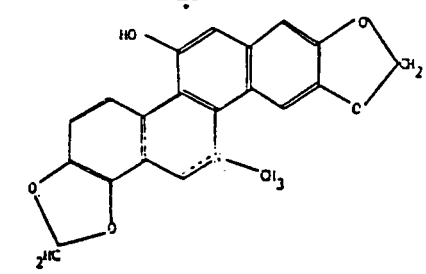
Chelirutine : C_{21} H_{17} NO_5
Masse molaire : 363 ;
Solubilité : Ethanol, Ether, Chloroforme.
Cette structure a été identifiée dans la plante entière (0,002 %) (Slavik, 1965)



Chelilutine : C_{22} $H_{21}NO_5$
Masse molaire : 379.
Solubilité : Ethanol. Ether, Chloroforme.
Cette structure a été identifiée dans les parties aériennes (0,003 %) (Slavik, 1955, 1965).

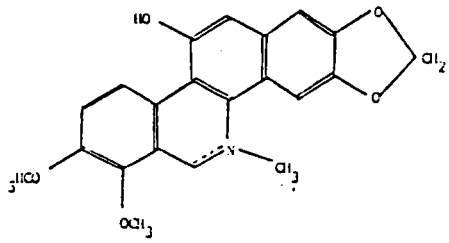


Chelidonine : C_{20} H_{19} NO_5



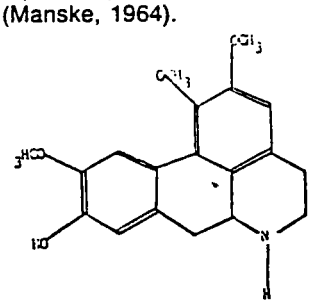
La chelidonine, localisée dans la plante entière (Slavik, 1955, 1965), possède des propriétés spasmolytiques (Scholz C., 1976) mais de manière inconstante. Malgré une activité anticancéreuse et antivirale, la chélidonine se caractérise surtout par ses propriétés antifongique et antibiotique à l'égard d'une gamme très large de champignon, et de bactéries (Zbierska, 1979). Dès 1892, Meyer montra que la chelidonine pouvait induire une baisse de l'activité du muscle cardiaque avec diminution du poul et baisse de la pressiion sanguine. A la dose de 0,1 mg/kg (Hanzlick, 1920) la chelidonine induit une narcose sans effet d'accoutumance. A la dose de 0,5 mg/kg l'animal meurt par arrêt cardiaque.

Homochelidonine : C_{21} H_{23} NO_5
Masse molaire : 369 ;
Solubilité : Ethanol, Ether, Chloroforme.
Cette structure est identifiée dans la plante entière (Manske, 1964).

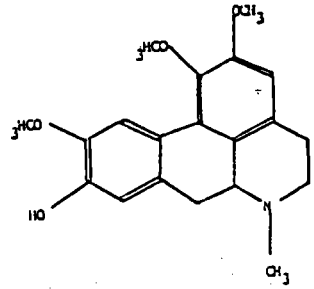


3) Groupe de l'Aporphine :
Ce groupe comprend des alcaloïdes à structure phénolique et des alcaloïdes à structure non phénolique.

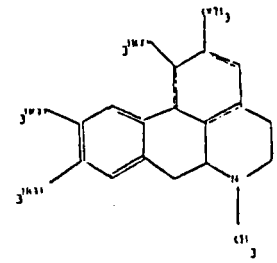
Laurotétamine : C_{19} H_{20} NO_4
Masse molaire : 327 ;
Point de fusion : 125°C.
Solubilité : Ethanol, Ethylacétate.
Cette structure a été identifiée dans la plante entière à l'état de trace et ne présente pas de propriété pharmacologique (Manske, 1964).



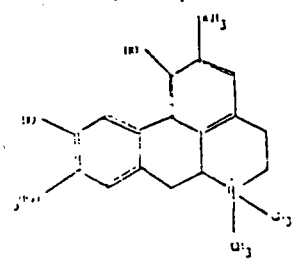
Lauroscholtzine : C_{20} H_{23} NO_4
Masse molaire : 341 ;
Point de fusion : 120°C.
Solubilité : Ethanol, Ethylacétate.
Cette structure est identifiée dans la plante entière à l'état de trace (Manske, 1964) et ne présente pas de propriété pharmacologique particulière.



