

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE  
Union-Discipline-Travail

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE FELIX HOUPHOUET-BOIGNY

Année académique : 2012 - 2013



UFR BIOSCIENCES

22 BP : 582 Abidjan 22

Tél. /Fax : 225 22 44 44 73

Courriel : [biosciences@univ-cocody.ci](mailto:biosciences@univ-cocody.ci)  
[ufrbiosciences@yahoo.fr](mailto:ufrbiosciences@yahoo.fr)

N° d'ordre : 752 / 2013

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE

## THESE

Présentée à l'UFR BIOSCIENCES pour obtenir le titre de :

**DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES**

Spécialité : Physiologie Animale et Pharmacologie

Par

**ABO KOUAKOU JEAN CLAUDE**

Docteur 3<sup>ème</sup> cycle de Physiologie Animale

**THEME**



**DE LA PLANTE A LA MOLECULE :  
TOXICITE, EFFETS  
PHARMACOLOGIQUES ET  
MECANISME D'ACTION DE *Justicia  
secunda* (Acanthaceae), PLANTE  
ANTIHYPERTENSIVE, SUR LE  
SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE  
DE MAMMIFERES**

Soutenue publiquement le **12 Janvier 2013**, devant le jury composé de :

Mr. **SERI Bialli V.**, Professeur Titulaire, Université Félix Houphouët-Boigny

Président

Mr. **AKA Kadjo J.**, Maître de Conférences, Université Félix Houphouët-Boigny

Directeur de thèse

Mr. **YANGNI-ANGATE H.**, Professeur Titulaire, Université Alassane Ouattara

Rapporteur

Mr. **YAO Datté J.**, Professeur Titulaire, Université Félix Houphouët-Boigny

Rapporteur

Mr. **EHILE Ehouan E.**, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua

Examineur

Mr. **TRAORE Karim S.** Maître de Conférences, Université Nangui Abrogoua

Examineur

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE  
Union-Discipline-Travail

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE FELIX HOUPHOUET-BOIGNY

Année académique : 2012 - 2013



UFR BIOSCIENCES

22 BP : 582 Abidjan 22

Tél. /Fax : 225 22 44 44 73

Courriel : [biosciences@univ-cocody.ci](mailto:biosciences@univ-cocody.ci)  
[ufrbiosciences@yahoo.fr](mailto:ufrbiosciences@yahoo.fr)

N° d'ordre : 752 / 2013

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE

## RESUME DE THESE

Présentée à l'UFR BIOSCIENCES pour obtenir le titre de :

**DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES**

Spécialité : Physiologie Animale et Pharmacologie

Par

**ABO KOUAKOU JEAN CLAUDE**

Docteur 3<sup>ème</sup> cycle de Physiologie Animale

### THEME



**DE LA PLANTE A LA MOLECULE :  
TOXICITE, EFFETS  
PHARMACOLOGIQUES ET  
MECANISME D'ACTION DE *Justicia  
secunda* (Acanthaceae), PLANTE  
ANTIHYPERTENSIVE, SUR LE  
SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE  
DE MAMMIFERES**

Soutenue publiquement le **12 Janvier 2013**, devant le jury composé de :

Mr. **SERI Bialli V.**, Professeur Titulaire, Université Félix Houphouët-Boigny

Mr. **AKA Kadjo J.**, Maître de Conférences, Université Félix Houphouët-Boigny

Mr. **YANGNI-ANGATE H.**, Professeur Titulaire, Université Alassane Ouattara

Mr. **YAO Datté J.**, Professeur Titulaire, Université Félix Houphouët-Boigny

Mr. **EHILE Ehouan E.**, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua

Mr. **TRAORE Karim S.** Maître de Conférences, Université Nangui Abrogoua

Président

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

# TABLE DES MATIERES

---

	<b>Page</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>DEDICACE</b> .....	<b>XV</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS ET SYMBOLES</b> .....	<b>XIX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XXXI</b>
<b>I – INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I – 1. Problématique</b> .....	<b>2</b>
<b>I – 2. Justification</b> .....	<b>6</b>
<b>I – 3. Objectifs de l'étude</b> .....	<b>6</b>
<b>I – 3 – 1. Objectif général</b> .....	<b>6</b>
<b>I – 3 – 2. Objectifs spécifiques</b> .....	<b>6</b>
<b>I – 4. Structure du mémoire</b> .....	<b>7</b>
<b>II – REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>8</b>
<b>II – 1. Hypertension artérielle (HTA)</b> .....	<b>9</b>
<b>II – 1 – 1. Pression artérielle : définition et mesure</b> .....	<b>9</b>
<b>II – 1 – 1 – 1. Définition de la pression artérielle</b> .....	<b>9</b>
<b>II – 1 – 1 – 2. Mesure de la pression artérielle</b> .....	<b>10</b>

II – 1 – 1 – 2 – 1. Historique .....	10
II – 1 – 1 – 2 – 2. Mesure directe de Ludwig .....	11
II – 1 – 1 – 2 – 3. Mesure indirecte .....	11
<b>II – 1 – 2. Définition, épidémiologie, causes et traitements</b>	
<b>de l’hypertension artérielle .....</b>	<b>12</b>
II – 1 – 2 – 1. Définition de l’HTA .....	12
II – 1 – 2 – 2. Epidémiologie de l’hypertension artérielle .....	13
II – 1 – 2 – 2 – 1. Dans le monde .....	13
II – 1 – 2 – 2 – 2. En Côte d’Ivoire .....	15
II – 1 – 2 – 3. Causes de l’hypertension artérielle .....	15
II – 1 – 2 – 4. Traitements de l’hypertension artérielle .....	17
II – 1 – 2 – 4 – 1. Règles hygiéno-diététiques ou traitements non Pharmacologiques .....	18
II – 1 – 2 – 4 – 2. Traitements médicamenteux .....	18
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1. Médicaments antihypertenseurs .....	19
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 1. Diurétiques .....	19
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 2. Bêtabloquants .....	22
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 3. Inhibiteurs de l’enzyme de conversion (IEC) .....	23
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 4. Antagonistes des récepteurs de l’angiotensine II (ARA II) .....	26
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 5. Inhibiteurs calciques (IC) .....	28
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 6. Autres antihypertenseurs .....	31
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 2. Associations fixes d’antihypertenseurs .....	32
II – 1 – 2 – 4 – 2 – 3. Bases pharmacologiques du traitement de l’hypertension artérielle .....	34
<b>II – 2. Méthodes de séparation et d’identification de composés des végétaux .....</b>	<b>37</b>
<b>II – 2 – 1. Techniques de séparation et de préparation de l’échantillon .....</b>	<b>37</b>
II – 2 – 1 – 1. Préparation de l’échantillon .....	37
II – 2 – 1 – 1 – 1. Généralités sur l’analyse de l’échantillon .....	38
II – 2 – 1 – 1 – 2. Extraction solide-liquide (SLE) .....	39
II – 2 – 1 – 1 – 3. Extraction liquide-liquide (LLE) .....	39

II – 2 – 1 – 1 – 4. Extraction en phase solide (SPE) .....	41
II – 2 – 1 – 1 – 5. Extraction des métabolites secondaires .....	44
II – 2 – 1 – 2. Méthodes chromatographiques .....	44
II – 2 – 1 – 2 – 1. Principes de la chromatographie .....	44
II – 2 – 1 – 2 – 2. Chromatographie liquide (LC) .....	47
II – 2 – 1 – 2 – 3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC) .....	49
II – 2 – 1 – 2 – 3 – 1. Chromatographie d’adsorption .....	51
II – 2 – 1 – 2 – 3 – 2. Chromatographie d’exclusion .....	51
II – 2 – 1 – 2 – 4. Chromatographie sur couche préparative (CCP) ou chromatographie sur couche mince (CCM) préparative .....	52
II – 2 – 1 – 2 – 5. Chromatographie centrifuge à contre-courant (CCC) .....	54
II – 2 – 1 – 2 – 6. Flash chromatographie .....	55
II – 2 – 1 – 2 – 7. Chromatographie liquide à basse pression (LPLC) .....	57
II – 2 – 1 – 2 – 8. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) .....	57
II – 2 – 1 – 2 – 9. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative) .....	58
II – 2 – 1 – 2 – 10. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	58
<b>II – 2 – 2. Techniques de séparation analytique .....</b>	<b>61</b>
II – 2 – 2 – 1. Chromatographie planaire ou chromatographie sur couche mince analytique (CCM analytique) .....	61
II – 2 – 2 – 2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	64
II – 2 – 2 – 3. Chromatographie liquide ultra-performante (UPLC) .....	67
<b>II – 2 – 3. Techniques d’identification structurale .....</b>	<b>68</b>
II – 2 – 3 – 1. Spectrométrie d’absorption de l’ultraviolet et du visible (UV-visible) .....	68
II – 2 – 3 – 2. Spectrométrie infrarouge (IR) .....	69
II – 2 – 3 – 3. Spectrométrie de masse (MS) .....	71
II – 2 – 3 – 4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	76

<b>III – MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>80</b>
<b>III – 1. Matériel végétal .....</b>	<b>81</b>
<b>III – 1 – 1. Description et répartition géographique .....</b>	<b>81</b>
<b>III – 1 – 2. Usages ethnobotaniques .....</b>	<b>81</b>
<b>III – 1 – 3. Préparation d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) .....</b>	<b>84</b>
<b>III – 2. Matériel biologique .....</b>	<b>84</b>
<b>III – 2 – 1. Matériel animal .....</b>	<b>84</b>
III – 2 – 1 – 1. Les souris .....	84
III – 2 – 1 – 2. Les rats .....	84
III – 2 – 1 – 3. Les cobayes .....	84
III – 2 – 1 – 4. Les lapins .....	86
<b>III – 2 – 2. Sang .....</b>	<b>86</b>
<b>III – 2 – 3. Cellules .....</b>	<b>86</b>
<b>III – 3. Techniques d'études .....</b>	<b>87</b>
<b>III – 3 – 1. Etudes toxicologiques .....</b>	<b>87</b>
III – 3 – 1 – 1. Etude de la toxicité aiguë chez la souris .....	87
III – 3 – 1 – 1 – 1. Echantillonnage .....	87
III – 3 – 1 – 1 – 2. Détermination de la dose maximale tolérée (DMT) et de la dose létale 50 % (DL <sub>50</sub> ) .....	87
III – 3 – 1 – 1 – 2 – 1. Méthode graphique de détermination de la DMT et de la DL <sub>50</sub> .....	88
III – 3 – 1 – 1 – 2 – 2. Méthode de calcul pour la détermination de la DL <sub>50</sub> .....	88
III – 3 – 1 – 2. Etude de la cytotoxicité .....	89
<b>III – 3 – 2. Etude de la pression sanguine artérielle .....</b>	<b>91</b>
III – 3 – 2 – 1. Dispositif expérimental .....	91
III – 3 – 2 – 2. Technique d'enregistrement de la pression artérielle de lapin .....	91
III – 3 – 2 – 2 – 1. Réalisation de la surpression .....	91

III – 3 – 2 – 2 – 2. Anesthésie du lapin .....	93
III – 3 – 2 – 2 – 3. Intubation de la veine saphène .....	93
III – 3 – 2 – 2 – 4. Mise à nu du nerf sympathique .....	93
III – 3 – 2 – 2 – 5. Intubation de la carotide .....	93
III – 3 – 2 – 2 – 6. Enregistrement de la pression sanguine artérielle .....	94
<b>III – 3 – 3. Etude de l'électrocardiogramme (ECG) .....</b>	<b>94</b>
III – 3 – 3 – 1. Dispositif expérimental .....	94
III – 3 – 3 – 2. Technique d'enregistrement de l'ECG de lapin .....	96
<b>III – 3 – 4. Etude des contractions du cœur isolé .....</b>	<b>96</b>
III – 3 – 4 – 1. Dispositif expérimental .....	96
III – 3 – 4 – 2. Techniques d'enregistrement de l'activité mécanique et de mesure du débit coronaire du cœur isolé de rat .....	98
III – 3 – 4 – 2 – 1. Anesthésie de l'animal .....	98
III – 3 – 4 – 2 – 2. Isolement du cœur .....	98
III – 3 – 4 – 2 – 3. Enregistrement de l'activité contractile du cœur isolé .....	99
III – 3 – 4 – 2 – 4. Mesure du débit coronaire du cœur isolé .....	99
<b>III – 3 – 5. Etude des contractions de l'artère aorte isolée .....</b>	<b>100</b>
III – 3 – 5 – 1. Dispositif expérimental .....	100
III – 3 – 5 – 2. Technique d'enregistrement de l'activité contractile de bandelettes d'artère aorte isolée de cobaye .....	100
<b>III – 3 – 6. Mesure de la viscosité du sang .....</b>	<b>102</b>
III – 3 – 6 – 1. Dispositif expérimental .....	102
III – 3 – 6 – 2. Technique de mesure de la viscosité du sang de bœuf .....	102
<b>III – 3 – 7. Mise en évidence de quelques composés dans l'extrait .....</b>	<b>104</b>
III – 3 – 7 – 1. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	104
III – 3 – 7 – 1 – 1. Méthodes d'analyses par chromatographie sur couche mince .....	104
III – 3 – 7 – 1 – 2. Méthodes de révélation .....	105
III – 3 – 7 – 2. Mise en évidence de quelques métabolites secondaires .....	105
III – 3 – 7 – 2 – 1. Mise en évidence des alcaloïdes .....	106
III – 3 – 7 – 2 – 2. Mise en évidence des flavonoïdes .....	107

III – 3 – 7 – 2 – 3. Mise en évidence des tanins .....	109
III – 3 – 7 – 2 – 4. Mise en évidence des polyphénols .....	110
III – 3 – 7 – 2 – 5. Mise en évidence des saponosides .....	110
III – 3 – 7 – 2 – 6. Mise en évidence des composés quinoniques .....	111
III – 3 – 7 – 2 – 7. Mise en évidence des stérols et polyterpènes .....	112
III – 3 – 7 – 2 – 8. Mise en évidence des anthocyanes .....	113
III – 3 – 7 – 2 – 9. Mise en évidence des glycosides cardiaques .....	113
III – 3 – 7 – 3. Mise en évidence par le DPPH de composés antioxydants (test antiradicalaire sur le DPPH) .....	114
<b>III – 3 – 8. Purification de l'extrait brut : séparation et identification des composés .....</b>	<b>115</b>
III – 3 – 8 – 1. Extraction liquide-liquide (LLE) de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> .....	115
III – 3 – 8 – 2. Méthodes chromatographiques .....	115
III – 3 – 8 – 2 – 1. Chromatographie sur couche mince .....	115
III – 3 – 8 – 2 – 2. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) .....	115
III – 3 – 8 – 2 – 3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC) .....	118
III – 3 – 8 – 2 – 4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique .....	118
III – 3 – 8 – 2 – 5. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative) .....	119
III – 3 – 8 – 3. Méthodes d'identification .....	122
III – 3 – 8 – 3 – 1. Chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ESI/TOF-MS) .....	122
III – 3 – 8 – 3 – 2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	124
<b>III – 4. Solutions physiologiques et substances chimiques et pharmacologiques utilisées .....</b>	<b>126</b>
<b>III – 4 – 1. Solutions physiologiques .....</b>	<b>126</b>
<b>III – 4 – 2. Substances chimiques et pharmacologiques .....</b>	<b>128</b>
<b>III – 5. Traitement des résultats .....</b>	<b>128</b>

III – 5 – 1. Enregistrements sur le papier enduit de noir de fumée .....	128
III – 5 – 2. Analyses statistiques .....	128
III – 5 – 3. Graphiques .....	128
 IV – RESULTATS .....	 130
 IV <sub>1</sub> – <u>Première partie</u>	
Etudes toxicologiques, tri phytochimique, effets pharmacologiques et mécanismes d’action d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> M. Vahl (Acanthaceae) sur l’activité cardio-vasculaire de Mammifères .....	      131
IV <sub>1</sub> – 1. Etudes toxicologiques d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) .....	  131
IV <sub>1</sub> – 1 – 1. Toxicité aiguë d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> chez des souris .....	  131
IV <sub>1</sub> – 1 – 1 – 1. Comportement des souris après traitement à l’AJse .....	132
IV <sub>1</sub> – 1 – 1 – 2. Mortalité des souris traitées en fonction de la dose de AJse .....	132
IV <sub>1</sub> – 1 – 1 – 3. Détermination de la dose maximale tolérée (DMT) et de la dose létale 50 % (DE <sub>50</sub> ) de AJse par la méthode graphique de Miller et Tainter .....	  134
IV <sub>1</sub> – 1 – 1 – 4. Détermination de la dose létale 50 % (DL <sub>50</sub> ) de AJse par la méthode de calcul de Dragsted et Lang .....	  134
IV <sub>1</sub> – 1 – 2. Cytotoxicité d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> .....	134
IV <sub>1</sub> – 1 – 3. Discussion .....	137
IV <sub>1</sub> – 2. Effets pharmacologiques d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia</i> <i>secunda</i> (AJse) sur la pression sanguine artérielle normale et sur l’hypertension artérielle induite chez le lapin .....	   140
IV <sub>1</sub> – 2 – 1. Effets dose-réponse de AJse sur la pression artérielle normale de lapin .....	  140
IV <sub>1</sub> – 2 – 2. Effets de AJse sur l’hypertension artérielle induite chez le lapin .....	142

IV <sub>1</sub> – 2 – 2 – 1. Effets de <i>AJse</i> sur l’hypertension induite par l’adrénaline .....	142
IV <sub>1</sub> – 2 – 2 – 2. Effets de <i>AJse</i> sur l’hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique .....	145
<b>IV<sub>1</sub> – 2 – 3. Discussion .....</b>	<b>147</b>
<b>IV<sub>1</sub> – 3. Mise en évidence de quelques composés de l’extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (<i>AJse</i>) .....</b>	<b>148</b>
<b>IV<sub>1</sub> – 3 – 1. Mise en évidence de quelques métabolites secondaires .....</b>	<b>148</b>
IV <sub>1</sub> – 3 – 1 – 1. Réactions en tubes .....	149
IV <sub>1</sub> – 3 – 1 – 2. Chromatographie sur couche mince .....	151
<b>IV<sub>1</sub> – 3 – 2. Mise en évidence par le DPPH de composés antioxydants .....</b>	<b>153</b>
<b>IV<sub>1</sub> – 3 – 3. Discussion .....</b>	<b>156</b>
<b>IV<sub>1</sub> – 4. Effets d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (<i>AJse</i>) sur le système cardio-vasculaire de Mammifères .....</b>	<b>162</b>
<b>IV<sub>1</sub> – 4 – 1. Effets d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> sur l’activité cardiaque .....</b>	<b>162</b>
IV <sub>1</sub> – 4 – 1 – 1. Effets de <i>AJse</i> sur l’électrocardiogramme (ECG) de lapin .....	162
IV <sub>1</sub> – 4 – 1 – 1 – 1. Effets dose-réponse de <i>AJse</i> sur l’ECG de lapin .....	162
IV <sub>1</sub> – 4 – 1 – 1 – 2. Effets de doses uniques de <i>AJse</i> sur l’ECG de lapin .....	166
IV <sub>1</sub> – 4 – 1 – 2. Effets d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> sur les contractions du cœur isolé de rat .....	172
IV <sub>1</sub> – 4 – 1 – 2 – 1. Effets de <i>AJse</i> sur l’activité mécanique du cœur isolé de rat .....	172
IV <sub>1</sub> – 4 – 1 – 2 – 2. Effets de <i>AJse</i> sur le débit coronaire du cœur isolé de rat .....	174
IV <sub>1</sub> – 4 – 1 – 3. Discussion .....	176
<b>IV<sub>1</sub> – 4 – 2. Effets d’un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> sur les contractions de l’artère aorte isolée de cobaye .....</b>	<b>182</b>
IV <sub>1</sub> – 4 – 2 – 1. Effets dose-réponse de <i>AJse</i> sur les contractions toniques de l’artère aorte isolée intacte de cobaye .....	182

IV <sub>1</sub> – 4 – 2 – 2. Effets dose-réponse de AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée dépourvue d'endothélium de cobaye .....	184
IV <sub>1</sub> – 4 – 2 – 3. Discussion .....	186
<b>IV<sub>1</sub> – 4 – 3. Effets d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> sur la viscosité du sang de bœuf .....</b>	<b>188</b>
IV <sub>1</sub> – 4 – 3 – 1. Effets dose-réponse de AJse sur le temps d'écoulement du sang .....	188
IV <sub>1</sub> – 4 – 3 – 2. Discussion .....	190
<b>IV<sub>1</sub> – 5. Mécanisme d'action de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) sur la pression artérielle .....</b>	<b>192</b>
IV <sub>1</sub> – 5 – 1. Interaction AJse – atropine sur la pression artérielle de lapin .....	193
IV <sub>1</sub> – 5 – 2. Interaction AJse – propranolol sur la pression artérielle de lapin .....	195
IV <sub>1</sub> – 5 – 3. Interaction AJse – vérapamil sur la pression artérielle de lapin .....	195
IV <sub>1</sub> – 5 – 4. Interaction AJse – nifédipine sur la pression artérielle de lapin .....	198
IV <sub>1</sub> – 5 – 5. Interaction AJse – prazosine sur la pression artérielle de lapin .....	198
IV <sub>1</sub> – 5 – 6. Interaction AJse – losartan sur la pression artérielle de lapin .....	200
IV <sub>1</sub> – 5 – 7. Discussion .....	206
<b>IV<sub>1</sub> – 6. Conclusion .....</b>	<b>210</b>
<b>IV<sub>2</sub> – <u>Deuxième partie</u> :</b>	
<b>Purification, identification structurale, étude toxicologique, effets pharmacologiques et mécanisme d'action cardio-vasculaire de substances contenues dans un extrait aqueux de <i>Justicia secunda</i> (Acanthaceae) .....</b>	<b>214</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 1. Purification bioguidée de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) et identification de la structure chimique d'un composé purifié bioactif .....</b>	<b>215</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 1 – 1. Séparation liquide-liquide (LLE) de AJse .....</b>	<b>215</b>

<b>IV<sub>2</sub> – 1 – 2. Analyses chromatographiques de l'extrait brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) et des phases chloroformique, acétatique et aqueuse issues de la séparation liquide-liquide (LLE) de AJse .....</b>	<b>215</b>
IV <sub>2</sub> – 1 – 2– 1. Chromatographie sur couche mince (CCM) de AJse et des phases issues de la LLE de cet extrait .....	215
IV <sub>2</sub> – 1 – 2– 2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de AJse et des différentes phases de la LLE .....	218
<b>IV<sub>2</sub> – 1 – 3. Effets pharmacologiques des phases issues de la séparation liquide-liquide de AJse sur la pression artérielle de lapin .....</b>	<b>225</b>
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 1. Effets dose-réponse des phases issues de la LLE de AJse sur la pression artérielle de lapin .....	225
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 1 – 1. Effets dose-réponse de la phase chloroformique sur la pression artérielle de lapin .....	225
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 1 – 2. Effets dose-réponse de la phase acétatique sur la pression artérielle de lapin .....	225
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 1 – 3. Effets dose-réponse de la phase aqueuse sur la pression artérielle de lapin .....	228
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 2. Effets sur la pression sanguine artérielle de lapin des phases, issues de la LLE de AJse, cumulées deux à deux .....	228
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 2 – 1. Effets sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique et acétatique cumulées .....	228
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 2 – 2. Effets sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique et aqueuse cumulées .....	232
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 2 – 3. Effets sur la pression artérielle de lapin des phases acétatique et aqueuse cumulées .....	232
IV <sub>2</sub> – 1 – 3 – 3. Effets sur la pression sanguine artérielle de lapin des trois phases (aqueuse, chloroformique et acétatique) issues de la LLE de AJse, cumulées .....	237
<b>IV<sub>2</sub> – 1 – 4. Purification de trois produits majoritaires de la phase acétatique (AcOEt) issue de la séparation de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) .....</b>	<b>237</b>

IV <sub>2</sub> – 1 – 4 – 1. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) de la phase acétatique .....	237
IV <sub>2</sub> – 1 – 4 – 2. Chromatographie sur colonne ouverte (CC) de composés issus de la MPLC de la phase AcOEt de AJse .....	242
IV <sub>2</sub> – 1 – 4 – 3. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative) de composés issus de la MPLC et de la CC .....	242
IV <sub>2</sub> – 1 – 4 – 4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des composés purifiés par HPLC semi-préparative .....	245
<b>IV<sub>2</sub> – 1 – 5. Effets pharmacologiques, sur la pression sanguine artérielle de lapin, de trois substances purifiées, issues de la phase acétatique de AJse .....</b>	<b>252</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 1 – 6. Identification du composé purifié P1/AcOEt/AJse isolé de la phase AcOEt de AJse .....</b>	<b>257</b>
IV <sub>2</sub> – 1 – 6 – 1. Chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ESI/TOF-MS) du composé purifié P1/AcOEt/AJse .....	257
IV <sub>2</sub> – 1 – 6 – 2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du composé purifié P1/AcOEt/AJse .....	257
IV <sub>2</sub> – 1 – 6 – 3. Détermination de la structure du composé purifié P1/AcOEt/AJse .....	257
<b>IV<sub>2</sub> – 1 – 7. Discussion .....</b>	<b>262</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 2. Etude toxicologique de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse .....</b>	<b>267</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 2 – 1. Cytotoxicité de P1/AcOEt/AJse .....</b>	<b>267</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 2 – 2. Discussion .....</b>	<b>267</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 3. Effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite chez le lapin .....</b>	<b>268</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 3 – 1. Effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline au lapin .....</b>	<b>268</b>

<b>IV<sub>2</sub> – 3 – 2. Effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique de lapin .....</b>	<b>268</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 3 – 3. Discussion .....</b>	<b>271</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 4. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur le système cardio-vasculaire de Mammifères .....</b>	<b>271</b>
<b>IV<sub>2</sub> – 4 – 1. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur la pression sanguine artérielle .....</b>	<b>271</b>
IV <sub>2</sub> – 4 – 1 – 1. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – propranolol sur la pression artérielle de lapin .....	272
IV <sub>2</sub> – 4 – 1 – 2. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – vérapamil sur la pression artérielle de lapin .....	272
IV <sub>2</sub> – 4 – 1 – 3. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – nifédipine sur la pression artérielle de lapin .....	275
IV <sub>2</sub> – 4 – 1 – 4. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – losartan sur la pression artérielle de lapin .....	275
IV <sub>2</sub> – 4 – 1 – 5. Discussion .....	278
<b>IV<sub>2</sub> – 4 – 2. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur l'activité cardiaque .....</b>	<b>279</b>
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 1. Effets de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur l'activité cardiaque .....	279
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 1 – 1. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur l'électrocardiogramme (ECG) de lapin .....	279
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 1 – 2. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur les contractions du cœur isolé de rat .....	281
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 1 – 3. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur le débit coronaire du cœur isolé de rat .....	284
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2. Mécanisme d'action de la substance pure P1/AcOEt/AJse sur les contractions cardiaques .....	284
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 1. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – vérapamil sur les contractions du cœur isolé de rat .....	288

IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2. Effets de P1/AcOEt/AJse sur les contractions du cœur isolé de rat en solutions physiologiques de compositions ioniques modifiées .....	288
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 1. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypocalcique sur les contractions cardiaques .....	290
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 2. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypercalcique sur les contractions cardiaques .....	290
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 3. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hyposodique sur les contractions cardiaques .....	292
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 4. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypersodique sur les contractions cardiaques .....	295
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 5. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypopotassique sur les contractions cardiaques .....	295
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 6. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hyperpotassique sur les contractions cardiaques .....	298
IV <sub>2</sub> – 4 – 2 – 3. Discussion .....	300
<b>IV<sub>2</sub> – 4 – 3. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur l'activité vasculaire .....</b>	<b>306</b>
IV <sub>2</sub> – 4 – 3 – 1. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye .....	306
IV <sub>2</sub> – 4 – 3 – 2. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – nifédipine sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye .....	306
IV <sub>2</sub> – 4 – 3 – 3. Discussion .....	311
<b>IV<sub>2</sub> – 5. Conclusion .....</b>	<b>311</b>
<b>V – CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>315</b>
<b>VI – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>319</b>

# AVANT PROPOS

---

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physiologie Animale de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire) et au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie de l'Université de Genève (Suisse), Section des Sciences Pharmaceutiques.

Il a été réalisé sous la direction scientifique du Professeur AKA Kadjo Justin.

## DEDICACE

---

*Je dédie ce mémoire*

***A DIEU le père tout-puissant***

*«A toi, Eternel, la grandeur, la force et la magnificence, l'éternité et la gloire, car tout ce qui est au ciel et sur la terre t'appartient ; à toi, Eternel, le règne, car tu t'élèves souverainement au-dessus de tout !». 1 Chroniques 29 : 11.*

*A Lui gloire, puissance et louange.*

***A feu mon père, ABO Kouamé Edmond***

*Tu nous as été arraché au moment où nous nous y attendions le moins. Tu as su créer en nous l'amour du travail bien fait et tu nous as guidé dans la voie de la réussite. Tu resteras à jamais gravé dans nos cœurs.*

*Paix à ton âme.*

***A ma mère, KOSSIA Dongo Christine***

*Tu n'as ménagé aucun effort pour nous donner une meilleure éducation. Tu nous a guidé avec amour et tu as été toujours là quand nous avons besoin de toi. Puisse l'Eternel te récompenser et te garder longtemps parmi nous.*

***A mon épouse, Mme ABO née KOFFI Akoua Akabra Catherine***

***A mes enfants, Flora, Anderson, Gemima et Bérénice***

*Je vous aime. Vous êtes ma raison de vivre.*

*Que DIEU vous protège et remplisse vos vies de bonheur et d'amour.*

***A mes frères et sœurs***

*Merci de m'avoir soutenu et témoigné votre affection durant tout ce temps. J'ai toujours pu compter sur vous à tout moment. Restons unis et soyons à la hauteur de nos parents.*

*Que DIEU vous bénisse.*

## REMERCIEMENTS

---

*Je tiens d'abord à remercier mon Directeur de thèse, **Monsieur AKA Kadjo Justin**, Maître de Conférences à l'Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan), UFR Biosciences, qui a bien voulu diriger ces travaux, en me faisant bénéficier de son expérience, son immense savoir, sa compétence et ses encouragements. Je voudrais lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire de Physiologie Animale et Psychophysiologie depuis le Diplôme d'Etude Approfondie (DEA), pour l'intérêt et le dévouement avec lequel il a suivi d'abord mes travaux de thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle, puis ces travaux de thèse de Doctorat d'Etat. Sa disponibilité, sa compréhension, son ouverture d'esprit, sa rigueur scientifique et son amour pour le travail bien fait m'ont permis de mener à terme ces travaux. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Que l'Eternel des armées le bénisse et lui donne la santé, la longévité pour que nous continuons toujours d'apprendre auprès de lui.*

*J'exprime mes sincères remerciements à **Monsieur EHILE Ehouan Etienne**, Professeur Titulaire à l'Université Nangui Abrogoua (Abidjan), UFR des Sciences de la Nature, Directeur du Laboratoire de Physiologie Animale et Pharmacologie, Secrétaire Général de l'Association des Universités Africaines (AUA) qui, après m'avoir initié aux travaux de recherche au cours de mon DEA, a étroitement et personnellement participé à la réalisation de ma thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle et collaboré à la réalisation de ces présents travaux. Il m'a également encadré pour tous les enseignements que j'ai dispensés à l'Université Nangui Abrogoua et à l'Université Jean Lorougnon Guédé (Daloa). J'ai aussi eu l'honneur de bénéficier de ses qualités exceptionnelles de pédagogue et de chercheur. Ses conseils éclairés m'ont été d'un précieux apport aussi bien dans ma vie civile que familiale.*

*Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance, ma déférente gratitude ainsi que mon dévouement sans faille. Merci également pour sa participation au jury de cette thèse.*

*Je remercie chaleureusement **Monsieur Kurt HOSTETTMANN**, Professeur Titulaire à l'Université de Genève (Suisse), Faculté des Sciences, Section des Sciences Pharmaceutiques, pour m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie où j'ai eu le plaisir d'effectuer 4 mois, puis 45 jours de stages postdoctoraux qui m'ont permis d'apprendre diverses techniques chromatographiques et spectrométriques usuelles et de purifier l'extrait de la plante que j'ai étudié.*

*Au cours de ces stages, j'ai bénéficié de l'encadrement des **Docteurs Anne-Emmanuelle HAY, Rahimana HO** (Maître-Assistants) et **Andrew MARSTON** (Maître de Conférences). Je les remercie sincèrement pour leurs conseils avisés et pour les discussions très enrichissantes que nous avons eues. Merci aussi à tous les autres Stagiaires et Doctorants que j'ai côtoyé et qui ont su rendre agréable mon séjour au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (Unige).*

*J'ai eu l'opportunité, durant ces stages de bénéficier de la collaboration de **Monsieur M.C. RECIO**, Professeur Titulaire à Université de Valence (Espagne), Faculté de Pharmacie, Département de Pharmacologie, pour les tests de cytotoxicité qu'il a effectués avec mes substances. Qu'il en soit remercié.*

*A **Monsieur SERI Bialli Victor**, Professeur Titulaire à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, j'exprime ma sincère reconnaissance pour ses conseils, la sympathie dont il a fait preuve de tout temps et pour l'intérêt bienveillant qu'il a toujours porté pour mes travaux et pour ma promotion. Je suis comblé de l'immense honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse, malgré ses nombreuses occupations.*

*Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon plus grand respect.*

*A **Monsieur YANGNI-ANGATE Hervé**, Professeur Titulaire à l'Université Alassane Ouattara (Bouaké), Faculté de Médecine, je voudrais dire merci pour l'évaluation de ces travaux en tant que rapporteur et pour l'honneur qu'il me fait d'accepter de siéger dans le jury et de juger cette thèse malgré ses multiples occupations.*

*Qu'il trouve ici l'expression de ma très haute considération.*

*A **Monsieur YAO Datté Jacques**, Professeur Titulaire à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, j'exprime ma reconnaissance pour l'évaluation de ces travaux en tant que rapporteur et pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse. Merci également pour ses conseils avisés dans ce mémoire.*

*A **Monsieur TRAORE Karim Sory**, Maître de Conférences à l'Université Nangui Abrogoua, UFR des Sciences et Gestion de l'Environnement, je voudrais dire merci pour l'honneur qu'il me fait de participer à ce jury pour l'évaluation de cette thèse.*

*Mes remerciements s'adressent également :*

- à **Monsieur TRAORE Flavien**, Professeur Titulaire à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, Directeur du Laboratoire de Physiologie Animale, aux **Docteurs SORO Tianga Y. et NENE-BI S. Anthelme** (Maître-Assistants), **KASSI Yomalan épouse ATTA, Mea Arsène et ZAHOUI O. Stanislas** (Assistants), enseignants dans ce Laboratoire, et **BAH Jean** (Technicien de Laboratoire), pour leurs disponibilités, leurs sens du partage et leurs sympathies qui ont permis de créer un cadre de travail agréable et dynamique au sein du dit Laboratoire ;

- à **Messieurs BEKRO Yves-Alain**, Professeur Titulaire à l'Université Nangui Abrogoua, UFR des Sciences Fondamentales et Appliquées et **KOUAKOU Koffi**, Maître de Conférences à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, pour leurs disponibilités, leurs esprits critiques et leurs conseils et suggestions dans la finalisation de ce mémoire ;

- à **Messieurs OFFOUMOU A. Michel et KATI-COULIBALY S.** (Professeurs Titulaires), **BA Abdoulaye, TAKO N. Antoine et GLIN Léon** (Maîtres de Conférences), **KOUAME Koffi, AMOAKON Kouakou, ADOU Kobenan F. J-B., ASSI Bessekon D. et BAH Calixte** (Maître-Assistants), tous à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, et **KOUAKOU K. Léandre**, Maître-Assistant à l'Université Nangui Abrogoua (Abidjan), UFR des Sciences de la Nature, pour leurs conseils et encouragements durant tout mon parcours universitaire à leurs côtés.

Un très grand merci à **Monsieur AKE Assi Laurent**, Professeur Emérite à l'Université Félix Houphouët-Boigny, Centre National de Floristique, pour l'identification de la plante étudiée, et à **Monsieur ATTIOUA Barthelemy**, Maître-Assistant à l'Université Félix Houphouët-Boigny, UFR des Sciences de la Structure de la Matière et Technologie, pour l'élucidation de la structure d'un de mes produits purifiés et pour ses conseils et suggestions.

Enfin, merci à tous **mes parents et amis** qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ces travaux, à **ceux qui croient en moi**, qui me soutiennent et m'encouragent dans tout ce que j'entreprends. Merci du fond du cœur pour leurs soutiens et la joie qu'ils m'ont toujours communiqué.

# LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

---

<b>AcOEt</b>	: Acétate d'éthyle
<b>Adr</b>	: Adrénaline
<b>AF</b>	: Acide formique (CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
<b>AJse</b>	: Extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> Vahl (Acanthaceae)
<b>AMP<sub>C</sub></b>	: Adénosine monophosphate cyclique
<b>ARA II</b>	: Antagoniste des récepteurs de l'Angiotensine II (Sartan)
<b>ATP</b>	: Adénosine triphosphate
<b>ATPase</b>	: Adénosine triphosphatase
<b>ATR</b>	: Atropine
<b>CC</b>	: Chromatographie sur colonne ouverte ( <i>Column Chromatography</i> )
<b>CCC</b>	: Chromatographie centrifuge à contre-courant ( <i>Conter-Current Chromatography</i> )
<b>CCM</b>	: Chromatographie sur couche mince (TLC, <i>Thin Layer Chromatography</i> )
<b>CCP</b>	: Chromatographie sur couche préparative
<b>CE<sub>50</sub> (DE<sub>50</sub>)</b>	: Concentration efficace 50 % (Dose efficace 50 %)
<b>cf.</b>	: Confer (reportez-vous à)
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	: Acétonitrile (MeCN)
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	: Méthanol (MeOH)
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	: Chloroforme
<b>CPG</b>	: Chromatographie en phase gazeuse (GC, <i>Gas Chromatography</i> )
<b>CPL</b>	: Chromatographie en phase liquide ou chromatographie liquide (LC, <i>Liquid Chromatography</i> )
<b>d</b>	: Doublet
<b>D.E.</b>	: Degré Engler
<b>d.i.</b>	: Diamètre interne
<b>Da</b>	: Dalton (unité de masse moléculaire)
<b>DAD</b>	: Détecteur à barrettes (réseau) de diodes ( <i>Diode Array Detector</i> )
<b>DL<sub>50</sub></b>	: Dose létale 50 % (CL <sub>50</sub> , concentration létale 50 %)
<b>DMSO-<i>d</i>6</b>	: Diméthylsulfoxyde hexadeutééré
<b>DMT</b>	: Dose maximale tolérée
<b>DPPH</b>	: 1,1 -diphényl-2-picrylhydrazyle

<b>EDTA</b>	: Ethylène diamine tétra acétique acide
<b>ESI</b>	: Ionisation par electrospray ( <i>ElectroSpray Ionization</i> )
<b>F 11-14/MPLC</b>	
<b>/AcOEt/AJse</b>	: Fractions 11 à 14 issues de la MPLC de la phase AcOEt de AJse
<b>g/l</b>	: Gramme par litre
<b>HAS</b>	: Haute autorité de la santé
<b>HPLC</b>	: Chromatographie liquide à haute performance ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HR</b>	: Haute résolution ( <i>High Resolution</i> )
<b>HTA</b>	: Hypertension artérielle
<b>Hyper Ca<sup>2+</sup></b>	: Hypercalcique (solution physiologique)
<b>Hyper K<sup>+</sup></b>	: Hyperpotassique (solution physiologique)
<b>Hyper Na<sup>+</sup></b>	: Hypersodique (solution physiologique)
<b>Hypo Ca<sup>2+</sup></b>	: Hypocalcique (solution physiologique)
<b>Hypo K<sup>+</sup></b>	: Hypopotassique (solution physiologique)
<b>Hypo Na<sup>+</sup></b>	: Hyposodique (solution physiologique)
<b>ICC (ICA, IC)</b>	: Inhibiteur des canaux calciques (inhibiteurs calciques)
<b>IEC (IECA)</b>	: Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II
<b>IR</b>	: Infrarouge
<b>ISH</b>	: <i>International Society of Hypertension</i>
<b>J</b>	: Constante de couplage
<b>J N C</b>	: <i>Joint National Committee</i>
<b>LDL</b>	: Lipoprotéine de basse densité ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
<b>LLE</b>	: Extraction (séparation) liquide-liquide ( <i>Liquid-Liquid Extraction</i> )
<b>Log</b>	: Logarithme décimal
<b>Los</b>	: Losartan
<b>LP</b>	: Libération prolongée
<b>LPLC</b>	: Chromatographie liquide à basse pression (Lobar) ( <i>Low Pressure Liquid Chromatography</i> )
<b>m</b>	: Multiplet
<b>m/z</b>	: Rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires d'ions
<b>mAU</b>	: Unité d'absorbance utilisée en chromatographie ( <i>milli Absorbance Unit</i> )
<b>ME</b>	: Mac Ewen (solution physiologique de référence)
<b>mg/kg</b>	: Milligramme par kilogramme

<b>mg/ml</b>	: Milligramme par millilitre
<b>ml</b>	: Millilitre
<b>mm Hg</b>	: Millimètre de mercure
<b>MPLC</b>	: Chromatographie liquide à moyenne performance ( <i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> )
<b>MS</b>	: Spectroscopie de masse ( <i>Mass Spectrometry</i> )
<b>MTT</b>	: Bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium
<b>NA</b>	: Nangui Abrogoua (Université)
<b>Nif</b>	: Nifédipine
<b>NO</b>	: Monoxyde d'azote
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé (WHO, <i>World Health Organisation</i> )
<b>P.C.</b>	: Poids corporel
<b>P1/AcOEt/AJse</b>	: Produit pur 1 issu de la phase AcOEt de AJse
<b>P2/AcOEt/AJse</b>	: Produit pur 2 issu de la phase AcOEt de AJse
<b>P3/AcOEt/AJse</b>	: Produit pur 3 issu de la phase AcOEt de AJse
<b>PA</b>	: Pression artérielle
<b>PAD</b>	: Pression artérielle diastolique
<b>PAS</b>	: Pression artérielle systolique
<b>Praz</b>	: Prazosine
<b>ppm</b>	: Partie par million ( <i>parts per million</i> = $10^{-6}$ )
<b>Pro</b>	: Propranolol
<b>Rf</b>	: Facteur de rétention ou rapport frontal ( <i>Retention factor</i> )
<b>RMN</b>	: Résonance magnétique nucléaire (NMR, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>SLE</b>	: Extraction solide-liquide ( <i>Solid-Liquid Extraction</i> )
<b>sp.</b>	: Espèce non précisée
<b>SPE</b>	: Extraction en phase solide ( <i>Solid Phase Extraction</i> )
<b>SRAA</b>	: Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
<b>T</b>	: Témoin
<b>TFA</b>	: Acide trifluoroacétique ( <i>TrifluoroAcetic Acid</i> )
<b>TOF</b>	: Temps de vol ( <i>Time Of Flight</i> )
<b>UPLC</b>	: Chromatographie liquide ultra performante ( <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>UV</b>	: Ultra-violet
<b>V<sub>D.E.</sub></b>	: Viscosité relative en degré Engler

<b>Ver</b>	: Vérapamil
<b>v/v</b>	: Volume pour volume
<b>®</b>	: Originale (marque)
<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b><math>\delta</math></b>	: Déplacement chimique

### **Remarques**

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment rencontrée dans la littérature. C'est pourquoi elles sont quelques fois issues de la terminologie anglo-saxonne.

Les couplages analytiques entre une méthode de séparation et une (ou plusieurs) méthode(s) de détection sont indiqués par les abréviations successives de ces dernières, séparées par le signe « / ». Exemple : HPLC/UV, UPLC/MS,... Lorsqu'il s'agit d'indiquer le type précis de détection, on le fera à l'aide des abréviations correspondantes placées avant celles désignant la méthode générale et séparées par un trait d'union. Exemple : DAD-UV, ESI-MS,...

# LISTE DES FIGURES

---

	Page
<b>Figure 1</b> : schéma de l'action des diurétiques .....	21
<b>Figure 2</b> : schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA) .....	25
<b>Figure 3</b> : schéma du mécanisme d'action des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II) .....	27
<b>Figure 4</b> : schéma du traitement de l'hypertension artérielle .....	36
<b>Figure 5</b> : schéma de l'extraction solide-liquide .....	40
<b>Figure 6</b> : schéma de l'extraction liquide-liquide .....	42
<b>Figure 7</b> : schéma de l'extraction en phase solide .....	45
<b>Figure 8</b> : schéma d'un dispositif de chromatographie liquide .....	48
<b>Figure 9</b> : schéma du montage pour chromatographie sur colonne ouverte (A) et expérience de base en CC (B) .....	50
<b>Figure 10</b> : schéma du tamisage moléculaire .....	53
<b>Figure 11</b> : schéma du principe de la chromatographie d'exclusion .....	53
<b>Figure 12</b> : élution des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires .....	53
<b>Figure 13</b> : schéma d'un dispositif de chromatographie de partage centrifuge à contre-courant .....	56
<b>Figure 14</b> : schéma d'un dispositif de flash chromatographie .....	56
<b>Figure 15</b> : schéma d'un dispositif de chromatographie liquide à haute pression semi-préparative .....	59
<b>Figure 16</b> : schéma d'un dispositif de chromatographie gazeuse .....	59
<b>Figure 17</b> : schémas d'une chambre de développement de CCM et plaque de CCM .....	63
<b>Figure 18</b> : schéma d'un dispositif de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	66
<b>Figure 19</b> : schéma d'un spectrophotomètre UV .....	70
<b>Figure 20</b> : schéma d'un spectromètre infrarouge "classique" .....	72
<b>Figure 21</b> : schéma d'un spectromètre de masse .....	75
<b>Figure 22</b> : schéma d'un spectromètre RMN .....	78

<b>Figure 23</b> : photographies de <i>Justicia secunda</i> M. Vahl (Acanthaceae) .....	82
<b>Figure 24</b> : préparation d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) .....	85
<b>Figure 25</b> : illustration d'une plaque de 96 puits dans laquelle le test colorimétrique du MTT a été réalisé .....	90
<b>Figure 26</b> : schéma du dispositif d'enregistrement de la pression artérielle .....	92
<b>Figure 27</b> : schéma du cardiographe utilisé pour l'enregistrement de l'électrocardiogramme (ECG) .....	95
<b>Figure 28</b> : schéma du dispositif d'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé et perfusé .....	97
<b>Figure 29</b> : photographie du dispositif d'enregistrement de l'activité contractile de l'artère aorte isolé .....	101
<b>Figure 30</b> : photographies du viscosimètre d'Engler utilisé pour la mesure de la viscosité du sang .....	103
<b>Figure 31</b> : extraction liquide-liquide de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) .....	116
<b>Figure 32</b> : photographie du dispositif pour chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) .....	117
<b>Figure 33</b> : photographie du dispositif pour chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique .....	120
<b>Figure 34</b> : photographie du dispositif pour chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative) .....	121
<b>Figure 35</b> : photographies du dispositif pour chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ESI/TOF-MS) .....	123
<b>Figure 36</b> : photographie d'une station de travail Sun pour la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	125
<b>Figure 37</b> : variation de la mortalité des souris en fonction de la dose de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) injectée .....	135
<b>Figure 38</b> : effets dose-réponse d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) sur la pression sanguine artérielle de lapin .....	141
<b>Figure 39</b> : effets d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline au lapin .....	143

<b>Figure 40</b> : effets cumulés d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) et de l'adrénaline sur la pression sanguine artérielle de lapin .....	144
<b>Figure 41</b> : effets d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique de lapin .....	146
<b>Figure 42</b> : photographies des plaques CCM après élution d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) en solution aqueuse .....	152
<b>Figure 43</b> : photographies des plaques CCM à la lumière du jour montrant l'activité antiradicalaire (DPPH) d'un extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) .....	155
<b>Figure 44</b> : enregistrement de l'ECG normal montrant les différentes ondes, intervalles et segments .....	164
<b>Figure 45</b> : effets dose-réponse de AJse sur l'ECG de lapin .....	165
<b>Figure 46</b> : effets de AJse à 20 mg/kg de poids corporel en fonction du temps sur l'ECG de lapin .....	168
<b>Figure 47</b> : effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel en fonction du temps sur l'ECG de lapin .....	169
<b>Figure 48</b> : effets de AJse à 40 mg/kg de poids corporel en fonction du temps sur l'ECG de lapin .....	170
<b>Figure 49</b> : effets dose-réponse de AJse sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat .....	173
<b>Figure 50</b> : effets dose-réponse de AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée intacte de cobaye .....	183
<b>Figure 51</b> : effets dose-réponse de AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye, dépourvue d'endothélium .....	185
<b>Figure 52</b> : effets dose-réponse de AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye, en présence et en absence d'endothélium .....	185
<b>Figure 53</b> : variation de la viscosité relative du sang de bœuf en fonction de la concentration de AJse .....	189
<b>Figure 54</b> : interaction AJse-atropine sur pression sanguine artérielle de lapin .....	194
<b>Figure 55</b> : interaction AJse-propranolol sur pression sanguine artérielle de lapin .....	196
<b>Figure 56</b> : interaction AJse-vérapamil sur pression sanguine artérielle de lapin .....	197
<b>Figure 57</b> : interaction AJse-nifédipine sur pression sanguine artérielle de lapin .....	199
<b>Figure 58</b> : interaction AJse-prazosine sur pression sanguine artérielle de lapin .....	201

<b>Figure 59</b> : interaction <i>AJse</i> -losartan sur pression sanguine artérielle de lapin .....	202
<b>Figure 60</b> : effets dose-réponse de <i>AJse</i> en présence du losartan sur la pression sanguine artérielle de lapin .....	204
<b>Figure 61</b> : effets dose-réponse de <i>AJse</i> sur la pression sanguine artérielle de lapin en présence et en absence du losartan .....	205
<b>Figure 62</b> : bilan de masse et rendement de la séparation liquide-liquide de 10 g de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> ( <i>AJse</i> ) (n = 4) .....	216
<b>Figure 63</b> : photographies des plaques CCM des phases CHCl <sub>3</sub> , AcOEt et H <sub>2</sub> O issues de la séparation liquide-liquide de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> ( <i>AJse</i> ) et de <i>AJse</i> .....	217
<b>Figure 64</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV de l'extrait brut de <i>Justicia secunda</i> à 210 (A), 254 (B), 280 (C), 360 (D) et 520 (E) nm .....	219
<b>Figure 65</b> : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 245 nm de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> ( <i>AJse</i> ) .....	220
<b>Figure 66</b> : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 245 nm de la phase chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ) issue de la LLE de <i>AJse</i> .....	221
<b>Figure 67</b> : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 245 nm de la phase acétatique (AcOEt) issue de la LLE de <i>AJse</i> .....	222
<b>Figure 68</b> : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 245 nm de la phase aqueuse (H <sub>2</sub> O) issue de la LLE de <i>AJse</i> .....	223
<b>Figure 69</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 245 nm de <i>AJse</i> (A) et des phases CHCl <sub>3</sub> (B), AcOEt (C) et H <sub>2</sub> O (D) .....	224
<b>Figure 70</b> : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin de la phase chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ) issue de la LLE de <i>AJse</i> .....	226
<b>Figure 71</b> : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin de la phase acétatique (AcOEt) issue de la LLE de <i>AJse</i> .....	227
<b>Figure 72</b> : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin de la phase aqueuse (H <sub>2</sub> O) issue de la LLE de <i>AJse</i> .....	229
<b>Figure 73</b> : baisses de la pression artérielle de lapin en fonction de la concentration de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> ( <i>AJse</i> ) et des phases chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ), acétatique (AcOEt) et aqueuse (H <sub>2</sub> O) issues de la LLE de <i>AJse</i> .....	230

<b>Figure 74</b> : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ) et acétatique (AcOEt) cumulées .....	231
<b>Figure 75</b> : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ) et aqueuse (H <sub>2</sub> O) cumulées .....	233
<b>Figure 76</b> : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des phases acétatique (AcOEt) et aqueuse (H <sub>2</sub> O) cumulées .....	234
<b>Figure 77</b> : baisses de la pression artérielle de lapin en fonction de la concentration de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) et des trois phases chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ), acétatique AcOEt) et aqueuse (H <sub>2</sub> O) issues de la LLE de AJse, cumulées deux à deux .....	235
<b>Figure 78</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 245 nm montrant les composés qui absorbent majoritairement dans les phases AcOEt + H <sub>2</sub> O (A) et la phase AcOEt (B) après la LLE de AJse (C) .....	236
<b>Figure 79</b> : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des trois phases chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ), acétatique (AcOEt) et aqueuse (H <sub>2</sub> O) issues de la LLE de AJse, cumulées .....	238
<b>Figure 80</b> : baisses de la pression artérielle de lapin en fonction de la concentration de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> AJse) et des trois phases (chloroformique (CHCl <sub>3</sub> ), acétatique (AcOEt) et aqueuse (H <sub>2</sub> O) issues de la LLE de AJse, cumulées .....	239
<b>Figure 81</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> (AJse) et des trois phases (CHCl <sub>3</sub> , AcOEt et H <sub>2</sub> O) issues de la LLE de AJse, cumulées .....	240
<b>Figure 82</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 245 nm de la phase AcOEt issue de la LLE de AJse (A) et d'un produit semi-purifié (B), issu de la fraction 11-14 de la MPLC de la phase AcOEt .....	243
<b>Figure 83</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 245 nm de la phase AcOEt issue de la LLE de AJse (A) et de produits semi-purifiés issus de la CC des fractions 38-40 (B et C) et 41-42 (D) de la phase AcOEt .....	244

<b>Figure 84</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 245 nm de la phase AcOEt issue de la LLE de <i>AJse</i> (A) et des produits purifiés P1/AcOEt/ <i>AJse</i> (B), P2/AcOEt/ <i>AJse</i> (C) et P3/AcOEt/ <i>AJse</i> (D) issus de la phase AcOEt .....	246
<b>Figure 85</b> : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 245 nm des 3 produits purifiés (A), majoritairement présents dans les phases AcOEt et H <sub>2</sub> O cumulées (B) et dans la phase AcOEt (C) issues de la LLE de <i>AJse</i> .....	247
<b>Figure 86</b> : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 245 nm du produit purifié P1/AcOEt/ <i>AJse</i> issu de la phase AcOEt de <i>AJse</i> .....	248
<b>Figure 87</b> : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 245 nm du produit purifié P2/AcOEt/ <i>AJse</i> issu de la phase AcOEt de <i>AJse</i> .....	249
<b>Figure 88</b> : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 245 nm du produit purifié P3/AcOEt/ <i>AJse</i> issu de la phase AcOEt de <i>AJse</i> .....	250
<b>Figure 89</b> : effets dose-réponse de la substance purifiée P3/AcOEt/ <i>AJse</i> sur la pression artérielle de lapin .....	253
<b>Figure 90</b> : effets dose-réponse de la substance purifiée P1/AcOEt/ <i>AJse</i> sur la pression artérielle de lapin .....	254
<b>Figure 91</b> : effets dose-réponse de la substance purifiée P2/AcOEt/ <i>AJse</i> sur la pression artérielle de lapin .....	255
<b>Figure 92</b> : baisses de la pression sanguine artérielle de lapin en fonction de la concentration de P1/AcOEt/ <i>AJse</i> et de P2/AcOEt/ <i>AJse</i> .....	256
<b>Figure 93</b> : rapport d'analyse TOF-MS du composé P1/AcOEt/ <i>AJse</i> .....	258
<b>Figure 94</b> : structure chimique du composé P1/AcOEt/ <i>AJse</i> .....	260
<b>Figure 95</b> : effets de P1/AcOEt/ <i>AJse</i> sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline au lapin .....	269
<b>Figure 96</b> : effets de P1/AcOEt/ <i>AJse</i> sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique de lapin .....	270
<b>Figure 97</b> : interaction P1/AcOEt/ <i>AJse</i> -propranolol sur la pression artérielle de lapin .....	273
<b>Figure 98</b> : interaction P1/AcOEt/ <i>AJse</i> -vérapamil sur la pression artérielle de lapin ...	274
<b>Figure 99</b> : interaction P1/AcOEt/ <i>AJse</i> -nifédipine sur la pression artérielle de lapin ...	276
<b>Figure 100</b> : interaction P1/AcOEt/ <i>AJse</i> -losartan sur la pression artérielle de lapin .....	277

<b>Figure 101 :</b> effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur l'électrocardiogramme de lapin .....	280
<b>Figure 102 :</b> diminutions, en fonction de la dose de P1/AcOEt/AJse, de l'amplitude des ondes P et T, du complexe QRS et de la fréquence de l'ECG de lapin .....	282
<b>Figure 103 :</b> effets de P1/AcOEt/AJse à $10^{-10}$ mg/ml sur les contractions du cœur isolé de rat .....	283
<b>Figure 104 :</b> diminutions de l'amplitude et de la fréquence des contractions du cœur isolé de rat en fonction de la concentration de P1/AcOEt/AJse .....	285
<b>Figure 105 :</b> diminution du débit coronaire du cœur isolé de rat en fonction de la concentration de P1/AcOEt/AJse .....	286
<b>Figure 106 :</b> effets de P1/AcOEt/AJse à $10^{-16}$ mg/ml sur les contractions du cœur isolé de rat .....	287
<b>Figure 107 :</b> interaction P1/AcOEt/AJse-vérapamil sur les contractions du cœur isolé de rat .....	289
<b>Figure 108 :</b> effets d'une solution physiologique hypocalcique (75 % CaCl <sub>2</sub> ) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypocalcique (75 % CaCl <sub>2</sub> ) sur les contractions du cœur isolé de rat .....	291
<b>Figure 109 :</b> effets d'une solution physiologique hypercalcique (125 % CaCl <sub>2</sub> ) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypercalcique (125 % CaCl <sub>2</sub> ) sur les contractions du cœur isolé de rat .....	293
<b>Figure 110 :</b> effets d'une solution physiologique hyposodique (90 % NaCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hyposodique (90 % NaCl) sur les contractions du cœur isolé de rat .....	294
<b>Figure 111 :</b> effets d'une solution physiologique hypersodique (125 % NaCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypersodique (125 % NaCl) sur les contractions du cœur isolé de rat .....	296
<b>Figure 112 :</b> effets d'une solution physiologique hypopotassique (75 % KCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypopotassique (75 % KCl) sur les contractions du cœur isolé de rat .....	297
<b>Figure 113 :</b> effets d'une solution physiologique hyperpotassique (125 % KCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hyperpotassique (125 % KCl) sur les contractions du cœur isolé de rat .....	299

**Figure 114 :** effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye ..... 307

**Figure 115 :** effets de la nifédipine sur la baisse du tonus de base des contractions de l'artère aorte isolée de cobaye induite par P1/AcOEt/AJse ..... 309

**Figure 116 :** baisse du tonus de base des contractions de l'artère aorte isolée de cobaye induite par P1/AcOEt/AJse en présence de nifédipine ..... 310

....

# LISTE DES TABLEAUX

---

	Page
<b>Tableau I</b> : classification de l'HTA chez l'adulte (de plus de 18 ans) .....	14
<b>Tableau II</b> : antihypertenseurs courants et leurs mécanismes d'action .....	33
<b>Tableau III</b> : classification systématique de <i>Justicia secunda</i> M. Vahl (Acanthaceae) .....	83
<b>Tableau IV</b> : solutions mères utilisées dans la préparation du Mac Ewen .....	127
<b>Tableau V</b> : composition de la solution physiologique de type Mac Ewen et des milieux physiologiques modifiés pour 1 litre de solution .....	127
<b>Tableau VI</b> : substances chimiques et pharmacologiques utilisées .....	129
<b>Tableau VII</b> : nombre de morts et pourcentage de mortalité des souris en fonction de la dose de l'extrait aqueux brut de <i>Justicia</i> <i>secunda</i> (AJse) injectée .....	133
<b>Tableau VIII</b> : récapitulatif des valeurs de DL <sub>50</sub> et DMT obtenues .....	136
<b>Tableau IX</b> : résultats des réactions en tube pour la mise en évidence de quelques métabolites secondaires dans l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> .....	150
<b>Tableau X</b> : résultats des révélations sur CCM pour la mise en évidence de quelques métabolites secondaires dans l'extrait aqueux brut de <i>Justicia secunda</i> .....	154
<b>Tableau XI</b> : effet dose-réponse de AJse sur l'amplitude des ondes P et T, du complexe QRS et sur la fréquence de l'ECG chez le lapin .....	167
<b>Tableau XII</b> : effets durant 5 min de doses uniques de AJse sur l'amplitude des ondes P et T, du complexe QRS et sur la fréquence de l'ECG chez le lapin (n = 4) .....	171
<b>Tableau XIII</b> : effets dose-réponse de AJse sur l'amplitude et la fréquence des contractions du cœur isolé de rat (n = 4) .....	175
<b>Tableau XIV</b> : variations du débit coronaire du cœur isolé de rat en fonction de la dose de AJse (n = 4) .....	175
<b>Tableau XV</b> : temps d'écoulement de 100 ml de sang de bœuf et viscosité en fonction de la concentration de AJse (n = 10) .....	189

<b>Tableau XVI</b> : bilan de masse de la MPLC pour 2,5 g de phase AcOEt et identification de composés à séparer par CC ou à purifier par HPLC semi-préparative .....	241
<b>Tableau XVII</b> : localisation, dans les fractions de la MPLC, des 3 composés isolés de la phase AcOEt de <i>AJse</i> .....	251
<b>Tableau XVIII</b> : données spectroscopiques RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ de P1/AcOEt/ <i>AJse</i> .....	259
<b>Tableau XIX</b> : constantes physiques et données spectrales du composé P1/AcOEt/ <i>AJse</i> .....	261

## RESUME

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales à travers la recherche de nouveaux composés pharmacologiquement actifs, principalement dans le traitement de l'hypertension artérielle (HTA), notre étude a porté sur *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae), plante utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de cette affection.

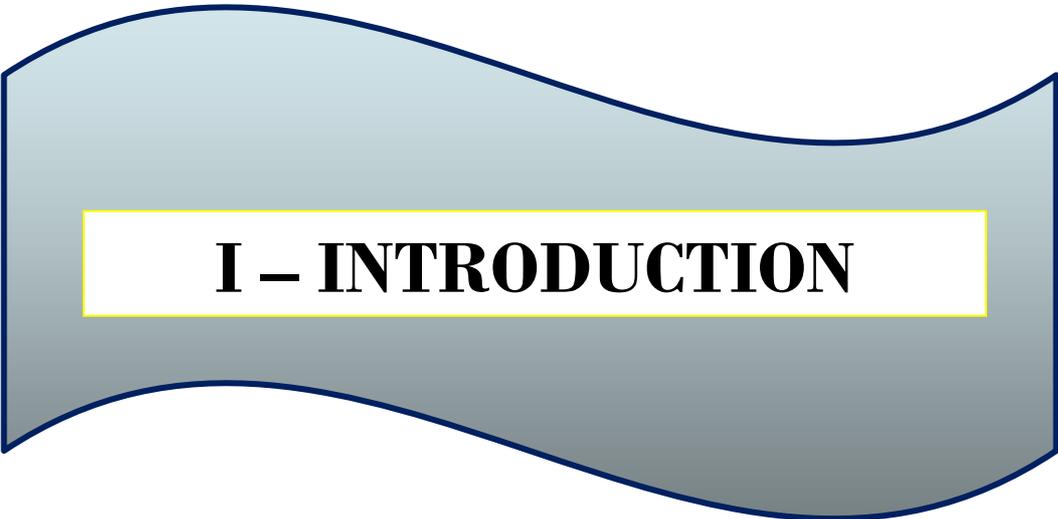
Dans ce contexte, l'effet d'un extrait aqueux brut de feuilles fraîches de *Justicia secunda* (AJse) a été évalué, à l'aide de méthodes de criblages biologiques et pharmacologiques, sur l'activité cardiovasculaire de Mammifères.

Nos résultats indiquent que cet extrait est peu toxique. Il entraîne essentiellement des effets hypotenseurs, antihypertenseurs, cardioinhibiteurs, vasodilatateurs, antioxydants et une augmentation de la viscosité du sang et du débit coronaire cardiaque. Ces effets sont dû à la présence de substances  $\beta$ -bloquants, anticalciques et, probablement, d'autres substances non identifiées contenues dans cet extrait. Par ailleurs, AJse s'est révélé riche en métabolites secondaires, notamment en stérols et polyterpènes, alcaloïdes, saponosides et anthocyanes.

Cette étude s'est poursuivie par l'isolement et la purification de composés responsables des divers effets de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*. La méthodologie de purification a été fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques et d'études pharmacologiques bioguidées sur la pression artérielle.

Ainsi, trois composés ont été purifiés. Celui dénommé P1/AcOEt/AJse, qui s'est révélé le plus pharmacologiquement actif sur la pression artérielle, a été retenu. A partir de méthodes spectrométriques, il a été identifié comme étant l'Acide 4-(octadécyloxy)-, 4-[[4-[[[(1-méthylheptyl)oxy]carbonyl]phényl]éthynyl]phényl ester benzoïque (C<sub>48</sub>H<sub>66</sub>O<sub>5</sub>). Sa masse moléculaire est de 723,4993 Da. Il s'agit d'une nouvelle molécule qui n'a jamais été décrite dans la littérature. Cette substance s'avère être peu toxique et 25 à 100 fois plus active que l'extrait brut sur le système cardiovasculaire de Mammifères. P1/AcOEt/AJse est un anticalcique qui, par ses propriétés d'inhibiteur calcique, induit une hypotension artérielle, une cardioinhibition et une vasodilatation. Ce composé est par ailleurs un antihypertenseur.

Dans cette étude, l'extrait aqueux brut de feuilles fraîches de *Justicia secunda* (AJse), de même que le produit purifié P1/AcOEt/AJse, ont montré des potentialités pharmacologiques intéressantes dans le traitement de l'HTA. Ceci justifie l'indication thérapeutique traditionnelle de l'extrait brut qui pourrait donc désormais être envisagé dans le traitement de l'HTA afin de soulager les patients. De même, le produit purifié (P1/AcOEt/AJse), nettement plus actif que AJse sur le système cardiovasculaire de Mammifères, pourrait être indiqué dans le traitement de cette affection.



# **I – INTRODUCTION**

## I – INTRODUCTION

### I – 1. Problématique

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour des soins de santé. D'après les découvertes archéologiques, il y a plus de 30 000 ans, l'homme de Neandertal utilisait déjà quelques plantes médicinales comme l'Achillée : *Achillea millefolium* (Asteracées) pour guérir les blessures. Les quatre espèces de Centaurée (*Centaurea* sp.) étaient utilisées pour combattre l'atonie intestinale, les maladies fébriles touchant les glandes abdominales), l'anémie et le surmenage. La Rose trémière : *Alcea rosea* (Malvaceae) servait comme adoucissant laxatif. Ainsi, dans l'Antiquité, les pharmacopées étaient utilisées sur tous les continents dans le monde, de sorte qu'elles constituent un vaste domaine où l'étendue des savoirs et de savoir faire traditionnels est considérable.

Dès 2900 avant J.C, en Chine, le plus vieux traité de médecine, le Pen Tsao de Shen Nung, mentionne quelques 365 remèdes à base de plantes. En Egypte, 1600 ans avant J.C., le Papyrus d'Ebers cite 877 remèdes à base de plantes. En Grèce, Hippocrate, père de la Médecine moderne il y a près de 2500 ans, recense plus de 400 plantes thérapeutiques, certaines héritées d'Inde, d'autres issues de ses recherches.

La science du XXI<sup>e</sup> siècle, avec des outils divers, poursuit toujours le même but : trouver dans la matière des éléments favorables à l'établissement et au maintien de la santé et du bien-être physique et psychique de l'être vivant.

L'essentiel des substances thérapeutiques utilisées pour les soins de santé est issue des plantes de la pharmacopée. En effet, le règne végétal est une source jugée inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique (Pousset, 1989). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90 % de la médecine traditionnelle. En Afrique, en 2002, jusqu'à 80 % de la population utilisait la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de soins de santé (OMS, 2002). Ceci est encore valable de nos jours. Les plantes thérapeutiques sont ainsi utilisées sous plusieurs formes de préparations contenant des mélanges complexes de constituants de principes actifs.

L'approfondissement de la connaissance des plantes thérapeutiques est donc capital pour optimiser leur utilisation. Dorénavant, la thérapeutique exige des méthodes scientifiques. Ainsi, depuis quelques années, il y a un regain d'intérêt pour les plantes médicinales comme source de molécules biologiquement actives dans la recherche de substances médicamenteuses plus efficaces, ayant peu d'effets secondaires. En effet, beaucoup de

médicaments en officine contiennent des principes actifs d'origine végétale. C'est le cas par exemple de l'artémisinine, un antimalarique obtenu à partir de *Artemisia annua* (Asteraceae) qui est actif contre des souches de *Plasmodium* résistantes aux antimalariques utilisés actuellement (Hamburger *et al.*, 1991).

Sachant qu'une plante peut contenir une multitude de substances différentes, on peut se rendre compte de la richesse naturelle du règne végétal. Relevons également que les plantes, sources de médicaments, présentent l'immense avantage d'être accessibles à tous, et particulièrement aux pays en voie de développement. C'est dans ce cadre, que le programme de valorisation des plantes médicinales a été mis en place sous l'égide du gouvernement ivoirien, depuis les années 1970, sollicitant la participation des Laboratoires de Botanique, de Chimie, de Biochimie, de Physiologie Animale et de Cristallographie, de l'Université Félix Houphouët-Boigny. Au Laboratoire de Physiologie Animale, les études concernent l'observation des effets physiologiques, puis la mise en évidence des modes d'action des molécules bioactives. La connaissance des mécanismes physicochimiques responsables de la genèse de l'activité cellulaire des tissus contractiles, offre un modèle d'étude idéal pour la mise en évidence des actions des différents composants des substances naturelles de la pharmacopée. La comparaison des principes d'action d'avec ceux des substances pharmacologiques et pharmacodynamiques connues, permet de déterminer la qualité et la quantité de l'activité physio thérapeutique de chaque composant des mixtures de la pharmacopée.

Dans le contexte socio-économique des pays en voie de développement, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faible prix. L'approfondissement des connaissances de plantes dans de tels pays est donc capital afin d'optimiser leurs utilisations. La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Cet engagement dans la valorisation du patrimoine médical traditionnel par la plupart des pays africains, la découverte de nouvelles molécules, la formulation de médicaments accessibles et utilisables dans le traitement des pathologies prioritaires sont encouragés par l'OMS (OMS, 2002).

Considérées par l'OMS comme un problème de santé publique dans le monde, les pathologies cardio-vasculaires constituent une cause majeure de mortalité en Côte d'Ivoire et dans le monde, et l'hypertension artérielle (HTA) est la plus fréquente de ces maladies (Waeber *et al.*, 1999).

En l'an 2000 la prévalence globale de l'hypertension dans la population mondiale adulte était estimée à 26,4 %, soit 972 millions d'individus hypertendus. Il faut cependant

noter que 639 millions d'entre eux proviennent des pays en voie de développement, soit 65,7% des cas (Kearney *et al.*, 2005). Selon cet auteur, la projection de ces statistiques fait redouter 1,56 milliard d'individus hypertendus en 2025. Il est à craindre que le continent africain soit submergé.

Face au nombre de plus en plus croissant de cas d'hypertension révélés en Afrique et dans le monde, et à la complexité de cette maladie, la thérapeutique moderne propose une gamme importante de médicaments antihypertenseurs. Mais, malgré la disponibilité de plusieurs types de médicaments faisant baisser et réguler la pression artérielle par des mécanismes différents (Waeber *et al.*, 1999), le traitement de l'hypertension demeure une tâche difficile. Le traitement de cette affection par la médecine moderne coûte en effet très cher et est bien hors de portée des populations du tiers monde (Breckenridge, 1982 ; Isah *et al.*, 1997 ; OMS, 1998 ; Dionkouda, 2005 ; Guindo, 2005 ; Xavier, 2005 ; Mbolla *et al.*, 2010). Par conséquent, en Afrique, les malades hypertendus ont recours à la médecine traditionnelle par l'utilisation des médicaments traditionnels qui sont, au plan socioculturel et économique, à leur portée.

Face à l'expansion de cette maladie dont la prise en charge est coûteuse, l'OMS, dans sa résolution AFR/RC50/R3 du 31 Août 2000, encourageait les pays africains à élaborer des stratégies régionales sur la médecine traditionnelle afin d'entreprendre des recherches sur les plantes médicinales et de promouvoir leurs utilisations optimales dans les systèmes de prestation des soins de santé (OMS, 2000).

Des travaux sont donc entrepris pour rechercher des remèdes à moindre coût et ayant l'innocuité, l'efficacité et la qualité prouvées (Diallo *et al.*, 2010). C'est ainsi que plusieurs plantes médicinales utilisées par les tradithérapeutes, réputées antihypertenseurs et reconnues pour leurs effets thérapeutiques, ont fait l'objet d'études. C'est le cas de *Mareya micrantha* (Euphorbiaceae) (Abo, 1996), *Zizyphus mauritiana* (Rhamnaceae) (Ba, 2005), *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) (Ajay *et al.*, 2007 ; Anga, 2007), *Bidens pilosa* (Asteraceae) (Kouakou, 2008), *Allium cepa* (Liliaceae) (Naseri *et al.*, 2008), *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) (Kassi, 2009) et *Hibiscus sabdariffa* (Malvacée) (Mea, 2009). Certaines plantes sont également proposées par la médecine traditionnelle pour le traitement de cette affection. C'est le cas, en Côte d'Ivoire, selon Tra Bi *et al.* (2008), de *Adansonia digitata* (Bombacaceae), *Albizia adianthifolia* (Mimosaceae), *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae), *Allium sativum* (Alliaceae), *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), *Bambusa vulgaris* (Poaceae), *Cassia occidentalis* (Caesalpinaceae), *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), *Cola nitida* (Steculiaceae),

*Fagara macrophylla* (Rutaceae), *Imperata cylindrica* (Poaceae), *Morinda lucida* (Rubiaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae), *Saccharum officinarum* (Poaceae), *Trema guineensis* (Ulmaceae) et *Vernonia colorata* (Asteraceae).

Pour notre part, notre étude a porté sur une plante de la pharmacopée : *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae), utilisée en médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques dans le traitement de l'hypertension artérielle.

*Justicia secunda* (Acanthaceae) est présente dans les zones tropicales et subtropicales d'Afrique, de Madagascar, des Antilles et d'Asie. Elle est cultivée, tout comme la majorité des espèces de cette famille, comme plante d'ornement des jardins (Heywood *et al.*, 2007).

La décoction de feuilles de *Justicia secunda* est utilisée en médecine traditionnelle par les populations de la Côte d'Ivoire, et aux Antilles par les Amérindiens (Etifier-Chalono, 2005), pour le traitement de l'hypertension artérielle. La tisane de feuilles et de tiges feuillées est prise en cas d'aménorrhée. Elle est aussi réputée abortive (Grenand *et al.*, 1987). Les feuilles de cette plante sont utilisées en médecine traditionnelle en Amérique centrale pour traiter les calculs rénaux et l'hyperglycémie (Wong, 1976 ; Cantillo *et al.*, 2007).

Certaines études ont montré que cette plante est active dans la reproduction (Lans, 2007) et présente des propriétés antimicrobiennes (Herrera *et al.*, 2002 ; Rojas *et al.*, 2006) et antianémiques (Chifundera, 2001 ; Moswa *et al.*, 2008 ; Tossou *et al.*, 2008).

Cependant, nos recherches bibliographiques sur cette plante n'ont montré aucune étude scientifique menée, ni sur l'hypertension artérielle, ni sur le système cardio-vasculaire.

Ainsi, par l'utilisation d'outils modernes de la recherche scientifique, il sera question, dans un premier temps, d'étudier la toxicité d'un extrait aqueux brut de feuilles de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae), de mettre en évidence ses propriétés antihypertensives, de déterminer ses composantes et de mettre en évidence ses effets et son mécanisme d'action sur le système cardio-vasculaire. Dans un second temps, il s'agira de séparer, purifier et identifier quelques composés bioactifs de l'extrait. Enfin, une étude de la toxicité et des effets pharmacologiques mettra en évidence la cytotoxicité et l'effet antihypertenseur d'une substance purifiée bioactive issue de *Justicia secunda*, ses effets et son mécanisme d'action sur le système cardio-vasculaire de Mammifères par l'étude de la pression sanguine artérielle, des activités électriques et mécaniques du cœur et de l'activité contractile des vaisseaux.

## **I – 2. Justification**

Ce travail a été motivé par :

✓ La recrudescence des maladies cardio-vasculaires, l'une des premières causes de mortalité, en Côte d'ivoire et dans le monde, et particulièrement l'hypertension artérielle qui affecte de plus en plus les sujets jeunes.

✓ La prise en charge relativement onéreuse de l'hypertension artérielle par la médecine moderne qui n'est pas toujours accessible à la majorité de la population en Côte d'ivoire et en Afrique. Cette prise en charge contribue à la paupérisation des populations.

✓ La revalorisation et la promotion des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle, en utilisant des méthodes scientifiques rigoureuses, en vue de la formulation de médicaments traditionnels améliorés efficaces, fabriqués à partir des matières premières africaines. Les populations africaines restant très attachées aux ressources de la médecine traditionnelle, cela représente des atouts économiques et socioculturels indéniables.

✓ La nécessité de faciliter l'accès des populations à des médicaments antihypertenseurs à moindre coût, compte tenu du coût élevé des médicaments conventionnels.

✓ L'utilisation de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae), plante de la pharmacopée ivoirienne, facilement accessible, ayant des propriétés antihypertensives avérées en médecine traditionnelle, et de techniques de pointe pour la mise en évidence de composés pharmacologiquement actifs.

✓ La quasi inexistence sur *Justicia secunda* d'études toxicologiques et pharmacologiques sur l'hypertension artérielle et le système cardio-vasculaire.

## **I – 3. Objectifs de l'étude**

### **I – 3 – 1. Objectif général**

L'objectif général de cette étude est la valorisation des plantes de la pharmacopée pour une utilisation rationnelle et la recherche de nouveaux composés à usage thérapeutique.

### **I – 3 – 2. Objectifs spécifiques**

Cette étude consistera à :

➤ étudier la toxicité d'un extrait aqueux de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae) par la détermination de la DL<sub>50</sub> et la DMT (toxicité aiguë) et la détermination

"*in vitro*" des concentrations tolérables par les cellules (cytotoxicité) de l'extrait brut et d'un composé purifié bioactif ;

- identifier les différents groupes chimiques présents et mettre en évidence l'existence ou pas de composés antioxydants dans l'extrait brut ;
- séparer et purifier les composés de l'extrait brut ;
- étudier les effets pharmacologiques de l'extrait brut, de ses fractions et de produits purifiés sur la pression sanguine artérielle ;
- identifier la structure chimique d'un composé bioactif purifié de l'extrait ;
- étudier, en référence aux effets de substances pharmacodynamiques, les effets pharmacologiques et les mécanismes d'action de l'extrait brut et d'un produit bioactif purifié de cet extrait sur le système cardio-vasculaire ; notamment sur l'électrocardiogramme, les contractions cardiaques, les contractions toniques de muscles lisses vasculaires et la viscosité du sang.

#### **I – 4. Structure du mémoire**

Dans ce mémoire, la revue bibliographique puis le matériel et les méthodes utilisées sont d'abord présentées. Suivent les résultats de nos travaux qui sont subdivisés en deux parties :

- la 1<sup>ère</sup> partie aborde la toxicité aiguë et la cytotoxicité d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae), la mise en évidence des grands groupes chimiques présents dans cet extrait, ses effets pharmacologiques sur l'activité cardio-vasculaire de Mammifères et son mécanisme d'action sur la pression artérielle ;

- la seconde partie concerne la purification de cet extrait aqueux brut, guidée par une étude pharmacologique sur la pression artérielle. Le composé pur le plus actif a été identifié et fait l'objet d'une étude toxicologique et d'un screening pharmacologique pour déterminer son(s) mécanisme(s) d'action sur l'activité cardio-vasculaire de Mammifères.

Enfin, l'analyse de ces résultats permet de dégager une conclusion générale et d'envisager des perspectives.



**II – REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## II – REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### II – 1. Hypertension artérielle (HTA)

Les pathologies cardio-vasculaires constituent une cause majeure de mortalité dans le monde (Murray et Lopez, 1997 ; Marques-Vidal et *al.*, 2004) et l'hypertension artérielle est la plus fréquente de ces maladies, avec une prévalence particulièrement élevée.

L'hypertension affecte de plus en plus les sujets jeunes ; toutefois, la prévalence reste plus importante chez les sujets âgés (Dickerson et Brown, 1995).

L'OMS considère les maladies cardio-vasculaires en général, et l'hypertension artérielle en particulier, comme un problème de santé publique dans le monde.

Pour comprendre l'hypertension artérielle qui est une élévation de la pression sanguine artérielle, il convient de connaître les caractéristiques et les méthodes de mesure de cette pression.

#### II – 1 – 1. Pression artérielle : définition et mesure

##### II – 1 – 1 – 1. Définition de la pression artérielle

L'appareil circulatoire est, pour l'ensemble de l'organisme, le système de distribution de nombreuses substances (nutriments provenant de la digestion, oxygène provenant de l'appareil respiratoire, hormones, etc.) et le système de drainage des déchets. Ces fonctions sont assurées grâce à la circulation sous pression du sang. Cette pression qu'exerce le flux sanguin sur la paroi des artères est appelée "tension" artérielle ou pression artérielle.

"Le but de l'existence" de la pression artérielle est de pousser le sang jusqu'au niveau des tissus de l'organisme pour qu'ils puissent assurer leurs fonctions dont par exemple l'oxygéner des tissus. Au niveau de ces tissus, la pression artérielle est très faible et le débit d'écoulement très réduit de manière à ce que l'oxygène puisse mieux pénétrer dans les tissus.

Ainsi, la pression artérielle se définit, d'après la loi de Hayen-Poiseuille, comme le produit de la résistance du vaisseau dans lequel se trouve le sang et le débit imposé par le cœur (Folkow, 1982 ; Royer, 1985 ; Guedeon, 1987 ; Chemla et Lecarpentier, 2001).

$$\text{Pression artérielle (PA)} = \text{Résistance du vaisseau (R)} \times \text{Débit cardiaque (Q)}$$

L'unité de pression artérielle actuellement établie est le millimètre de mercure (mm Hg), mais le remplacement du mercure est prévu par la commission sanitaire européenne.

La résistance du vaisseau (R) correspond à la rigidité des parois de l'artère. Elle peut varier dans de très nombreuses circonstances.

$$R = 8L \eta / \pi r^4 \quad \text{où}$$

-  $L$  = longueur des vaisseaux (constante)

-  $\eta$  = viscosité du sang

-  $r$  = rayon des vaisseaux

-  $\pi = 3,14$

Le débit cardiaque (Q) correspond à la capacité du cœur à éjecter du sang lors de chaque contraction (systole), correspondant donc à un volume de sang éjecté par minute (environ 5 litres par minute). Il est en fait le produit du volume de sang éjecté à chaque systole ou volume d'éjection systolique (Vs) par la fréquence cardiaque (Fc).

$$Q = V_s \times F_c$$

Ce débit cardiaque sera fonction, simultanément, de la pression différentielle, du rayon de l'artère et de la viscosité du sang.

L'expression du débit sanguin selon la loi de Poiseuille (Boccalon, 1995) est donc la suivante :

$$Q = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 L \eta} \quad \text{avec } \Delta P = \text{pression différentielle (P1 - P2) en deux points différents le long d'une artère}$$

Cette relation montre que la variation de l'un ou plusieurs des facteurs suivant : viscosité du sang ( $\eta$ ), rayon des vaisseaux ( $r$ ), fréquence cardiaque (Fc) et volume d'éjection systolique (Vs), modifie la pression artérielle. L'augmentation de la pression artérielle de façon théorique résulte de l'élévation du débit cardiaque, des résistances périphériques vasculaires ou de la masse sanguine circulante (Waeber *et al.*, 1990). En réalité, la cause la plus fréquente de l'hypertension artérielle est l'élévation des résistances vasculaires (Di Matteo et Vacheron, 1987).

## **II – 1 – 1 – 2. Mesure de la pression artérielle**

### **II – 1 – 1 – 2 – 1. Historique**

C'est en 1628 que Harvey William découvrit la circulation du sang. Il démontra, en évaluant la quantité de sang éjectée par le cœur à chaque contraction, qu'en une heure le cœur déplace une masse de sang égale à trois fois le poids du corps. C'est pourtant seulement en 1730 que la pression sanguine fut mesurée pour la première fois par Hales Stephen avec un manomètre relié par une canule introduite dans l'artère crurale d'un cheval. Cent ans plus tard,

en 1828, Poiseuille Jean-Louis Marie fit les mêmes mesures avec un manomètre à mercure dont les unités (mm ou cm de mercure) sont encore utilisées en pratique médicale, convertible avec le système international d'unités accepté universellement aujourd'hui : Pascal (Pa).

La méthode courante en pratique clinique (méthode de la sténose) a été inventée en 1905 par Korotkoff Nikolai. Elle consiste à mesurer au manomètre la contre pression exercée sur une artère par un brassard gonflable tout en auscultant l'artère.

## **II – 1 – 1 – 2 – 2. Mesure directe de Ludwig**

L'enregistrement graphique direct de la pression artérielle est réalisé avec un manomètre relié par un cathéter introduit à contre courant dans une artère. Il montre des oscillations périodiques synchrones avec le cycle cardiaque. La pression artérielle normale varie à chaque cycle cardiaque entre une valeur minimale d'environ 10 kPa (80 mm Hg), la pression diastolique (PD), et une valeur maximale d'environ 16 kPa (120 mm Hg), la pression systolique (PS).

L'usage du cathétérisme artériel se justifie en raison des avantages que représente les possibilités de monitorer la pression artérielle de manière invasive et de réaliser facilement des prélèvements sanguins.

## **II – 1 – 1 – 2 – 3. Mesure indirecte**

La mesure non invasive de la pression artérielle s'effectue avec tensiomètre ou un sphygmomanomètre (sphygmomètre : pouls ; manomètre : mesure de pression) et un stéthoscope (Gired *et al.*, 1998). Cette méthode est utilisée en clinique humaine. C'est la méthode par « contrepulsion » ou de la sténose. Dans ce cas, le médecin mesure deux nombres :

- la pression artérielle systolique (PAS) qui reflète la pression lors de la contraction du ventricule gauche (systole) ;
- la pression artérielle diastolique (PAD) qui reflète la pression lors de la relaxation du ventricule gauche (diastole).

Une pression artérielle moyenne (PAM) se calcule à partir des deux premiers.

$$PAM = (PAS + 2PAD) / 3$$

Les mesures de pression artérielle s'expriment en centimètre ou en millimètre de mercure (Hg) ; par exemple 12/7 veut mentionner 120 millimètres de mercure pour la pression artérielle maximale (systolique) et 70 millimètres de mercure pour la pression artérielle minimale (diastolique).

L'association tensiomètre et stéthoscope est de plus en plus remplacée par des appareils automatiques (tensiomètres électroniques) avec un brassard gonflé par un moteur et la détection est faite soit par la perception de bruits (méthode auscultatoire), soit par des variations d'amplitude de l'onde de pouls (méthode oscillométrique).

Lorsqu'on couple un tensiomètre électronique à une batterie et à une mémoire, on peut prendre alors la pression artérielle de manière répétée durant 24 heures : c'est le monitoring ambulatoire de la pression artérielle (MAPA), faussement appelé aussi Holter tensionnel.

## **II – 1 – 2. Définition, épidémiologie causes et traitements de l'hypertension artérielle**

### **II – 1 – 2 – 1. Définition de l'HTA**

L'hypertension artérielle, est définie par une pression du sang dans les artères trop élevée par rapport à une valeur dite "normale", établie par de nombreux comités scientifiques à travers le monde. C'est l'élévation anormale, permanente ou paroxystique, de la tension artérielle au repos. L'Organisation Mondiale de la Santé et la société internationale hypertension (OMS, 1999-a et 1999-b) indiquent que l'hypertension artérielle est l'élévation de la pression régnant à l'intérieur des artères, supérieure à 139 mm Hg (maxima) et 89 mm Hg (minima). Les valeurs doivent être retrouvées élevées à trois occasions différentes pour qu'on puisse parler d'hypertension artérielle. Le patient porteur d'une HTA est un hypertendu.

De cette définition de l'hypertension artérielle, Richer *et al.*, (1984) et Guedeon (1987), suggèrent de prendre en compte l'âge du sujet, la notion d'antécédents familiaux et de nombreux facteurs environnementaux.

En cas de normotension, les chiffres sont compris entre 120 et 139 mm Hg pour la tension artérielle systolique, et entre 80 et 89 mm Hg pour la tension artérielle diastolique (Guidelines Subcommittee, 1999).

L'OMS a fixé des seuils. Elle précise les différents niveaux de pression artérielle (d'après les dernières recommandations européennes éditées en juin 2007).

Ainsi, selon l'OMS, il existe trois grades d'hypertension :

- \* l'hypertension artérielle labile ou limite, lorsque les valeurs augmentées ne sont retrouvées qu'occasionnellement ;

- \* l'hypertension artérielle modérée ;

- \* l'hypertension artérielle sévère ou maligne, si elle reste élevée malgré l'administration concomitante de médicaments antihypertenseurs (Richer *et al.*, 1984 ; Dievart et Everaere, 1998).

Le **tableau I** donne la classification de l'HTA selon les normes tensionnelles définies par l'OMS (1999-b).

## **II – 1 – 2 – 2. Epidémiologie de l'hypertension artérielle**

Les statistiques sont difficiles à établir car elles concernent essentiellement, si ce n'est exclusivement, les patients traités.

### **II – 1 – 2 – 2 – 1. Dans le monde**

Selon l'OMS, en 1980, l'hypertension est apparue comme la maladie la plus répandue dans le monde. Cette maladie est en continuelle expansion et atteint les personnes de tout âge, de tout sexe et de toute classe sociale.

En 2000, on estimait à environ 26,4 % la proportion d'hypertendus (26,6 % des hommes et 26,1 % des femmes) dans le monde et, d'ici 2025, 29,2 % d'Hommes devraient être atteints (29 % des hommes et 29,5 % des femmes). Parmi les 972 millions d'adultes hypertendus, 333 millions, soit 34,3 %, proviennent des pays « développés », et 639 millions, soit 65,7 %, sont issus des pays « en développement ». Le nombre d'adultes hypertendus d'ici 2025 pourrait augmenter de 60 % et atteindre 1,56 milliard (Kearney *et al.*, 2005).

L'hypertension artérielle serait responsable d'un peu moins de 8 millions de décès par an dans le monde et de près 100 millions de jours d'invalidité (Lawes *et al.*, 2008). Elle serait la cause de près de la moitié des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des accidents cardiaques.