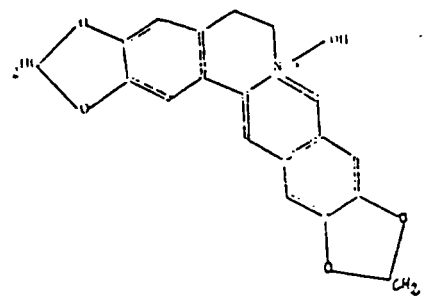
Glaucine : C_{21} H_{25} NO_4
Masse molaire : 355.
Cette structure a été identifiée en plus grande quantité dans les parties aériennes et présente des propriétés antitussives marquées (Daniezak et coll., 1973). Le glaucine est légèrement narcotique, convulsivante, déprime le cœur et exerce une action toxique sur les muscles striés (Garnier, 1961).



Escholine : ou magnoflorine :
C_{20} H_{23} NO_4
Masse molaire : 341,16 ;
Point de fusion : 220°C.
Solubilité : Ethanol, Chloroforme.
Cette structure a été identifiée dans les racines (Gertig, 1965). Cet alcaloïde possède des propriétés hypotensives (Drost et coll., 1974).



4) Groupe de la protoberbérine : représenté par un seul alcaloïde :
la coptisine (C_{19} H_{15} NO_5) ; c'est une base non phénolique identifiée en faible quantité à la fois dans les racines et dans les parties aériennes (Slavikova et Slavik, 1955, 1965).
Masse molaire : 337,36 ;
Point de fusion : 218°C.
Solubilité : dans l'eau et les alcalis.
La coptisine est connue pour ses propriétés cytotoxiques
(Bezanger-Beauquesne et coll., 1980).

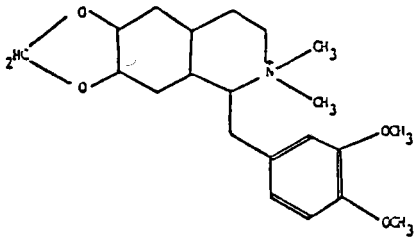


5) Groupe de la Benzyltetrahydroisoquinoléine : représenté par un seul alcaloïde :
L'Escholinine (ou hydroxymethylromnéine) : C_{21} H_{26} NO_4
Masse molaire : 355,17 ;
Point de fusion : 205-207°C.
Cet alcaloïde n'est connu que dans ce genre (Gertig, 1965).

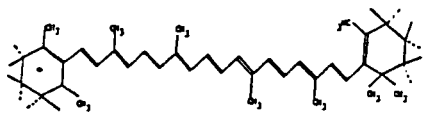
suite p. 23



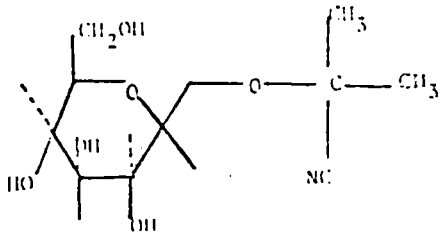
suite de la p. 20



B. - UN CAROTENOÏDE : (Abrol, 1966 ; Swain et Harborne, 1979).
Eschscholtzantine : responsable de la coloration intense des pétales mais qui ne semble pas présenter de propriétés pharmacologiques.



C. - DÉRIVÉ CYANOGNÉTIQUE : (Hegnauer, 1969 ; Abrol, 1966).
Linamarine : $C_{10}H_{19}NO_6$.
Masse molaire : 249 ;
Solubilité : eau, alcool, acétone chaude.
La molécule est très toxique, après libération d'acide cyanhydrique par hydrolyse. La linamarine a été identifiée à la fois dans les racines et les parties aériennes (Abrol, 1966).



D. - FLAVONOSIDES :
La Rutine (Quercetine gluco-rhamnoside).
Point de fusion : 188-190°C.
Solubilité : Alcool éthylique.
Se rencontre dans les pétales, richement colorés à une concentration de 5 % (Hegnauer, 1969).

BIBLIOGRAPHIE

ABROL Y.P., Occurence of Linamarin et Lotaustralin Iceland Poppy Indian J. Chem., 1966. 4, 251-252.

ALLES G.A., A comparative study of the pharmacology of certain cryptopine alkaloids. J. Pharmacol., 1952, 104, 253-256.

BAILLON H., Dictionnaire botanique. Hachette Paris, 1876, 2. 580 p.