La prévalence de l'hypertension artérielle est variable dans les différents pays. Exemple : Grande Bretagne, 38 % (Colhoun *et al.*, 1998) ; Etats-Unis, 20 % (Mulrow, 1998) ; France, 31 % (Godet-Thobie *et al.*, 2008) ; Burkina Faso, 23 % (Ouedraogo, 2003) ; Guinée, 43,6 % en milieu urbain, 14,9 % en milieu rural (Balde *et al.*, 2006-a) et 29 % en basse Guinée (Balde *et al.*, 2006-b) ; selon l'OMS, Madagascar, 17,67 % ; Maurice, 29,6 % ; Algérie, 29,1 % ; Congo, 32,5 % ; Érythrée, 16 % ; Cameroun, 24 % ; Zimbabwe, 27,6 % (OMS, 2005). Maïga indique que la prévalence de l'HTA était de 20,83 % au Sénégal, 23,7 % au Mali, 20 % au Togo et 16 % au Rwanda (Maïga, 1989).

Dans une étude collaborative croisée régionale, portant sur les populations noires, il a été également démontré que les taux d'HTA augmentaient de 16 % en Afrique occidentale, 26 % dans les Caraïbes et 33 % aux Etats-Unis (Walinjorn et Face, 2000).

**Tableau I : classification de l'HTA chez l'adulte (de plus de 18 ans)**

	Pression systolique	Pression diastolique
Tension artérielle optimale	< 120 mm Hg	< 80 mm Hg
Tension artérielle normale	120 - 129 mm Hg	80 - 84 mm Hg
Tension artérielle normale haute	130 - 139 mm Hg	85 - 89 mm Hg
HTA légère (stade 1)	140 - 159 mm Hg	90 - 99 mm Hg
Sous-groupe « limite »	140 - 149 mm Hg	90 - 94 mm Hg
HTA modérée (stade 2)	160 - 179 mm Hg	100 - 109 mm Hg
HTA sévère (stade 3)	≥ 180 mm Hg	≥ 110 mm Hg
Hypertension systolique isolée	≥ 140 mm Hg	< 90 mm Hg
Sous-groupe « limite »	140 - 149 mm Hg	< 90 mm Hg

Actuellement, l'hypertension artérielle est la principale maladie cardio-vasculaire en Afrique où sa prévalence est estimée en moyenne à 25 % au sein de la population de plus de 18 ans, avec une fréquence hospitalière comprise entre 30 et 70 % (Diallo *et al.*, 2010). Cette affection est volontiers compliquée en Afrique avec 20 à 69 % d'atteinte rénale, 24 à 50 % d'accidents vasculaires cérébraux et 16 à 34 % d'insuffisance cardiaque, selon des sources hospitalières (Belila, 2002).

## **II – 1 – 2 – 2. En Côte d'Ivoire**

En Côte d'Ivoire, selon les études réalisées par Bertrand *et al.* en 1974, la prévalence de l'hypertension systolique ou diastolique était de 10,89 %. Cette prévalence de l'HTA se situait en 1993 à 13,4 % dans la population abidjanaise (Comoe *et al.*, 1993). Selon l'Institut de Cardiologie d'Abidjan (ICA), elle est passée à 13,9 % de la population ivoirienne en 2000, (Anonyme, 2003). En 2004, la prévalence de l'hypertension artérielle en Côte d'Ivoire était de 15 % (Dionkouda, 2005). Selon une enquête STEPS (Stratégies et Techniques pour l'Extension de la Protection Sociale), en 2005, l'hypertension artérielle (PAS 140 mm Hg et/ou PAD 90 mm Hg) touchait 21,7 % de la population ivoirienne âgée de 15 à 64 ans (OMS, 2005). En 2007, l'HTA concernait 21 % de la population de la ville d'Abidjan (Koffi, 2007). Selon Kramo *et al.* (2011), entre 2000 et 2009, les patients hypertendus âgés de  $59,1 \pm 12,5$  ans (54,3 % de femmes), reçus à l'Institut de Cardiologie d'Abidjan, 21,7 % avaient une HTA de stade 1, 32,3 % de stade 2 et 46,0 % de stade 3.

Tout comme dans le monde, en Côte d'Ivoire, l'augmentation de la prévalence de l'hypertension artérielle en fait un problème de santé publique majeur, après le paludisme et le SIDA.

## **II – 1 – 2 – 3. Causes de l'hypertension artérielle**

Dans 90 % de cas, l'hypertension artérielle (HTA) est dite essentielle (primitive) ou idiopathique (OMS, 1999-b). Aucune cause connue ne peut être retrouvée dans ce cas.

Dans 10 % des cas, l'hypertension artérielle a une cause ; elle est alors qualifiée de symptomatique ou secondaire. Plusieurs causes peuvent être à l'origine d'une hypertension ; certaines étant curables de façon définitive. Ces causes secondaires sont à rechercher par le biais d'exploration cardiaque (électrocardiogramme, échographie cardiaque), rénale (échographie rénale, bilan de la fonction rénale), surrénalienne (scanner et bilan hormonal surrénaliens).

Dans la grande majorité des cas, le mécanisme précis de l'HTA reste inconnu. On peut cependant déterminer un certain nombre de circonstances associées statistiquement à l'HTA ; c'est ce qu'on appelle un facteur de risque (Odi, 1986). Ce terme implique que le lien de causalité n'est pas établi (risque seulement statistique). C'est une variabilité associée à la probabilité de survenue de la maladie. La coexistence fréquente de plusieurs de ces facteurs chez le même patient en fait une maladie multifactorielle. La grande majorité des malades hypertendus a au moins un facteur de risque cardio-vasculaire (Xavier, 1999).

On distingue les facteurs ci-dessous comme favorisant l'hypertension artérielle.

✓ L'âge : la pression artérielle augmente avec l'âge. Des études épidémiologiques ont en effet montré que le risque de faire une HTA croît avec l'âge (Dickerson et Brown, 1995 ; Brady *et al.*, 2005). Chez le sujet de plus de 45 ans, la prévalence de l'hypertension artérielle est plus élevée. Ainsi, moins de 2 % des sujets de moins de 20 ans sont hypertendus, alors qu'ils sont plus de 40 % après 60 ans (Odi, 1986).

✓ Le sexe : le niveau tensionnel des hommes est supérieur à celui des femmes jusqu'à 50 ans puis, au-delà, il y a inversion. Ceci est dû au fait que avant la ménopause les hormones féminines représentent un facteur protecteur face au risque cardio-vasculaire.

✓ L'hérédité : il existe un déterminisme génétique de l'HTA essentielle dont la nature composite a été mise en évidence. Le développement de la génétique moléculaire a permis d'identifier sur le gène de l'angiotensinogène, un polymorphisme génétique impliqué dans l'hypertension artérielle essentielle (Pieri et Kirkiacharian, 1992). Ainsi, il existe des familles d'hypertendus ; c'est-à-dire que si des parents font de l'hypertension, les enfants ont plus de risques d'être hypertendus que les autres. Chez plus de 50 % des sujets hypertendus, il existe un antécédent d'hypertension artérielle chez l'un des parents (Meyer, 1979 ; Gilbenkrantz, 1990).

✓ L'alimentation :

\* le facteur le plus étudié a été la consommation de sel alimentaire (NaCl) dont l'importance pourrait déclencher, sinon entretenir une HTA (Guedeon, 1987 ; Xavier, 1999 ; Strazzullo *et al.*, 2009) ;

\* la consommation d'alcool de façon chronique entraîne un accroissement du niveau tensionnel. Les grands buveurs (alcooliques) ont une élévation de la pression systolique de plus de 1 cm Hg, en moyenne, par rapport aux non-buveurs ;

\* la consommation d'acides gras saturés a une relation positive avec le niveau tensionnel, alors que la consommation d'acides gras polyinsaturés diminue le risque d'hypertension (Keys *et al.*, 1987) ;

\* une alimentation trop riche en matières grasses animales, pauvre en fruits et légumes, favorise l'hypertension ;

\* la consommation de café s'accompagne d'une augmentation de la tension, mais l'effet est minime du fait du développement d'une tolérance à la caféine.

✓ L'obésité : il existe une forte corrélation entre l'indice de masse corporelle (indice de surcharge pondérale, rapportant le poids à la taille) et le niveau tensionnel (Froment, 1976 ; Horvath *et al.*, 2008). L'HTA est significativement plus fréquente chez les sujets présentant une surcharge pondérale, a fortiori chez les obèses (Khosla et Lowe, 1972). A l'opposé, un régime hypocalorique chez un obèse hypertendu s'accompagne d'une baisse de la tension.

✓ Le diabète : les sujets diabétiques ont, en moyenne, une tension artérielle plus élevée que dans le reste de la population (Longo, 1995).

✓ La grossesse peut parfois entraîner une HTA (Abole, 2006; Anonyme, 2007-a) ; on parle alors d'HTA gravidique.

✓ La sédentarité et le stress : un stress aigu s'accompagne d'une augmentation transitoire de la tension. Il est possible que l'un des facteurs importants soit les conditions psychologiques liées au mode de vie ou bien à la réponse individuelle aux situations de stress ; c'est-à-dire, certaines façons dont l'individu réagit face à un stress chronique, car il n'est pas établi chez l'Homme qu'un stress chronique puisse entraîner une élévation durable de la pression artérielle (Xavier, 1999).

#### **II – 1 – 2 – 4. Traitements de l'hypertension artérielle**

Dans les rares cas où une cause est trouvée, le traitement de l'HTA doit s'attaquer à la cause. Le but de ce traitement est de rétablir la tension artérielle dans les conditions optimales afin d'éviter les complications. Le traitement de certaines HTA d'origine définie peut entraîner parfois la guérison du patient. Ce traitement repose sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques de régulation de la tension artérielle (Fattorusso et Ritter, 1995).

Plusieurs moyens sont à la disposition du praticien pour la normalisation des chiffres tensionnels du patient (Gross *et al.*, 1986 ; Almange, 1998 ; Waeber, 1998).

## **II – 1 – 2 – 4 – 1. Règles hygiéno-diététiques ou traitements non pharmacologiques**

Elles consistent à modifier certaines habitudes de vie qui peuvent contribuer à l'élévation de la tension artérielle. Elles peuvent parfois suffire à normaliser la tension artérielle et doivent toujours être proposées. Cela consiste à :

- perdre du poids en cas de surcharge (Horvath *et al.*, 2008), afin de maintenir l'indice de masse corporelle (IMC) en dessous de 25 kg/m<sup>2</sup>, ou à défaut, afin d'obtenir une baisse de 10 % du poids initial (Anonyme, 2007-b) ;
- diminuer la consommation de sel (Guedeon, 1987; Xavier, 1999 ; He *et al.*, 2005 ; Strazzullo, 2009), si possible moins de 6 g/jour (Anonyme, 2007-b), éviter la salière sur la table, les salaisons ;
- limiter la consommation d'alcool (Odi, 1986 ; Kouakou, 1994), par exemple, à moins de 3 verres de vin ou équivalent par jour chez l'homme et 2 verres de vin ou équivalent par jour chez la femme (Boffeta et Garfinkel, 1990 ; Klatsky *et al.*, 1990 ; Anonyme, 2007-b) ;
- augmenter la consommation de fibres alimentaires, en particulier avec une alimentation riche en légumes et en fruits, et diminuer celle des graisses (Appel *et al.*, 1997), en particulier les graisses dites saturées ;
- augmenter la consommation d'eau ;
- lutter contre les facteurs de risque associés (tabac, cholestérol, diabète, sédentarité) ;
- utiliser une pilule faiblement dosée en œstrogènes ;
- éviter le thé, le café, et associer éventuellement la relaxation chez les neurotoniques ;
- mener si possible une vie calme et régulière, en respectant les heures de sommeil ;
- pratiquer des exercices physiques (Arakawa, 1996 ; Whelton *et al.*, 2002) : une activité physique aérobie régulière (au moins 30 minutes environ, 3 fois par semaine) diminue les risques coronaires (Whelton *et al* 2002 ; Anonyme, 2007-b).

## **II – 1 – 2 – 4 – 2. Traitements médicamenteux**

Des valeurs de 140/90 mm Hg sont indiquées pour un traitement antihypertenseur de patients ni diabétique, ni insuffisant rénaux (Argueda *et al.*, 2010). Les antihypertenseurs ou hypotenseurs sont des médicaments qui sont administrés pour réduire l'hypertension artérielle. Le bénéfice du traitement pharmacologique est avant tout dépendant de la baisse de la pression artérielle, quelle que soit la classe d'antihypertenseur utilisée.

## **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1. Médicaments antihypertenseurs**

On regroupe les médicaments antihypertenseurs en plusieurs classes. Chaque classe agit différemment pour faire baisser la tension artérielle selon qu'elle agit sur le système nerveux autonome, sur la fibre musculaire lisse de la paroi vasculaire ou sur le système rénine-angiotensine.

La connaissance de la physiopathologie et de la pharmacologie a permis la mise au point d'un arsenal thérapeutique de mécanisme différent, qui comprend essentiellement quatre grandes classes, à savoir : les diurétiques, les inhibiteurs adrénergiques bêtabloquants ( $\beta$ -bloquants), les inhibiteurs calciques (IC) ou inhibiteurs des canaux calciques et les bloqueurs du système rénine-angiotensine comprenant les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II) et, plus récemment, des antagonistes spécifiques de l'activité rénine plasmatique (Waeber, 1998).

### **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 1. Diurétiques**

Les diurétiques sont familièrement appelés « pilules pour l'eau » parce qu'ils agissent sur les reins pour faire évacuer par l'urine l'excès d'eau et de sodium.

Ils agissent par élimination, via l'urine, d'une partie de l'eau et du sodium contenus dans le sang ; ceci induit une diminution du volume sanguin et donc une baisse de la tension artérielle.

On pense que le sodium contribue à la résistance vasculaire en augmentant le tonus vasoconstricteur artériolaire et la réactivité vasculaire à l'effet des différentes substances endogènes vasoconstrictrices comme l'angiotensine II, les catécholamines, l'endothéline etc. (Katzung, 2006). Cette hyperréactivité pourrait être secondaire à la surcharge calcique induite par la surcharge sodique intracellulaire chronique. Ces effets sont annulés ou inversés par les diurétiques ou la restriction sodée. En réduisant les réserves de sodium de l'organisme, les diurétiques diminuent la pression artérielle essentiellement. Cependant, leur action sur le potassium (kaliémie) doit être contrôlée car, en générale, le potassium est éliminé avec le sodium.

Les traitements diurétiques augmentent l'élimination urinaire de sodium en agissant à différents niveaux de la surface luminale (pôle urinaire) des cellules du tubule rénal. Cette propriété est mise à profit dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque.

Il existe principalement quatre sites de réabsorption où agissent les diurétiques en augmentant la fraction sodée excrétée : trois au niveau du néphron et un sur une portion du tube collecteur. Ainsi, on distingue trois catégories principales de diurétiques en fonction des sites d'action au niveau du tubule rénal (**figure 1**).

- Ceux qui agissent au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé : diurétiques de l'anse de Henlé. Ce sont des dérivés sulfamidés. Ces médicaments inhibent le co-transport du sodium, du potassium et du chlore dans la branche ascendante de l'anse de Henlé, site habituel d'une importante réabsorption sodée estimée à 35-45 %. Les diurétiques de l'anse sont ceux qui peuvent induire la plus grande élimination sodée. En effet, la natriurèse induite est très importante, puisque la réabsorption à ce niveau l'est aussi. L'inhibition du transport actif du NaCl provoque une augmentation associée de l'excrétion de  $Mg^{2+}$  et de  $Ca^{2+}$  (Katzung, 2006).

- Ceux qui agissent au niveau du tube contourné distal : les thiazides et apparentés. Tous ont en commun un groupement sulfamidé non substitué. Les thiazidiques et apparentés inhibent le co-transport du sodium ( $Na^+$ ) et du chlore ( $Cl^-$ ) à travers la portion proximale du tube contourné distal rénal (face endoluminale des cellules du tube contourné distal) où 5 à 8 % du  $Na^+$  est normalement réabsorbé (Katzung, 2006). En empêchant la réabsorption de NaCl, ils entraînent à court terme une diminution du volume extracellulaire et du débit cardiaque et une stimulation du système rénine-angiotensine. A long terme, le débit cardiaque se normalise, alors que le volume extracellulaire reste diminué.

- Ceux qui agissent au niveau du tube contourné distal et surtout du tube collecteur : diurétiques distaux, appelés également épargneurs potassiques. Cette classe de diurétiques comporte les diurétiques anti-aldostérones, localisés au niveau du tube collecteur du néphron, et les diurétiques dont le site d'action est le tube contourné distal (diurétiques distaux), mais qui agissent indépendamment de l'aldostérone. Le tube contourné distal et les canaux collecteurs assurent l'homéostasie potassique.

La sécrétion de potassium et d'ions  $H^+$  est couplée à la réabsorption de  $Na^+$  et stimulée par l'aldostérone.

- Les épargneurs potassiques, qui agissent indépendamment de l'aldostérone au niveau du tube contourné distal, associent une baisse de l'excrétion potassique et hydrogénée ( $H^+$ ) à une augmentation d'environ 2 % de la fraction sodée excrétée. Ces diurétiques distaux inhibent ainsi la sécrétion potassique et d'ions hydrogène par les tubes distaux et collecteurs. Ils sont faiblement salurétiques et par nature hyperkaliémiant car retiennent le potassium urinaire.

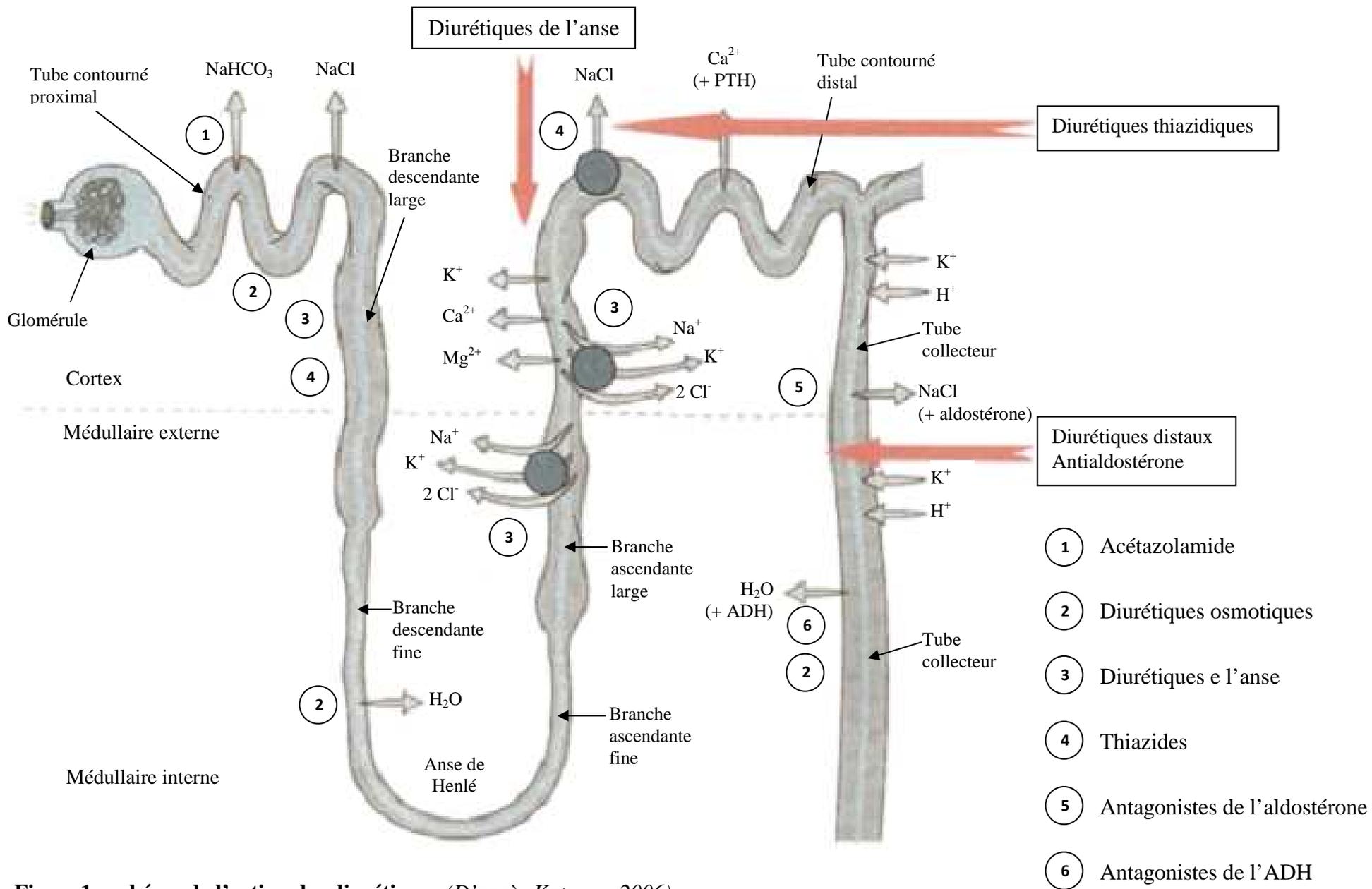


Figure 1 : schéma de l'action des diurétiques (D'après Katzung, 2006)

- Les antialdostérones sont aussi faiblement natriurétiques et bloquent de façon compétitive les récepteurs minéralocorticoïdes à la jonction du tube contourné distal et du tube collecteur. L'amplitude de l'effet natriurétique des anti-aldostérones dépend du niveau de sécrétion plasmatique d'aldostérone par la corticosurrénale. Dans tous les cas, l'amplitude de l'effet natriurétique des diurétiques distaux est inférieure à celle obtenue avec les diurétiques thiazidiques et de l'anse de Henlé (Katzung, 2006). Les antagonistes de l'aldostérone diminuent la composante de sécrétion couplée à la sécrétion de  $\text{Na}^+$  et inhibent les effets directs de l'aldostérone sur les mouvements de  $\text{K}^+$ .

## **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 2. Bêtabloquants**

Les bêtabloquants, ou bêtabloqueurs ou adrénolytiques bêta ou anti-adrénergiques bêta sont des inhibiteurs compétitifs des effets des catécholamines sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Giudicelli, 1984 ; Castaigne, 1988 ; Witchitz, 1994 ; Brown, 1995).

Selon Lands *et al.* (1967 et 1976), il existe essentiellement deux sous-types de récepteurs adrénergiques : les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénergiques. Des récepteurs  $\beta_3$ , impliqués dans le métabolisme lipidique ont été plus récemment identifiés. Ils renforcent la lipolyse dans les tissus adipeux (Nisoli *et al.*, 1996). Les trois (3) types de récepteurs coexistent dans la plupart des tissus, avec une prédominance de l'un ou l'autre.

Outre les effets communs, les  $\beta$ -bloquants ont des effets particuliers à un certain nombre d'entre eux. Ainsi, ils sont classés en fonction de l'inhibition plus ou moins sélective des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Certains  $\beta$ -bloqueurs inhibent à la fois les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  ( $\beta$ -bloqueurs dits « non sélectifs », type propranolol), d'autres seulement les récepteurs  $\beta_1$ . Ces derniers sont dits « cardiosélectif », type aténolol (Witchitz, 1994 ; Brown, 1995 ; Moulin et Coquerel, 2002).

Du point de vue des caractéristiques pharmacologiques, on distingue :

- les  $\beta$ -bloqueurs liposolubles comme le propranolol qui franchissent la barrière cérébro-méningée ;
- les  $\beta$ -bloqueurs hydrosolubles comme l'aténolol qui pénètrent peu le cerveau.

Le pouvoir adrénolytique est la seule propriété commune à tous les bêtabloquants.

Les bêtabloquants inhibent de façon spécifique et compétitive les récepteurs bêta-adrénergiques périphériques mais aussi centraux s'ils passent la barrière hémoméningée. Ils ont des effets communs qui sont essentiellement cardio-vasculaires. Ils agissent principalement en réduisant l'activité des catécholamines sur le cœur et les vaisseaux sanguins et diminuent aussi la pression artérielle (Giudicelli, 1984).

Les bêtabloquants réduisent la transmission d'influx nerveux au cœur et aux vaisseaux sanguins. Ainsi, le cœur bat moins vite et avec moins de force et la tension artérielle chute. L'effet hypotenseur est associé à un abaissement de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection ventriculaire gauche. En fait, en plus de leur action hypotensive, les bêtabloquants diminuent la fréquence cardiaque (effet chronotrope négatif), la contractilité myocardique (effet inotrope négatif), le débit cardiaque et la vitesse de conduction auriculo-ventriculaire (effet dromotrope négatif). Ils s'opposent aux effets proarythmogènes de la stimulation bêta-adrénergique (effet bathmotrope négatif) et appartiennent à la classe II des médicaments anti-arythmiques (Vaughan-Williams, 1970 et 1984 ; Motte *et al.*, 1996).

Les bêtabloquants inhibent la sécrétion de rénine et, peut-être inhibent le tonus sympathique par effet central (Witchitz, 1994 ; Brown, 1995 ; Gired *et al.*, 1998).

Ils réduisent aussi le travail cardiaque et la consommation myocardique en oxygène.

Les bêtabloquants sont particulièrement indiqués en cas de cardiopathie ischémique associée. Ils sont contre-indiqués en cas de bradycardie (fréquence cardiaque inférieure à 50 battements par minute), d'asthme, de diabète, de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, etc.

## **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 3. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC)**

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) sont utilisés principalement dans le traitement de l'hypertension artérielle.

Comme leur nom l'indique, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion empêchent l'action de cette enzyme.

L'enzyme de conversion, une métalloprotéine à zinc : la dipeptidylcarboxypeptidase, ubiquitaire, active la transformation de l'angiotensine I, substance dépourvue d'effet physiologique, en angiotensine II (Anonyme, 1989), et la bradykinine en peptides physiologiquement actifs. L'angiotensine II, par ses puissantes propriétés vasoconstrictrices, entraîne une augmentation des résistances périphériques vasculaires, et donc un puissant effet hypertenseur. Au niveau rénal, l'angiotensine II diminue la perfusion rénale ainsi que la filtration glomérulaire et stimule la sécrétion d'aldostérone par la cortico-surrénale (Tufro-MeReddie *et al.*, 1994). L'aldostérone, quant à elle entraîne une rétention sodée et une augmentation de la volémie (Bouchard, 1999). En fait, cette enzyme de conversion assume deux missions principales dans l'organisme. D'une part, elle est compétente pour la synthèse de l'angiotensine II, octapeptide actif sur la vasoconstriction, à partir de son précurseur inactif : l'angiotensine I (décapeptide), en scindant les deux acides aminés C terminaux.

D'autre part, elle catalyse la dégradation du médiateur, la bradykinine en produits inactifs (Ferreira *et al.*, 1970).

L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine entraîne une diminution de la concentration d'angiotensine II au niveau des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> de l'angiotensine (Azizi *et al.*, 1997-b). Premièrement, de ce fait, le tonus vasculaire diminue et la pression artérielle baisse. Deuxièmement, la baisse des taux d'angiotensine II induit une diminution de la libération d'aldostérone de la corticosurrénale et donc un effet sur le bilan hydrique. Au niveau cellulaire, on peut observer une baisse des effets mitogènes médiés par l'angiotensine II sur les fibroblastes et les myocytes du cœur, qui conduisent, notamment après un infarctus, à des changements défavorables (remodelage).

Le mécanisme d'action moléculaire des inhibiteurs de l'enzyme de conversion repose sur la similitude des IEC avec une fin de chaîne peptidique de l'angiotensine I. De ce fait, les IEC sont considérés par erreur par l'enzyme de conversion de l'angiotensine comme le substrat physiologique angiotensine I. A la différence du substrat physiologique, ils ne sont pas transformés par l'enzyme et bloquent cette dernière. Ainsi, les IEC empêchent ce métabolisme de l'angiotensine I en angiotensine II et réduisent les taux circulants d'angiotensine II et d'aldostérone. Les IEC vont donc réduire la vasoconstriction normalement induite par l'angiotensine II (Griendling *et al.*, 1997). Les IEC, en supprimant l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II sur l'artériole efférente du glomérule, peuvent diminuer la filtration glomérulaire. En effet, au niveau du rein, le blocage des récepteurs AT<sub>1</sub> agit sur les artérioles post-glomérulaires préférentiellement, avec pour conséquence une diminution de la fraction filtrée. Les IEC induisent ainsi une réduction des résistances artérielles et artériolaires périphériques ainsi qu'une diminution de la volémie. Il s'ensuit une vasodilatation et une baisse de la pression artérielle.

Par ailleurs, les IEC empêchent la dégradation de la bradykinine, substance vasodilatatrice, en métabolites inactifs. En effet, la bradykinine a des effets tissulaires locaux de vasodilatation par stimulation de la production d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandines vasodilatatrices (Seyedi *et al.*, 1995 ; Katzung, 2006). Ces effets sont donc favorisés par les IEC. L'inhibition de la dégradation de la bradykinine par les IEC potentialise leurs effets vasodilatateurs et restaure la fonction endothéliale des artères et artérioles si elle était altérée. Toutefois, cette inhibition de la dégradation de la bradykinine entraîne son accumulation et par conséquent ses effets indésirables associés.

Le mécanisme d'action des IEC est schématisé à la **figure 2**.

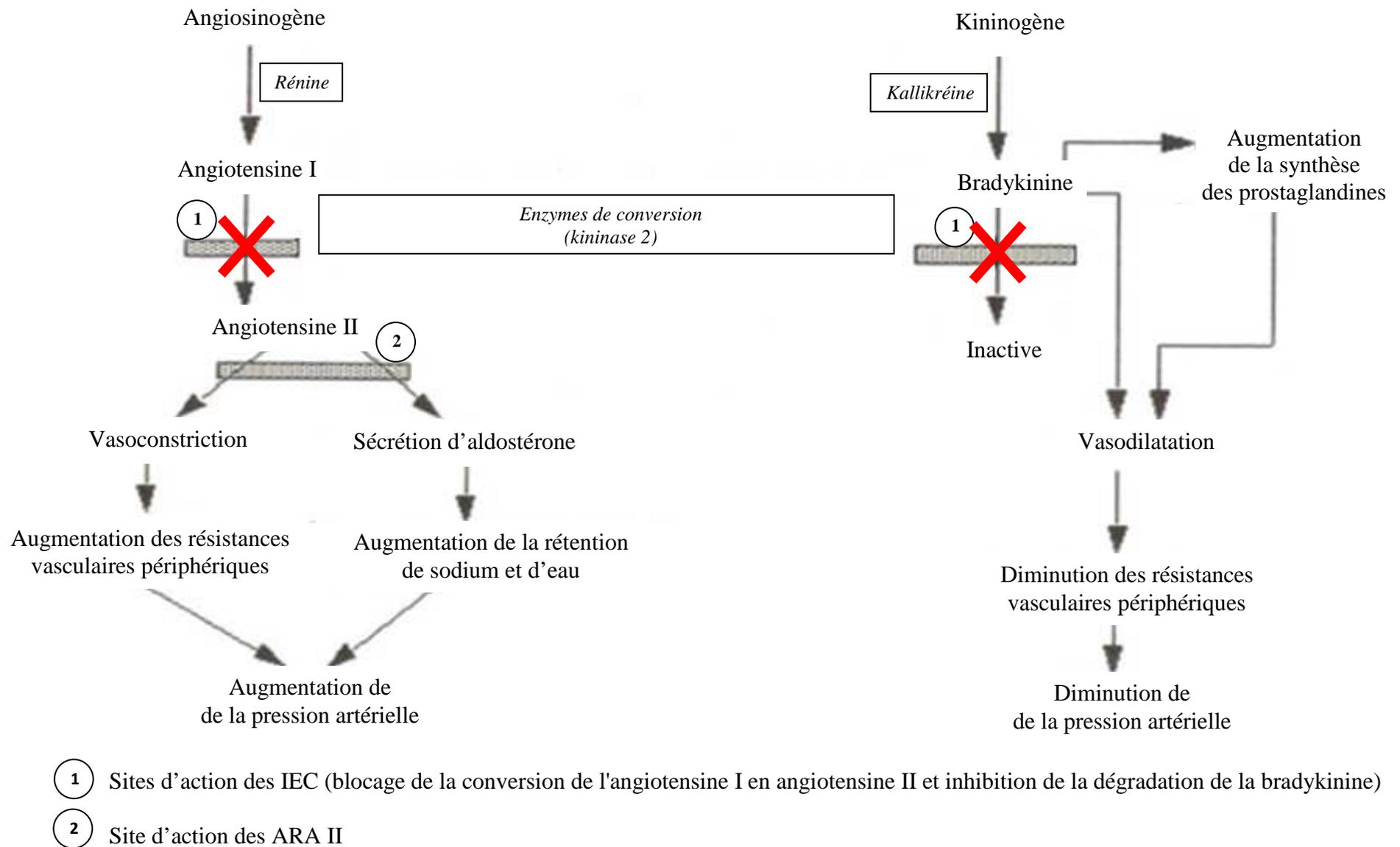


Figure 2 : schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA) (D'après Katzung, 2006)

Les IEC ont d'autres actions :

- ils inhibent l'augmentation induite par l'angiotensine II de la libération de noradrénaline (effet pré-synaptique) et l'effet de stimulation de la croissance cellulaire et de la production de collagène par les fibroblastes ;

- ils stimulent la production des prostaglandines qui sont vasodilatatrices et ils ont un effet protecteur rénal chez les diabétiques.

#### **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 4. Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II)**

L'indication officielle des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II ou sartans) est le traitement de l'hypertension légère ou modérée (Bouchard, 1999).

Les ARA II sont des antagonistes, soit compétitifs, soit non compétitifs des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II (Goodfriend *et al.*, 1996 ; Nicholls *et al.*, 1997). Il est connu que l'angiotensine II stimule deux types de récepteurs : les récepteurs AT<sub>1</sub> (forte affinité) et les récepteurs AT<sub>2</sub> (faible affinité). La plupart des effets de l'angiotensine II sont dus à la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> (Boutouyrie, 1999). L'angiotensine II cause une vasoconstriction et une production d'aldostérone entraînant une rétention sodée et une augmentation du volume intra-vasculaire.

Les ARA II bloquent l'action de l'angiotensine II en agissant sur son récepteur AT<sub>1</sub>, diminuant ainsi ses effets (Goodfriend *et al.*, 1996). Ils protègent ainsi les vaisseaux sanguins de l'angiotensine II ; par conséquent, les vaisseaux se dilatent et la tension artérielle baisse. Le mécanisme d'action des ARA II est schématisé à la **figure 3**.

Les ARA II ont des effets très proches de ceux des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC). Toutefois le mécanisme d'action des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II diffère de celui des IEC par le fait qu'ils bloquent directement les effets de l'angiotensine II en bloquant ses récepteurs plutôt que sa formation (Roffman, 1998) et, ceci, sans blocage de la dégradation de la bradykinine. Leurs effets pharmacologiques sont donc ceux des IEC moins les effets d'inhibition du catabolisme de la bradykinine (Katzung, 2006). De ce fait, l'effet vasodilatateur des bradykinines pourrait être important. De plus, les bradykinines pourraient diminuer l'agrégation plaquettaire et avoir des effets antithrombotiques et antiprolifératifs bénéfiques.

Il y aurait ainsi des avantages au mécanisme des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II. Premièrement, une inhibition plus spécifique et complète de l'angiotensine II puisque, contrairement aux IECA, les antagonistes de l'angiotensine II bloquent aussi l'effet de l'angiotensine II produite par d'autres voies que celle impliquant l'enzyme de



conversion de l'angiotensine (Roffman, 1998). En second lieu, l'enzyme inhibée par les IECA métabolise les bradykinines. Les IECA causent ainsi une accumulation de bradykinines, qui serait à l'origine de certains de leurs effets indésirables majeurs, tels la toux et l'angioedème. Par leur mécanisme d'action différent, les antagonistes de l'angiotensine II sont moins sujets à causer ces effets (Mancini, 1996 ; Nicholls *et al.*, 1996).

## II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 5. Inhibiteurs calciques (IC)

Les inhibiteurs calciques (IC, ICA), ou inhibiteurs des canaux calciques (ICC) ou anticalciques, représentent une classe pharmacologique relativement importante car largement utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance coronaire (Safar, 1985 ; Izzo et case, 1995 ; Legalerey, 2001 ; Partouche, 2001). Ils font partie des traitements de 3<sup>ème</sup> intention de l'hypertension artérielle essentielle (Partouche, 2001).

### ➤ Classification

Chaque inhibiteur calcique a, en fonction de son affinité pour certains canaux calciques et pour certains tissus, un effet prédominant auquel correspond une indication thérapeutique préférentielle (Almange, 1998). Les inhibiteurs calciques à effet cardio-vasculaire sont donc classés en fonction de leur effet prédominant, vasculaire ou cardiaque. On obtient ainsi deux types de profil d'antagoniste calcique, selon que l'effet vasculaire ou que l'effet cardiaque est prédominant (dépendant de l'affinité de l'antagoniste calcique pour les canaux vasculaires et cardiaques).

Il s'agit d'un groupe hétérogène de molécules qui peut être divisé chimiquement en dihydropyridines (DHP) et non-dihydropyridines (non-DHP). Les non-DHP appartiennent au groupe des benzothiazépines et au groupe phénylalkylamines. La conséquence principale est une sélectivité vasculaire plus grande pour les DHP.

On distingue ainsi trois (3) familles ou groupes chimiques selon le site préférentiel de leur action (Antonius-Gunawan *et al.*, 1981 ; Fleckenstein, 1983 ; Spedding, 1985 ; Legalerey, 2001).

✓ **Les dihydropyridines** : ils sont les antagonistes calciques à action vasculaire préférentielle. En effet, les inhibiteurs calciques sélectifs des canaux calciques présents dans la famille des dihydropyridines ont un tropisme vasculaire prépondérant avec un effet vasodilatateur artériel très puissant supérieur à celui des autres inhibiteurs calciques. De plus, ils ont une action moins marquée sur le myocarde. Ils n'ont aucune action sur le tissu

de conduction. Leurs effets s'expriment donc principalement par une baisse de la pression artérielle sans modification du rythme cardiaque.

La nifédipine, anticalcique de courte durée d'action, est utilisée dans le traitement des hypertensions sévères qui résistent aux traitements habituels (Frishman *et al.*, 1984 ; Klein, 1984). C'est l'inhibiteur calcique à effet vasculaire prédominant de référence.

✓ **Les benzothiazépines** : ils ont un tropisme mixte, à la fois vasculaire et myocardique, avec une prédominance de l'action coronarodilatatrice sur l'action inotrope négative. Le seul représentant de cette classe est le diltiazem.

✓ **Les phénylalkylamines** : ils ont un tropisme également mixte, à la fois vasculaire et myocardique avec une prédominance de l'action cardiaque sur l'action artériodilatatrice périphérique. Le seul représentant est le Vérapamil qui est l'inhibiteur calcique ayant l'effet inotrope négatif le plus marqué (Motte *et al.*, 1996 ; Legalerey, 2001). Il déprime davantage les fonctions chronotrope, dromotrope et inotrope du myocarde que les benzothiazépines (diltiazem).

#### ➤ **Mécanisme d'action**

Les inhibiteurs calciques ou antagonistes du calcium sont des médicaments qui permettent d'inhiber le transfert membranaire du calcium dans les cellules musculaires cardiaques et les cellules musculaires vasculaires (Cohen, 1997; Gired *et al.*, 1998 ; Lüllmann *et al.*, 1998 ; Moulin et Coquerel, 2002 ).

Les inhibiteurs calciques ont en commun la propriété de bloquer de façon sélective l'entrée du calcium au travers des canaux calciques lents ou voltage dépendants (canaux de types L) situés dans la membrane plasmique des cellules du myocarde et des cellules musculaires lisses des vaisseaux (par opposition aux canaux de type N présents sur les neurones et de type T présents au niveau des glandes sécrétrices), en se fixant sur ces canaux (Slonick et Frishman, 1989 ; Laurent *et al.*, 1994 ; Gired *et al.*, 1998 ; Legalerey, 2001; Moulin et Coquerel, 2002). Les canaux L sont ubiquitaires, mais ils sont largement majoritaires dans le cœur où ils ont deux rôles essentiels : un rôle électrogène et un rôle dans le contrôle de la contraction. Dans les vaisseaux, les canaux L sont impliqués dans le développement et le maintien du tonus contractile. En empêchant l'ouverture de ces canaux, les inhibiteurs calciques entraînent une relaxation du muscle lisse vasculaire et une diminution des résistances vasculaires. Ils entraînent une diminution des résistances périphériques par leur effet vasodilatateur.

❖ **Au niveau cellulaire**, ce blocage induit la diminution de l'entrée du calcium au cours du plateau du potentiel d'action, succédant normalement l'excitation d'une cellule contractile, et une inhibition de l'action de l'ATPase des myofibrilles. Cet effet est lié à une inhibition sélective de la fréquence d'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage cellulaire. Ceci entraîne ce qui suit.

\* Au niveau vasculaire, la diminution de l'influx calcique entraîne une relaxation musculaire et une diminution des résistances périphériques, avec pour conséquence une vasodilatation et une chute de la pression artérielle (Ishii *et al.*, 1980 ; Karaki et Weiss, 1988 ; Stoll et Spector, 1989 ; Michiru et Quentin, 2003). En effet, en agissant sur les canaux calciques de type L, les inhibiteurs calciques à effet vasculaire prédominant entraînent une vasodilatation des artères, y compris des coronaires, réduisent des résistances périphériques et abaissent la pression artérielle. Si cet abaissement est trop rapide ou trop brutal, il entraîne une libération de catécholamines qui ont une action vasoconstrictive et des effets inotrope et chronotrope positifs. Au niveau des cellules musculaires lisses des artérioles, il y a une diminution de l'activité des protéines contractiles aboutissant donc à un effet vasodilatateur. Les inhibiteurs calciques, en inhibant le transfert transmembranaire du calcium, réduisent le tonus des artères en diminuant les capacités vasoconstrictrices (calcium-dépendant) des fibres musculaires lisses artérielles.

\* Au niveau myocardique, l'inhibition de l'entrée du calcium provoque une réduction du relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique, entraînant donc, au niveau des cellules musculaires cardiaques, une diminution de la force contractile (Godfraind *et al.*, 1986 ; Cosma, 1989 ; Schwinger *et al.*, 1990 ; Cohen, 1997). Au niveau des fibres cardiaques, une réduction de l'entrée de calcium lors du potentiel d'action réduit la contractilité et ralentit la conduction auriculo-ventriculaire. De plus, certains antagonistes du calcium ont des effets inotropes négatifs et chronotropes négatifs car ces inhibiteurs calciques ralentissent la conduction de l'influx cardiaque qui s'accompagne en outre d'un ralentissement de la fréquence sinusale, permettant donc d'obtenir une action anti-arythmique associée à une action anti-spastique majeure.

\* Au niveau du nœud sinusal, les anticalciques provoquent une diminution de la fréquence de décharges entraînant un effet chronotrope négatif ou bradycardisant (Kawai *et al.*, 1981 ; Caron *et al.*, 1993 ; Laurent *et al.*, 1994). A ce niveau, le blocage des canaux calciques aboutit à une réduction de l'automaticité sinusale et donc des effets inotrope, dromotrope et chronotrope négatifs.

\* En outre, les inhibiteurs calciques diminuent l'excitabilité du nœud sino-auriculaire (effet bathmotrope négatif) et ralentissent la conduction auriculo-ventriculaire (effet dromotrope négatif) (Caron *et al.*, 1993 ; Motte *et al.*, 1996).

❖ **Au niveau de l'organisme**, le blocage des canaux calciques entraîne la baisse des résistances artériolaires, provoquant une diminution de la charge du travail systolique et de la fréquence cardiaque, et donc une baisse de la consommation d'oxygène au niveau du myocarde.

## **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 1 – 6. Autres antihypertenseurs**

Les autres antihypertenseurs sont plutôt utilisés comme traitement d'appoint. Il en existe différents types.

❖ **Les antihypertenseurs centraux** tels que les alpha-stimulants centraux : ils agissent sur le tronc cérébral (siège du centre régulateur de la tension artérielle). Ils inhibent le système nerveux sympathique au niveau central en stimulant la voie  $\alpha_2$ -adrénergique (Patel *et al.*, 2007). La clonidine en est le chef de file. Les antihypertenseurs centraux ont pour effet de diminuer les décharges sympathiques des centres vasopresseurs du tronc cérébral et favorisent le sommeil. Ils diminuent le tonus sympathique vasoconstricteur. Ils ont une action centrale et donc diminuent la fréquence cardiaque, les résistances périphériques, de même que l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone. Toutes ces actions concourent à diminuer la pression artérielle.

❖ **Les antihypertenseurs vasodilatateurs périphériques** : ils augmentent directement le calibre des vaisseaux sanguins en décontractant les muscles de la paroi vasculaire (action vasodilatatrice) entraînant une baisse de la résistance périphérique et accroissent les débits cardiaque et rénal. Les vasodilatateurs artériolaires constituent un groupe chimiquement hétérogène capable d'abaisser les chiffres tensionnels de façon non spécifique quel que soit le type d'hypertension artérielle et les cofacteurs de risque associés. Ils n'ont pas prouvé leur capacité à réduire la morbidité, même si leur efficacité hypotensive est incontestable.

L'apparition des nouvelles classes thérapeutiques a considérablement réduit leurs indications.