BEZANGER - BEAUQUESNE L., PINKAS M., TORCK M. et TROTIN F., Plantes Médicinales des régions tempérées. Maloine S.A., Paris, 1980, 117-118.

BREHM M., Le Monde des plantes. Merveilles de la nature. Bailleres J-B. Paris, 1878, 3. 123-125.

BRINDEJONC G. Sur un alcaloïde de Eschscholtzia californica. Bull Soc. Chim. Française, 1911, 9, 97-101.

CHENEY R.H., Therapeutic potential of Eschscholtzia californica herba. Quart. J. Crude-Drug, 1963, 3, 413-416.

CLARK C., Systematic studies of eschscholtzia (Papaveraceae), I the origin and affinities of eschscholtzia mexicana systematic botany, 1978, 3 (4), 374-385.

DANIEZAK R., DOPOWSKACE A. et BORKOWSKI B., Pol. J. Pharmacol. Pharm., 1973, 25, 271-283.

DROST K., SZAUFER M. et KOWALEWSKI Z., Herba Pol., 1974, 20, 301-307.

DEYSSON G., Organisation et classification des plantes vasculaires. Sedes, Paris, 1979, 2, 272-276.

DYKE S.F., Les pavots peuvent-ils causer la cecite ? Act. Chim., 1979, 10, 24-26.

GARNIER G., BEZANGER BEAUQUESNE L. et DEBRAUX G., Ressources Médicinales de la Flore Française. Vigot Frères. Paris, 1961, 1, 485-487.

GERTIG H., Alkaloïdy Maku Kalifornijskiego (Eschscholtzia Californica Chamisso). Séparation et chromatographie sur couche mince de la fraction alcaloïdique présente dans les parties aeriennes. Acta Poloniae Pharmaceutica, 1964, 21 (2), 127-130.

GERTIG H., Alkaloidy Maku Kalifornijskiego (Eschscholtzia californica Chamisso) Separation preparative de la fraction alcaloidique obtenue à partir de l'extrait benzenique des racines Acta Poloniae Pharmaceutica 1965, 22 (3), 271-279

GERTIG H., Alkaloïdy Maku Kalifornijskiego (Eschscholtzia californica Chamisso). Séparation préparative de la fraction alcaloïdique obtenue à partir de l'extrait benzènique des parties aériennes. Acta Poloniae Pharmaceutica, 1965, 22 (4), 359-372.

GERTIG H., Alkaloïdy Maku Kalifornijskiego (Eschscholtzia Californica Chamisso). Alcaloïdes contenus dans l'extrait méthanolique des parties aériennes obtenu par l'extraction benzènique de la drogue. Acta Poloniae Pharmaceutica, 1965, 22 (5), 443-448.

HAKIM S.A.E., Argemone oil, Sanguinarine and Epidemic Dropsy glaucome. Brit., J. Ophthal., 38, 193.

HANZLICK P.J., Pharmacology of chelidonin. J. Amer. med. ass., 1920, 75, 1324-1325.

HEATHCOTE R.S.A., J. Pharm. Exp. Ther., 1924, 25(1), 35-45.

HEGNAUER, Chemotaxinomie. Ed. Birkhaüser Verlag. Basel Stuttgart. 1969. 5. 606 p.

HENRY H., Papavers alkaloïds. Deuxième édition, 1924, 247-253. 296-303.

KERHARO J. et ADAM J.G., La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Vigot Frères. Paris. 1974. 623 p.

MANSKE R.H.F., SHIN K.M., The alkaloïds of Papaveraceous Plants. LIII Eschscholtzia Californica Cham., Can. J. Chem., 1965. 43, 2180-2182.

MANSKE R.H.F., SHIN K.H., BATTERSBY A.R., SHAW D.F., The alkaloïds of Papaveraceous Plants. LIV The Structure of Eschscholtzia. Can. J. Chem., 1965. 43. 2183-2189.

MANSKE R.H.F., SHIN K.H., The alkaloids of Papaveraceous Plants. LV A new alkaloid, Eschscholtzidine, and its structure. Can. J. Chem., 1966. 44, 1259-1260.

MANSKE R.H.F., et HOLMES H.L., The alkaloïds chemistry and physiology Ed. Academic Press. New York., 1960. 1 p.