❖ **Les alphabloquants périphériques** : ils diminuent la transmission d'influx nerveux vers les vaisseaux sanguins, ce qui permet au sang de circuler plus facilement. Les  $\alpha$ -bloquants sont des antagonistes compétitifs des effets  $\alpha_1$ -adrénergiques des

catécholamines. Leur activité  $\alpha_1$ -bloquant très sélective antagonise la noradrénaline de façon compétitive au niveau des récepteurs postsynaptiques périphériques (Patel *et al.*, 2007). La prazosine est l'antagoniste  $\alpha_1$  à indication vasculaire de référence de ce groupe.

Les antagonistes des récepteurs  $\alpha_1$ , en réduisant la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$  périphériques, entraînent une diminution de la vasoconstriction artérielle et veineuse (Woodman et Vatner, 1987) et une diminution des résistances périphériques et, conséquemment, un abaissement de la pression artérielle. Ils induisent également une diminution de l'agrégation plaquettaire, une facilitation de l'évacuation de la vessie en réduisant la constriction au niveau du trigone. En réduisant la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$  du système nerveux central, les antagonistes  $\alpha_1$  qui traversent la barrière hémato-encéphalique ont un effet sédatif. Les antagonistes  $\alpha_1$  ont des indications vasculaires ou urologiques selon leur point d'impact préférentiel (Schmitz *et al.*, 1981 ; Woodman et Vatner, 1987).

Le **tableau II** indique les médicaments couramment utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle et leurs mécanismes d'action.

## **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 2. Associations fixes d'antihypertenseurs**

La connaissance de la physiopathologie et de la pharmacologie a permis la mise au point d'un arsenal thérapeutique de mécanismes différents, qui comprend essentiellement quatre grandes classes : les diurétiques, les inhibiteurs adrénergiques bêtabloquants, les inhibiteurs des canaux calciques (ICC) et les bloqueurs du système rénine-angiotensine associant les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II). Ces cinq classes d'antihypertenseurs sont recommandées en première intention dans l'HTA essentielle non compliquée (Anonyme, 2007-b).

Pour traiter l'hypertension artérielle, tous les médicaments antihypertenseurs sont prescrits soit isolément (monothérapie) si l'hypertension est modérée, soit diversement associés (traitement combiné).

L'association fixe de classes thérapeutiques d'antihypertenseurs est utilisée pour améliorer le pronostic (Anonyme, 2007-b ; Gnakamene *et al.*, 2009). Par exemple :

- bêtabloquant et diurétique thiazidique ou bêtabloquant et inhibiteur calcique de type dihydropiridine ;
- diurétique thiazidique et IEC ou diurétique thiazidique et ARA II ;
- inhibiteur calcique et IEC, inhibiteur calcique et ARA II ou inhibiteur calcique et diurétique thiazidique.

**Tableau II : antihypertenseurs courants et leurs mécanismes d'action**

<b>Médicaments (noms scientifiques ou chimiques)</b>	<b>Mécanisme d'action</b>
<b>Diurétiques thiazidiques</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chlorthalidone</li> <li>• Hydrochlorothiazide</li> <li>• Indapamide • Métolazone</li> </ul>	Les diurétiques sont familièrement appelés « pilules pour l'eau » parce qu'ils agissent sur les reins pour faire évacuer par l'urine l'excès d'eau et de sodium.
<b>Bêtabloquants</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acébutolol • Aténolol</li> <li>• Métoprolol • Nadolol</li> <li>• Pindolol • Propranolol • Timolol</li> </ul>	Les bêtabloquants réduisent la transmission d'influx nerveux au cœur et aux vaisseaux sanguins. Ainsi, le cœur bat moins vite et avec moins de force. La tension artérielle chute et le cœur travaille moins.
<b>Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Benazépril • Captopril</li> <li>• Énalapril • Fosinopril</li> <li>• Lisinopril • Perindopril</li> <li>• Quinapril • Ramipril</li> </ul>	Les inhibiteurs de l'IECA empêchent la sécrétion d'angiotensine II, une hormone qui entraîne normalement un rétrécissement des vaisseaux sanguins. Il s'ensuit un relâchement des vaisseaux sanguins et une baisse de la tension artérielle.
<b>Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Losartan • Valsartan</li> </ul>	Ces agents protègent les vaisseaux sanguins de l'angiotensine II. Par conséquent, les vaisseaux se dilatent et la tension artérielle baisse.
<b>Inhibiteurs calciques (IC)</b> <p style="margin-left: 20px;"><i>Dihydropyridines :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amlodipine • Félodipine</li> <li>• Nifédipine</li> </ul> <p style="margin-left: 20px;"><i>Non-dihydropyridines :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diltiazem • Vérapamil</li> </ul>	Les inhibiteurs des canaux calciques empêchent le calcium de pénétrer dans les cellules musculaires du cœur et les vaisseaux sanguins, ce qui entraîne la décontraction des vaisseaux sanguins et la réduction de la tension artérielle.
<b>Vasodilatateurs</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydralazine • Minoxidil</li> </ul>	Les vasodilatateurs augmentent directement le calibre des vaisseaux sanguins en décontractant les muscles de la paroi vasculaire.
<b>Alphabloquants</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Doxazosine • Prazosine</li> <li>• Terazosine</li> </ul>	Les alphabloquants diminuent la transmission d'influx nerveux vers les vaisseaux sanguins qui, en demeurant relâchés, permettent au sang de circuler plus facilement.

Dans certains cas, l'association de deux antihypertenseurs est utilisée pour minimiser les effets secondaires qui s'opposent. Par exemple, pour éviter des troubles de la kaliémie dans les associations de deux diurétiques comme un thiazidique avec un antialdostérone pour lesquels la diminution et l'augmentation du potassium sanguin s'annulent plus ou moins.

Il apparaît donc nécessaire chez l'hypertendu d'établir un profil de risque, en fonction de tous les cofacteurs de risque, afin de choisir une thérapeutique adaptée qui dans la grande majorité des cas doit être poursuivie à vie. Il importe que le traitement soit poursuivi régulièrement, car un arrêt intempestif expose à une brusque hausse de la tension artérielle (phénomène de rebond) et, éventuellement, à des accidents cardiaques, cérébraux, rénaux, etc.

### **II – 1 – 2 – 4 – 2 – 3. Bases pharmacologiques du traitement de l'hypertension artérielle**

Les médicaments antihypertenseurs sont des agents à visée symptomatique puisque la plupart des hypertensions artérielles sont d'origine inconnue. Le but de l'utilisation de ces médicaments est de ramener les chiffres tensionnels à la normale, et ce, par une réduction des divers facteurs d'hypertension que sont : le débit cardiaque, la résistance périphérique, le volume sanguin circulant (Meyer, 1978 ; Lechat *et al.*, 1982). Les différents produits utilisés vont agir sur un ou plusieurs de ces facteurs.

Le bénéfice des traitements médicamenteux antihypertenseurs chez les patients hypertendus, sans complication cardio-vasculaire, est modeste : réduction de 2 à 10 accidents vasculaires cérébraux (AVC) sur 1000 patients traités pendant 2 à 6 ans ; réduction de 2 à 5 infarctus du myocarde sur 1000 patients traités pendant 2 à 6 ans (Horvath *et al.*, 2008).

Le médicament est donné à vie. Il doit être, idéalement, simple, efficace et bien toléré. Il doit être naturellement expliqué au patient. La multiplicité des médicaments implique qu'aucun n'est parfait. Le choix est fait par le médecin en fonction du type d'hypertension, des maladies associées, de l'efficacité et de la tolérance des différents produits. Il est courant qu'il soit nécessaire d'essayer successivement plusieurs médicaments avant de trouver celui qui convient au patient traité (Rossignol *et al.*, 2004).

Il a été relevé que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II) semblent être moins efficaces chez la population noire d'origine africaine puisque les niveaux de rénine sont moins élevés chez cette catégorie de patients (Roffman, 1998 ; Anonyme, 1999).

Les travaux de Materson *et al.* (1993) ont démontré que les diurétiques et, à un niveau moindre, les anticalciques, ont une efficacité supérieure aux bêtabloquants et aux IEC chez les sujets de race noire. Les recommandations actuelles préconisent l'utilisation de ces deux

antihypertenseurs (diurétiques et ICA) chez les sujets de race noire car plus efficaces dans ce type de population (Chobanian *et al.*, 2003 ; Douglas *et al.*, 2003). En plus, les diurétiques ont un coût beaucoup moins élevé que les autres antihypertenseurs (Bertrand, 2005).

En première intention (c'est-à-dire, le patient n'ayant jamais été traité), le médecin peut choisir une molécule (monothérapie) à une dose conventionnelle (Monane *et al.*, 1997) ou deux molécules (bithérapie) à doses faibles (Castaing, 2000). Si l'objectif tensionnel est atteint, le traitement est reconduit.

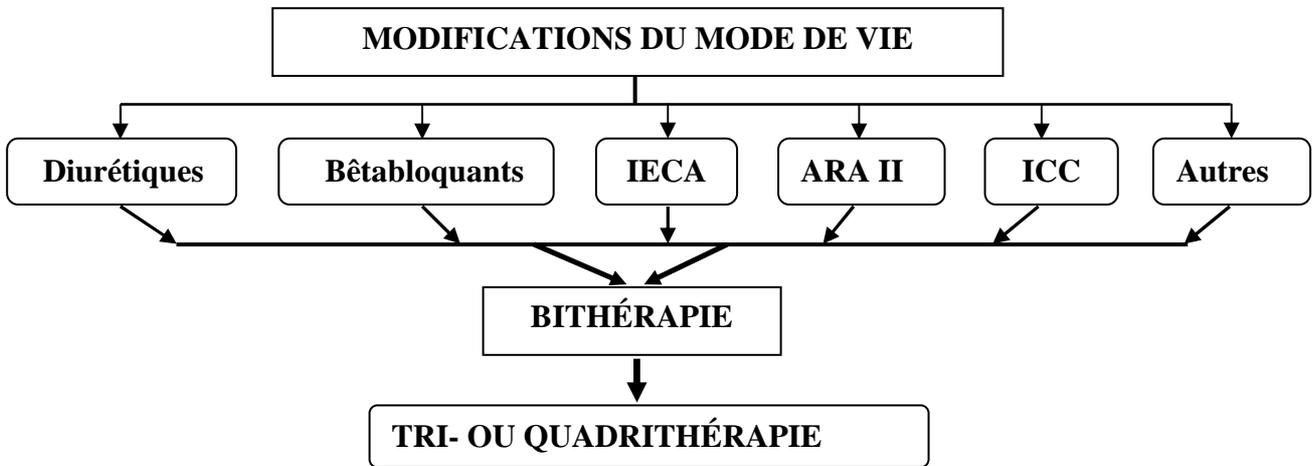
En cas d'inefficacité (ou d'efficacité insuffisante) ou d'effets indésirables au traitement initial, on peut, soit poursuivre une monothérapie avec une autre classe de médicaments, soit faire une bithérapie à pleine dose en deuxième intention. Les recommandations actuelles tendent à conseiller une bithérapie comme traitement initial de l'hypertension artérielle modérée, particulièrement dans l'HTA du sujet de race noire qui a une hypertension reconnue comme difficile à normaliser (Roffman, 1998 ; Anonyme, 1999 ; Chobanian *et al.*, 2003 ; Douglas *et al.*, 2003). Il faut noter cependant que la première cause d'inefficacité reste la prise irrégulière ou l'absence de prise du médicament prescrit, c'est-à-dire une mauvaise observance (Yiannakopoulou *et al.*, 2005 ; Adoubi *et al.*, 2006).

Si l'HTA est sévère, on peut être amené à prendre trois (trithérapie), voire plus de classes de molécules différentes. L'inefficacité d'un traitement comportant trois médicaments de trois classes différentes définit une « hypertension artérielle résistante » (Calhoun *et al.*, 2008 ; Sarafidis et Bakris, 2008).

La stratégie thérapeutique la plus communément admise pour le traitement de l'HTA est celle dite par palier. Elle consiste à prescrire une thérapeutique et à rajouter une autre en cas d'inefficacité de la première prescrite seule. Ainsi, un traitement peut se faire par un, voire deux, trois ou quatre antihypertenseurs (Bouvenot *et al.*, 1995 ; Gnakamene *et al.*, 2009).

Le schéma de la **figure 4** indique les modes de traitement de l'hypertension systolo-diastolique sans maladie coexistante.

L'étude HOT (*Hypertension Optimal Treatment*) a montré que la protection maximale sur le plan cardio-vasculaire est obtenue sous traitement antihypertenseur lorsque la pression artérielle est abaissée, entre 80 et 85 mm Hg pour la pression diastolique, et 135 et 140 mm Hg pour la pression systolique (Hansson *et al.*, 1998). Depuis cette étude, il est établi que la monothérapie est insuffisante pour normaliser les chiffres tensionnels de la plupart des hypertendus (Gnakamene *et al.*, 2009). Ainsi, la monothérapie qui était le mode de traitement prédominant à la phase initiale a été supplantée par la bithérapie. En outre, les prescriptions de polythérapie (trithérapie ou plus) ont quadruplé.



**Figure 4 : schéma du traitement de l’hypertension artérielle**

IECA : inhibiteurs de l’enzyme de conversion de l’angiotensine II

ARA II : antagonistes des récepteurs de l’angiotensine II

ICC : inhibiteurs des canaux calciques

Autres : autres antihypertenseur

## **II – 2. Méthodes de séparation et d'identification de composés des végétaux**

Les très nombreux travaux orientés vers l'étude des substances naturelles (études structurales, propriétés biologiques, études de leur biosynthèse, chimiotaxonomie, etc.) impliquent le plus souvent leur purification à partir d'une matière première très complexe (plante, organe animal, culture cellulaire, etc.). La première étape (extraction) vise à l'obtention la plus sélective possible d'un composé, ou plus généralement d'un ensemble de composés chimiquement proches. Les étapes suivantes (purification, isolement), souvent longues et fastidieuses, doivent respecter au mieux l'intégrité chimique (donc biologique) des molécules initialement présentes dans la matière première. Cette étape fait généralement appel à tout l'arsenal des techniques chromatographiques. La pharmacopée exige ainsi le recours à diverses techniques chromatographiques afin de garantir l'identité et la qualité pharmaceutique d'une drogue.

L'évolution des technologies a permis la mise au point d'instruments très performants pour la séparation et l'identification de composés des végétaux. Ces techniques ouvrent ainsi la voie à des possibilités nouvelles, notamment avec l'introduction des méthodes couplées et des méthodes non destructives qui se contentent de petits échantillons ne nécessitant pas, ou très peu, de préparation préalables à la mesure.

Ce chapitre a pour objet de présenter, sans être exhaustif, quelques techniques couramment utilisées en Laboratoire pour séparer, purifier et identifier des composés présents dans les extraits végétaux.

### **II – 2 – 1. Techniques de séparation et de préparation de l'échantillon**

Pour l'analyse de médicaments, le prétraitement des échantillons est un passage souvent obligatoire. Le but du prétraitement de l'échantillon est l'élimination des constituants qui interfèrent avec la méthode d'analyse utilisée, et parfois, également l'augmentation de la concentration des composés à déterminer.

#### **II – 2 – 1 – 1. Préparation de l'échantillon**

Chaque analyse a sa ou ses solutions ; mais la préparation de l'échantillon est souvent indispensable et est aujourd'hui considérée comme une étape fondamentale du processus analytique.

## II – 2 – 1 – 1 – 1. Généralités sur l'analyse de l'échantillon

La mise en œuvre d'une analyse de médicaments impose de disposer d'un échantillon. Celui-ci contient généralement les espèces recherchées, encore appelées analyte (terme anglais), et le reste des composés, en nombre variable, qui constituent dans leur ensemble ce qu'on appelle la matrice. L'analyte, qui désigne l'espèce à analyser, doit être en quantité suffisante et sous une forme qui convient à l'instrument utilisé. La plupart des échantillons nécessitent donc un prétraitement spécifique. Cette étape, qui fait suite à l'échantillonnage proprement dit, conditionne le résultat au même titre que la mesure elle-même ou la précision de l'instrument utilisé (Moffat *et al.*, 1986 ; Rouessac et Rouessac, 2004).

Sachant que la moitié des analyses tombe dans la catégorie des analyses de trace (moins de 1 ppm d'analyte dans l'échantillon brut), il faut des méthodes d'enrichissement importantes. Quant il s'agit de doser des traces parmi d'autres composés des milliers de fois plus abondants, on peut toujours craindre que les résultats soient influencés par la composition de la matrice. Ce type d'interférence entre analyte et autres composés rend nécessaire de procéder à un pré-traitement spécifique de l'échantillon.

Il existe plusieurs méthodes pour l'élimination des produits gênants. Ce sont : la filtration, la centrifugation, l'extraction par échange d'ions, l'extraction solide-liquide, l'extraction liquide-liquide, l'extraction en phase solide, la recristallisation, la chromatographie, etc.

Pour concentrer le produit à analyser, on peut, par exemple, l'extraire puis éliminer le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor<sup>®</sup>). Il est alors possible d'utiliser le résidu pour l'analyse ou de le remettre en solution dans un volume connu. Les principes actifs, sous forme de résidu sec ou en solution organique, sont moins sujets aux dégradations qu'en solution aqueuse.

Pour les petites quantités, on peut parfois concentrer l'analyte directement sur colonne ou sur une pré-colonne lors d'une analyse par HPLC (voir II – 2 – 2 – 2., page 64) ou sur une cartouche d'extraction avant analyse (voir II – 2 – 1 – 1 – 4., page 41).

Lorsque deux produits ne sont pas séparables lors d'une extraction, d'autres techniques de séparation, tels que les techniques chromatographiques (voir II – 2 – 1 – 2., page 44), sont applicables.

Suivant les appareils et les méthodes, on fait appel à diverses techniques d'extraction (Mahuzier et Hamon, 1997 ; Houghton et Raman, 1998).

## II – 2 – 1 – 1 – 2. Extraction solide-liquide (SLE)

Un échantillon sous forme de poudre peut contenir des principes actifs et des excipients, tous solides. On procède tout d'abord à une extraction solide-liquide (SLE, *Solid-Liquid Extraction*). Ce type d'extraction se base sur l'immersion et la décantation, d'où son nom populaire de lessivage. Pour ce faire, il existe différentes techniques d'extraction : la macération, la décoction, l'infusion, etc.

L'extraction solide-liquide (**figure 5**) permet d'extraire par solubilisation les composants solubles de matières solides à l'aide d'un solvant.

La SLE permet de séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur solubilité dans le solvant extracteur. Ce dernier sera donc choisi en fonction de la solubilité des constituants à séparer.

Le solvant contenant le soluté dissous est séparé et régénéré, le plus souvent par évaporation/distillation, et il reste une solution d'extrait concentrée comme produit.

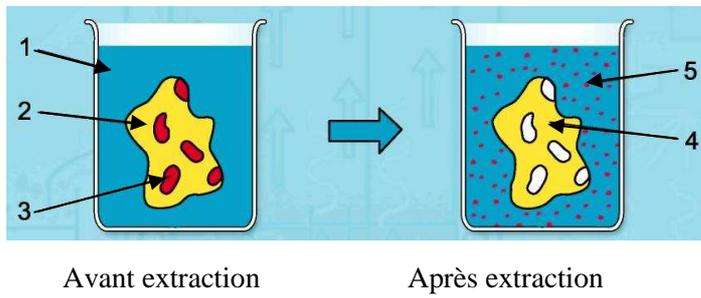
Les facteurs influençant le rendement de l'extraction sont les suivants :

- le temps de contact de la poudre avec le solvant ;
- le volume de solvant utilisé ;
- le type de solvant utilisé ;
- la granulométrie de la poudre : plus la surface de contact est grande, plus l'extraction sera rapide ;
- la température : un traitement thermique peut améliorer l'extraction.

Afin d'obtenir une extraction aussi rapide et complète que possible, le solvant nécessite de grandes surfaces d'échange et des chemins diffusionnels courts. Ceci peut être obtenu par le broyage de la matière solide à extraire. Toutefois, une granulométrie trop petite peut entraîner la formation de grumeaux et rendre le passage du solvant plus difficile.

## II – 2 – 1 – 1 – 3. Extraction liquide-liquide (LLE)

L'extraction liquide-liquide (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) est une technique dans laquelle deux solutions non miscibles (exemple : une solution aqueuse et un solvant organique) sont mis en contact l'une avec l'autre afin de permettre le transfert de matière (soluté), selon leurs différentes affinités, entre deux phases liquides (Rosset *et al.*, 1995 ; Mahuzier et Hamon, 1997). Cette mise en contact se fait par agitation pendant quelques minutes au sein d'une ampoule à décanter ou dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (mélangeurs). L'agitation du milieu a pour effet d'augmenter la surface de contact entre les phases et de favoriser la diffusion du soluté au sein de chaque phase.



- 1 – Solvant
- 2 – Matière à extraire
- 3 – Soluté
- 4 – Phase stationnaire lavée
- 5 – Solvant avec soluté dissous

**Figure 5 : schéma de l'extraction solide-liquide (D'après Mahuzier et Hamon, 1997)**

Dans l'extraction liquide-liquide on cherche à extraire, à l'aide d'un solvant, un soluté contenu dans un mélange liquide homogène (les deux solutions ne doivent pas être miscibles). Avec l'extraction liquide-liquide, un composant sous forme liquide (A : soluté) peut être séparé de l'éluant (C) par dissolution préférentielle dans un solvant (B). On utilise pour cela une certaine quantité d'un solvant qui ne doit pas être miscible avec l'éluant, mais être miscible avec le soluté. Les deux phases liquides (éluant + solvant) sont mélangées intimement (mélange non homogène) et le soluté se distribue dans chacune des phases selon un équilibre physico-chimique. Le mélange non homogène est alors décanté en deux phases non miscibles :

- l'extrait (A + B), contenant majoritairement du solvant, et le soluté extrait ;
- le soluté qui peut contenir une partie de soluté non extrait (**figure 6**).

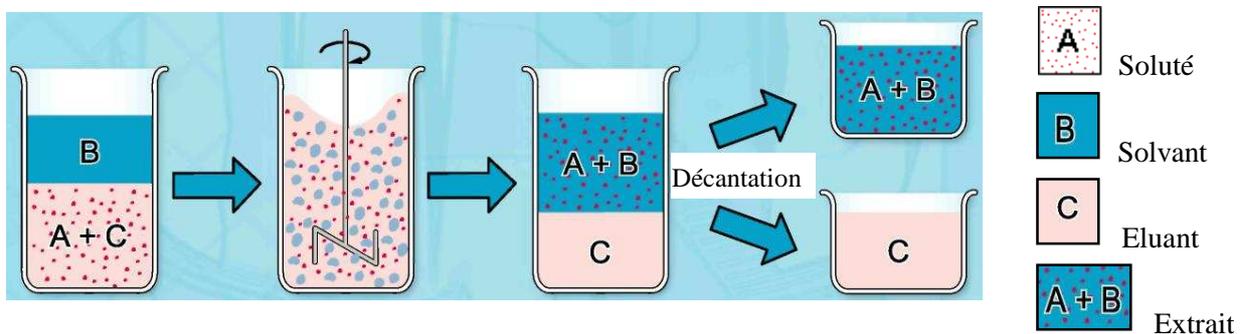
Pour extraire de façon quantitative une substance d'une phase aqueuse, il est préférable d'extraire plusieurs fois avec un petit volume de solvant organique plutôt qu'une fois avec un grand volume (Jeffery *et al.*, 1989).

Afin d'obtenir le soluté le plus pur possible, l'extraction est suivie, le plus souvent, par une étape de séparation dans laquelle le solvant est séparé du soluté. Pour débarrasser le soluté du solvant d'extraction, il existe plusieurs méthodes dont la décantation gravimétrique ou centrifuge, l'évaporation (à l'aide d'un évaporateur rotatif), la lyophilisation et la recristallisation.

## **II – 2 – 1 – 1 – 4. Extraction en phase solide (SPE)**

L'extraction en phase solide (SPE, *Solid Phase Extraction*) est différente de l'extraction solide-liquide dans laquelle le solide (exemple : feuilles séchées) contient un ou plusieurs principes actifs que l'on peut extraire avec un solvant. A cette fin, on utilise une petite cartouche ouverte en matière plastique, ressemblant à un corps de seringue, contenant un adsorbant solide approprié sur lequel on fait passer un volume connu de l'extrait brut. Actuellement, il existe une grande variété de cartouches contenant différents types de garnissage. La nature de la phase solide est choisie en fonction du type de composés que l'on veut extraire. Il existe deux modes d'utilisation.

✓ Le mode le plus courant consiste dans un premier temps à retenir sur l'adsorbant les composés d'intérêt pour l'analyse projetée et à éliminer de la matrice initiale, par rinçage le plus possible de constituants jugés indésirables pour la suite du dosage. En général, on dépose l'échantillon sur un support qui laisse passer les impuretés et retient le ou les produits à analyser. Dans ce cas, il est possible de déposer un grand volume d'échantillon.



**Figure 6 : schéma de l'extraction liquide-liquide (D'après Mahuzier et Hamon, 1997)**

Ensuite, on récupère par élution les analytes avec un faible volume de solvant adéquat, ceci permettant en plus d'en augmenter la concentration. On a ainsi reconstitué une solution fortement enrichie en analyte ; une nécessité pour les analyses de traces.

✓ L'autre mode, moins fréquent, bien que très simple, est de choisir la stratégie inverse qui consiste à retenir les composés non désirés (impuretés) sur la phase solide et à ne laisser passer que les composés d'intérêt. Dans ce cas, ils sont purifiés mais non concentrés (Rouessac et Rouessac, 2004). Un exemple commun est la phase inverse C<sub>18</sub> où des chaînes contenant 18 atomes de carbone sont greffées sur des particules de silice. Ces greffons vont interagir avec les composés organiques hydrophobes par le biais des forces de Van der Waals et ceux-ci seront alors extraits de l'échantillon aqueux en contact avec la silice. Ainsi, on fait passer l'échantillon sur le remplissage pour retenir les composés non désirés tandis que les analytes passent librement.

La méthode pour la séparation par SPE des composés d'intérêt se déroule comme décrit ci-dessous.

**a)** Conditionnement de la cartouche. C'est une étape très importante. Le conditionnement change suivant la nature de la phase solide. Chaque type de phase a une procédure spécifique de conditionnement.

Pour une cartouche C<sub>18</sub> par exemple, il est recommandé de passer dans un premier temps du méthanol (ou de l'acétonitrile). La raison est que lorsque les particules de silice sont greffées avec des chaînes hydrophobes, celles-ci deviennent imperméables, les chaînes sont en quelque sorte "collées" à la particule. Le méthanol pénètre dans la phase greffée et "décolle" les greffons, les rendant ainsi accessibles au solvant aqueux et aux solutés. La seconde étape du conditionnement consiste à faire passer le solvant de l'échantillon pour laver les restes de méthanol qui saturent la phase solide et empêchent les interactions de partage entre la phase solide et les solutés.

Cette étape permet aussi de se retrouver dans des conditions identiques de pH et de force ionique avant le passage de l'échantillon aqueux.

**b)** Dépôt de l'échantillon. Le volume du dépôt de l'échantillon peut varier du microlitre au litre. Il dépend de la capacité du tube, de la nature de la matrice (milieu dans lequel se trouve le produit à analyser), de la nature de la garniture, etc.

**c)** Lavage. Pour le lavage (rinçage), il est nécessaire de bien choisir le solvant ; c'est-à-dire celui qui permet d'éluer seulement les impuretés. Après avoir lavé la phase solide, on sèche la cartouche en appliquant le vide pendant 1 à 2 minutes.

**d) Elution.** Il consiste à faire passer un solvant approprié permettant de récupérer l'analyte.

La **figure 7** donne le schéma de la séparation d'un analyte de la matrice par extraction en phase solide.

## **II – 2 – 1 – 1 – 5. Extraction des métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires des plantes ont des structures chimiques très variées et sont souvent présents sous forme de glycosides ou d'aglycones dans les matrices végétales. Ces composés peuvent en plus avoir un caractère acide ou basique, ce qui fait que leurs propriétés physico-chimiques diffèrent grandement au sein d'un extrait brut.

Pour avoir une idée de la nature des constituants d'une plante, le matériel végétal séché et broyé est généralement extrait successivement par macération avec des solvants de polarité croissante (par exemple dichlorométhane puis méthanol).

Selon les cas, des extractions spécifiques seront nécessaires pour obtenir un enrichissement dans une classe bien précise de composés (Wagner et Bladt, 2001). C'est le cas des constituants volatiles des huiles essentielles, ainsi que certains groupes de composés tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines, les stéroïdes, etc., pour lesquels un solvant d'extraction spécifique est choisi.

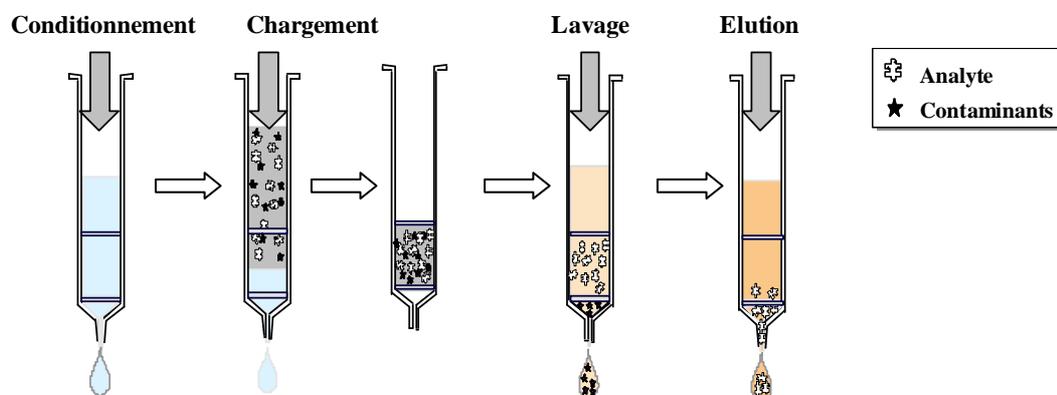
## **II – 2 – 1 – 2. Méthodes chromatographiques**

Toutes les méthodes chromatographiques sont fondées sur les mêmes phénomènes. Ce sont des méthodes d'analyse qui permettent de séparer les constituants d'un mélange en utilisant leurs différences de comportement lors de leur passage entre une phase mobile et une phase fixe dite phase stationnaire (Munier, 1972). Elles servent en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Elles sont aussi utilisées pour la séparation ou la purification des échantillons.

On peut employer ces techniques à des fins préparatives pour des quantités notables ( $10^{-2}$  g à 10 g) ou analytiques ( $10^{-9}$  g à  $10^{-3}$  g) afin de déterminer la présence (analyse qualitative) et la concentration (analyse quantitative) d'une substance (Moffat *et al.*, 1986).

### **II – 2 – 1 – 2 – 1. Principes de la chromatographie**

Les analyses chromatographiques reposent sur un principe constant : les substances présentes en mélange sont séparées, à l'aide d'un support solide (plaque, colonne, etc.), en les faisant circuler à travers un milieu fixe inerte (alumine, silice, etc.) à l'aide d'un solvant



**Figure 7 : schéma de l'extraction en phase solide**

*(D'après fascicule de travaux pratiques de chimie analytique pharmaceutique et pharmacognosie-phytochimie, Ecole de Pharmacie, Genève-Lausanne, 2008)*

mobile (gaz, liquide) qui les entraîne. Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa solubilité dans la phase mobile et de son affinité pour la phase fixe qui tend à le retenir. Finalement on obtient la séparation des constituants du mélange initial. Le principe de base repose sur les équilibres de concentrations qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles.

Les méthodes chromatographiques, bien que très diverses, mettent en jeu un certain nombre de principes communs :

- les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées ;
- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une migration des substances le long de la phase stationnaire ;
- la séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre et dépend du coefficient de partition (Munier, 1972).

On peut classer les différents types de chromatographies de plusieurs façons selon que l'on considère la nature des phases utilisées (gaz, liquide, etc.) ou les mécanismes de séparation des composés (chromatographie d'adsorption, d'exclusion, d'échange d'ions, etc.).

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit :

- ✓ un solide finement divisé, appelé phase stationnaire, est immobilisé dans une colonne ;
- ✓ au sommet de cette colonne, un petit volume de l'échantillon à séparer est posé ;
- ✓ cet échantillon est forcé à traverser la colonne au moyen de la phase mobile afin d'entraîner ses divers constituants. La phase stationnaire retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie (comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, etc.) réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. La séparation s'opère suivant les interactions chimiques ou physiques des analytes avec la phase mobile ainsi qu'avec la phase stationnaire. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun dans la phase mobile (Rouessac et Rouessac, 2004).

## II – 2 – 1 – 2 – 2. Chromatographie liquide (LC)

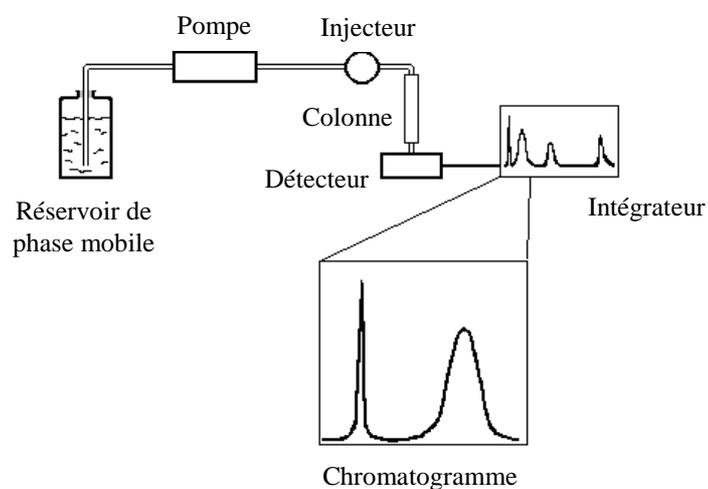
La purification des substances naturelles fait appel à de nombreuses techniques chromatographiques utilisant une phase mobile liquide et une phase stationnaire solide, regroupées sous le terme générique de chromatographie en phase liquide (CPL ou *liquid chromatography*, LC, en anglais). C'est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative. Elle est principalement fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse, d'échange d'ions, d'exclusion ou d'interaction stéréochimique (Munier, 1972).

La chromatographie liquide est une technique de séparation reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles. En LC, l'une des phases, dite stationnaire, est contenue dans une colonne ou fixée à un support solide sur une surface plane, et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première en entraînant les analytes. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers (Houghton et Raman, 1998).

L'appareillage en chromatographie liquide se compose d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur) (**figure 8**).

La phase mobile, délivrée à partir d'un ou plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur.

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé chromatogramme, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. Il présente un graphique d'une fonction de la concentration en analyte en fonction du temps (ou du volume) d'élution. Pour obtenir ce chromatogramme, il faut placer à l'extrémité aval de la colonne un capteur dont il existe un grand nombre de variantes. Le chromatogramme, passage obligé de toute analyse chromatographique, est obtenu à partir des variations en fonction du temps d'un signal électrique envoyé par le détecteur. Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de pics chromatographiques revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.



**Figure 8 : schéma d'un dispositif de chromatographie liquide**

*(D'après fascicule de travaux pratiques de chimie analytique pharmaceutique et pharmacognosie-phytochimie, Ecole de Pharmacie, Genève-Lausanne, 2008)*

### II – 2 – 1 – 2 – 3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

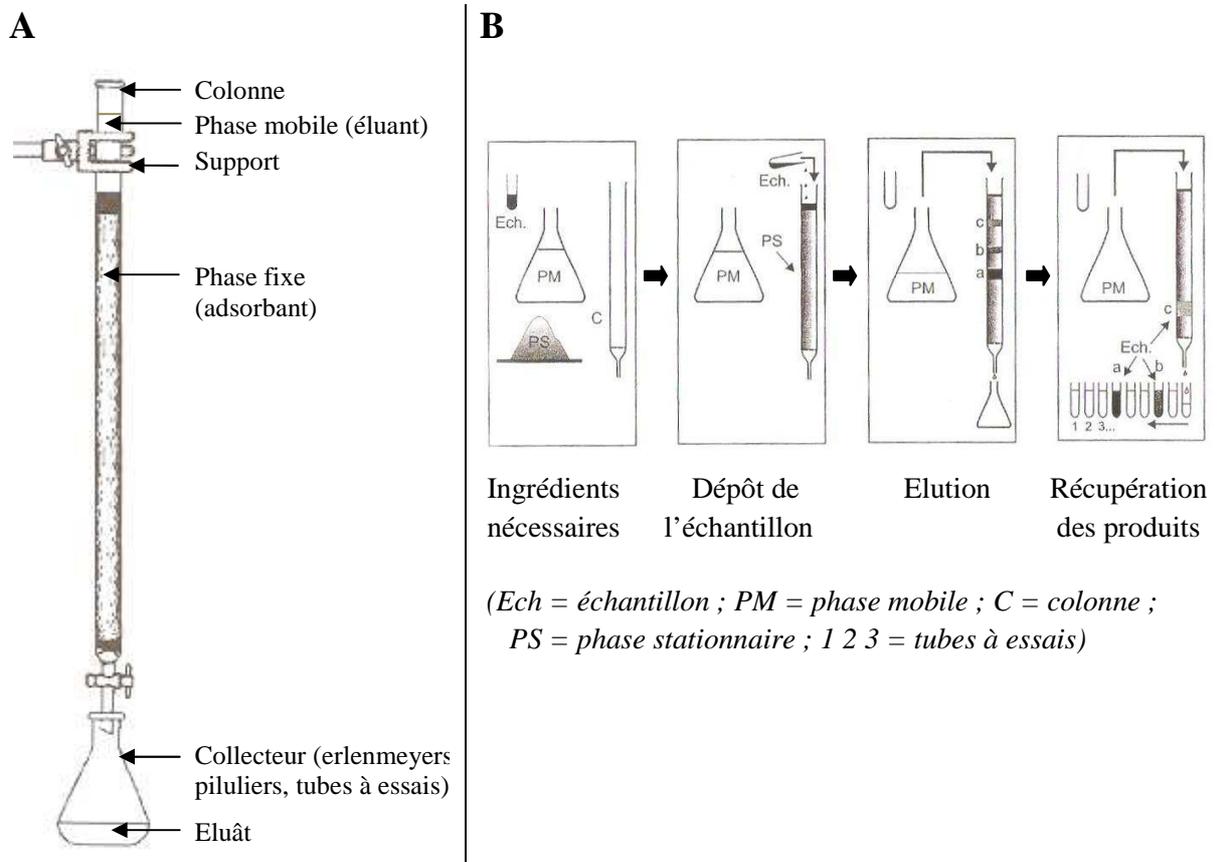
La chromatographie sur colonne ouverte (CC, *Column Chromatography*) est constituée d'une colonne de verre remplie de particules de phase stationnaire, le solvant migrant sous le simple effet de la pesanteur (**figure 9**).

Le conditionnement manuel d'une colonne commence par le dépôt d'un coton hydrophile dans l'embouchure d'écoulement. La phase stationnaire est mise en suspension dans l'éluant de départ, puis versée dans la colonne en plusieurs fois jusqu'à stabilisation au niveau désiré. La quantité de phase stationnaire utilisée est généralement 30 à 50 fois la quantité de l'échantillon à déposer.

L'échantillon peut être introduit sous forme liquide ou solide dans la colonne. Lorsque l'échantillon se solubilise totalement dans une petite quantité d'éluant de départ, il est utilisé sous forme liquide. Dans ce cas, la solution obtenue est déposée délicatement sur la phase stationnaire. Par contre, lorsque l'échantillon n'est pas soluble dans l'éluant de départ, il est utilisé sous forme solide (poudre). Ainsi, l'échantillon est d'abord adsorbé sur une quantité de phase stationnaire, correspondant à 2 ou 3 fois sa masse, au moyen d'un solvant dans lequel l'échantillon est totalement soluble. Après évaporation du solvant, l'échantillon adsorbé sur la phase stationnaire est déposé soigneusement à la surface de la phase stationnaire. Le tout est ensuite recouvert d'une fine couche protectrice de sable, afin que l'introduction d'éluant ne perturbe pas le dépôt de l'échantillon.

La composition de l'éluant de départ est déterminée par analyses chromatographiques sur couche mince (CCM) préalables (Hostettmann *et al.*, 1998), en essayant de faire migrer les substances d'intérêt à un facteur de rétention ( $R_f$ ) d'environ 0,3 (voir II – 2 – 2 – 1., page 61). L'élution se fait en mode gradient ou en mode isocratique et les dernières fractions sont lixiviées avec du méthanol pur. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale. Le débit varie en fonction du type de séparation souhaité et peut aller d'environ 1 ml/min (fractions enrichies) à 10 ml/min (extrait brut). Sous l'action de l'éluant et des liaisons qu'elles établissent avec l'adsorbant, les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne et prendre un certain retard les unes par rapport aux autres pendant la migration. Elles vont donc se présenter avec un certains retard en sortie de colonne.

Les différentes fractions sont collectées dans des tubes à essai (10 à 250 ml) disposés sur un collecteur, dans des erlenmeyers ou dans des piluliers. L'analyse par CCM du contenu des tubes permet ensuite de regrouper rationnellement les fractions selon leur profil



**Figure 9 : schéma du montage pour chromatographie sur colonne ouverte (A)  
et expérience de base en CC (B) (D'après Rouessac et Rouessac, 2004)**

chromatographique. Les différentes fractions collectées peuvent également être regroupées selon leur activité biologique. Les solvants de ces fractions regroupées sont finalement éliminés à l'évaporateur rotatif.

## **II – 2 – 1 – 2 – 3 – 1. Chromatographie d'adsorption**

La chromatographie d'adsorption est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est un adsorbant solide polaire (phase normale) ou apolaire (phase inverse). Elle est basée sur la (ré)partition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile et permet la séparation des constituants d'un mélange de substances en utilisant les propriétés qui les relient à un substrat déterminé.

Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

La chromatographie d'adsorption est appliquée selon différentes techniques :

- sur papier : en chromatographie ascendante ou radiale ; dans cette technique le papier constitue la phase fixe ;
- sur couche mince : le gel adsorbant (cellulose, silice) est coulé sur une plaque (verre, aluminium, plastique), mélangé à un liant (plâtre) ;
- sur colonne : ouverte à pression ambiante, en flash chromatographie, à basse, moyenne ou haute pression.

Dans cette dernière forme de chromatographie, la phase stationnaire étant contenue dans une colonne, l'éluant, qui peut-être sous la pression d'une pompe ou non, entre par une extrémité et sort par l'autre. Il peut-être un solvant unique ou un mélange de solvant. Sous l'action de l'éluant et des liaisons qu'elles établissent avec l'adsorbant, les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne et prendre un certain retard les unes par rapport aux autres pendant la migration. Elles vont donc se présenter avec un certains retard en sortie de colonne.

## **II – 2 – 1 – 2 – 3 – 2. Chromatographie d'exclusion**

La chromatographie d'exclusion est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration quand la phase stationnaire est hydrophile (phase mobile aqueuse) ou perméation de gel quand elle est hydrophobe (la phase mobile est un solvant organique) (Rouessac et Rouessac, 2004).

Dans la chromatographie d'exclusion stérique les composants sont séparés selon leur dimension moléculaire (taille et forme). La phase stationnaire est un solide comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. Elle se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille (**figure 10**).

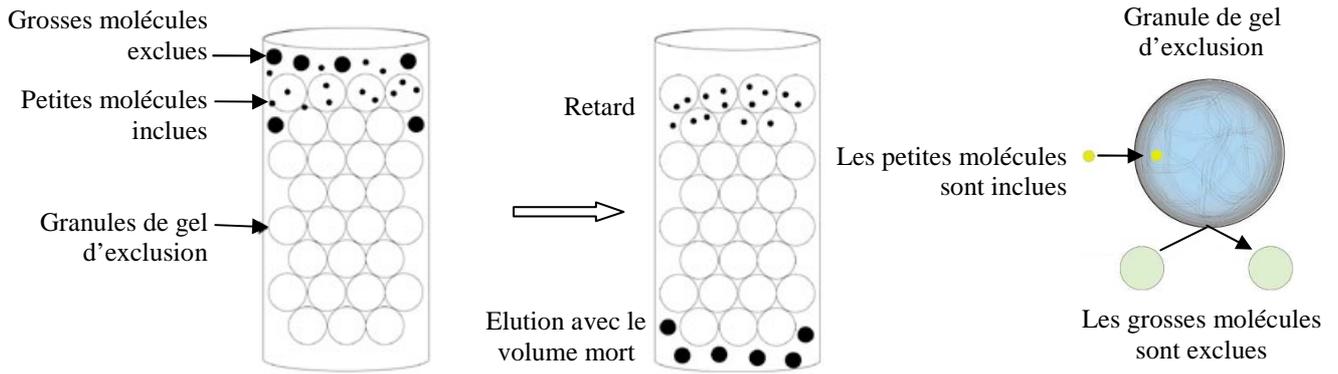
On réalise ainsi une sorte de perméation sélective à l'échelle moléculaire. En effet, lorsqu'un mélange de deux molécules (des grosses et des petites) est déposé sur une colonne remplie d'un gel de sephadex (1), les grosses particules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) ne peuvent pénétrer dans les pores, sont exclues du gel (d'où le nom de chromatographie d'exclusion) et ne se répartissent donc que dans le volume extérieur aux billes, c'est-à-dire dans la phase mobile (éluant) (2). Elles sont donc éluées les premières (3) car n'étant pas retenues par la phase fixe. En revanche, les petites particules diffusent plus lentement, car incluses dans les pores du gel (2), ce qui freine leur migration. Elles sont donc éluées les dernières (4) car elles ont une plus grande distance à parcourir pour arriver en bas de la colonne (**figure 11**).

La vitesse de migration d'un composé va donc dépendre, pour une même famille de molécules, de sa masse moléculaire. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires (**figure 12**) ; ainsi la durée de séjour dans la colonne augmente lorsque la taille des analytes diminue.

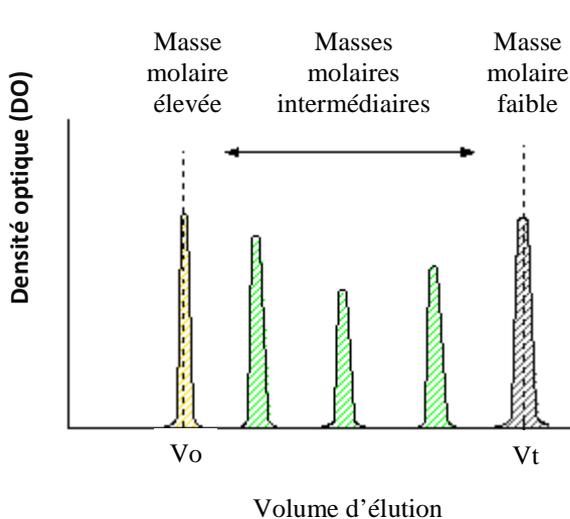
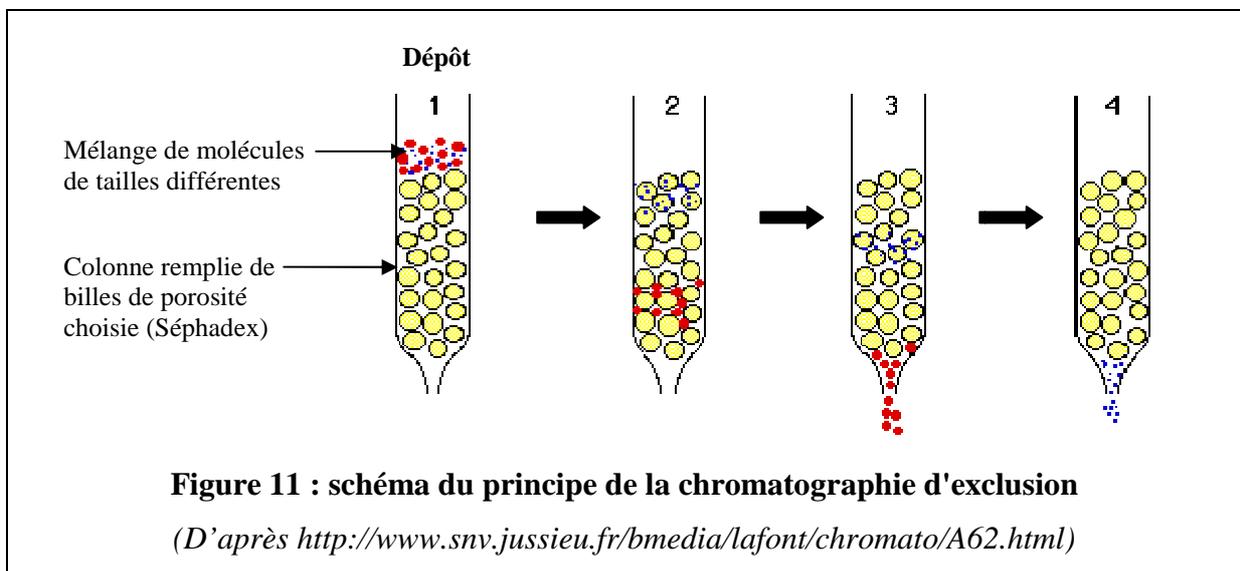
La chromatographie d'exclusion est réalisée soit dans le but d'éliminer les sucres contenus dans les extraits, employant alors comme phase stationnaire du Diaion® HP20/L, soit comme méthode de purification de fractions, employant du Sephadex® LH-20 (gel de dextrane®).

## **II – 2 – 1 – 2 – 4. Chromatographie sur couche préparative (CCP) ou chromatographie sur couche mince (CCM) préparative**

La plupart du temps, les extractions permettent de séparer les constituants. Mais, si quel que soit le pH de la phase aqueuse et la nature de la phase organique, les principes actifs ne sont pas séparés, il est nécessaire de faire une séparation par chromatographie sur couche préparative (Moffat *et al.*, 1986). De même, lorsque deux principes actifs sont chimiquement proches et ne sont pas séparables par LLE, on a recours à la chromatographie sur couche préparative.



**Figure 10 : schéma du tamisage moléculaire (D'après Rouessac et Rouessac, 2004)**



- Les molécules de masse molaire élevée sortent les premières, à un volume d'élution  $V_0$  (volume mort de la colonne)
- Les molécules de masse molaire faible sortent les dernières, à un volume d'élution  $V_t$  (volume total des liquides de la colonne).
- Les molécules de masses molaires intermédiaires sortent à des volumes d'élution intermédiaires et sont éluées dans l'ordre des masses molaires décroissantes.

**Figure 12 : élution des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires**

(D'après <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/image22.gif>)

La CCP dérive de la chromatographie sur couche mince analytique (voir II – 2 – 2 – 1., page 61) mais, dans ce cas, les zones de silice qui correspondent aux taches sont récupérées de la plaque, contrairement à la CCM analytique. A cette différence s'ajoute la quantité d'échantillon appliquée sur la plaque chromatographique (20 mg à 40 mg) ainsi que l'épaisseur de la couche du gel de silice sur la plaque (1 à 3 mm).

Dans cette technique, les plaques utilisées sont généralement des plaques en verre de 20 x 20 cm recouvertes de gel de silice. L'adsorbant est le même que pour les CCM analytique. Pour séparer des produits par CCP, il est nécessaire d'avoir des hRf (= Rf x 100) très différents compris entre 30 et 70, car la résolution est moins bonne que sur CCM analytique. La préparation de la cuve de migration est la même que pour la CCM analytique, seule la taille et le volume d'éluant changent.

Le mélange à séparer est solubilisé dans un minimum de solvant adéquat, le plus apolaire possible, tel l'éther ou le chloroforme, de manière à obtenir la dissolution totale. La solution est déposée très soigneusement, à l'aide d'une pipette pasteur au bout très effilé ou d'un capillaire à point de fusion, ouvert aux deux extrémités. Le dépôt se fait en ligne à 2 cm du bord inférieur et 2 cm des côtés ; l'épaisseur ne devant pas dépasser 5 mm. Il peut s'avérer utile d'effectuer le dépôt sous courant d'air (sèche-cheveux) pour évaporer le solvant au fur et à mesure et éviter ainsi une dispersion sur une trop large bande. Il est nécessaire de bien sécher avant d'éluer. La plaque est développée dans une cuve saturée contenant l'éluant adéquat. Après migration sur environ 16 cm, la plaque est séchée à température ambiante (sous une hotte) ou avec un sèche-cheveux, et les taches sont localisées sous lumière UV. Si les produits ne sont pas visibles à 254 ou 366 nm, il est nécessaire de pulvériser un réactif adéquat "*ad hoc*" sur une petite bande, en bord de plaque, puis de localiser les différents éluats sur la partie "vierge" de la plaque.

La silice correspondant aux différentes taches est soigneusement grattée à l'aide d'un scalpel ou d'une fine spatule. Les composés d'intérêt fixés sur la silice sont recueillis individuellement puis finement broyés et extraits en plusieurs fois sous agitation magnétique, dans un solvant adéquat. Les différents extraits (possibilité de contrôle par CCM analytique) sont réunis, séchés sur sulfate de sodium anhydre, filtrés puis concentrés au moyen de l'évaporateur rotatif dans un ballon taré.

## **II – 2 – 1 – 2 – 5. Chromatographie centrifuge à contre-courant (CCC)**

Depuis plusieurs années, parallèlement aux nombreuses techniques chromatographiques utilisant une phase mobile liquide et une phase stationnaire solide,

regroupées sous le terme générique de chromatographies liquides, se sont développées les techniques de chromatographies liquide-liquide dites de contre-courant (CCC) (Ito, 1982 ; Mandava *et al.*, 1982 ; Murayama *et al.*, 1982 ; Renault et Zeches-Hanrot, 1995). La CCC et la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) sont voisines par beaucoup d'aspects (Foucault et Nakanishi, 1990 ; Abbou et Kleiman, 1991 ; Berthod *et al.*, 2009). En effet, les séparations sont basées sur le partage des solutés entre deux phases, et la chaîne d'appareillage est la même : réservoir, pompe, injecteur, colonne, détecteur (s), collecteur (**figure 13**).

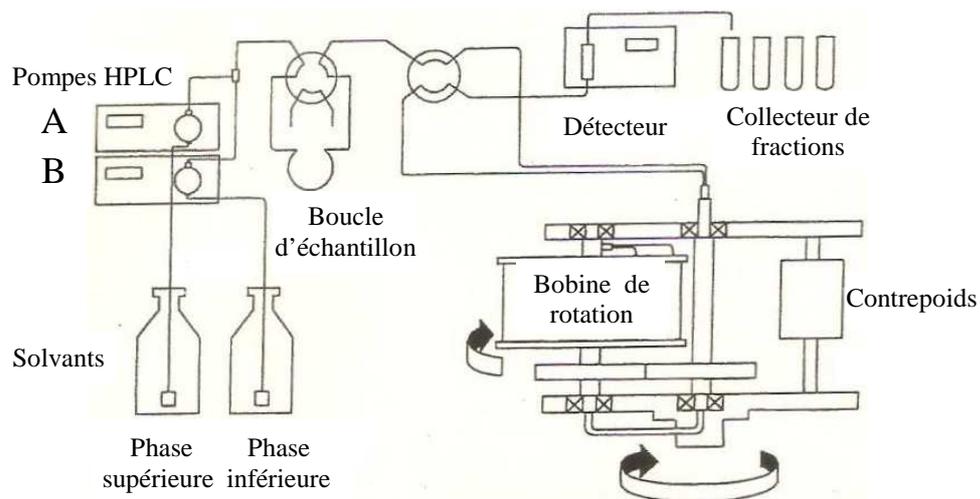
La CCC a la particularité d'employer comme phase stationnaire une phase liquide. Il ya donc absence de support solide au niveau de la colonne (Conway et Petroski, 1995). Cette technique est donc basée sur le partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles, préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants ou solutions. Ces phases sont maintenues en contact dans la colonne chromatographique. Une des phases, dite stationnaire, reste dans la colonne grâce au champ de forces centrifuges (d'où la dénomination de chromatographie de partage centrifuge, CPC) généré par le mouvement planétaire synchronisé de colonne enroulée ; l'autre phase liquide, percolée au travers, joue le rôle de phase mobile (Slacanin *et al.* 1989 ; Foucault, 1995). Des échanges sont ainsi possibles entre les deux phases. L'extrait est traité dans une colonne de rectification et son élution permet la séparation progressive des solutés en fonction de leur coefficient de partage respectif. Le solvant de l'extraction provient d'un bac tampon et est injecté dans la colonne par l'intermédiaire d'une pompe.

Le choix du système de solvants peut se faire selon un diagramme ternaire de phases (Conway, 1990 ; Foucault et Nakanishi, 1990 ; Oka *et al.*, 1991), ou par l'utilisation de gammes préétablies (Abbott et Kleiman, 1991).

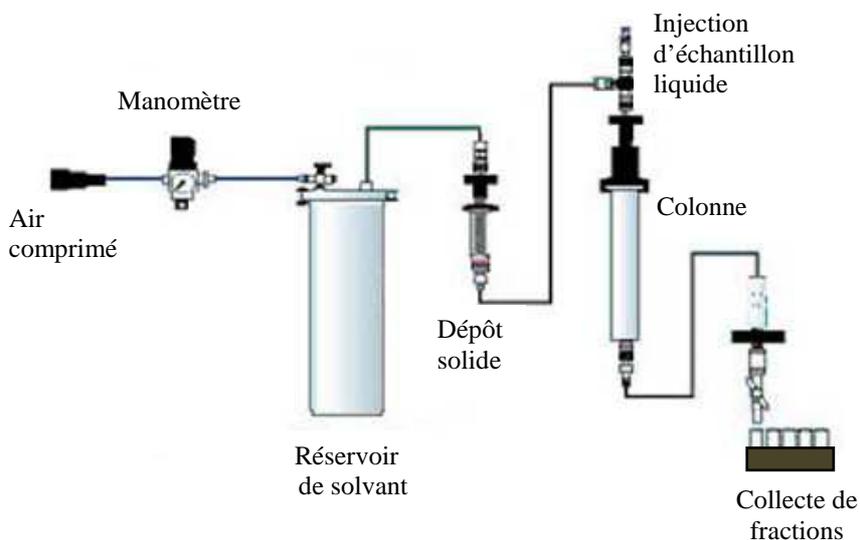
## **II – 2 – 1 – 2 – 6. Flash chromatographie**

C'est une technique de fractionnement et de purification utilisant un système manuel de pression hydraulique. Le système est composé d'une bouteille d'air comprimé qui alimente une pompe pneumatique, d'une vanne d'injection, de deux modules de compression utilisable selon les quantités d'échantillon et d'un régulateur de pression (manomètre) (**figure 14**).

Dans cette technique, le support chromatographique, qui peut être de la silice normale ou de la silice en phase inverse, est conditionné dans des cartouches. Les échantillons à purifier sont déposés sur des pré-colonnes de silice ou de phase inverse. La colonne de phase stationnaire sous pression (7 Bar maximum) permet d'accélérer la purification, par rapport à un système équivalent à pression atmosphérique, avec un débit élevé.



**Figure 13 : schéma d'un dispositif de chromatographie de partage centrifuge à contre-courant** (D'après Slacanin et al. 1989)



**Figure 14 : schéma d'un dispositif de flash chromatographie** (D'après [http://www.interchim.com/interchim/chroma/catalog\\_chrom\\_pdf/pdf5.htm](http://www.interchim.com/interchim/chroma/catalog_chrom_pdf/pdf5.htm))

Cette technique permet également une amélioration dans la résolution de séparation et une quantité plus élevée d'échantillon.

#### **II – 2 – 1 – 2 – 7. Chromatographie liquide à basse pression (LPLC)**

La chromatographie liquide à basse pression (Lobar) (LPLC, *Low Pressure Liquid Chromatography*) est une technique d'élution basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne et, à une autre échelle, similaire à celle de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (voir II – 2 – 2 – 2., page 64). Une manipulation de LPLC se déroule à une basse pression de travail comprise entre 1 et 10 bars, et la quantité d'échantillon à analyser et la dimension des colonnes sont plus importantes. La résolution est par conséquent moins bonne qu'en HPLC, mais plusieurs centaines de milligrammes d'échantillon peuvent être fractionnés en une analyse.

Le dispositif est constitué d'une pompe, d'un détecteur à longueur d'onde fixe et d'un enregistreur. La colonne est une cartouche contenant la phase stationnaire, connectée par son extrémité inférieure à une cuve de collecte sous basse pression.

#### **II – 2 – 1 – 2 – 8. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)**

Le principe de la chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC, *Medium Pressure Liquid Chromatography*) est semblable à celui de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (voir II – 2 – 2 – 2., page 64) ; Cette technique de séparation, à mi-chemin entre la LPLC et la HPLC permet, en une analyse, la séparation d'une plus grande quantité de mélanges complexes tout en conservant une résolution convenable. La MPLC est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique, sur colonnes de chromatographie en verre contenant la phase stationnaire (en phase normale ou en phase inverse). Des colonnes de calibres variables sont utilisées. La colonne est surmontée d'une pré-colonne permettant d'effectuer un dépôt d'échantillon et reliée au système de solvants. L'échantillon est introduit sous forme solide mélangé à la phase stationnaire (sur 3 fois son poids) ou sous forme liquide (1 à 20 ml) suivant sa solubilité. L'éluant est poussé par pression d'air délivrée par une pompe à travers la pré-colonne, puis la phase stationnaire. En MPLC, la pression de travail est comprise entre 15 et 20 bars.

Les systèmes d'élution employés avec un débit élevé (entre 2,5 et 250 ml/min) sont généralement des mélanges binaires ou ternaires monophasiques permettant de travailler en gradient polarité ou en isocratique. Des fractions sont collectées dans des tubes à essai grâce à un collecteur de fraction programmable en fonction du volume, du temps ou du seuil

de détection par couplage à un photomètre UV (détecteur) à longueur d'onde variable de 190 à 740 nm.

## **II – 2 – 1 – 2 – 9. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative)**

La chromatographie liquide à haute pression semi-préparative est une technique très utilisée pour les étapes finales de purification (Ito *et al.*, 1994). Elle est utilisée pour la séparation de mélanges de 1 à 100 mg. La chromatographie préparative est utilisée pour purifier des produits pour d'autres utilisations. Son but est d'obtenir de la substance ; c'est pourquoi, à toute échelle, elle implique de collecter des fractions.

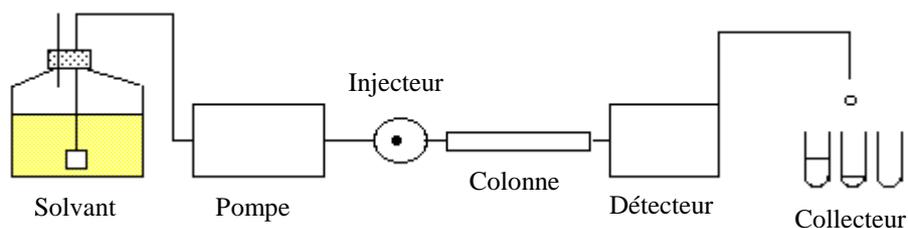
La HPLC semi-préparative est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique (voir II – 2 – 2 – 2., page 64). Le montage (**figure 15**) se compose d'une pompe, d'un injecteur, d'une colonne, d'un détecteur UV à longueur d'onde fixe ou variable et d'un collecteur de fractions.

Par convention, la chromatographie liquide à haute pression semi-préparative correspond aux colonnes avec un diamètre interne (d.i.) de 8 à 25 mm et avec des particules de 5 à 10  $\mu\text{m}$  (Hostettmann *et al.*, 1998).

## **II – 2 – 1 – 2 – 10. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

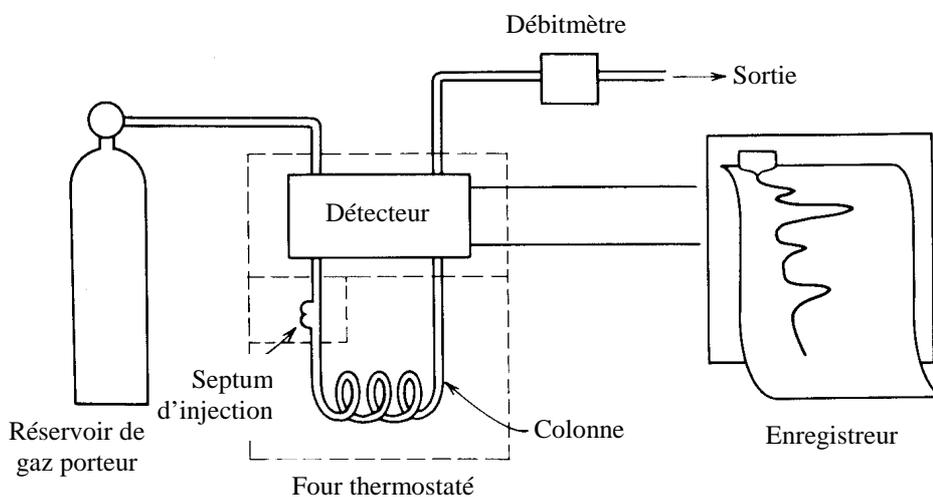
La chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC, en anglais, pour *Gas Chromatography*) est très voisine de la chromatographie liquide, mais ici, la phase mobile est un gaz. Elle se fonde sur le partage du soluté entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire liquide ou solide immobilisée sur un support inerte. La CPG est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur, comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire. Elle est fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse ou d'exclusion. La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage (Tranchant, 1995 ; Rouessac et Rouessac, 2004).

Un appareil de CPG (**figure 16**) réunit, dans un bâti unique, outre les trois modules classiques (injecteur, colonne et détecteur), un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits, contrôlés avec précision,



**Figure 15 : schéma d'un dispositif de chromatographie liquide à haute pression semi-préparative**

(D'après <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A4.html#A4>)



**Figure 16 : schéma d'un dispositif de chromatographie gazeuse**

(D'après fascicule de travaux pratiques de chimie analytique pharmaceutique et pharmacognosie-phytochimie, Ecole de Pharmacie, Genève-Lausanne, 2008)

permettent une grande répétabilité des temps de rétention (Ettre et Hinshaw, 1993 ; Tranchant, 1995).

L'installation de chromatographie gazeuse est schématisée comme suit.

La phase mobile, c'est à dire le gaz, est sous pression dans un cylindre métallique. C'est dans son flux que l'on injecte le mélange à analyser, et c'est lui qui le véhicule jusqu'au détecteur à travers toute la colonne. Un ou deux détendeurs permettent de réduire la pression entre 1 et 4 bars avant passage dans la colonne. La qualité de la séparation dépendant de la vitesse de la phase mobile, il est important de bien régler cette pression (Hinshaw et Ettre, 1994). On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants : hélium, diazote ou dihydrogène (Rouessac et Rouessac, 2004). Il existe actuellement 3 grandes classes de colonnes : les colonnes remplies, capillaires et mégabores.

L'échantillon à analyser, facilement volatil, est préalablement mis en solution dans un solvant très volatil. Il est injecté (1 à 10  $\mu$ l), à l'aide d'une microseringue, à travers un septum qui obture la chambre d'injection ou injecteur. Dans cette chambre d'injection, l'échantillon est volatilisé et homogénéisé avec le gaz vecteur et porté en tête de la colonne (Rouessac et Rouessac, 2004). La température de l'injecteur doit être d'au moins 30 °C supérieure à celle de la colonne.

La colonne est placée dans une enceinte à température régulée par un four (type chaleur tournante). Il est possible de modifier la température en cours d'analyse (gradient de température) afin de séparer, dans un temps court, des composés de volatilités différentes.

La phase stationnaire dans la colonne peut être un liquide non (ou peu) volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Dans les deux cas, la phase stationnaire va provoquer un phénomène de rétention chromatographique avec les différents composés (solutés). Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne.

Les différentes molécules du mélange vont donc se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

La phase gazeuse qui a traversé la colonne rencontre un élément essentiel qui est appelé détecteur avant de sortir à l'air libre. Le détecteur permet de mesurer en continu le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier. Il envoie un signal électronique vers un enregistreur qui dessinera les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne) appelées chromatogrammes (Tranchant, 1995).

## II – 2 – 2. Techniques de séparation analytique

### II – 2 – 2 – 1. Chromatographie planaire ou chromatographie sur couche mince analytique (CCM analytique)

La chromatographie sur couche mince (CCM ou en anglais TLC, pour *Thin Layer Chromatography*) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites (Randerath, 1971 ; Moffat, 1986). Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée de la pureté relative des échantillons à analyser ou à fractionner. C'est également un support facilement utilisable pour caractériser ultérieurement des substances par leurs réactivités chimiques ou leurs activités sur certaines cibles biologiques ou biochimiques (Wagner et Bladt, 2001).

La chromatographie sur couche mince repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage (Vernin, 1970 ; Randerath, 1971). Sa mise en œuvre nécessite plusieurs matériels.

✓ Une plaque de chromatographie sur couche mince comportant la phase stationnaire. Elle se compose d'un support rigide inerte (plaque de verre, feuille d'aluminium ou de plastique) de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10 cm ou 5 x 10 cm), avec une épaisseur comprise entre 0,5 et 2 mm, sur lequel a été étalée uniformément une fine couche d'un milieu d'adsorption (usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose) comme phase stationnaire (exemple gel de silice 60 F<sub>254</sub> : le nombre 60 indique le diamètre moyen des pores de l'adsorbant en angström ; la lettre F indique l'addition d'un indicateur fluorescent ; le chiffre 254 précise la longueur d'onde d'excitation à laquelle il faut regarder la plaque). L'épaisseur de la couche de phase stationnaire est de l'ordre de 0,2 mm (200 μm). Toutes les couches prêtes à l'emploi renferment un liant organique (incorporé au cours de la fabrication) destiné à leur assurer une stabilité suffisante, une bonne adhérence et une grande résistance aux frottements.

✓ Une cuve chromatographique. C'est un récipient en verre, de forme variable (selon les manipulations à effectuer) fermé par un couvercle maintenu étanche.

✓ La phase mobile : solvant (éluant) approprié. La phase mobile est généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, adapté au type de séparation recherché (Renault *et al.*, 2002). Le solvant de migration doit être choisi de manière à obtenir une bonne séparation des principes actifs, sans provoquer de dégradation en cours de la migration des composés. La phase mobile est introduite dans la cuve de migration quelques

minutes (environ 5 à 10 min) avant son utilisation. Les parois de la cuve sont garnies de papier buvard imbibé de solvant et la cuve est fermée, ceci pour faciliter sa saturation en vapeur de solvant d'élution.

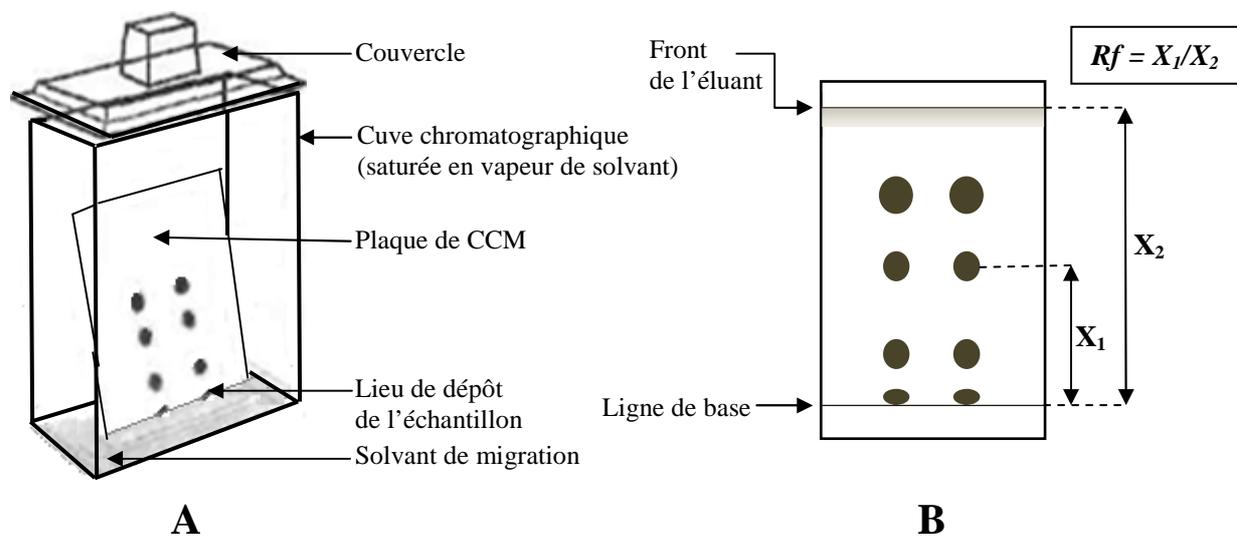
✓ Les échantillons. Ils sont le plus souvent solubilisés dans un solvant volatil qui n'est pas forcément le même que l'éluant. Les échantillons à analyser sont déposés, à 1 cm du bas de la plaque, en petits spots sous forme de points de 2 à 3 mm de diamètre ou de trait horizontal de 1 à 2 cm de longueur, sur l'absorbant. Les dépôts doivent être espacés entre eux d'environ 1 cm et se trouver à 1,5 ou 2 cm des bords latérales. Les quantités déposées sur les plaques sont normalement de 100 µg pour les extraits et de 10 µg pour les produits purs. Ce dépôt est réalisé délicatement, en plusieurs fois, avec 1 à 5 µl de ces solutions, soit manuellement avec un capillaire, soit de manière automatique (Wagner et Bladt, 2001).

La plaque ainsi préparée est déposée obliquement dans la cuve munie d'un couvercle, plongeant d'environ 0,5 cm dans la phase mobile servant d'éluant. Pour une bonne migration des composés, la cuve contenant la phase mobile doit être saturée. L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion. Les composés déposés sont alors dissous par la phase mobile qui migre lentement par capillarité, en mode ascendant, le long de la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer (**figure 17A**).

Selon la nature des phases mobile et stationnaire, deux types de mécanismes d'interaction permettent la séparation de composés présents en mélange : l'adsorption sur la surface de la phase stationnaire solide et le partage entre un film de phase stationnaire liquide et la phase mobile. Les constituants du mélange se séparent ainsi par migration différentielle (Moffat, 1986).

Lorsque le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (en général une dizaine de centimètres), la plaque est retirée de la cuve. Immédiatement après avoir sorti la plaque, le front de solvant (position limite atteinte par la phase mobile) est marqué avec un crayon à papier, la plaque est séchée à l'air ou éventuellement au sèche-cheveux pour évaporer entièrement le solvant (Rouessac et Rouessac, 2004).

Lorsque les constituants sont colorés, ils sont directement visibles sur la plaque. Des produits fluorescents incorporés dans la phase stationnaire des plaques utilisées permettent également la visualisation des composés UV-actifs ; les constituants de l'échantillon désactivant la fluorescence du matériau, la plaque est fluorescente partout sauf aux endroits où se trouvent les constituants. Ainsi, les taches sont localisées sous éclairage ultraviolet à 254 nm (extinction de la fluorescence) et 366 nm (fluorescence propre)



**Figure 17 : schémas d'une chambre de développement de CCM et plaque de CCM**

*(D'après Rouessac et Rouessac, 2004)*

**A** - Cuve chromatographique (munie d'un couvercle) contenant la plaque de CCM portant les échantillons

**B** - Aspect classique d'une plaque de CCM après développement ; calcul du Rf

et entourés au crayon à papier ou photographiés. Ceci permet la détection des produits à faible activité spectrale dans le domaine du visible (environ 450 à 700 nm).

Les différents constituants de l'échantillon ne migrant pas à la même vitesse le long de la plaque, on obtient alors, dans le cas idéal, autant de taches que de constituants sur le trajet de migration du solvant.

Les hauteurs de migration des différentes tâches sont mesurées et on détermine alors, pour chaque constituant, le rapport frontal ou facteur de rétention ( $R_f$ , *Retention factor*) qui caractérise la position de chaque tache et qui est caractéristique d'une seule espèce chimique (**figure 17-B**). C'est le rapport de la distance de migration du produit (centre de la tache quand elle est ronde) sur la distance de migration de l'éluant (front du solvant) (Randerath, 1971).

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}} = X_1 / X_2$$

Si nécessaire, l'utilisation de réactifs chimiques en solution, vaporisés sur les chromatogrammes, permettent de compléter les observations faites visuellement sous les lampes UV (Krebs *et al.*, 1969). La révélation par "sprayage" consiste à faire une réaction chimique à même le support en pulvérisant un réactif approprié ou un mélange de réactifs (Wagner *et al.*, 1984 ; Wagner et Baldt, 2001). En effet, un choix adapté de réactifs permet non seulement de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans un extrait (criblage général), mais offre en plus une méthode simple et rapide pour localiser un composé particulier dans un mélange (extrait, fraction enrichie, etc.).

## II – 2 – 2 – 2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La technique de séparation la plus utilisée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance, abrégée CLHP (ou HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). La HPLC analytique est utilisée pour analyser les extraits et les fractions, pour guider et optimiser les conditions de séparation et d'isolement avec la MPLC et la HPLC semi-préparative, et pour vérifier la pureté des produits d'isolement (Adams et Nakanishi, 1979 ; Snyder *et al.*, 1997). Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

A l'origine la lettre P du sigle HPLC correspondait au mot "Pression". La grande efficacité de cette technique, qui combine les attributs rapidité et résolution élevée, fait que la lettre P désigne actuellement le mot "Performance" (Rouessac et Rouessac, 2004).

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux de la chromatographie classique sur colonne. Ainsi, une installation de HPLC comporte divers modules spécialisés : les solvants (phase mobile), le dégazeur, les pompes, l'injecteur automatique, la colonne thermostatée, le détecteur et le micro-ordinateur (intégrateur) (**figure 18**).

Ces modules se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis et sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Ces appareillages sont pilotés automatiquement par un programme informatique.

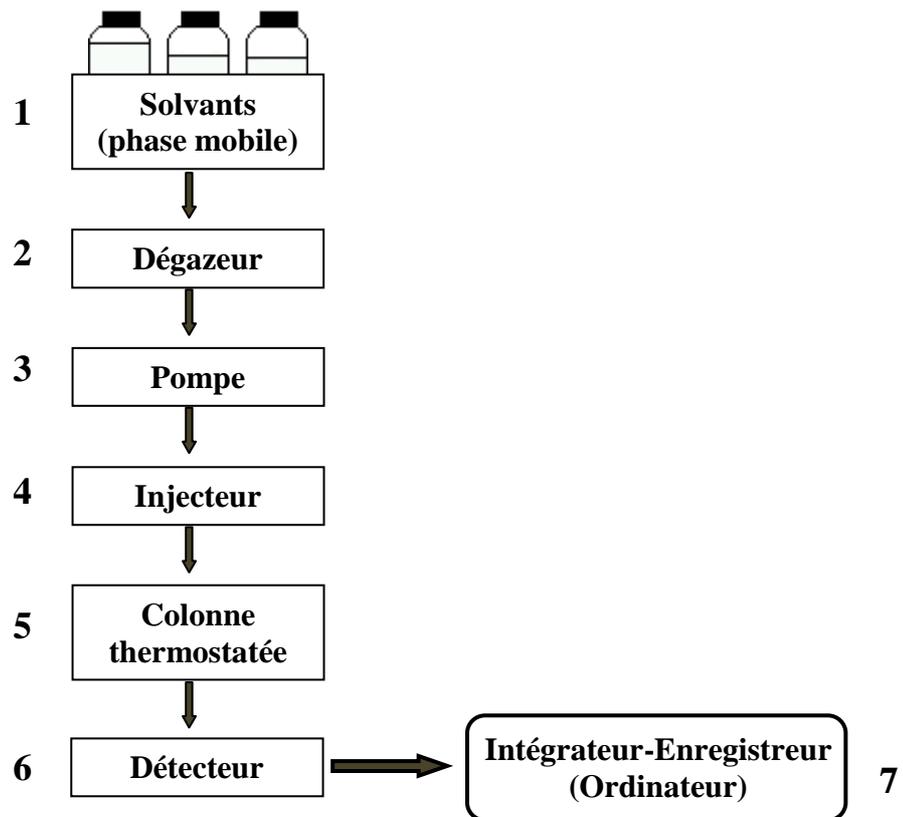
✓ La phase mobile est une combinaison miscible d'eau et de divers liquides organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane, etc.) (Renault *et al.*, 2002). Ces solvants doivent être dégazés (par barbotage de gaz neutre dans les réservoirs de phase mobile ou par des dégazeurs en ligne) afin d'en retirer l'air dissous qui pourrait former des bulles pouvant gêner la progression du liquide dans les tubes (mauvais débits) et créer des faux pics ou artefacts au niveau du détecteur.

La composition de la phase mobile peut être modifiée au cours de l'analyse : c'est le mode dit « gradient » ou « élution graduée ». En opposition, il y a le mode « isocratique », pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse. Dans une élution avec deux pompes, un mélangeur est aussi nécessaire afin d'obtenir une phase mobile homogène.

✓ Les pompes servent à déplacer les solvants à haute pression (150 à 200 bars). Elles permettent de délivrer, à un débit non pulsé et stable, un éluant de composition fixe (mode isocratique) ou au contraire de composition variable pour faire un gradient d'élution (mode gradient).

✓ L'injection est effectuée par un injecteur à boucle d'échantillonnage. Il permet d'introduire l'échantillon, solubilisé dans un solvant adéquat et exempt de particules en suspension, en tête de colonne, dans le système à haute pression.

✓ La colonne est un cylindre calibré, généralement en acier inoxydable, parfois doublé d'un matériau inerte (verre ou plastique spéciaux). Elle contient la phase stationnaire de fine granulométrie (diamètre compris entre 2 et 5  $\mu\text{m}$ ), polaire et hydrophile (phase normale) ou apolaire et hydrophobe (phase inverse). La phase normale la plus utilisée est à base de



**Figure 18 : schéma d'un dispositif de chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

gel de silice. La phase "inverse" est en général composée de petites particules de silice sur lesquelles on a greffé des fonctions chimiques, le plus souvent des chaînes à 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Selon le taux de greffage, on obtient une plus ou moins grande résolution. Cette phase stationnaire qui remplit la colonne est maintenue entre deux disques frittés. La colonne peut être précédée d'une pré-colonne qui permet d'éviter les colmatages éventuels occasionnés par l'accumulation de molécules de très grosse taille.

La colonne chromatographique permet la séparation des molécules chimiques en fonction de certaines de leurs propriétés respectives (taille, polarité, hydrophilie, affinité, etc.). Les molécules sortiront ainsi de la colonne à différents temps appelés temps de rétention, suivant leurs interactions avec la phase stationnaire et la phase mobile.

✓ Un détecteur chromatographique (spectroscopie UV-visible, barrette de diode, fluorimètre, réfractomètre, etc.), qui suit la colonne, permet de détecter en continu, dans le flux sortant, les analytes séparés. Le plus répandu est le détecteur UV-visible à barrette de diode (DAD, *Diode Array Detector*), d'où l'appellation HPLC/DAD-UV. Il mesure l'absorption de la lumière par le produit, à la sortie de la colonne, et opère à longueur d'onde fixe (celle-ci ayant été fixée par l'opérateur), à longueurs d'ondes variables entre 190 et 800 nm ou à longueurs d'ondes multiples comme les réseaux de diodes.

✓ Un ordinateur (intégrateur, enregistreur) complète le plus souvent le dispositif, pour la commande du système chromatographique, ainsi que l'acquisition et le traitement des données provenant du détecteur.

L'analyse qualitative consiste à identifier les analytes par leur temps de rétention qui, pour des conditions données (solvant, débit, colonne etc.), est caractéristique du composé. Le résultat observable d'une analyse HPLC se présente sous la forme d'une courbe du signal détecté en fonction du temps : c'est le chromatogramme. Il comporte plusieurs pics de forme gaussienne, de caractéristiques différentes. On admet que chaque pic correspond à un seul composé.

### **II – 2 – 2 – 3. Chromatographie liquide ultra-performante (UPLC)**

La chromatographie liquide ultra-performante (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) permet, par rapport à un système HPLC classique, d'améliorer sensiblement la séparation et la résolution des pics chromatographiques. La UPLC repose sur l'emploi de phase stationnaire composée de particules de diamètre inférieur à 2  $\mu\text{m}$  (alors que les colonnes HPLC sont habituellement remplies de particules de 3 à 5  $\mu\text{m}$ ). De ce fait,

il est possible d'augmenter le débit, et donc la vitesse d'analyse, sans altérer les performances chromatographiques.

L'avènement de la UPLC a toutefois nécessité le développement instrumental d'un nouveau système de chromatographie en phase liquide, pouvant tirer avantage des performances de séparation (en limitant les volumes morts) et compatible avec les pressions générées (de l'ordre de 550 à 1000 bar, comparativement à 170 à 400 bar en HPLC).

Le système UPLC est composé des mêmes éléments qu'un système HPLC (cf. II – 2 – 2 – 2).

Le couplage de cette technique séparative avec un analyseur de masse à haute résolution (UPLC/ESI/TOF-MS) (voir II – 2 – 3 – 3., page 71) est idéal pour établir une comparaison de fractions ou d'extraits, ou d'effectuer de la déréplication (Spitsmeister *et al.*, 2010 ; Favreto *et al.*, 2012).

## **II – 2 – 3. Techniques d'identification structurale**

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques telles que la spectrométrie de masse, la spectrométrie UV-visible, la spectrométrie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire du proton et/ou du carbone.

Ces techniques permettent, dans un temps réduit, d'avoir des données importantes conduisant à l'élucidation structurale des molécules. Leur principe de base repose sur le fait que la molécule est soumise à des sources d'énergie et que sa réponse est enregistrée sous la forme d'un spectre.

### **II – 2 – 3 – 1. Spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible (UV-visible)**

La technique de spectrophotométrie est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible (ultraviolet : 200 à 400 nm ; visible : 400 à 750 nm).

La spectrométrie UV-visible est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Les techniques de spectrométrie UV-visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico-structurales et les caractéristiques optiques des composés (Meyer et Denier, 1996). Dans les substances, chaque composé absorbe à une longueur d'onde bien déterminée, ce qui permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption UV permet

également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins.

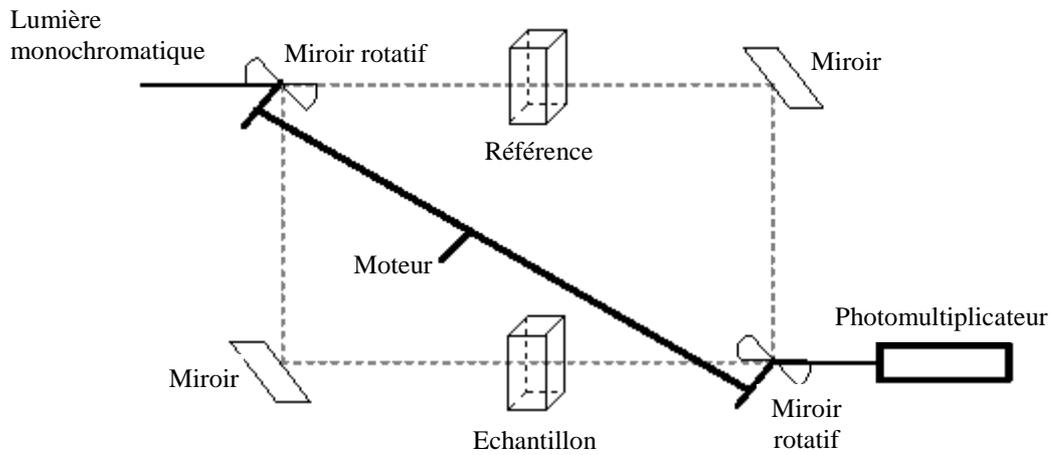
La chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV-Visible perfectionnés, à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés. Les détecteurs UV ou à barrettes de diodes (DAD, *Diode Array Detector*) sont couramment utilisés comme détecteurs des techniques chromatographiques (HPLC).

La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm (Rouessac et Rouessac, 2004). Les appareils principalement utilisés en spectrométrie UV-visible sont des spectrophotomètres à double faisceaux qui se présentent comme schématisé ci-dessous (**figure 19**).

Dans cet instrument, le faisceau monochromatique, issu d'une lampe au tungstène (180 à 1100 nm), est divisé en deux de manière identique : un des rayons traverse une cellule de référence (celle du fond) contenant le solvant (ou le milieu utilisé sans la (les) substance(s) étudiée(s)) et l'autre rayon traverse la cellule (celle de devant) contenant l'échantillon (Hamon *et al.*, 1990). Pour l'UV, on utilise des cuves en quartz (le verre absorbe en UV) et, pour le visible, il est possible d'utiliser des cuves jetables en plastique. Le signal dû à l'absorption de la référence est automatiquement soustrait de celui dû à l'absorption de l'échantillon ; le spectre résultant est donc celui dû exclusivement à la substance étudiée. Il est nécessaire de faire la correction de ligne de base (le zéro) en mettant le solvant (ou le milieu utilisé sans la (les) substance(s) étudiée(s)) dans les deux cuves.

## **II – 2 – 3 – 2. Spectrométrie infrarouge (IR)**

La spectrométrie infrarouge (spectrométrie IR) est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge (longueur d'onde comprise entre 780 nm et 1 000 000 nm) du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectrométrie d'absorption. Comme pour toutes les techniques de spectroscopie, elle peut être employée pour l'identification de composés ou pour déterminer la composition d'un échantillon. Elle permet de déterminer la présence de groupements fonctionnels (fonctions chimiques) dans les molécules organiques, et les structures dans certaines molécules simples.



**Figure 19 : schéma d'un spectrophotomètre UV**

*(D'après fascicule de travaux pratiques de chimie analytique pharmaceutique et pharmacognosie-phytochimie, Ecole de Pharmacie, Genève-Lausanne, 2008)*

Le spectre infrarouge d'un échantillon est établi en faisant passer un faisceau de lumière infrarouge au travers de cet échantillon. L'examen de la lumière transmise indique la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde. On peut le faire avec un faisceau monochromatique, avec une modification de la longueur d'onde dans le temps, ou en utilisant un instrument à "transformée de Fourier" afin de mesurer toutes les mesures d'onde simultanément. On peut alors produire les spectres en absorbance ou en transmittance et indiquer les longueurs d'ondes d'absorption. L'analyse de ces caractéristiques indique des détails de la structure moléculaire de l'échantillon.

La spectrométrie infrarouge exploite le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec des niveaux d'énergie discrets (modes vibratoires). Les liaisons entre les atomes composant une molécule peuvent être considérées comme des « ressorts » qui possèdent des fréquences de vibration propres et absorbent les rayons électromagnétiques d'énergie correspondante. Lorsqu'une molécule est exposée à un rayonnement IR, elles absorbent à différentes fréquences dont chacune est caractéristique d'une fonction chimique (Mukamel, 2000). Afin qu'un mode vibrationnel dans une molécule soit actif dans l'infrarouge, il doit être associé à des modifications du dipôle permanent.