MOLOKHOVA L.G., SUSLINA M.L., DATSKOVSKE S.B. et FIGURKIN B.A., Tr. Permsk. GOS. Med. Inst., 1973. 118. 26-28.

SLAVIK J. et SLAVIKOVA L., Alkaloide der Mohngewächse (papaveraceae) III Alkaloide des Kalifornischen Kappen-Mohns (Eschscholtzia californica chamisso). Czechoslov. Chem Commun 1955. 20. 27-31.

SLAVIK J. et SLAVIKOVA L., Alkaloide der Mohngewächse (papaveraceae) XIX. Uber Alkaloïde aus Dicranostigma lactucoides. Czechoslov. Chem. Commun., 1961, 26, 1839-1844.

SLAVIK J. et SLAVIKOVA L., HAISOVA K., Alkaloïde der Mohngewächse (Papaveraceae) XXXVI. Uber weiteree Alkaloïde aus den arten Eschscholtzia douglasii unc E. glauca greene and über die Konstitution von californidine. Czechoslov. Chem. Commun., 1967, 32. 4420-4430.

SLAVIK J., DOLEJS L., SEDMERA P., Alkaloïds of the papaveraceae XLIV quaternary. Alkaloïds from Roots of three eschscholtzia species and from the aerial Part of Hunnemannia fumariaefolia. Sweet. constitution of Escholidine. Czechoslov. Chem. Commun., 1970, 35. 2597-1612.

SLAVIK J., DOLEJS L., Alkaloïds of the papaveraceae LII. The Constitution of Escholinine and the identity of Esholine with magnoflonne. Czechoslov. Chem. Commun., 1973, 38. 3514-3520.

SLAVIK J., SLAVIKOVA L., Alkaloïds of the papaveraceous XLV. Phenolic Non. quaternary Alkaloïds from the roots of three Eschscholtzia species. Czechoslov. Chem. Commun., 1971, 36. 2067-2069.

SLAVIK J., SLAVIKOVA L., DOLEJS L., Quaternary Alkaloïds of an Eschscholtzia species. Czechoslov. Chem. Commun., 1975. 40. 1095-1102.

SLAVIK J., NOVAK V., SLAVIKOVA L., Alkaloid form E. Lobii. Czechoslov Chem. Commun., 1976. 41, 2429-2432.

SLAVIKOVA L., SLAVIK J., Alkaloide der Mohngewächse (papaveraceae) XXX III. Uber die alkaloïde von der Artender gattung Eschscholtzia und über die Konstitution des Neuen Alkaloïds Escholamin. Czechoslov. Chem. Commun., 1966. 31, 3362-3372.

SCHOLZ C., HAENSEL R. et MILLE C., Pharm., 1976. 121, 1571-1574.

SWAIN J., HARBORNE J.B., Phytochemistry. Int. J. plant Biochem., 1979. 18 2. 303-309

VICHKANOVA S.A. et ADGINA V.V., Antibiotiki, 1971, 16, 609-612.

ZBIERSKA J., KOWALEWSKI Z., Wlasciwosci przeciwnowotworowe i antybiotyczne N- tlenku chelidoniny. Herba polonica, 1980, 26 (1), 61-66.

◄ Eschscholtzia Californica

R E S U M E

Une étude bibliographique nous a permis de répertorier 12 espèces d'Eschscholzia, toutes originaires de Californie. Sept d'entre elles sont décrites et les éléments macroscopiques et microscopiques caractéristiques de l'espèce Eschscholzia californica Cham. ont été déterminés.

L'effet sédatif mentionné par la tradition a été confirmé scientifiquement. E. californica présente également un effet anxiolytique à faible dose (25 mg/Kg). Il a été mis en évidence un profil pharmacologique du type sédatif-anxiolytique, mais atypique par comparaison à celui des benzodiazépines. Par voie orale E. californica n'est actif qu'associé avec un excipient de type labrafil, par contre il présente un effet sédatif par voie rectale.

Une étroite collaboration avec les producteurs a permis de mettre au point un extrait industriel pilote atoxique, présentant toutes les caractéristiques pharmacologiques. Le fractionnement a montré que les alcaloïdes et les précurseurs (acides aminés) ne sont pas responsables de l'activité.

M O T S C L E S

- Tradition, Californie
- Papavéraceae, Eschscholzia californica Cham., Alcaloïdes
- Tests comportementaux, Sédatifs, Anxiolytiques, Fractionnement