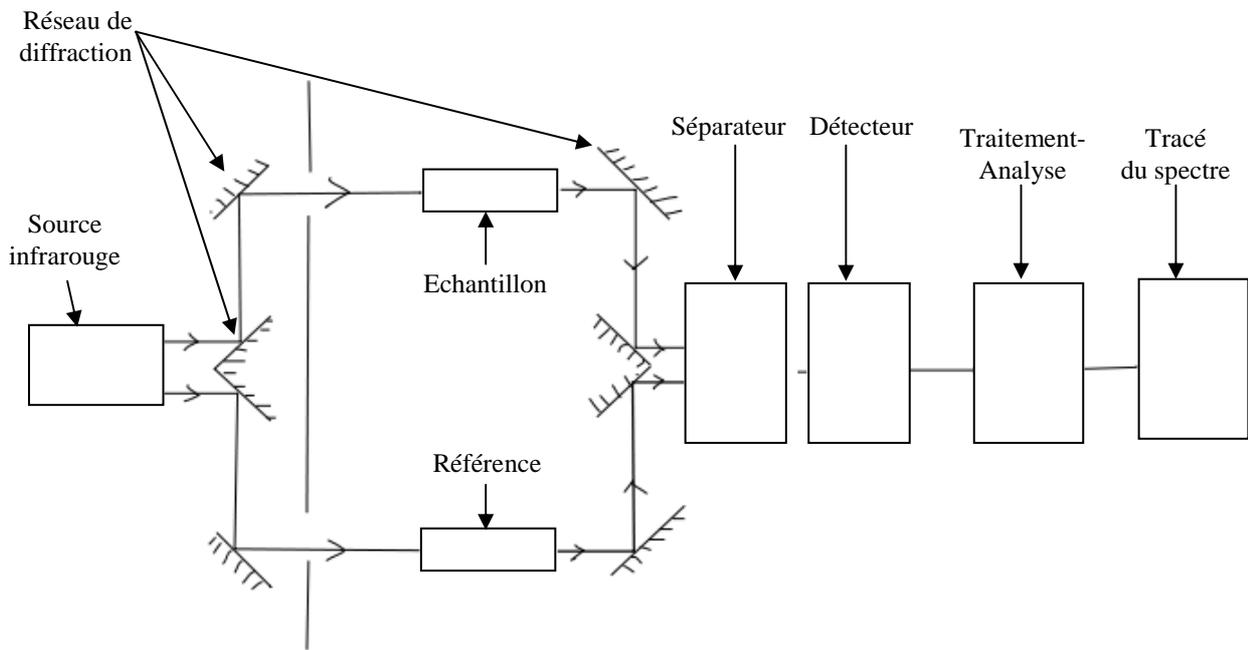
La **figure 20** est la représentation schématique d'un spectromètre infrarouge "classique".

Le principe de fonctionnement d'un tel appareil est qu'un rayon de lumière infrarouge est produit et séparé en deux faisceaux. L'un passe au travers de l'échantillon, l'autre au travers d'une référence qui est parfois le composé dans lequel l'échantillon a été dissous. Les faisceaux sont ensuite réfléchis jusqu'à un détecteur, après être passés par un séparateur qui alterne rapidement les faisceaux entrant dans le détecteur. Les deux signaux sont comparés et le spectre ainsi obtenu tracé.

Les appareils les plus utilisés en spectrométrie IR sont le spectrophotomètre IR à double faisceau et le spectrophotomètre IR à "transformée de Fourier" (FT-IR) (Demirdöven *et al.*, 2004).

## **II – 2 – 3 – 3. Spectrométrie de masse (MS)**

La spectrométrie de masse (MS, *Mass Spectrometry*) ou SM en français, est une technique structurale incontournable pour l'étude de la matière organique. C'est une méthode d'identification structurale des composés organiques qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon



**Figure 20 : schéma d'un spectromètre infrarouge "classique"**

(D'après <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/56/SpectroIR.svg/709px-SpectroIR.svg.png>)

(De Hoffmann, 1996). La MS permet, grâce aux informations recueillies à partir de la fragmentation de la molécule, de déterminer la composition, la structure et la masse moléculaire du composé (Nakanishi et Occolowitz, 1979). Dans le cas des produits nouveaux, des mesures en spectrométrie de masse à haute résolution sont nécessaires afin de confirmer leur formule chimique brute.

Il existe de nombreux types de spectromètres de masse. Tous ont en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur (Bouchonnet *et al.*, 1999). Leur principe de fonctionnement apparaît dans la succession d'étapes auxquelles l'échantillon est soumis.

➤ Introduction de l'échantillon sous forme gazeuse, liquide ou solide, ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire, ...).

➤ Ionisation : l'échantillon porté sous forme de gaz ou de vapeur est ionisé dans la source de l'appareil. Les ions ainsi obtenus sont appelés ions moléculaires. A ce stade, tout composé formé de molécules conduit à un mélange statistique d'ions de fragmentation. Il existe plusieurs types de source d'ionisation en spectrométrie de masse (Bouchonnet *et al.*, 1999).

- L'électrospray ou l'ionisation par électronébulisation (ESI, *ElectroSpray Ionization*). L'électrospray permet de détecter l'ion pseudo-moléculaire, et donc de connaître la masse moléculaire du composé.

- L'ionisation par impact électronique (EI, *Electron Impact ionization*). L'impact électronique provoque une fragmentation forte, impliquant une disparition presque totale de l'ion moléculaire. Par contre, ce procédé permet d'obtenir des informations sur les processus de fragmentation, et donc sur la structure des composés étudiés.

- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

- Le bombardement par atomes rapides (FAB, *Fast Atom Bombardment*).

- La désorption-ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*)

En fonction de la source d'ionisation employée, l'analyse par spectrométrie de masse permet d'obtenir des informations sur le processus de fragmentation d'un composé ou sur sa masse moléculaire.

Les ions de fragmentation sont alors soumis, sous un très bon vide, à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions

permettent de déterminer leur rapport masse/charge, donc éventuellement leur nature. La spectrométrie de masse est fondée sur la mesure directe du rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires ( $m/z$ ), positives ou négatives, d'ions obtenus à partir de la substance à analyser. Ce rapport est exprimé en dalton (1 Da = masse de l'atome d'hydrogène).

➤ Accélération : aussitôt formés, les ions sont extraits de cette partie de l'appareil, focalisés et accélérés par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.

➤ Séparation : les ions sont alors « filtrés » suivant leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) par l'analyseur. Il est possible de combiner presque toutes les techniques d'ionisation avec les analyseurs de masse, mais les plus répandues sont : l'impact électronique avec le quadripôle (Q, *Quadrupole*), l'ionisation à pression atmosphérique avec le quadripôle ou la trappe d'ions (IT, *Ion Trap*) et le MALDI avec l'analyseur de temps de vol (TOF, *Time of Flight*) (March, 1997 ; Bouchonnet, 2001).

➤ Détection : après séparation, les ions terminent leur course en venant frapper le capteur d'un détecteur dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus.

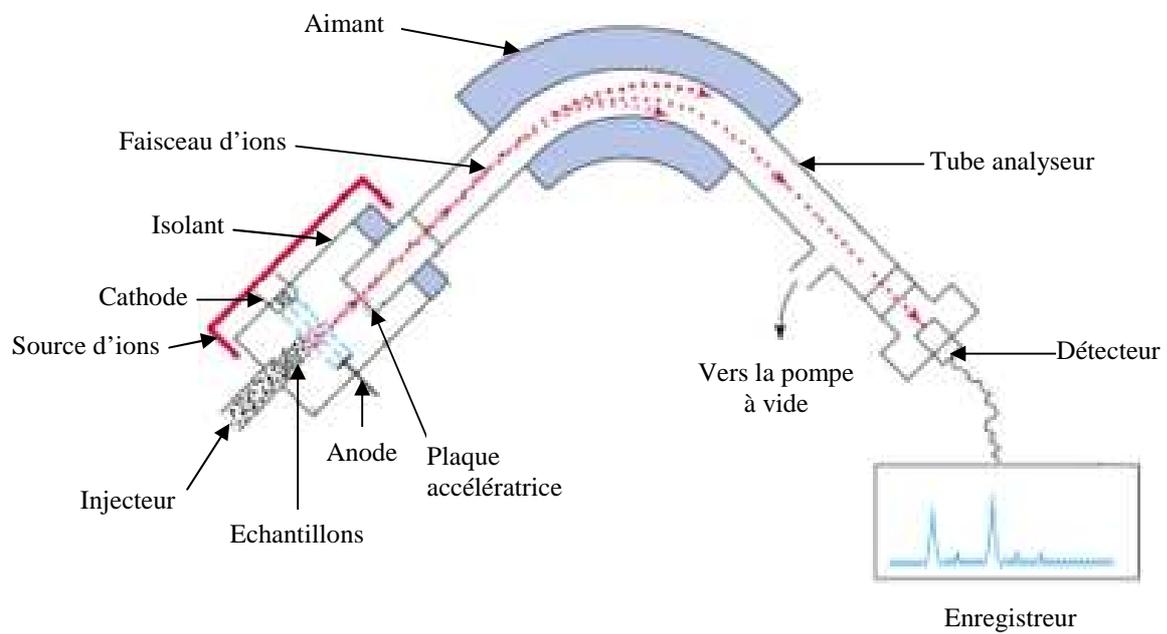
➤ Affichage du spectre de masse issu du traitement du signal envoyé par le détecteur.

La **figure 21** est le schéma d'un spectromètre de masse à secteur magnétique associé à une source d'ionisation d'impact électronique.

Les résultats sont présentés au moyen d'un graphe, appelé spectre de masse, sur lequel figurent les abondances relative des différentes espèces ioniques formés, classés par ordre croissant de leur rapport masse/charge (Vollhardt et Schore, 1994 ; Silverstein *et al.*, 1998). Cela représente en abscisse le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) des ions et en ordonnée leur intensité. En principe le terme  $m/z$  est un symbole (toujours exprimé en italique) et donc une unité. En opérant dans des conditions identiques, la fragmentation est reproductible et, de ce fait, caractéristique du composé étudié (ce dernier est détruit par l'analyse). Le spectre de masse correspond ainsi à un tracé permettant l'identification de la masse des composés moléculaires.

### Remarque

De nos jours, la détection par spectrométrie de masse est généralement utilisée couplée à des techniques de chromatographie liquide (De Graeve *et al.*, 1986 ; Niessen, 2000 ; Cleon et Sevrain, 2002 ; Cleon et D'Angeli, 2005) telles que la chromatographie liquide à haute performance (Norton *et al.*, 2007) ou la chromatographie liquide ultraperformante (Spitsmeister *et al.*, 2010 ; Favreto *et al.*, 2012).



**Figure 21 : schéma d'un spectromètre de masse**

(D'après <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Spectrographe de Masse.png>)

La chromatographie liquide ultra-performante (UPLC) couplée à la spectrométrie de masse combine les avantages de ces deux techniques, à savoir la haute sélectivité et l'efficacité de séparation de la UPLC et une détection puissante et sensible de la MS. A cela s'ajoutent les informations structurales, fournies par la MS, importantes pour l'identification structurale de la molécule (Niessen, 2000). Ainsi l'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution couplée à la UPLC (UPLC/ESI/TOF-MS) permet, grâce à un couplage entre l'électrospray (ESI) et un analyseur de masse de type temps de vol (TOF), de déterminer la formule brute du composé (le TOF est connecté à la sortie du détecteur DAD par une interface de type ESI).

La chromatographie gazeuse (GC) et la spectrométrie de masse (MS) sont également couplées de façon satisfaisante (Hamon *et al.*, 1990 ; Novak et Heinrich, 1993 ; Niessen, 2000). La combinaison de la technique de séparation (GC) avec la technique d'analyse (MS) est désignée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou GC-MS. Dans ce cas, l'échantillon est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse. Mais, sitôt passé en GC, les gaz ionisés sont injectés dans un spectrographe de masse. Le chromatogramme généré discrimine les différents constituants chimiques qui apparaissent sous la forme de pics individuels. On obtient pour chaque pic de GC (au temps de rétention correspondant) un spectre de masse permettant de caractériser le composé obtenu.

## **II – 2 – 3 – 4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

La méthode incontournable pour l'identification de la structure des composés naturels isolés ou de nombreuses molécules chimiques, est la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN ou NMR, en anglais, pour *Nuclear Magnetic Resonance*) (Young, 1975 ; Bria et Watkin, 1997). Utilisée en complément des méthodes de spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, la spectrométrie RMN permet d'établir la formule développée, la stéréochimie et, dans certains cas, la conformation du composé étudié (Günther, 1993 ; Rouessac et Rouessac, 2004).

La RMN est basée essentiellement sur le phénomène de magnétisme et repose sur la propriété qu'ont les noyaux de certains atomes tels que  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$  et  $^{31}\text{P}$  de posséder un moment magnétique nucléaire permanent, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée "le spin" (Canet, 1991 ; Günther, 1993). Placés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent, par rapport à celui-ci, certaines orientations bien définies auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts. Pour une valeur donnée de champ, des transitions entre niveaux

immédiatement contigus sont dues à l'absorption de radiations électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques dans la région des radiofréquences (Vollhardt et Schore, 1994 ; Silverstein *et al.*, 1998).

Les RMN du proton ( $^1\text{H}$ -RMN), du carbone ( $^{13}\text{C}$ -RMN), du phosphore ( $^{31}\text{P}$ -RMN) et du fluor ( $^{19}\text{F}$ -RMN), dont les noyaux sont de spin 1/2, sont le plus souvent étudiées. La faible abondance du  $^{13}\text{C}$  dans la nature (1 % environ) fait que la RMN du carbone est peu sensible. Sont étudiés également le  $^{17}\text{O}$  de spin 5/2 et le  $^{14}\text{N}$  de spin 1.

Pour réaliser une analyse en RMN l'échantillon est préalablement dissout dans un solvant deutéré qui peut être du méthanol, du chloroforme, de la pyridine, etc. Ces solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques. Le tube contenant cet échantillon est alors soumis au champ magnétique (Silverstein *et al.*, 1998). La **figure 22** représente le schéma d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire.

Lorsqu'ils sont soumis au rayonnement électromagnétique (radiofréquence), le plus souvent appliqué sous forme d'impulsions, les noyaux atomiques absorbent l'énergie du rayonnement puis la relâchent lors de la relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Ce phénomène permet l'obtention des spectres utiles à l'élucidation structurale ; le spectre RMN étant un graphe de l'intensité des pics en fonction de leur fréquence d'absorption (Günther, 1993 ; Trahms et Burghoff, 2010).

La technique RMN utilise plusieurs méthodes regroupées en deux grands groupes : la RMN monodimensionnelle et la RMN bidimensionnelle.

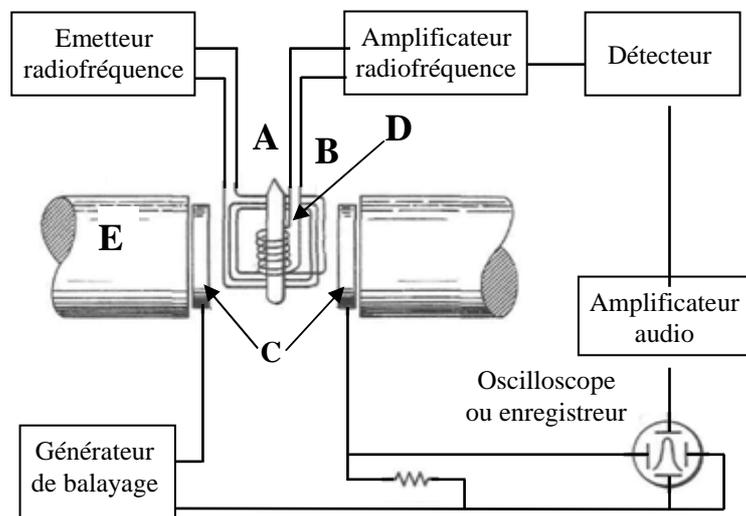
#### ❖ **RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)**

##### • **RMN proton ( $^1\text{H}$ )**

Le spectre RMN du proton est une méthode utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus (McQuarrie, 1988). Il fournit les informations essentielles sur les différents types de protons présents dans la molécule analysée. Par l'intégration des signaux, il est possible de déterminer le nombre d'hydrogène présent dans la molécule. Les signaux, appelés "déplacement chimiques" ( $\delta$ ), sont exprimée en partie par million (ppm) de la valeur du champ magnétique.

##### • **RMN carbone ( $^{13}\text{C}$ ) : DEPT 135° et Jmod**

Dans cette technique, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule (Günther, 1993). L'analyse se base sur les



**Figure 22 : schéma d'un spectromètre RMN (D'après Silverstein et al., 1998)**

- A - Tube échantillon
- B - Bobine d'émission
- C - Bobines de balayage
- D - Bobine de réception
- E - Aimant

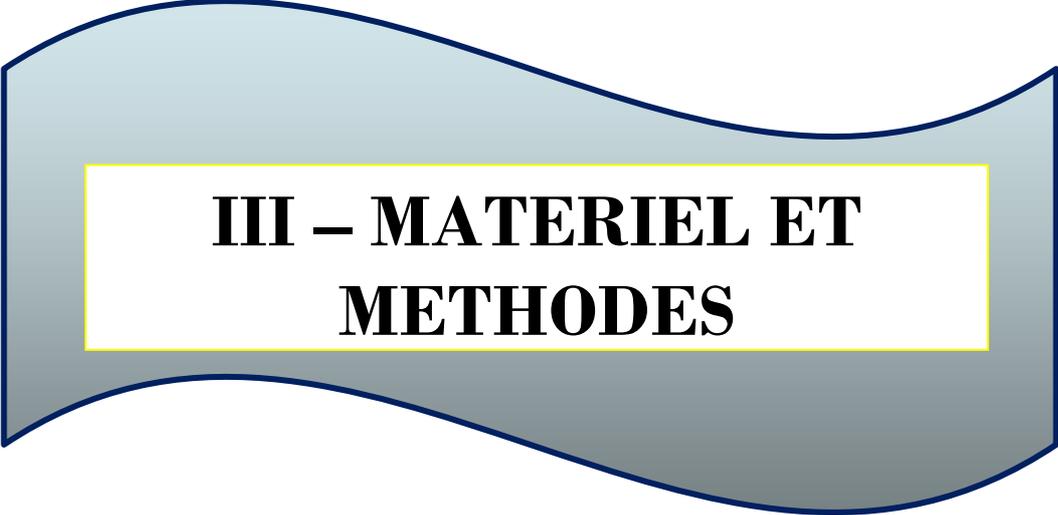
*Le tube est perpendiculaire à l'axe z de l'aimant*

déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires ( $\text{CH}_3$ ), secondaires ( $\text{CH}_2$ ), tertiaire ( $\text{CH}$ ) et, dans une moindre mesure, les carbones quaternaires ( $\text{C}$ ).

La différence majeure entre le DEPT  $135^\circ$  (*Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer*) et le Jmod (*J-modulated spin-echo*), réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le Jmod alors qu'ils ne le sont avec le DEPT.

#### ❖ RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps : le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection (Derome, 1989). Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection : c'est le temps de mixage (Günther, 1993).



**III – MATERIEL ET  
METHODES**

### III – MATERIEL ET METHODES

#### III – 1. Matériel végétal

L'étude a porté sur un extrait de feuilles fraîches de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae).

Cette plante (**figure 23**) a été identifiée et authentifiée par Monsieur AKE-ASSI Laurent, Professeur Emérite de Botanique à l'Université Félix Houphouët-Boigny, sous le numéro d'herbier 21160 du Centre National de Floristique (CNF) de cette Université. L'échantillon a été récolté dans la commune d'Abobo, à Abidjan (Côte d'Ivoire), le 18 juillet 2007.

Le diagramme du **tableau III** donne la classification systématique de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae).

#### III – 1 – 1. Description et répartition géographique

*Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae) est un arbuste de 0,5 à 1 mètre de haut qui possède une tige subérigée, un peu angulée, à deux lignes pubérulentes. Les feuilles sont ovales et oblongues ; les feuilles supérieures sont plus petites avec une base arrondie, parfois oblique. Leurs apex sont longuement acuminés et parfois obliquement mucronulés. La panicule, terminale, est composée d'épis opposés ou de subombelles, entièrement pubérulents. Les fleurs sont brièvement pédicellées. Les loges de l'anthere sont obtuses, presque également fixées, mais inégales. L'ovaire est glabre. Les fruits sont des capsules finement pubérulentes et acuminées et les graines qu'elles contiennent sont lenticulées. La floraison a lieu dans la période de novembre à mai (Fournet, 1978).

*Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae) est présente dans les zones tropicales et subtropicales d'Afrique, de Madagascar, des Antilles et d'Asie. Elle est cultivée, tout comme la majorité des espèces de cette famille, comme plante d'ornement des jardins (Heywood *et al.*, 2007).

#### III – 1 – 2. Usages ethnobotaniques

Les feuilles et les tiges feuillées donnent une tisane de couleur rouge qui aurait, pour les créoles, une action clarificatrice. Cette tisane est prise en cas d'aménorrhée. Elle est aussi réputée abortive (Grenand *et al.*, 1987). La décoction de feuilles de cette plante est utilisée pour lutter contre l'anémie au Congo (Chifundera, 2001), à Madagascar (Moswa *et al.*, 2008) et au Bénin (Tossou *et al.*, 2008). Pour cela, au Bénin, la plante est communément appelée en

*Justicia secunda* (Acanthaceae)



**A**



**B**

**Figure 23 : photographies de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae)**

**A** – Plante

**B** – Rameau feuillet florifère

---

Nom scientifique : *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae)

Synonymes :

- *Rhacodiscus secundus* M. (Vahl) Bremek ;
- *Gonzalea coccocypselum* ;
- *Dianthera secunda*.

Référence : ABO KOUAKOU, in AKE-ASSI, N° 21160, région d'Abidjan, Abobo, 18 juillet 2007 (Centre National de Floristique, Université Félix Houphouët-Boigny).

**Auteur : ABO Kouakou Jean Claude**

**Tableau III : classification systématique de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae)**

Classification Systématique	
Règne	Végétal
Sous-règne	Cormophytes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Scrophulariales
Famille	Acanthaceae
Sous famille	Acanthoidae
Tribu	Ruelliae
Sous tribu	Justiciinae
Genre	<i>Justicia</i> L.
<b>Espèce</b>	<b><i>Justicia secunda</i> M. Vahl</b>

langue fongbé « hounsiman», c'est-à-dire plante qui donne le sang. La décoction de feuilles de *Justicia secunda* est également utilisée en médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire et aux Antilles (Etifier-Chalono, 2005) pour le traitement de l'hypertension artérielle.

### **III – 1 – 3. Préparation d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

Cinquante grammes (50 g) de feuilles fraîches de *Justicia secunda* sont mis dans un litre (1 l) d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant dix minutes (10 min). La décoction obtenue est filtrée trois fois sur du coton hydrophile et sur du papier filtre Wattman n° 1. Le filtrat est séché à l'étuve à 50 °C, puis lyophilisé. La poudre obtenue, de couleur marron, constitue l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse).

La **figure 24** représente le schéma de l'extraction de AJse.

## **III – 2. Matériel biologique**

### **III – 2 – 1. Matériel animal**

Les différentes expériences ont été réalisées sur des Mammifères : souris, rats, cobayes et lapins.

#### **III – 2 – 1 – 1. Les souris**

Des souris blanches, mâles et femelles, *Mus musculus* (Muridae), de souche Swiss, sont utilisées pour l'étude de la toxicité aiguë. Elles pèsent en moyenne  $25 \pm 2$  g.

#### **III – 2 – 1 – 2. Les rats**

Des rats blancs albinos, mâles et femelles, *Rattus norvegicus* (Muridae), de souche Wistar, sont utilisés pour l'étude de l'activité contractile du cœur isolé. Ils pèsent entre 200 et 250 g.

#### **III – 2 – 1 – 3. Les cobayes**

Des cobayes de l'espèce *Cavia porcellus* (Caviidae), pesant entre 300 et 400 g, sont utilisés pour l'étude des contractions toniques de l'artère aorte isolée.

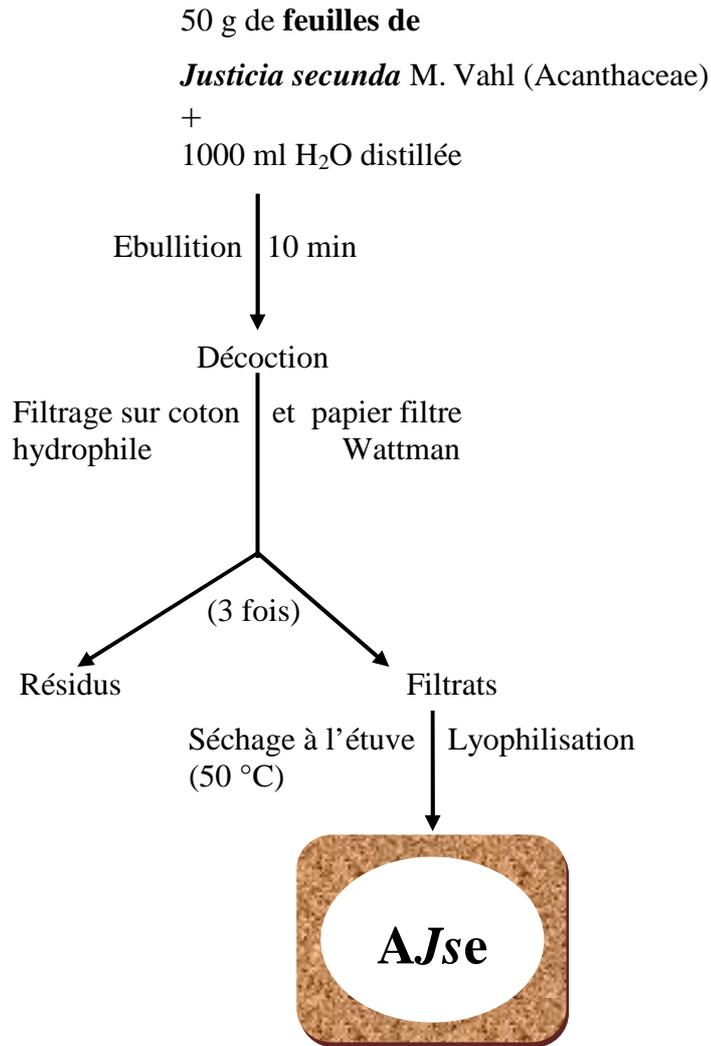


Figure 24 : préparation d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)

### III – 2 – 1 – 4. Les lapins

Des lapins, de l'espèce *Oryctolagus cuniculus* (Leporidae), ont été utilisés pour l'étude de la pression sanguine artérielle et de l'électrocardiogramme. Ils pèsent entre 2 et 2,5 Kg.

#### Remarques

- Les lapins et les cobayes proviennent de différentes fermes d'élevages situées dans la banlieue d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Avant les expérimentations, ces animaux sont acclimatés pendant une semaine à l'animalerie de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny, afin de réguler et d'harmoniser leurs états physiologiques.

- Les rats et les souris proviennent de l'animalerie de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny.

- Dans cette animalerie, les souris, les rats et les lapins sont nourris, *ad libitum*, aux granulés produits par Ivograin (Abidjan) pour l'élevage de rongeurs. Les cobayes y sont nourris au *Panicum maximum* (Poaceae).

- Les procédures d'élevage, d'acclimatation et d'expérimentation ont été menées en conformité avec les lignes directrices pour les soins et l'utilisation des animaux de Laboratoire publiées par l'Institut National de la Santé (NIH, *National Institutes of Health*).

### III – 2 – 2. Sang

Du sang de bœuf est utilisé pour étudier la viscosité sanguine.

Ce sang est prélevé lors de l'abattage de bœufs à l'abattoir municipal de Port-Bouet (Abidjan). Il est rendu incoagulable par ajout d'une solution de NaCl 9 ‰ + EDTA 5 ‰ + héparine 1 ‰.

### III – 2 – 3. Cellules

Trois lignées cellulaires de leucocytes ont été utilisées dans l'étude de la cytotoxicité. Ce sont : des neutrophiles péritonéaux de rats, des neutrophiles humains et des macrophages de souris.

### **III – 3. Techniques d'études**

#### **III – 3 – 1. Etudes toxicologiques**

##### **III – 3 – 1 – 1. Etude de la toxicité aiguë chez la souris**

La toxicité aiguë est la capacité d'un produit chimique d'engendrer des effets nocifs relativement tôt, après l'administration d'une dose d'un produit ou d'une exposition de quatre heures à un produit chimique dans l'air. On définit généralement « relativement tôt » en termes de minutes, d'heures (jusqu'à 24 h) ou de jours (jusqu'à environ deux semaines), mais rarement plus.

##### **III – 3 – 1 – 1 – 1. Echantillonnage**

Des souris pesant entre  $25 \pm 2$  g sont réparties, dans des cages étiquetées, en 10 lots de 10 souris, chaque lot comportant autant de mâles que de femelles. Les tests portent sur un lot témoin et 9 lots traités. Le poids moyen de chaque lot est déterminé.

L'extrait étudié est dilué dans une solution isotonique de NaCl 9 ‰.

L'étude toxicologique est réalisée en injectant par voie intra-péritonéale, dans un premier temps, différentes doses de la substance étudiée aux 9 lots tests de souris. Chaque souris reçoit 0,5 ml d'une dose unique (évaluée en g/kg de poids corporel) de la substance. Chaque souris du lot témoin reçoit également 0,5 ml d'une solution de NaCl 9 ‰ par voie intra-péritonéale. Les taux de mortalité sont déterminés après une période d'observation de 48 heures. Cette première étape permet de déterminer deux doses limites de l'extrait : celles provoquant respectivement 0 % et 100 % de mortalité.

La seconde étape consiste à faire des dilutions intermédiaires entre ces deux concentrations limites, et à injecter 0,5 ml d'une dose unique de la substance à 10 souris dans une autre série de 9 autres lots de 10 souris. Les effets sur le comportement des animaux traités sont observés durant 2 heures et les troubles symptomatiques sont notés. Le nombre de souris mortes est comptabilisé 48 heures après l'administration de la substance.

Chaque étape de cette étude est réalisée trois fois.

##### **III – 3 – 1 – 1 – 2. Détermination de la dose maximale tolérée (DMT) et de la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>)**

La dose maximale tolérée (DMT) ou dose maximale sans effet (en anglais NOAEL, *no observable adverse effect level*) est la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé. Elle est déterminée par une méthode graphique.

La dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>) est la dose de substance causant la mort de 50 % de la population de souris étudiée. Elle est déterminée par une méthode graphique et par une méthode de calcul.

### **III – 3 – 1 – 1 – 2 – 1. Méthode graphique de détermination de la DMT et de la DL<sub>50</sub>**

La méthode utilisée est celle de Miller et Tainter (1944). Dans cette méthode, les pourcentages de souris mortes permettent de tracer la courbe de mortalité en fonction du logarithme de la concentration du produit, exprimée en mg/kg de poids corporel. La courbe est obtenue grâce au programme *GraphPad Prism 5* (Microsoft, San Diego USA).

La DMT correspond à la concentration qui induit 0 % de mortalité et la DL<sub>50</sub> à celle qui induit 50 % de mortalité.

### **III – 3 – 1 – 1 – 2 – 2. Méthode de calcul pour la détermination de la DL<sub>50</sub>**

La méthode de calcul de Dragsted et Lang (1957) est également utilisée pour déterminer la DL<sub>50</sub>. Cette méthode repose sur le postulat suivant :

- tout animal ayant survécu à une dose donnée d'une substance qui lui est administrée, survivrait à toute autre dose inférieure de cette substance ;
- de même, tout animal ayant succombé à une dose donnée d'une substance qui lui est administrée, succomberait également à toute autre dose supérieure.

Ainsi, le pourcentage de mortalité (M %), pour une dose donnée de la substance administrée, est donné par le nombre de spécimens morts (Nm) à cette dose, sur le nombre de spécimens morts plus le nombre de survivants (Nv) :

$$M \% = Nm \times 100 / Nm + Nv$$

Le calcul de la DL<sub>50</sub> selon la méthode de Dragsted et Lang se fait par extrapolation, c'est-à-dire la recherche de la valeur approximative de la dose qui correspond à 50 % de mortalité dans un intervalle (X1-X2).

La formule consacrée est :

$$DL_{50} = [50(X2 - X1) + (X1Y2 - X2Y1)] / [Y2 - Y1]$$

- X1: dose inférieure encadrant la DL<sub>50</sub> ;
- X2 : dose supérieure encadrant la DL<sub>50</sub> ;
- Y1: pourcentage de mortalité correspondant à X1 ;
- Y2 : pourcentage de mortalité correspondant à X2.

### III – 3 – 1 – 2. Etude de la cytotoxicité

Ce test a été réalisé par le Professeur M.C. Recio à l'Université de Valence (Espagne), Faculté de Pharmacie, Département de Pharmacologie.

La cytotoxicité des substances à tester a été évaluée au moyen du test colorimétrique du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium, Sigma Aldrich, France), test développé par Mosmann (1983) et modifié par Denizot et Lang (1986). Ce test colorimétrique du MTT est un test *in vitro* mesurant la croissance globale d'une population cellulaire. Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la capacité des cellules à réduire un composé tétrazolium, le bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium, par les déshydrogénases mitochondriales présentes uniquement dans les cellules vivantes métaboliquement actives, en formazan violet. Le produit absorbe fortement vers 570 nm. Cette absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque. Sous condition contrôlée, l'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

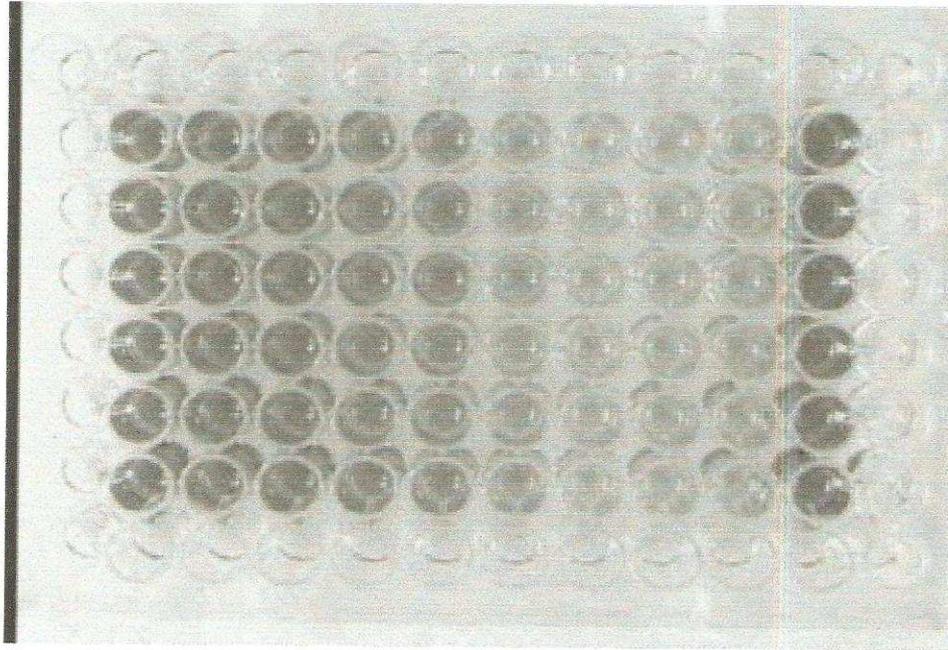
Trois lignées cellulaires de leucocytes sont utilisées dans cette étude : des neutrophiles péritonéaux de rats, des neutrophiles humains ( $10^6$  cellules) et des macrophages de souris RAW 264.7 ( $2.10^5$  cellules). Ces cellules ont été incubées pendant 24 h dans des plaques de 96 puits à fond plat (Costar, Cambridge, USA), avant le traitement avec la substance dont on souhaite mesurer l'effet sur la croissance cellulaire. Elles sont exposées à l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* ou à la substance purifiée à raison de 5  $\mu$ l de différentes concentrations de solution de la substance testée dans les plaques (**figure 25**), à 37 °C, pendant 1-3 heures pour les neutrophiles humains et de rats, et pendant 24 heures pour les macrophages de souris. Ensuite, 100  $\mu$ l d'une solution à 5 mg/ml de MTT sont ajoutés aux plaques, lesquelles sont incubées dans une étuve à 37 °C, en atmosphère humide, 5 % de CO<sub>2</sub> (3-4 heures) jusqu'à ce que des dépôts violets (réduction du MTT en formazan coloré) apparaissent.

Ce métabolite formé par les cellules est par la suite solubilisé dans 100  $\mu$ l de diméthylsulfoxyde (DMSO, Merck, Darmstadt, Allemagne).

Toutes les expériences ont été réalisées en *triplica*.

Les cristaux de formazan dissouts dans du DMSO produisent une solution violette. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie. L'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaque Labsystems Multiskan® MCC/340.

Le nombre de cellules vivantes après l'incubation en présence ou non des composés à tester ou de produit de référence est directement proportionnel à l'intensité de la coloration violette mesurée quantitativement par spectrophotométrie.



**Figure 25 : illustration d'une plaque de 96 puits dans laquelle le test colorimétrique du MTT a été réalisé**

Une diminution de l'absorbance de la solution indique une diminution de la viabilité cellulaire et donc une cytotoxicité du composé testé.

### **III – 3 – 2. Etude de la pression sanguine artérielle**

#### **III – 3 – 2 – 1. Dispositif expérimental**

La pression sanguine artérielle est enregistrée par une méthode dite sanglante à l'aide d'un manomètre à mercure de Ludwig (**figure 26**).

Le manomètre de Ludwig (1) comporte un tube en U comportant deux branches contenant du mercure. Dans la branche de gauche repose, à la surface du mercure, un flotteur surmonté d'une tige métallique au sommet de laquelle est fixé un stylet inscripteur (6). Ce stylet marque le tracé de la pression sanguine artérielle sur un cylindre, recouvert de papier enduit de noir de fumée (7) et entraîné en mouvement rotatif par un moteur (8). La branche de droite du tube en U comporte 2 ouvertures reliées à des cathéters :

- le cathéter supérieur est relié à une seringue (3) et permet de remplir toute la branche droite, au-dessus du mercure, de solution physiologique héparinée et, éventuellement, de créer une surpression dans le manomètre ;

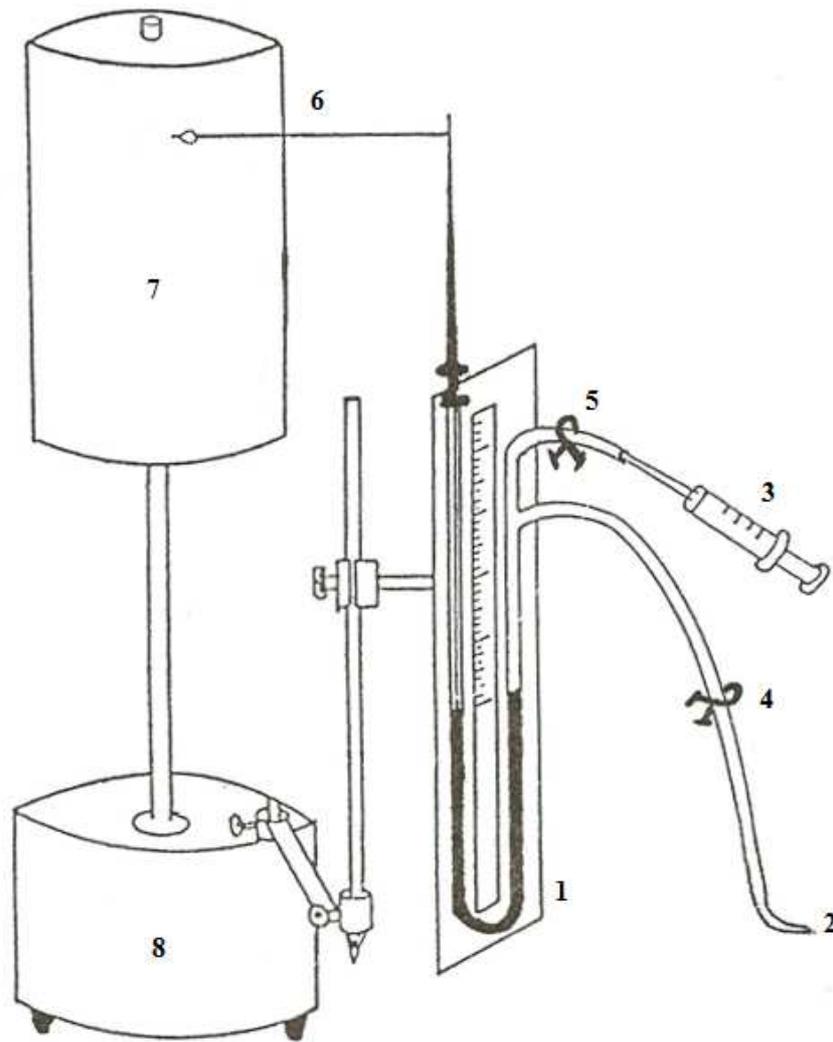
- le second cathéter (2) sert à intuber la carotide dont la pression sera mesurée.

#### **III – 3 – 2 – 2. Technique d'enregistrement de la pression artérielle de lapin**

##### **III – 3 – 2 – 2 – 1. Réalisation de la surpression**

La branche de droite du manomètre de Ludwig est préalablement remplie, au dessus du mercure, avec une solution physiologique héparinée. Pour cela, le tube de polyvinyle (2) est plongé dans un bûcher contenant une solution de Mac Ewen hépariné. Les pinces (4 et 5) sont ouvertes et le liquide est aspiré à l'aide de la seringue (3) jusqu'à ce que la branche droite du tube soit entièrement remplie de solution physiologique héparinée. Ensuite, la pince (4) est fermée et la seringue est relevée (pour ne pas que des bulles d'air retournent dans le manomètre) et la solution physiologique héparinée se trouvant dans la seringue est réinjectée dans le manomètre. On crée ainsi une surpression qui fait remonter le mercure dans l'autre branche du manomètre. La pince (5) est enfin fermée et on enregistre sur le papier enduit de noir de fumée du cylindre (7) le niveau de référence du stylet qui correspond au niveau du mercure de ladite branche gauche sur lequel repose le flotteur.

Après la réalisation de la surpression dans le manomètre, l'on passe à la phase de dissection de l'animal et à l'intubation de sa carotide pour l'enregistrement de sa pression



**Figure 26 : schéma du dispositif d'enregistrement de la pression artérielle**  
 (D'après Laboratoire de Physiologie Animale, Université Félix Houphouët-Boigny, 2010)

- 1 - Manomètre à mercure de Ludwig
- 2 - Canule pour l'intubation de la carotide
- 3 - Seringue permettant de faire la surpression
- 4 et 5 - Pinces
- 6 - Stylet inscripteur de la pression artérielle
- 7 - Cylindre enregistreur
- 8 - Moteur

artérielle ou pression carotidienne, et à l'intubation de sa veine saphène pour l'injection des substances à tester.

### **III – 3 – 2 – 2 – 2. Anesthésie du lapin**

Le lapin est d'abord anesthésié par injection intrapéritonéale d'éthyle carbamate (MERCK, France) dosé à 40 %, à raison de 1 g/kg de poids corporel et placé en décubitus dorsal. On procède ensuite à la dissection.

### **III – 3 – 2 – 2 – 3. Intubation de la veine saphène**

Le lapin anesthésié et placé en décubitus dorsal, sa partie postérieure est tournée sur le côté et la peau est incisée le long de la face externe de la cuisse. La peau est ensuite écartée et un garrot est posé à la racine du membre pour faire saillir la veine saphène qui apparaît, recouverte de tissu conjonctif. Cette gaine de tissu conjonctif est incisée latéralement le long de la veine qui est mise à nu sur environ 2 cm. La veine saphène est ensuite ligaturée en amont et une deuxième ligature est préparée en aval pour fixer le cathéter lorsqu'il sera introduit dans cette veine. Une hémisection est enfin pratiquée sur cette veine pour y introduire et ligaturer le cathéter qui est relié à une seringue contenant une solution physiologique héparinée.

Les substances pharmacodynamiques et pharmacologiques seront injectées au lapin par cette veine saphène à l'aide d'une autre seringue.

### **III – 3 – 2 – 2 – 4. Mise à nu du nerf sympathique**

Un nerf sympathique est dégagé au niveau du cou du lapin anesthésié, et un fil est passé en dessous. Ce fil facilitera la pose, sous le nerf sympathique, des électrodes excitatrices reliées à un stimulateur JEULIN (Réf: 554 035) pour, éventuellement, stimuler électriquement ce nerf.

### **III – 3 – 2 – 2 – 5. Intubation de la carotide**

Elle s'effectue à l'aide de la canule (1) reliée au manomètre de Ludwig et remplie de solution physiologique héparinée.

Les poils du lapin anesthésié sont tondus au niveau du cou et une incision longitudinale d'environ 5 cm y est pratiquée. Pour cela, on coupe soigneusement d'abord la peau le long de la trachée artère, puis différents plans musculaires pour mettre en évidence la trachée artère puis l'une des deux carotides.

Une ligature est ensuite faite en aval, le plus loin possible de la zone de l'hémisection à pratiquer sur la carotide dégagée, pour empêcher le sang de la tête de refluer à ce niveau. La carotide est ensuite pincée en amont à l'aide d'un clamp, du côté du cœur, afin d'empêcher l'arrivée du sang. Un fil est passé sous la carotide pour préparer un nœud entre la ligature et le clamp. Une hémisection est pratiquée sur la carotide et la canule (1), remplie de Mac Ewen hépariné, reliée au manomètre où a été réalisée une surpression, y est introduite en direction du cœur. Cette canule est fortement ligaturée et le clamp de la carotide est enlevé.

### **III – 3 – 2 – 2 – 6. Enregistrement de la pression sanguine artérielle**

Pour l'enregistrement de la pression sanguine carotidienne, le cylindre enregistreur est d'abord mis en marche et le niveau de référence du stylet inscripteur est inscrit sur le papier d'enregistrement enduit de noir de fumée, qui couvre le cylindre (7). La pince (4) est ensuite ouverte et le sang, arrivant du cœur, entre directement en contact avec la solution physiologique héparinée du manomètre. On enregistre alors une chute du stylet inscripteur et le tracé normal des variations de la pression sanguine artérielle moyenne. En fait, toute variation de la pression artérielle au niveau de la carotide intubée est transmise au liquide physiologique de la branche de droite, puis à la branche de gauche du tube en U grâce au mercure. Le flotteur qui repose sur ce mercure subit les mêmes variations qui sont ainsi inscrites, grâce au stylet inscripteur, sur le papier d'enregistrement.

Le tube du manomètre de Ludwig en forme de U ayant une section uniforme, à toute variation de niveau du mercure dans la branche de gauche comportant le stylet inscripteur correspond une variation égale, mais dans le sens contraire, dans l'autre branche. Ainsi, pour déterminer la valeur exacte du tonus de base et des variations de la pression artérielle du lapin, il faudra doubler la hauteur inscrite par rapport au niveau initial.

La dénivellation de la chute initiale du stylet correspond à la pression artérielle moyenne de référence du lapin.

### **III – 3 – 3. Etude de l'électrocardiogramme (ECG)**

#### **III – 3 – 3 – 1. Dispositif expérimental**

L'activité électrique globale du cœur ou électrocardiogramme est enregistrée à l'aide d'un électrocardiographe de marque NIHON KOHDEN CARDIOFAX, model ECG-6851K (**figure 27**). C'est un appareil à une piste d'enregistrement avec 12 dérivations (CARDIETTE AUTORULER 12/1).



**Figure 27 : photographie du cardiographe utilisé pour l'enregistrement de l'électrocardiogramme (ECG)**

(Nihon Kohden, Cardiofax Electrocardiographe, Model ECG-6851K)

(D'après *Laboratoire de Physiologie Animale, Université Félix Houphouët-Boigny, 2010*)

- Charge / Operate : interrupteur de mise en marche / arrêt du cardiographe
- Paper feed : déroulement du papier d'enregistrement
- Paper speed : vitesse de déroulement du papier
- Filter (Hum/EMG): filtres
- Sensitivity : sensibilité
- Reset : remise à zéro
- Auto / Manuel : sélecteur du mode de dérivation automatique / manuel
- Lead selector : sélecteur de la dérivation
- Start / Stop : marche / arrêt de l'enregistrement

### III – 3 – 3 – 2. Technique d'enregistrement de l'ECG de lapin

Le lapin est anesthésié par injection intrapéritonéale d'éthyle carbamate dosé à 40 %, à raison de 1 g/kg de poids corporel et placé en décubitus dorsal.

La veine saphène est intubée (cf. III – 3 – 2 – 2 – 3., page 93) à l'aide d'un cathéter relié à une seringue contenant une solution physiologique héparinée. Les substances à tester seront injectées à l'animal par cette voie.

L'ECG du lapin est enregistré à partir de la dérivation DII des dérivations standards ou bipolaires d'Einthoven (Einthoven, 1912). Cet enregistrement en mode différentiel ou bipolaire nécessite la mise en place de 3 électrodes actives et 1 électrode indifférente sur l'animal. Aussi, le lapin une fois anesthésié, les aisselles des deux membres antérieures et les aines des deux membres postérieurs, destinées à recevoir les électrodes d'enregistrement, sont rasées et nettoyées avec de l'alcool éthylique à 90°. Les 4 électrodes sont enduites d'une pâte électrolytique (Cardio Cream, NIHON KOHDEN CORPORATION, Japon) et fixées aux zones rasées des 4 membres de l'animal, puis reliées aux 4 fiches du câble d'enregistrement connecté à l'électrocardiographe comme suit :

- fiche R (*right*) reliée à l'aisselle du membre supérieur droit ;
- fiche L (*left*) reliée à l'aisselle du membre supérieur gauche ;
- fiche F (*foot*) reliée à l'aine du membre inférieur gauche ;
- fiche N (électrode neutre, "Terre") reliée à l'aine du membre inférieur droit.

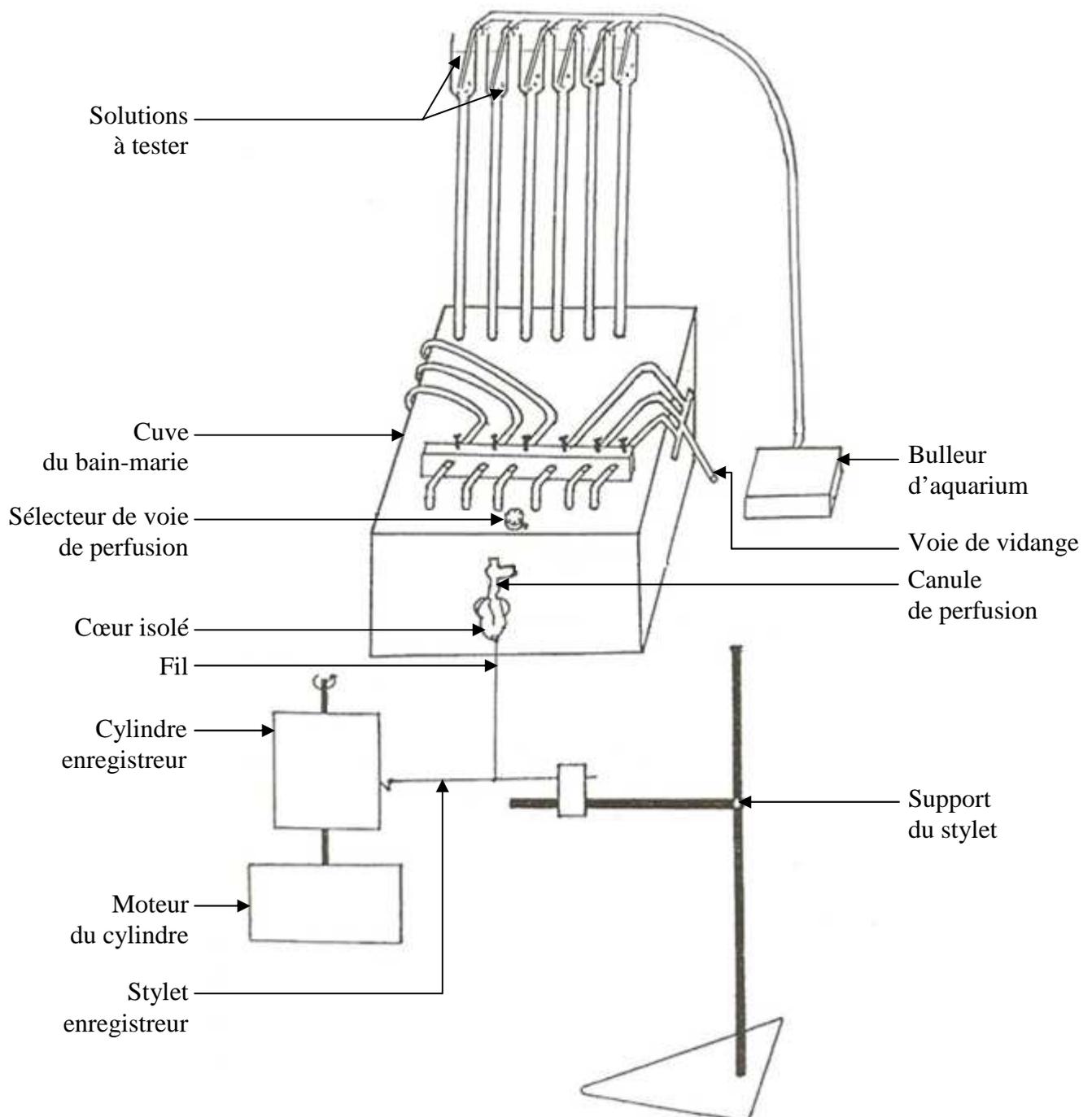
L'enregistrement de l'ECG est effectué sur papier thermosensible (papier pour ECG Colson), animé d'un mouvement rectiligne, à vitesse constante (2,5 mm/s). Pour chaque enregistrement, un calibrage du cardiographe est effectué. Avant l'enregistrement, les différents paramètres de l'appareil (vitesse, filtre et amplification) sont réglés.

### III – 3 – 4. Etude des contractions du cœur isolé

#### III – 3 – 4 – 1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé et perfusé (**figure 28**) dérive de celui de Langendorff (1895). Il comprend :

- un système de perfusion composé d'une cuve en plexiglas qui contient un bain-marie thermostaté avec une canule de perfusion reliée à un robinet à voies multiples qui permet de sélectionner les solutions physiologiques à tester contenues dans des godets ;
- un système d'enregistrement composé d'un stylet en contact avec un cylindre enregistreur qui repose sur un moteur.



**Figure 28 : schéma du dispositif d'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé et perfusé**

*(D'après Laboratoire de Physiologie Animale, Université Félix Houphouët-Boigny, 2010)*

La canule de perfusion est reliée à un robinet à 6 voies. Chaque voie est connectée à 1 godet par l'intermédiaire d'un serpentin qui immerge dans un bain-marie thermostaté à 38 °C. La solution physiologique de référence (Mac Ewen glucosé) et les solutions tests, contenues dans ces godets, sont oxygénées par barbotage d'air en provenance d'un bulleur d'aquarium. Afin de permettre une perfusion du cœur à pression constante, et une perfusion par les artères coronaires, tous les godets sont placés à une hauteur d'environ 50 cm par rapport au niveau de la canule de perfusion.

Avant la perfusion, les différentes voies du robinet sont purgées de façon à chasser toutes les bulles d'air.

Le cœur isolé est fixé à la sortie du dispositif de perfusion et relié par son apex à un stylet. Ce stylet inscripteur, monté en système de levier horizontal fixé sur un support, permet de transcrire les battements cardiaques qui sont enregistrés sur le cylindre enregistreur entraîné en mouvement rotatif, à vitesse constante, par un moteur électrique. Tout le système de levier du stylet enregistreur est fixé sur un support muni de vis micrométriques qui permettent son déplacement vertical et horizontal afin d'assurer un bon contact de ce stylet avec le papier d'enregistrement.

Pour la mesure du débit coronaire, le perfusât est recueilli et le temps de perfusion chronométré. Pour recueillir le perfusât, un entonnoir en verre, porté par un anneau fixé au support muni de vis micrométriques, est disposé en dessous du cœur isolé. En dessous de l'entonnoir se trouvent des tubes à essai pour collecter le perfusât. Un chronomètre mesure le temps de recueillement dans chaque tube à essai.

### **III – 3 – 4 – 2. Techniques d'enregistrement de l'activité mécanique et de mesure du débit coronaire du cœur isolé de rat**

#### **III – 3 – 4 – 2 – 1. Anesthésie de l'animal**

Le rat est anesthésié par injection intrapéritonéale d'éthyle carbamate dosé à 20 %, à raison de 1 g/kg de poids corporel.

#### **III – 3 – 4 – 2 – 2. Isolement du cœur**

Une fois anesthésié, l'animal est placé en décubitus dorsal sur une planchette de contention et placé rapidement sous respiration artificielle. Pour cela, une trachéotomie est pratiquée et la trachée artère est intubée à l'aide d'un cathéter relié à une pompe à air, réglée convenablement, afin d'assurer à l'animal une bonne respiration.

Une thoracotomie médiane est ensuite effectuée et le thorax est maintenu ouvert par des écarteurs. Après avoir dégagé le péricarde, le cœur est mis à nu, ainsi que la crosse aortique et les artères collatérales (trois) qui y prennent naissance, en dilacérant le thymus qui les enrobe. Du fil est passé en dessous de chacun de ces vaisseaux pour préparer des nœuds.

Une hémisection est pratiquée sur la crosse aortique, le plus loin possible du cœur et, une canule, reliée à une seringue préalablement remplie de Mac Ewen héparinée et dépourvue de bulle d'air, y est introduite. La canule et les différentes artères collatérales sont ligaturées, puis la solution physiologique héparinée est injectée dans le cœur afin d'empêcher le sang de coaguler à l'intérieur du myocarde.

Toutes les adhérences du cœur sont enfin sectionnées, ainsi que les vaisseaux, en deçà des ligatures, de façon à l'isoler totalement.

### **III – 3 – 4 – 2 – 3. Enregistrement de l'activité contractile du cœur isolé**

La canule d'intubation rattachée au cœur isolé est reliée au dispositif de perfusion et raccordé dans un premier temps au godet contenant la solution de Mac Ewen de référence. La solution physiologique parvient dans l'aorte sous une pression suffisante (quelques cm Hg), et ainsi, les valvules sigmoïdes se ferment. Le liquide emprunte la circulation des deux artères coronaires et, après les avoir traverser, aboutit dans l'oreillette droite, puis dans le ventricule droit avant d'être déversé à l'extérieur. L'apex du cœur maintenu par une pince serre-fine, est ensuite relié au levier inscripteur du cardiographe par un fil. Le stylet du levier frotte sur un cylindre couvert de papier enduit de noir de fumée, et entraîné en mouvement rotatif par un moteur électrique. Il y inscrit les battements cardiaques.

### **III – 3 – 4 – 2 – 4. Mesure du débit coronaire du cœur isolé**

Avant de perfuser le cœur avec la solution test, le perfusât est recueilli pendant 2 min dans un tube à essai lors de la perfusion du cœur avec la solution de Mac Ewen de référence. Ensuite, lors de la perfusion du cœur avec la solution test, le perfusât est recueilli dans un autre tube à essai. Le prélèvement du perfusât débute lorsque les effets du produit testé apparaissent stables sur les contractions cardiaques. Un chronomètre mesure la durée de ce prélèvement.

Le débit coronaire, calculé par le rapport du volume du perfusât recueilli sur le temps de prélèvement, est exprimé en ml/min.

### **III – 3 – 5. Etude des contractions de l'artère aorte isolée**

#### **III – 3 – 5 – 1. Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental utilisé pour l'enregistrement de l'activité contractile de l'aorte isolée comporte un enregistreur polygraphe RIKADENKI (1), un transducteur (F30 HSE372), un amplificateur de type HUGO SACHS ELECTRONIK (2) et un système de maintien en survie de l'organe isolé (**figure 29**).

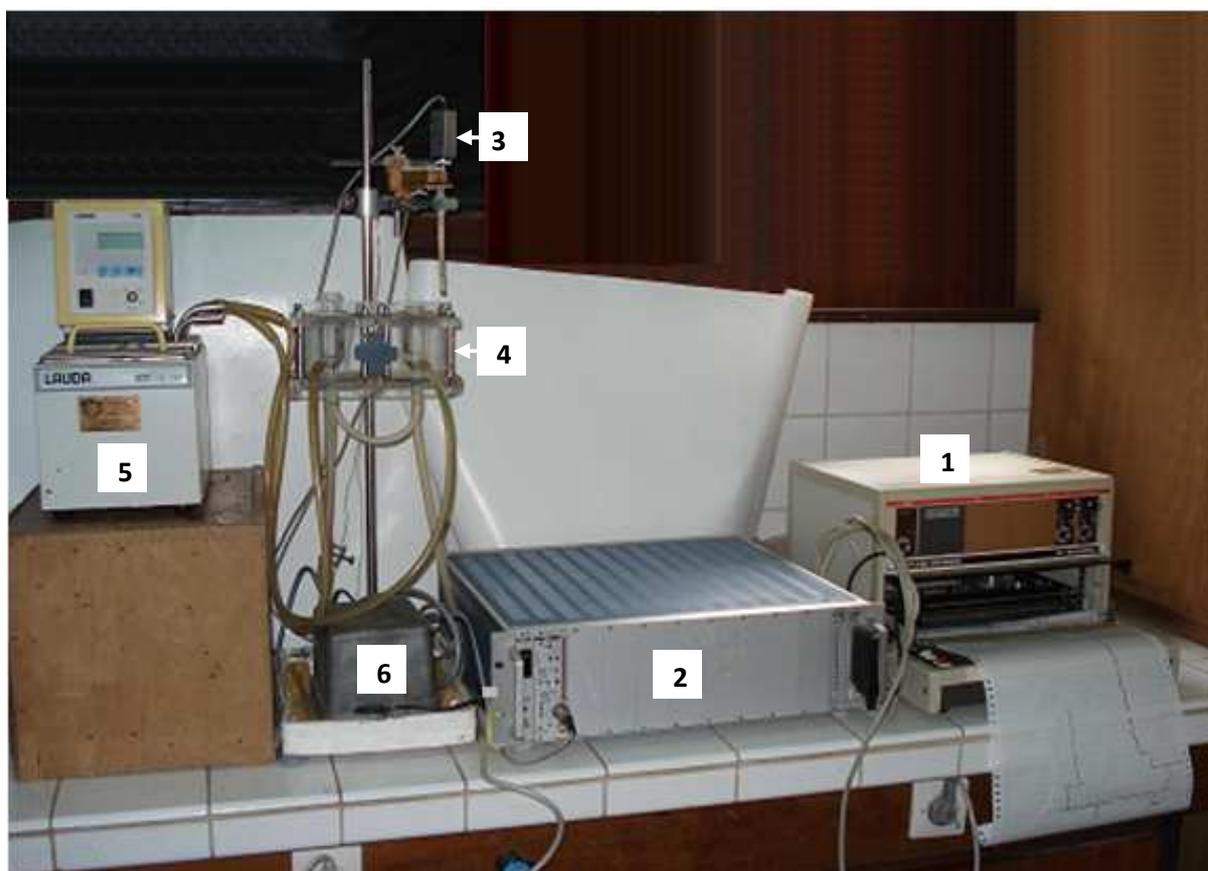
Le transducteur (3), qui transforme le faible mouvement mécanique en variation de potentiel électrique par l'intermédiaire d'une variation d'angle de sa partie mobile, est fixé sur un support muni de vis micrométrique qui permet son déplacement vertical afin de tendre le fil relié à l'organe isolé et assurer une bonne perception des variations de tonus musculaire.

Pour la survie de l'organe, l'on dispose d'un ensemble de deux cuves à organe isolé (4), d'une capacité de 20 ml, qui plongent dans un bain-marie à 38 °C. Ce bain-marie est irrigué en continu en eau bidistillée par un bain circulant thermostaté (LAUDA Ecoline E100) à circulation fermée (5). Un générateur d'air (6) assure l'oxygénation des solutions physiologiques dans les cuves à organe isolé, par l'intermédiaire d'un cathéter en polyvinyle. L'ensemble des cuves est monté sur un support.

#### **III – 3 – 5 – 2. Technique d'enregistrement de l'activité contractile de bandelettes d'artère aorte isolée de cobaye**

Le cobaye est sacrifié par dislocation cervicale et, après une thoracotomie, des fragments de crosse aortique d'environ 3 mm de longueur, dégagés des conjonctives qui l'entourent, sont prélevés et déposés dans une boîte de pétri contenant du Mac Ewen glucosé et oxygéné. Chaque fragment de crosse aortique est fendu longitudinalement puis, après avoir éliminé la graisse, découpé en deux ou trois lambeaux. On obtient des bandelettes d'environ 2 mm de largeur sur 3 mm de longueur, dont chacune des deux extrémités est attachée par du fil, en laissant un nœud ouvert à l'une des extrémités. Ces bandelettes sont maintenues en survie dans l'une des cuves à organe isolé.

Une bandelette d'aorte est montée dans l'autre cuve à organe isolé (fixée à un crochet au fond de la cuve) et est reliée par un fil au support de la jauge de contrainte du transducteur. Ce transducteur est relié à l'amplificateur. Ainsi, l'activité contractile de l'organe est captée par le transducteur, puis amplifiée par l'amplificateur et transmise à l'enregistreur graphique qui transcrit les contractions sur du papier déroulant à vitesse constante (1 mm/s).



**Figure 29 : photographie du dispositif d'enregistrement de l'activité contractile de l'artère aorte isolé**

*(D'après Laboratoire de Nutrition et Pharmacologie, Université Félix Houphouët-Boigny, 2010)*

- 1 - Enregistreur graphique (RIKADENKI)
- 2 - Amplificateur (HUGO SACHS ELECTRONIK)
- 3 - Transducteur (F30 HSE372)
- 4 - Cuves à organe isolé
- 5 - Bain-marie circulant (LAUDA Ecoline E100)
- 6 - Générateur d'air

Pour chaque préparation, un étalonnage du transducteur mécano-électrique est réalisé avec une masse marquée de 1 g. L'amplitude des contractions de l'artère aorte enregistrées, qui traduit la force des contractions, est ainsi exprimée en gramme (g ou gramme force).

La bandelette d'artère aorte, montée dans la cuve contenant du Mac Ewen glucosé, est équilibrée pendant 1 heure, puis précontractée par une solution de KCl, selon la méthode décrite par Naseri *et al.* (2008). Pour cela, une solution de KCl (80 mM) est ajoutée à la solution de survie. Cela entraîne une augmentation du tonus de base, preuve que l'organe étudié est fonctionnel.

Après le lavage de la préparation, les solutions tests sont ajoutées au Mac Ewen glucosé, dans la cuve contenant l'organe isolé.

### **III – 3 – 6. Mesure de la viscosité du sang**

#### **III – 3 – 6 – 1. Dispositif expérimental**

La mesure de la viscosité du sang de bœuf a été réalisée au Laboratoire de Pharmacologie et Physiologie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny à l'aide d'un viscosimètre d'Engler (**figure 30**).

Le viscosimètre d'Engler comprend deux cuves métalliques (réservoir à double paroi) dont la plus petite (1) plonge dans la plus grande (2), contenant de l'eau servant de bain-marie thermostaté à 38 °C. La petite cuve est percée d'un orifice central (2,8 - 2,9 mm d.i.) obturé par un mandrin (3) de bois avant le remplissage.

Un chronomètre de marque KENKO de sensibilité 1/100<sup>ème</sup> de seconde sert à mesurer le temps d'écoulement.

#### **III – 3 – 6 – 2. Technique de mesure de la viscosité du sang de bœuf**

Le principe du viscosimètre d'Engler consiste à mesurer le temps nécessaire pour que s'écoule un volume donné de liquide à travers un orifice percé au centre de la petite cuve de l'appareil. Le constructeur de l'appareil donne la relation entre ce temps d'écoulement et la viscosité du liquide. La mesure se rapporte à celle de deux temps au chronomètre ( $t_0$  et  $t$ ). Connaissant la masse volumique du liquide,  $t/t_0$  est appelé degré Engler (D.E.).

La détermination de la viscosité relative ( $V_R$ ) consiste à calculer le rapport entre le temps d'écoulement ou vitesse d'écoulement d'un volume de sang et celui du même volume d'eau, mesuré à la même température.



**A**



**B**

**Figure 30 : photographies du viscosimètre d'Engler utilisé pour la mesure de la viscosité du sang**

*(D'après Laboratoire de Pharmacologie et Physiologie, Université Félix Houphouët-Boigny, 2010)*

**A** – Vue de face, couvercle fermé

**B** – Vue de haut, couvercle ouvert

1 - Petite cuve métallique

2 - Grande cuve métallique

3 - Mandrin de bois

4 - Couvercle

Ainsi, une quantité connue (100 ml) de liquide à tester (sang de bœuf) est versée dans le réservoir de la petite cuve. Une fiole jaugée (marque Kavalier) spéciale à 2 traits, placée en dessous du viscosimètre, sert à recueillir et à mesurer le volume écoulé. Au temps 0, le mandrin qui obture l'orifice est soulevé et le sang s'écoule. Le temps d'écoulement laminaire est chronométré. Lorsque la quantité de sang affleure 50 ml dans la fiole, le chronomètre est arrêté.

Les tests sont réalisés avec 1 ml d'une solution de l'extrait aqueux de *Justicia secunda* (AJse), à des concentrations variables, mélangée à 99 ml de sang rendu incoagulable (avec NaCl 9 ‰ + EDTA 5 % + héparine). Le témoin est de l'eau distillée à 37 °C.

### **III – 3 – 7. Mise en évidence de quelques composés dans l'extrait**

#### **III – 3 – 7 – 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

##### **III – 3 – 7 – 1 – 1. Méthodes d'analyses par chromatographie sur couche mince**

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des feuilles d'aluminium de 20 x 20 cm recouvertes de gel de silice 60 F<sub>254</sub> d'une épaisseur de 0,2 mm (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Germany), découpées suivant les besoins.

Le solvant de migration, qui est un mélange binaire méthanol-eau (9 : 1 v/v), est introduit (0,5 à 1 cm de hauteur) dans la cuve de migration (Camag, Muttenz, Suisse) quelques minutes avant son utilisation. Les parois de la cuve sont garnies de papier buvard et la cuve est fermée. Cette disposition permet de faciliter sa saturation.

Après avoir coupé la plaque aux dimensions voulues en fonction du nombre de dépôts à faire et des dimensions de la cuve de migration, une ligne est tracée au crayon à papier à 1,5 ou 2 cm du bord inférieur de la plaque et un petit trait marque l'emplacement du dépôt à effectuer.

Les produits à analyser sont solubilisés de préférence dans de l'eau, du méthanol ou un mélange eau-méthanol (1 : 1 v/v). Des volumes de 1 à 5 µl de ces solutions (100 µg pour les extraits et de 10 µg pour les produits purs) sont déposés délicatement, à 1,5 ou 2 cm des bords inférieur et latéraux, à l'aide d'un capillaire. Le dépôt a un diamètre qui ne dépasse pas 5 mm. Lorsqu'il y en a plusieurs, ces dépôts doivent être espacés d'environ 1 cm. Ils sont séchés sous courant d'air ou au sèche-cheveux.

La plaque est introduite délicatement dans la cuve de migration, le plus verticalement possible (cf. **figure 17-A**, revue bibliographique II – 2 – 2 – 1., page 63). La migration se fait sur une distance d'une dizaine de centimètres et la plaque est sortie de la cuve.

Le front de solvant est marqué avec un crayon à papier dès la sortie de la plaque, et celle-ci est séchée. Les taches sont observées et photographiées à la lumière visible ou sous ultraviolets (254 et 366 nm). Elles peuvent être révélées par pulvérisation d'un réactif approprié (Wagner *et al.*, 1984 ; Wagner et Bladt, 2001), puis photographiées.

Le rapport frontal ou facteur de rétention (Rf) caractérise la position de chaque tache (cf. **figure 17-B**, revue bibliographique II – 2 – 2 – 1., page 63).

### **III – 3 – 7 – 1 – 2. Méthodes de révélation**

Conformément à leurs caractéristiques optiques, les substances séparées sont mises en évidence dans le domaine de la lumière visible ou en lumière ultraviolette. La mise en évidence des composés peut également se faire après coloration (révélation) avec un réactif approprié sous forme de pulvérisation ("spray").

Les spots sont révélés par leur coloration propre, sous lumière UV à 366 nm ou à 254 nm (produits fluorescents lorsqu'ils sont excités à cette longueur d'onde) ou encore par pulvérisation ("sprayage") d'un réactif approprié (Wagner *et al.*, 1984 ; Wagner et Bladt, 2001) qui va donner des taches colorées.

### **III – 3 – 7 – 2. Mise en évidence de quelques métabolites secondaires**

L'étude consiste à caractériser les grands groupes de composés chimiques que contiennent les extraits de plantes. Ces classes de métabolites sont, en général, mises en évidence par des réactions caractéristiques, en présence de réactifs « spécifiques » (Wagner *et al.*, 1984 ; Wagner et Bladt, 2001).

Cette étude a été réalisée à partir des méthodes classiques utilisées en chimie des substances naturelles pour la recherche des métabolites secondaires tels que : les stérols et terpènes, les saponosides, les alcaloïdes, les quinones, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les anthocyanes et les glycosides cardiaques.

La mise en évidence des grands groupes chimiques a été réalisée par les réactions en tubes basées sur des réactions différentielles de coloration, de précipitation et d'apparition de mousse, dont les intensités permettent en outre d'avoir une idée sur la concentration en principes actifs. Elles sont adaptées pour des constituants présents en quantité importante et servant de marqueur ou de traceur. Des essais témoins sont réalisés avec des composés connus.

Par la suite, des tests de révélation sur des chromatogrammes de chromatographie sur couche mince (CCM) sont effectués pour confirmer la détection rapide des groupes chimiques, qui satisfont ces critères, par les réactions en tube qui n'ont qu'une valeur indicative. Pour valider le résultat de la révélation, un principe actif donnant une réaction positive (témoin) est déposé sur la même plaque CCM.

### III – 3 – 7 – 2 – 1. Mise en évidence des alcaloïdes

#### ➤ Tests en tubes

La méthode la plus générale pour mettre en évidence les alcaloïdes consiste à les précipiter par les « réactifs généraux des alcaloïdes ». Ces réactions générales de précipitation sont fondées sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à former des complexes insolubles (précipités) avec des métaux lourds (bismuth, mercure, platine, tungstène), et/ou des métalloïdes (iode, iodure ...) sous forme de sels lourds.

Trois réactifs sont en général utilisés pour mettre en évidence la présence d'alcaloïdes. Ce sont le réactif de Bouchardât (AcOH iodo-ioduré), le réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium) et le réactif de Valser-Mayer (mercuri-iodure de potassium).

Dans cette étude, la mise en évidence des alcaloïdes s'est faite par les réactifs de Bouchardât et de Dragendorff. Pour ce faire, 0,5 g d'extrait sont dissouts dans 10 ml d'alcool à 60° ; les alcaloïdes étant solubles dans l'alcool. Dans 2 tubes à essai, 8 ml de la solution alcoolique ainsi obtenue sont repartis et soumis aux deux tests ci-après.

#### ✓ Mise en évidence par le réactif de Bouchardât.

Ce réactif est composé essentiellement de solution iodo-ioduré. Dans le 1<sup>er</sup> tube à essai contenant 4 ml de la solution à étudier, 2 gouttes du réactif de Bouchardât sont ajoutées. L'apparition d'un précipité ou d'une coloration brun-rougeâtre montre une réaction positive, c'est-à-dire la présence des alcaloïdes.

#### ✓ Mise en évidence par le réactif de Dragendorff.

Ce réactif est composé de l'iodobismuthate de potassium. Dans le 2<sup>ème</sup> tube à essai contenant 4 ml de la solution à étudier, 2 gouttes de réactif de Dragendorff sont ajoutées. L'apparition d'un précipité ou d'une coloration orangée indique la présence d'alcaloïdes.

Dans ces deux tests, un essai témoin est réalisé avec de la quinine.

### ➤ **Révélation des chromatogrammes sur couche mince**

Deux tests fondés sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds ou avec l'iode ont été effectués.

#### ✓ **Test de Dragendorff**

Après migration, les spots sont pulvérisés avec le réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium). Ce réactif est préparé à partir de deux solutions A et B. La solution A est obtenue en dissolvant 1,7 g de sous-nitrate de bismuth et 20 g d'acide tartrique dans 80 ml d'eau. La solution B s'obtient par dissolution de 16 g d'iodure de potassium dans 40 ml d'eau.

Au moment de l'emploi, 2,5 ml de la solution A et un même volume de la solution B sont mélangés, puis 10 g d'acide tartrique et 50 ml d'eau y sont ajoutés. La solution obtenue est ensuite pulvérisée.

L'apparition en lumière visible de taches oranges témoigne de la présence d'alcaloïdes.

Un essai témoin est effectué avec la réserpine.

#### ✓ **Test d'iodoplatinate**

La révélation s'effectue avec le réactif d'iodoplatinate de potassium.

Pour préparer ce réactif, dissoudre 0,25 g de tétrachlorure de platine ( $PtCl_4$ ) et 5 g d'iodure de potassium (KI) dans 100 ml d'eau, puis ajouter prudemment 5 ml d'acide chlorhydrique concentré.

Après pulvérisation du réactif, l'apparition d'une coloration bleue à violette marque la présence d'alcaloïdes.

Le témoin utilisé dans ce test est le diphenyldramine.

### **III – 3 – 7 – 2 – 2. Mise en évidence des flavonoïdes**

#### ➤ **Tests en tubes**

Les flavonoïdes sont caractérisés par la réaction à la cyanidine. Le principe est basé sur le fait que les hétérosides flavoniques en solution alcoolique et en présence d'hydrogène naissant donnent des dérivés diversement colorés en fonction de la structure chimique des flavonoïdes. Ainsi, les flavones donnent une coloration orange, les flavonols donnent une coloration rouge et les flavonones donnent une coloration rouge-orangée.

Pour la mise en évidence des flavonoïdes, 5 ml d'alcool chlorhydrique 2 fois dilués sont ajoutés, dans un tube à essai, à 10 mg d'extrait. Le tout est porté au bain-marie à 65 °C pendant 15 min, puis filtré à chaud. 2 à 3 copeaux (rognure) de magnésium sont ajoutés au filtrat alcoolique. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamyl fait apparaître une coloration rouge-orangée ou violacée qui se développe lentement en présence de flavonoïdes.

La coloration est comparée à celle du quercétol standard (0,05 mg/ml) traité avec la même quantité de réactif.

#### ➤ **Révélation des chromatogrammes sur couche mince**

La mise en évidence des flavonoïdes se fait après pulvérisation avec le réactif de NEU (2-aminoéthyl-diphénylborate), NP/PEG (*Natural Products-Polyethylene Glycol*) ou NST/PEG (*Naturstoff-Polyethylenglykol*).

Ce réactif est préparé à partir de deux solutions : une solution méthanolique de diphénylboryloxy-éthylamine (NST, solution I) et une solution éthanolique de polyéthylène glycol à 5 % (PEG, solution II). Pour préparer ces deux solutions, on dissout 1,5 g de diphenylboryloxyéthylamine et 2,5 g de polyéthylène glycol, respectivement dans 50 ml de méthanol et 50 ml d'éthanol. Les deux solutions sont conservées à 4 °C.

La réaction est positive lorsqu'on observe une fluorescence en UV à 365 nm après pulvérisation des deux réactifs.

Le test se déroule suivant les étapes ci-après :

- le chromatogramme est chauffé pendant 10 minutes à 80 °C, puis il est laissé se refroidir ;
- la solution I est ensuite pulvérisée sur ce chromatogramme ;
- après séchage, les taches sont visualisées à la lumière UV (365 nm) et, 15 minutes après, la solution II est pulvérisée sur le chromatogramme.

Une fois les deux solutions pulvérisées, d'intenses fluorescences se produisent, immédiatement ou après 15 minutes, à la lumière UV (365 nm). La solution II (PEG) permet d'augmenter l'intensité de la fluorescence.

Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes oranges, rouges, jaunes, bleues ou vertes (Wagner et Bladt, 2001).

Le témoin utilisé est la rutine.

### III – 3 – 7 – 2 – 3. Mise en évidence des tanins

#### ➤ Tests en tubes

La réaction de Stiasny au formol chlorhydrique permet de distinguer les tanins catéchiques (par précipitation) des tanins galliques (par saturation à l'acétate de sodium).

A 10 mg d'extrait, on ajoute 10 ml de réactif de Stiasny (formol 30 % - HCl concentré, 2 : 1 v/v). Le mélange est porté au Bain Marie à 80 °C pendant 30 minutes, puis refroidi sous un courant d'eau. L'observation de précipités en gros flocons brun-clairs témoigne de la présence de tanins condensés ou tanins catéchiques.

La catéchine sert de témoin.

Après filtration de la solution précédente pour enlever les flocons, le filtrat recueilli est saturé avec de l'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de chlorure ferrique 2 % fait apparaître une coloration bleu-noire intense prouvant la présence de tanins hydrosolubles ou de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

Un essai témoin est réalisé avec l'acide gallique.

#### ➤ Révélation des chromatogrammes sur couche mince

La mise en évidence de tanin catéchique ou tanin condensé est réalisée par pulvérisation du réactif à l'anisaldéhyde sulfurique.

Ce réactif est préparé comme suit :

- 0,5 ml d'anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde) sont mélangés avec 10 ml d'acide acétique glacial ;
- 85 ml de méthanol sont ajoutés à la solution précédente puis mélangés ;
- enfin, 5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés au mélange.

La solution ainsi obtenue est homogénéisée et conservée à 4 °C pendant toute la durée d'utilisation.

Pour le test, environ 10 ml de la solution sont pulvérisés sur le chromatogramme, puis celui-ci est chauffé à 100 °C pendant 10 minutes.

Les taches sont observées en comparant leurs colorations à celle du témoin : la catéchine (rouge-orangée).

### **III – 3 – 7 – 2 – 4. Mise en évidence des polyphénols**

#### **➤ Tests en tubes**

Les polyphénols ont la capacité de former des chélates colorés avec des sels de métaux lourds. Ils sont caractérisés par la réaction au chlorure ferrique. L'appréciation de la coloration met en évidence la formation de complexe avec l'ion ferrique.

Pour la mise en évidence des polyphénols, à 200 mg d'extrait, dans un tube à essai, sont ajoutés un mélange de 2 ml d'eau distillée et 6 ml d'acétone. Ce mélange, placé au bain-marie (60 °C maximum) pendant 5 minutes, est agité de temps en temps, puis filtré à la fin de cette période. Au filtrat sont ajoutées 2 gouttes de solution alcoolique de chlorure ferrique 10 %. L'apparition d'un précipité vert-noirâtre intense indique la présence de composés polyphénoliques.

Un essai témoin est réalisé avec une solution alcoolique d'acide gallique.

#### **➤ Révélation des chromatogrammes sur couche mince**

Le Fast Blue Salt B (3,3'-diméthoxy-biphenyl-4,4'-bis (diazonium-dichloride)) est un réactif utilisé dans la mise en évidence des composés phénoliques. C'est une solution à 0,5 %. Il est préparé en dissolvant 0,5 g de Fast Blue Salt B (FBS B) dans 100 ml d'eau distillée, suivi d'une agitation jusqu'à dissolution totale. La solution est conservée au réfrigérateur.

Pour chaque test, 5 à 8 ml de la solution de Fast Blue Salt B sont pulvérisés sur le chromatogramme. Ce dernier est séché puis observé dans le visible.

Le test est positif lorsqu'on observe une coloration rouge.

Le témoin utilisé est le thymol.

### **III – 3 – 7 – 2 – 5. Mise en évidence des saponosides**

#### **➤ Tests en tubes**

La mise en évidence des saponosides est basée sur leur pouvoir aphrogène, c'est-à-dire la possibilité qu'ont leurs solutions aqueuses de mousser par agitation. La caractérisation des saponosides repose ainsi sur leur propriété physique qui est que les solutions aqueuses qui les contiennent moussent après agitation.

Pour la mise en évidence des saponosides, 1 g de l'extrait est dissout dans 100 ml d'eau distillée puis 10 ml de cette solution aqueuse sont mis dans un tube à essai. Celui-ci est ensuite bouché avec le pouce et agité vigoureusement, en position verticale, pendant environ 15 secondes et laissé au repos pendant 15 minutes. La persistance d'une mousse résiduelle

d'une hauteur supérieure à 1 cm indique la présence des saponosides. On appelle « indice de mousse » l'inverse de la dilution correspondant à ce tube.

Exemple de calcul : on utilise un extrait dilué à 1 %, soit 1 g/100 ml.

Si un tube contenant 1,5 ml de cet extrait à 1 % et 8,5 ml d'eau à une hauteur de mousse de 1 cm après agitation, les 1,5 ml de ce tube contiennent :

$$\begin{array}{ccc} & \nearrow & \nwarrow \\ & \text{concentration} & \text{dilution} \\ & \text{initiale} & \text{dans le tube} \\ & \nearrow & \nwarrow \\ & 1/100 \times \boxed{1,5/10} & = 0,0015 \text{ g d'extrait contenu dans 10 ml ;} \end{array}$$

c'est-à-dire une dilution finale à 0,0015/10. L'indice de mousse est l'inverse de cette dilution, soit :

$$\boxed{\text{Indice de mousse} = 10/0,0015 = 667}$$

#### ➤ Révélation des chromatogrammes sur couche mince

La mise en évidence des saponosides est réalisée par pulvérisation du réactif à la vanilline sulfurique. Environ 10 ml de cette solution sont pulvérisés sur le chromatogramme, puis celui-ci est chauffé à 100 °C pendant 10 minutes. Ce chromatogramme peut-être examiné à la lumière UV (365 nm).

Les taches sont observées en comparant leurs colorations à celle du témoin : l'easine (rose violette).

### III – 3 – 7 – 2 – 6. Mise en évidence des composés quinoniques

#### ➤ Tests en tubes

La mise en évidence des composés quinoniques se fait par la réaction de Borntraeger. Cette réaction est fondée sur le fait que les quinones donnent, sous l'action de lessive alcaline ajoutée en faible quantité (ammoniaque, soude, eau de chaux), une coloration rouge cerise.

Deux (2) ml de la solution à étudier sont évaporés à sec. Le résidu est trituré dans 5 ml d'acide chlorhydrique à 1/5 puis, dans un tube à essai. La solution est portée au bain-marie bouillant à 95 °C pendant 3 minutes. Après un temps de refroidissement sous un écoulement d'eau froide, l'hydrolysate est extrait par 20 ml de chloroforme. Cette phase chloroformique est recueillie dans un tube à essai et 0,5 ml d'ammoniaque (1/2) y est ajouté. L'apparition d'une coloration allant du rouge au violet caractérise la présence de composés quinoniques.

Un test témoin est réalisé avec de la vitamine E.

➤ **Révélation des chromatogrammes sur couche mince**

La mise en évidence des anthraquinones et anthrones est réalisée par pulvérisation du réactif à l'hydroxyde de potassium composé d'une solution éthanolique (5 à 10 %) d'hydroxyde de potassium.

Le chromatogramme est révélé par vaporisation de 10 ml de cette solution de potasse éthanolique. Celui-ci est observé sous lumière UV à 365 nm. Les taches rouges qui apparaissent caractérisent les anthraquinones et celles, jaunes, les anthrones.

Un test témoin est réalisé avec la rhéine.

### **III – 3 – 7 – 2 – 7. Mise en évidence des stérols et polyterpènes**

➤ **Tests en tubes**

Les terpènes et les stérols sont caractérisés par la réaction de Liebermann-Burchard. Ils sont mis en évidence par une coloration mauve (violet pâle) virant au vert, du fait de la transformation de ces composés chromogènes en composés colorés par l'acide sulfurique.

Pour la mise en évidence des terpènes et des stérols, 0,2 g d'extrait sont mis à macérer dans 5 ml d'éther éthylique pendant 30 minutes. Le macéré obtenu est filtré et évaporé à sec. Le résidu est dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique et recueilli dans un tube à essai. 0,5 ml d'acide sulfurique concentré est coulé le long de la paroi du tube à essai. La présence des stérols et polyterpènes est caractérisée par l'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert.

Un essai témoin est réalisé avec une solution chloroformique de cholestérol.

➤ **Révélation des chromatogrammes sur couche mince**

Le réactif de Liebermann Burchard permet la mise en évidence des triterpènes de types oléanane, ursane, lupane ainsi que les stéroïdes.

Trois solvants sont utilisés dans la préparation du réactif et la réalisation de ce test. Il s'agit de l'éthanol, de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique. Pour réaliser ce test, on prépare une première solution composée d'un mélange à volume égal (5 ml) d'acide sulfurique et d'anhydride acétique. A cette solution, on rajoute 50 ml d'éthanol absolu. La préparation est effectuée à froid dans de la glace.

Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100 °C pendant une dizaine de minutes.

Selon le type de composé mis en évidence, on observe des taches de colorations diverses à la lumière UV à 365 nm :

- coloration rouge pour les triterpènes de type oléanane et ursane ;

- coloration jaune-orangée pour les triterpènes de type lupane ;
- coloration jaune ou jaune-vert pour les stéroïdes.

Un essai témoin est réalisé avec du sitostérol.

### **III – 3 – 7 – 2 – 8. Mise en évidence des anthocyanes**

#### **➤ Tests en tubes**

Les anthocyanes, pigments vacuolaires, sont solubles dans l'eau et leur couleur dépend du pH.

Pour la mise en évidence des anthocyanes, une solution aqueuse de l'extrait est préparée en dissolvant 1 g de poudre de cet extrait dans 10 ml d'eau distillée. Cette solution est répartie dans plusieurs séries de tubes à essai (1 ml) et, dans chaque tube, 1 ml de solution tampon phosphate à différents pH (5 à 8) est ajouté. L'observation de variation de couleur en fonction du pH de la solution tamponnée ajoutée indique la présence d'anthocyanes.

Le vin rouge (J. P. CHENET, MERLOT, France, 2009), est utilisé comme témoin.

#### **➤ Révélation des chromatogrammes sur couche mince**

La mise en évidence des anthocyanes par la CCM est réalisée à la suite de l'extraction des anthocyanidines. Pour cela, 1 g de poudre de l'extrait est introduit dans une fiole conique. On y ajoute 10 ml d'eau distillée. Le mélange est extrait 2 fois au n-butanol, qui extrait les anthocyanidines de couleur rouge.

L'observation de la CCM effectuée à partir d'aliquote de la phase butanolique fait apparaître des taches de coloration pourpre ou rouge qui indiquent la présence d'anthocyanidines.

Un test témoin est réalisé avec la cyanidine.

### **III – 3 – 7 – 2 – 9. Mise en évidence des glycosides cardiaques**

#### **➤ Tests en tubes**

La mise en évidence des glycosides cardiaques est réalisée avec le réactif de Kedde qui est composé d'un mélange de 5 ml d'une solution éthanolique (3 %) de 3,5-dinitrobenzoïque et 5 ml de NaOH 2 M.

Pour cette mise en évidence, 1 g de poudre de l'extrait est introduit dans une fiole conique. On y ajoute 10 ml d'alcool à 60° et 5 ml d'une solution d'acétate de plomb à 10 %. Le mélange est porté au bain-marie bouillant pendant 10 min, puis refroidi et filtré sur du coton. Le filtrat est agité dans un tube à essai avec 10 ml de chloroforme et laissé décanter.

La phase chloroformique (inférieure) est récupérée dans un tube à essai et évaporée au bain-marie bouillant jusqu'à obtention d'un résidu sec qui est par la suite repris dans 0,4 ml d'isopropranol. A la solution obtenue, 1 ml de réactif de Kedde est ajouté, puis 2 gouttes de potasse.

La réaction donne une coloration rose ou violette en présence de glycosides cardiaques. Cette réaction colorée est due à la présence du cycle lactonique pentagonal insaturée des cardénolides.

Un essai témoin est réalisé avec la digoxine.

#### ➤ **Révélation des chromatogrammes sur couche mince**

La mise en évidence des glycosides cardiaques par la CCM est réalisée par pulvérisation du réactif de Kedde.

Le chromatogramme est révélé par vaporisation de 5 à 8 ml du réactif de Kedde fraîchement préparé. L'observation de la CCM fait apparaître des taches roses ou violettes qui indiquent la présence de glycosides cardiaques.

Un test témoin est réalisé avec la k-strophanthine.

### **III – 3 – 7 – 3. Mise en évidence par le DPPH de composés antioxydants**

#### **(test antiradicalaire sur le DPPH)**

Pour détecter l'activité antiradicalaire, le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) est utilisé. Le DPPH est un radical stable, de coloration violette en solution. Il présente un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué repose sur la disparition de ce maximum d'absorption lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Cuendet *et al.*, 1997).

Le test est effectué sur plaque CCM, spotée avec 100 µg d'extrait, développée et séchée.

Une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml est vaporisée sur la plaque CCM, faisant apparaître une coloration violette sur toute la plaque. Après un temps de réaction optimal de 30 minutes, les composés à propriété antioxydante (antiradicalaire) sont localisés par l'apparition de zones jaune-blanches (taches décolorées) sur fond violet.

La quercétine (1 µg), un antioxydant de synthèse, très active, est utilisée comme témoin.

### III – 3 – 8. Purification de l'extrait brut : séparation et identification des composés

#### III – 3 – 8 – 1. Extraction liquide-liquide (LLE) de l'extrait aqueux brut

##### de *Justicia secunda*

Dix (10) grammes d'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (*AJse*) sont dissouts dans 500 ml d'eau distillée. 500 ml de chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) sont ajoutés à cette solution aqueuse et le mélange est agité vigoureusement et mis à décanter dans une ampoule à décanter. La phase chloroforme (inférieure) est récupérée et évaporée. Cette opération est reprise deux autres fois avec la phase aqueuse.

500 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt) sont ensuite ajoutés à la phase aqueuse. Le mélange est agité vigoureusement et mis à décanter dans une ampoule à décanter. Cette opération est répétée trois fois. Les phases eau (inférieure) et acétate d'éthyle (supérieure) sont récupérées et évaporées.

La **figure 31** représente le schéma de l'extraction liquide-liquide de *AJse*.

#### III – 3 – 8 – 2. Méthodes chromatographiques

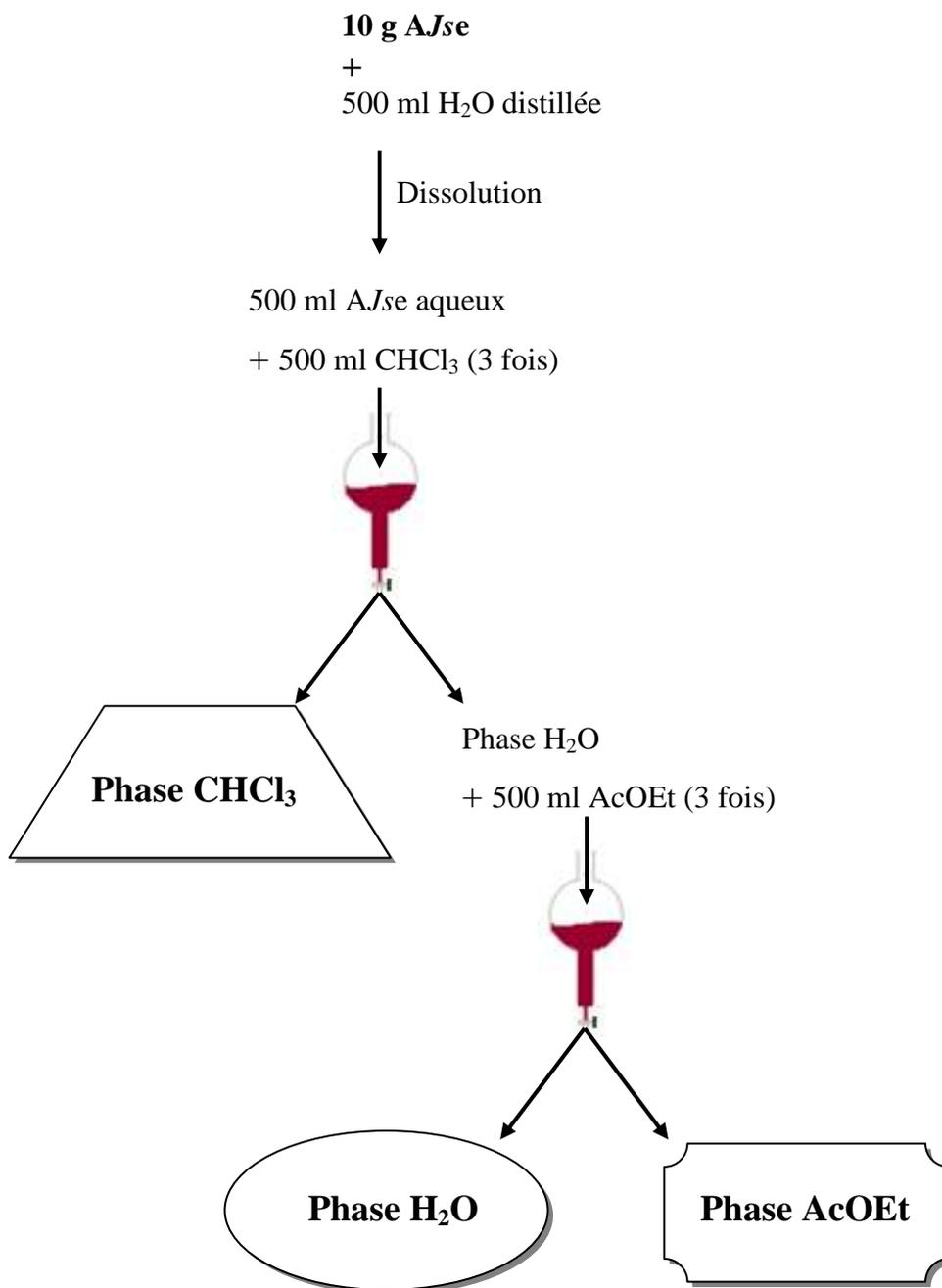
##### III – 3 – 8 – 2 – 1. Chromatographie sur couche mince

Idem à III – 3 – 7 – 1 (matériel et méthodes, page 104).

##### III – 3 – 8 – 2 – 2. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)

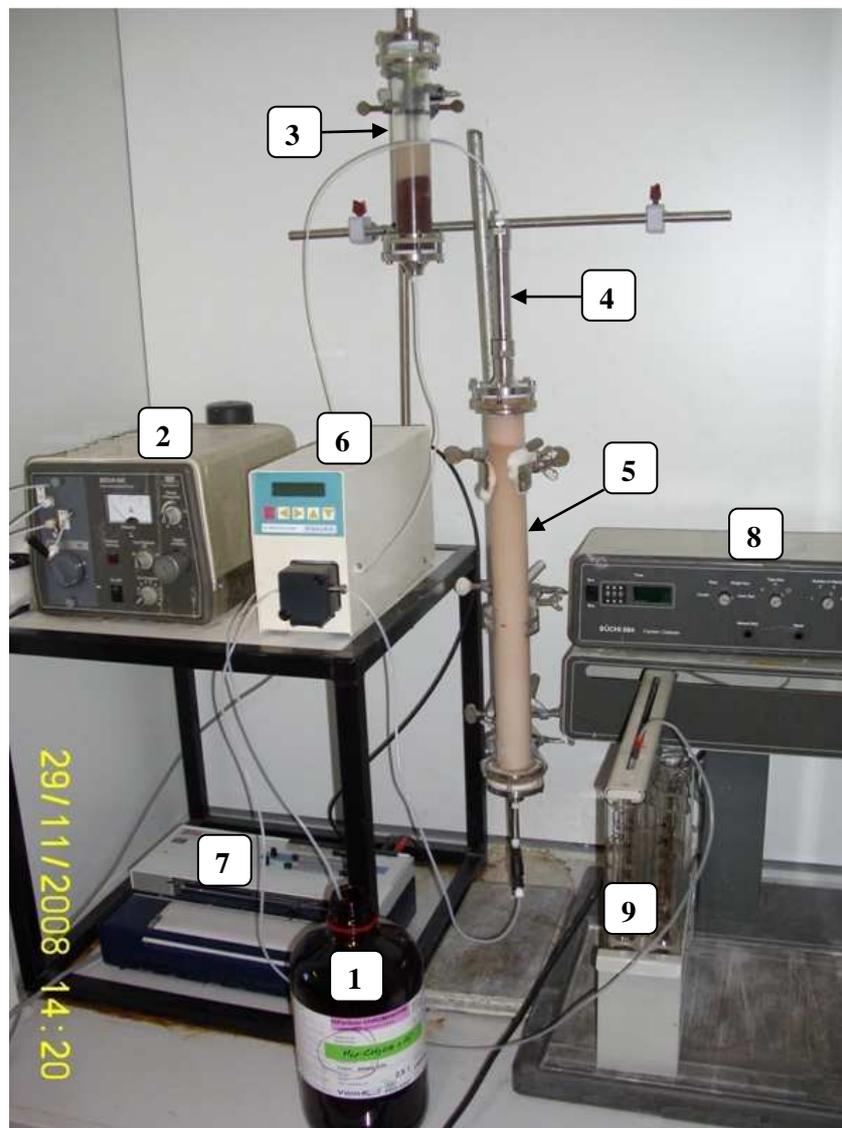
Le système utilisé pour la Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC, *Medium Pressure Liquid Chromatography*) (**figure 32**) est constitué d'une pompe Büchi 684 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse), d'un collecteur de fraction de type ISCO Retriever II® (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse), d'un détecteur à longueur d'onde fixe Büchi 683 (UV Detector Knauer 2001, Berlin, Allemagne), d'un enregistreur Pharmacia LKB 2210 (Bromma, Suède) et d'une colonne de verre à gaine plastique (4 x 45 cm) surmontée d'une pré-colonne de verre à gaine métallique (2 x 4 cm).

La colonne est remplie de phase inverse LiChroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ , Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) suspendue dans l'éluant ( $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$  5 %) et stabilisée pendant quelques heures. L'échantillon (2,5 g), absorbé de phase stationnaire (LiChroprep RP-18) sur 3 fois sa masse, est introduit dans une colonne sèche (3 x 10 cm) et complété avec du sable de Fontainebleau pour remplir le volume mort. Cette colonne est ensuite raccordée au système à moyenne pression, juste avant la pré-colonne.



**Figure 31 : extraction liquide-liquide de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

- AJse : extrait aqueux brut de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae)
- Phase CHCl<sub>3</sub> : phase chloroformique
- Phase AcOEt : phase acétatique
- Phase H<sub>2</sub>O : phase aqueuse



**Figure 32 : photographie du dispositif pour chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)**

*(D'après Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève, 2008)*

- |                            |                             |
|----------------------------|-----------------------------|
| 1 - Solvant (phase mobile) | 6 - Détecteur               |
| 2 - Pompe                  | 7 - Enregistreur            |
| 3 - Colonne sèche          | 8 - Collecteur de fractions |
| 4 - Pré-colonne            | 9 - Tubes collecteurs       |
| 5 - Colonne                |                             |

L'éluant utilisé pour cette chromatographie est un mélange binaire méthanol-eau ( $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ ) + 0,1 % d'acide formique ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ , Fluka, Allemagne). Le gradient de la phase mobile varie de 5 % à 100 %  $\text{CH}_3\text{OH}$  et le changement de phase mobile en cours d'analyse s'effectue manuellement (« gradient par palier », *step gradient*). La pression de travail est comprise entre 15 et 20 bars et le débit est de 20 ml/min.

Des fractions de 140 ml sont collectées à l'aide du collecteur automatique. La détection est effectuée à 254 nm.

Le suivi de la séparation et le rassemblement des fractions ont été effectués sur la base d'analyse par CCM ou par HPLC avant d'éliminer les solvants à l'évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor®, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse).

### **III – 3 – 8 – 2 – 3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)**

La colonne ouverte (cf. **figure 9-A**, revue bibliographique II – 2 – 1 – 2 – 3., page 50) utilisée lors de la chromatographie sur colonne (CC, *Column Chromatography*) est effectuée avec une phase stationnaire de gel de Silice 60 (0,06-0,200 mm, Merck). Cette phase stationnaire est introduite dans la colonne (2,5 x 40 cm), mélangée à la phase mobile ( $\text{H}_2\text{O-CH}_3\text{OH}$  5 %) et laissée stabiliser.

L'échantillon (10 mg), absorbé au préalable avec du gel de Silice sur 3 fois sa masse, est déposé sur le Silica gel 60 dans la colonne, recouvert d'une fine couche de solvant. Le tout est protégé avec une couche de sable de Fontainebleau.

L'éluant utilisé pour cette chromatographie est  $\text{H}_2\text{O-CH}_3\text{OH}$  + 0,1 % d'acide formique (Fluka, Allemagne). Le gradient de la phase mobile varie de 5 % à 100 %  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Le débit est de 2,5 ml/min. Des fractions de 20 ml sont récupérées dans des tubes à essai disposés sur un collecteur de fraction Büchi B-683 (ISCO Retriever II®, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse).

Le suivi des séparations, ainsi que le rassemblement final des fractions sont effectués sur la base d'analyses HPLC ou CCM avant d'éliminer les solvants à l'évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor®, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse).

### **III – 3 – 8 – 2 – 4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) est couplée à la spectrophotométrie ultraviolet/visible (HPLC/DAD-UV). Les analyses HPLC sont réalisées avec un système intégré HP (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) 1090 série II, composé d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur

à réseau de diode (DAD, *Diode Array Detector*) série 1090 pour l'enregistrement des spectres UV/Visible. Cet ensemble est contrôlé par une station Vectra 486/66XM munie d'un programme informatique HPChemstation (**figure 33**).

Les injections des échantillons (10 µg) sont effectuées par un injecteur automatique intégré. Les temps d'analyses sont compris entre 30 et 60 min, et la pression est d'environ 100 à 150 bars.

Pour les analyses, une colonne en phase inverse Symmetry C 18 (5 µm ; 150 x 3,9 mm d.i., eau), précédée d'une pré-colonne, est utilisée. La phase mobile est un mélange binaire méthanol-eau (CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O) contenant 0,1 % d'acide formique (Fluka, Allemagne), à un débit de 1 ml/min.

Le solvant est élué en mode gradient (phase mobile de composition variable en cours d'analyse). Le gradient d'éluion est le suivant :

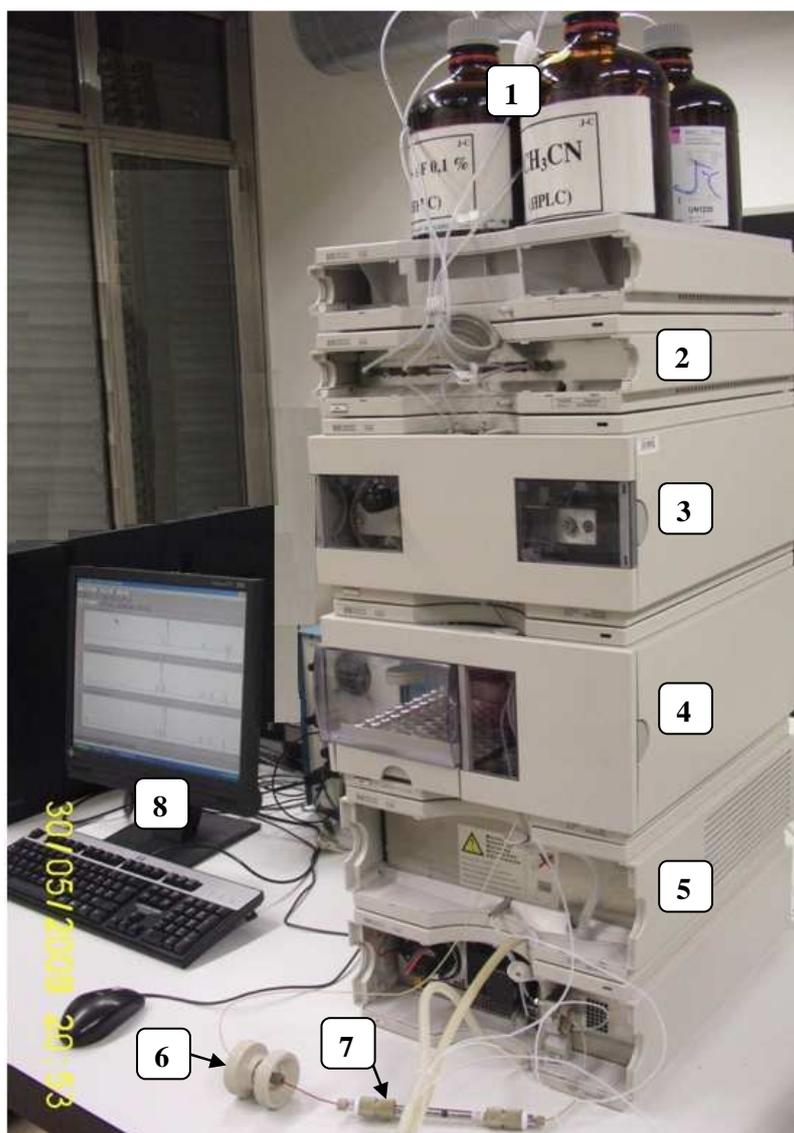
	Temps (min)	% CH <sub>3</sub> OH
1	0,00 à 3,00	2,0
2	3,00 à 33,00	50,0
3	33,00 à 38,00	100,0
4	38,00 à 43,00	100,0
5	43,00 à 43,10	2,0
6	43,10 à 50,00	2,0

### III – 3 – 8 – 2 – 5. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative)

Dans le présent travail, la HPLC semi-préparative est utilisée pour purifier et séparer les fractions précédemment obtenues par MPLC ou par CC.

Les séparations par chromatographie semi-préparative sont réalisées sur un appareil muni d'un détecteur UV LKB 2151 (Bromma, Suède), d'un injecteur 7125 (Rheodyne), d'une pompe à 2 voies Shimadzu LC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan) et d'un enregistreur LKB 2210 (Bromma, Suède). L'ensemble du dispositif (**figure 34**) est contrôlé par le programme HPChemstation.

Pour ces analyses HPLC semi-préparatives, une colonne à compression radiale µBondapak® (phase inverse) de dimension 100 x 25 mm d.i., granulométrie 10 µm (eau, Milford, MA, USA), précédée d'une pré-colonne, est utilisée.



**Figure 33 : photographie du dispositif pour chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique**

*(D'après Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève, 2009)*

1 - Réservoirs de solvants

2 - Système de dégazage

3 - Système de pompes

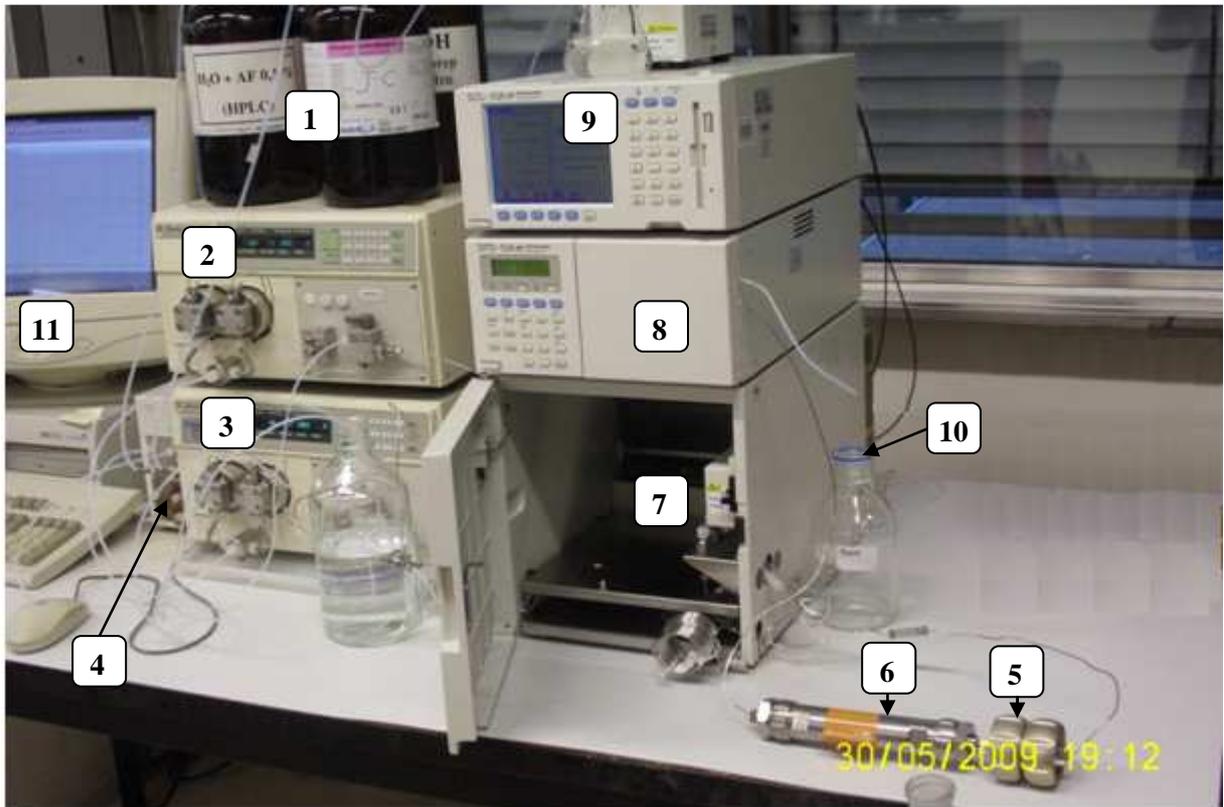
4 - Système d'injection

5 - Détecteur

6 - Pré-colonne

7 - Colonne

8 - Ordinateur



**Figure 34 : photographie du dispositif pour chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative)**

*(D'après Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève, 2009)*

- |                            |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| 1 - Réservoirs de solvants | 7 - Chambre d'injection      |
| 2 et 3 - Pompes            | 8 - Détecteur                |
| 4 - Dégazeur               | 9 - Enregistreur             |
| 5 - Pré-colonne            | 10 - Collecteur de fractions |
| 6 - Colonne                | 11 - Ordinateur              |

Un système de solvant méthanol-eau (CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O), acidifié (+ 0,1 % d'acide formique), est utilisé comme phase mobile, en mode isocratique ou gradient, avec détection à 254 nm. Le débit est de 20 ml/min. Les gradients, variables en fonction de l'extrait injecté (20 µg), sont indiqués en dessous des chromatogrammes correspondants.

La collecte des fractions est réalisée manuellement.

### III – 3 – 8 – 3. Méthodes d'identification

Une fois les composés purifiés, il est nécessaire de les identifier.

Les composés purifiés sont identifiés grâce à la spectrométrie de masse (MS) et à la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

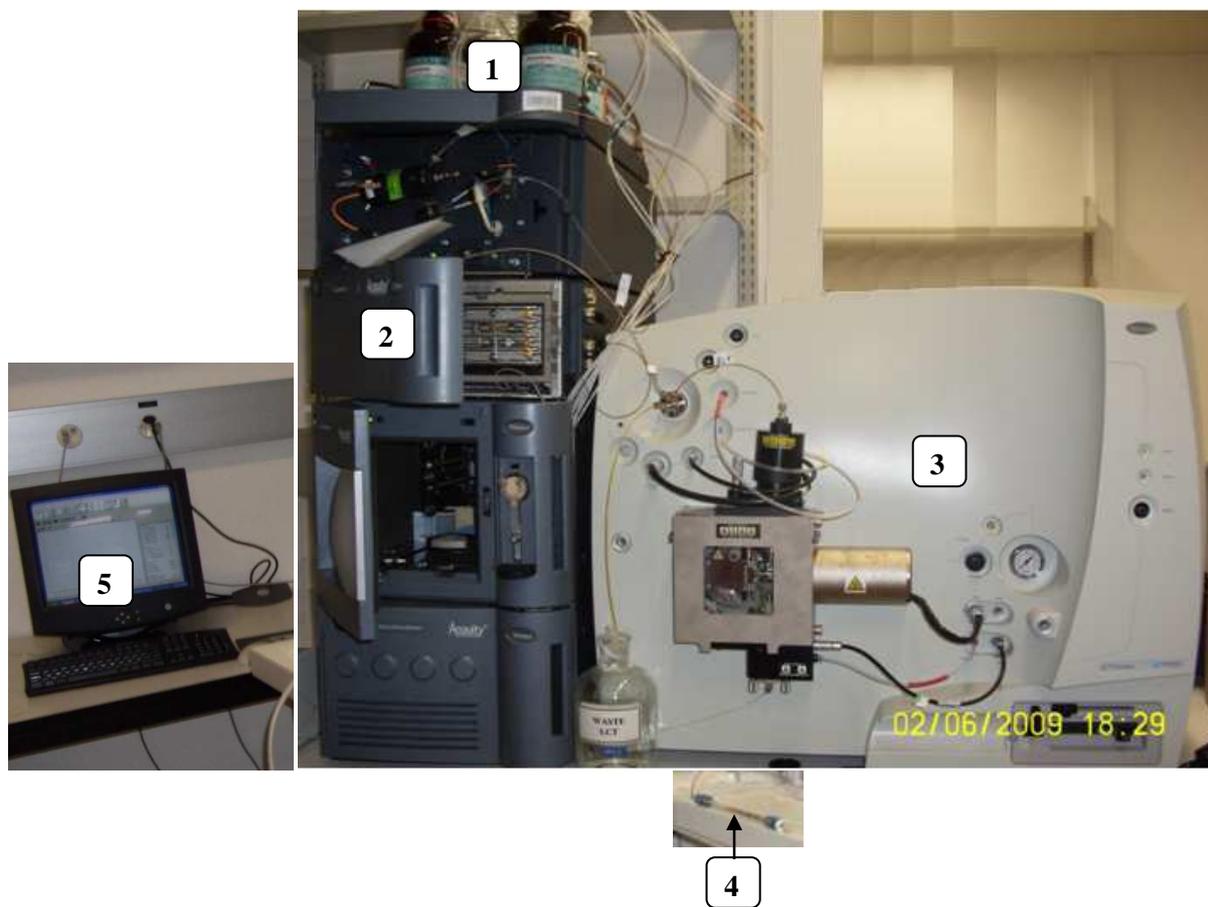
#### III – 3 – 8 – 3 – 1. Chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ESI/TOF-MS)

Dans cette étude, le système de la chromatographie liquide ultra-performante (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) est couplé à la spectrométrie de masse (MS, *Mass Spectrometry*) (**figure 35**). Les extraits analysés par cette technique sont préalablement purifiés.

Ces analyses UPLC/ESI/TOF-MS ont été menées sur l'appareillage constitué des éléments suivants :

- un système UPLC (UPLC®, Waters, Milford, USA), composé des mêmes éléments qu'un système HPLC (cf. III – 3 – 8 – 2 – 4., page 118), ayant le même principe de fonctionnement que ce dernier, mais améliore la séparation et la résolution des pics chromatographiques ;
- un analyseur de masse de type temps de vol (TOF, *Time Of Flight*) (LCT Premier, Micromass®, Waters) connecté à la sortie du détecteur DAD par une interface de type *electrospray* ou ionisation par *electrospray* (ESI, *ElectroSpray Ionization*) ;
- un spectromètre de masse à analyseurs quadripolaires TSQ (*Triple Stage Quadrupole*) 700 Finnigan MAT (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).

Pour les analyses, les solutions d'échantillons (20 µg/ml dans CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O 85 : 15 v/v) sont injectées en quantité de 5 µl. La colonne employée (Acquity UPLC® BEH) possède les caractéristiques suivantes : dimensions 50,0 x 1,0 mm d.i. ; phase stationnaire C18 ; diamètre des particules 1,7 µm ; température 35 °C.



**Figure 35 : photographies du dispositif pour chromatographie liquide ultra-performante ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ESI/TOF-MS)**

*(D'après Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève, 2009)*

- 1 - Réservoirs de solvants
- 2 - UPLC
- 3 - MS
- 4 - Colonne
- 5 - Ordinateur

Le système de solvants employés est CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O + 0.1 % d'acide formique, à un débit de 0,3 ml/min. Le gradient utilisé est le suivant :

	Temps (min)		% CH <sub>3</sub> CN
1	0,00	à 0,22	5,0
2	0,22	à 3,50	95,0
3	3,50	à 3,60	100,0
4	3,60	à 5,00	100,0
5	5,00	à 5,10	5,0
6	5,10	à 6,00	5,0

L'analyseur de masse de type temps de vol (TOF) est connecté à la sortie du détecteur DAD par une interface de type électrospray ou ionisation par électrospray (ESI). L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution permet, grâce à un couplage entre l'ESI et un analyseur TOF, de déterminer la masse avec quatre chiffres après la virgule et la formule brute du composé. Les analyses sont réalisées dans les conditions suivantes : mode négatif ; voltage du capillaire, 2800 V ; voltage du cône, 40 V ; voltage de l'ouverture « 1 », 15 V ; température de désolvatation, 250 °C ; température de la source, 120 °C ; voltage du « *multiple channel plate* » (MCP), 2650 V. La masse de référence est donnée pour une solution de Leucine Enkephaline (Sigma) synthétique, dessiquée à 5 µg/ml dans CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (1 : 1 v/v).

Cette solution est infusée au moyen d'une deuxième pompe (LC-10AD VP Shimadzu®) avec un débit de 30 µl/min et une fréquence de 1/4 *scans*. En mode normal, la masse de référence est la Leucine Enképhaline 213C [M-H]<sup>-</sup> à *m/z* 556.2672. Pour éviter un déplacement des signaux de trop forte intensité, ceux-ci sont référencés par rapport à la Leucine Enkephaline [M-H]<sup>-</sup> (*m/z* 554.2615).

Les spectres de masse obtenus en mode d'ionisation par impact électronique (EI) et D/IC sont enregistrés avec un spectromètre de masse à analyseurs quadripolaires TSQ 700 Finnigan MAT (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).

### III – 3 – 8 – 3 – 2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les mesures de RMN sont effectuées sur spectromètre à impulsions UNITY Inova 500 de Varian (Palo Alto, CA, USA), piloté par le logiciel Solaris VNMR du même fabricant, installé sur une station de travail Sun (**figure 36**).



**Figure 36 : photographie d'une station de travail Sun pour la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

*(D'après Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève, 2008)*

- 1 - Console
- 2 - Aimant supraconducteur
- 3 - Station informatique

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont enregistrés sur un appareil VRX-200 (Varian) à 200 MHz. Le standard interne est le tétraméthylsilane (TMS) et les valeurs de déplacements chimiques  $\delta$  [ppm] sont exprimées par rapport au signal du TMS. Le solvant deutéré utilisé pour la préparation des échantillons est le diméthylsulfoxyde hexadeutééré (DMSO-*d*6).

Le solvant deutéré utilisé pour les mesures RMN est le DMSO-*d*6 (Dr Glaser SA). La température de travail est fixée à 30 °C.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  sont enregistrés à une radiofréquence de 499,87 MHz et les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  à 125,70 MHz. Des mesures complémentaires, dites « bidimensionnelles », sont souvent nécessaires pour mettre en évidence des corrélations homo- et hétéronucléaires entre les atomes de carbone et d'hydrogène au sein des molécules analysées. Il s'agit des expériences suivantes, réalisées grâce à des programmes de séquences d'impulsions fournis par Varian pour le spectromètre cité plus haut : gHMBC (*Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence*), gHSQC (*Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence*), gdcfCOSY (*Gradient Double Quantum Filtered COrrrelation SpectroscopY*), DEPT (*Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer*), gHSQCTOCSY (*Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence TOtal Correlation SpectroscopY*).

### III – 4. Solutions physiologiques et substances chimiques et pharmacologiques utilisées

#### III – 4 – 1. Solutions physiologiques

Le Mac Ewen est la solution physiologique de référence utilisée au cours des expérimentations "*in vivo*" sur les Mammifères et pour maintenir en survie leurs organes isolés ("*in vitro*"). Il est préparé à partir de solutions ioniques mères. Ces solutions mères sont issues de dilutions, dans de l'eau distillée, de produits chimiques cristallisés.

Le **tableau IV** donne la composition et les concentrations des solutions ioniques mères utilisées dans la préparation de la solution physiologique de type Mac Ewen.

Les solutions physiologiques de compositions ioniques modifiées sont préparées comme la solution de Mac Ewen mais en modifiant, au cours de leur préparation, dans la proportion indiquée, la concentration de l'ion concerné.

Le **tableau V** ci-dessous donne la composition de la solution physiologique de type Mac Ewen et des milieux physiologiques de compositions ioniques modifiées.

Le pH de la solution physiologique est ajusté à 7,4 avec du HCl ou du NaOH et du glucose y est ajouté (2 g/l de Mac Ewen) juste avant les expérimentations.

**Tableau IV : solutions mères utilisées dans la préparation du Mac Ewen**

Substance sous forme cristallisée	Poids moléculaire (g/mol)	Concentration pondérale (g/l)	Concentration molaire (mmole/l)
NaCl	58,44	80	1368,93
KCl	74,56	20	268,24
CaCl <sub>2</sub>	110,99	20	180,20
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na	156,01	15	96,15
HCO <sub>3</sub> Na	84,01	40	476,13
MgCl <sub>2</sub>	203,31	10	49,19

**Tableau V : composition de la solution physiologique de type Mac Ewen et des milieux physiologiques de compositions ioniques modifiées pour 1 litre de solution**

Substance en solution mère	Mac Ewen de référence		Solutions physiologiques de compositions ioniques modifiées					
	V	C	HypoCa <sup>2+</sup>	HyperCa <sup>2+</sup>	HypoNa <sup>+</sup>	HyperNa <sup>+</sup>	HypoK <sup>+</sup>	HyperK <sup>+</sup>
	(ml)	(mM)	75 % C (mM)	125 % C (mM)	90 % C (mM)	125 % C (mM)	75 % C (mM)	125 % C (mM)
NaCl	95	<b>130,05</b>	130	130	<b>117</b>	<b>162,5</b>	130	75,63
KCl	21	<b>5,63</b>	5,63	5,63	5,63	5,63	<b>4,23</b>	<b>7,04</b>
CaCl <sub>2</sub>	12	<b>2,16</b>	<b>4,14</b>	<b>6,9</b>	5,52	5,52	5,52	5,52
H <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub> Na	9,5	<b>0,91</b>	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
HCO <sub>3</sub> Na	25	<b>11,90</b>	11,90	11,90	11,90	11,90	11,90	11,90
MgCl <sub>2</sub>	5	<b>0,25</b>	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24

V : volume

C : concentration

La solution physiologique saline (NaCl 9 ‰) est également utilisée pour certaines dilutions.

### **III – 4 – 2. Substances chimiques et pharmacologiques**

Les substances chimiques et pharmacologiques utilisées sont indiquées dans le **tableau VI**. Ce sont des produits de synthèse.

## **II – 5. Traitement des résultats**

### **II – 5 – 1. Enregistrements sur le papier enduit de noir de fumée**

Les enregistrements effectués sur le papier enduit de noir de fumée (pression artérielle et contractions cardiaques) sont fixés avec du vernis cellulosique. Ils sont ensuite scannés et traités à l'ordinateur à l'aide des logiciels *ABBYY FineReader 8.0* et *Paint*, de façon à obtenir des tracés en noir sur fond blanc.

### **II – 5 – 2. Analyses statistiques**

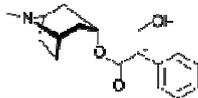
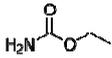
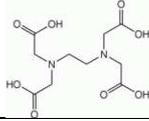
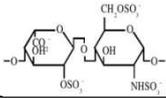
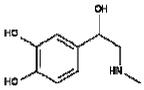
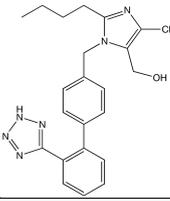
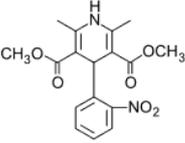
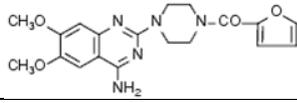
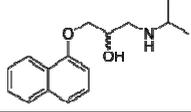
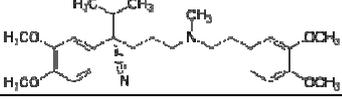
Le programme informatique *GraphPad InStat* (San Diego CA, USA) a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Les valeurs sont données sous forme de moyenne suivie de l'erreur standard sur la moyenne.

La différence entre deux valeurs a été déterminée par le test de comparaison *Student-Newman-Keuls*. Elle est considérée comme non significative (ns) pour une probabilité supérieure à 5 % ( $P > 0,05$ ) ou significative : (\*) pour  $P < 0,05$  ; (\*\*) pour  $P < 0,01$  ; (\*\*\*) pour  $P < 0,001$ .

### **II – 5 – 3. Graphiques**

Le programme informatique *GraphPad Prism 5* (San Diego CA, USA) a permis de tracer les graphiques. Les courbes sigmoïdes sont tracées après transformation des valeurs obtenues. Les valeurs de l'axe des abscisses sont transformées en logarithme décimal.

**Tableau VI : substances chimiques et pharmacologiques utilisées**

Nom scientifique ou chimique	Nom commerciale	Laboratoire d'origine et provenance	Structure chimique	Usage
<b>Atropine</b>	Atropine	SIGMA (USA)		Antagoniste cholinergique
<b>Ethyle carbamate</b>	Ethyle carbamate	MERCK (France)		Anesthésique
<b>Ethylène diamine tétra-acétique acide</b>	EDTA	SIGMA (USA)		Chélatant du Ca <sup>2+</sup>
<b>Héparine sodique</b>	Héparine choay®	Sanofi-aventis (France)		Anticoagulant
<b>L- adrénaline</b>	Adrénaline	FLUKA (Allemagne)		Hypertenseur Vasoconstricteur Cardiotonique
<b>Losartan</b>	Cozaar®	MSD Chibret (USA)		Inhibiteur des récepteurs à l'angiotensine II
<b>Nifédipine</b>	Nifédipine	SIGMA (USA)		Inhibiteur calcique
<b>Prazosine</b>	Alpress LP®	PFIZER (Allemagne)		α <sub>1</sub> -bloquant Vasodilatateur
<b>Propranolol</b>	Propranolol	SIGMA (USA)		β-bloquant
<b>Vérapamil</b>	Vérapamil LP®	MERCK (France)		Inhibiteur calcique



## **IV – RESULTATS**

## IV – RESULTATS

### IV<sub>1</sub> – Première partie :

#### **Etudes toxicologiques, tri phytochimique, effets pharmacologiques et mécanismes d'action sur l'activité cardio-vasculaire de Mammifères d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae)**

La première partie de notre étude consistera à :

- étudier d'abord la toxicité aiguë et la cytotoxicité d'un extrait aqueux brut de feuilles de *Justicia secunda* afin de déterminer les doses limites pour un usage pharmacologiques ;
- vérifier ensuite les propriétés antihypertensives de cet extrait, justifiant l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle ;
- mettre en évidence les grands groupes chimiques contenus dans l'extrait, probablement à l'origine des effets thérapeutiques ;
- enfin, étudier ses effets sur le système cardio-vasculaire de Mammifères et déterminer son mécanisme d'action sur la pression artérielle.

### **IV<sub>1</sub> – 1. Etudes toxicologiques d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

Les études toxicologiques visent à prévoir d'une part la symptomatologie après l'administration de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* "in vivo" à des souris, rechercher les paramètres toxicologiques et la limite de l'innocuité de cet extrait (toxicité aiguë) et, d'autre part, déterminer "in vitro" la viabilité de cellules exposées à AJse (cytotoxicité). Ceci permettra d'apprécier les risques potentiels de l'administration de cette nouvelle substance et de déterminer les niveaux de doses pour les études pharmacologiques ultérieures.

#### **IV<sub>1</sub> – 1 – 1. Toxicité aiguë d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* chez des souris**

Cette étude consiste à déterminer quantitativement et qualitativement les phénomènes nocifs (dommages biologiques graves ou mortels) qui se manifestent chez des souris, pendant une période déterminée, résultant de l'administration d'une dose unique de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*.

Ainsi, AJse, en solution physiologique saline (NaCl 9 ‰), est administré par voie intrapéritonéale à 9 lots de 10 souris chacun, à des doses uniques comprises entre 0,5 et 10 g/kg de poids corporel (P.C.). Un lot témoin de 10 souris reçoit une injection de la solution isotonique de NaCl 9 ‰. Les animaux traités sont mis en observation pendant 2 heures après l'administration de AJse pour relever d'éventuels troubles symptomatiques. 48 heures après l'administration de l'extrait, le nombre de souris mortes par lot est comptabilisé.

#### **IV<sub>1</sub> – 1 – 1 – 1. Comportement des souris après traitement à l'AJse**

L'injection de AJse, à des doses comprises entre 0,5 et 10 mg/kg de poids corporel provoque, de façon générale, dans les 10 premières minutes, un déplacement de la souris en longeant les recoins de la cage et un étirement fréquent de son tronc. Les doses inférieures n'ont pas d'effets sur les animaux.

Pour des doses de supérieures à 2 mg/kg P.C., l'animal se déplace en traînant son train arrière, et ce, durant les 30 premières minutes.

Après cette période, pour les doses non létales, les troubles symptomatiques observés après l'administration de l'extrait s'estompent progressivement. Ainsi, l'animal se déplace de plus en plus normalement, s'abreuve et mange normalement.

Les doses létales entraînent une diminution de la mobilité de la souris qui reste fréquemment immobile, blottie dans les angles de la cage, avec une respiration saccadée. Il s'alimente peu ou pas. Les yeux, le museau et l'extrémité de la queue rougissent légèrement. La mort survient entre 1 heure et 10 heures après l'injection. L'animal meurt sans agitation et reste couché sur le côté.

#### **IV<sub>1</sub> – 1 – 1 – 2. Mortalité des souris traitées en fonction de la dose de AJse**

Une première série de tests sur 9 lots de 10 souris montre que l'injection de doses inférieures ou égale à 0,5 g/kg P.C. provoquent 0 % de mortalité. Celles supérieures ou égales à 10 g/kg de poids corporel provoquent 100 % de mortalité.

Des dilutions sont réalisées dans cette gamme de concentration de AJse (0,5 à 10 g/kg P.C.) et le traitement d'une deuxième série de 9 autres lots de 10 souris induit, en fonction de la dose, la mort ou pas des animaux traités. Le taux de mortalité des souris augmente de manière dose dépendante.

Le **tableau VII** ci-dessous indique le nombre de souris mortes et leur pourcentage en fonction de la dose de AJse injectée, pour une série d'expérience type.

**Tableau VII : nombre de morts et pourcentage de mortalité des souris en fonction de la dose de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) injectée**

<b>Lots</b>	<b>Doses de AJse (g/kg P.C.)</b>	<b>Nombre de souris testées</b>	<b>Nombre de souris mortes</b>	<b>% de morts</b>
1	<b>0 (témoin)</b>	10	0	0
2	<b>0,5</b>	10	0	0
3	<b>0,75</b>	10	1	10
4	<b>1</b>	10	1	10
5	<b>2</b>	10	3	30
6	<b>4</b>	10	4	40
7	<b>5</b>	10	6	60
8	<b>6</b>	10	8	80
9	<b>8</b>	10	9	90
10	<b>10</b>	10	10	100

### **IV<sub>1</sub> – 1 – 1 – 3. Détermination de la dose maximale tolérée (DMT) et de la dose létale 50 % de AJse par la méthode graphique de Miller et Tainter**

Les taux de mortalité, obtenus à la suite de trois (3) séries d'expériences, ont permis de tracer la courbe de la **figure 37** qui donne les moyennes de variation du taux de mortalité des souris en fonction de la dose de AJse injectée. Le tracé obtenu (courbe de Trevan, 1927) est une courbe sigmoïde (**figure 37-a**). Cette courbe dose-réponse est linéarisée (Bliss, 1938) par le tracé de la courbe de la mortalité exprimée en valeur probit en fonction du logarithme de la concentration de AJse (**figure 37-b**). L'équation de la droite obtenue est :

$$Y = 3,65 \text{Log}X + 3,4 \quad \text{où } X \text{ est la concentration de AJse.}$$

Sur la courbe linéarisée, l'on détermine la dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>). Les paramètres toxicologiques déterminés par la méthode graphique de Miller et Tainter (1944) sont les suivants :

- DMT = 117 mg/kg P.C.
- DL<sub>50</sub> = 2 742 mg/kg P.C.

### **IV<sub>1</sub> – 1 – 1 – 4. Détermination de la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>) de AJse par la méthode de calcul de Dragsted et Lang**

La méthode de calcul de Dragsted et Lang (1957) a permis de déterminer, pour 3 séries d'expériences, la dose létale 50 % suivante :

$$DL_{50} = 2\,250 \pm 327 \text{ g/kg P.C.}$$

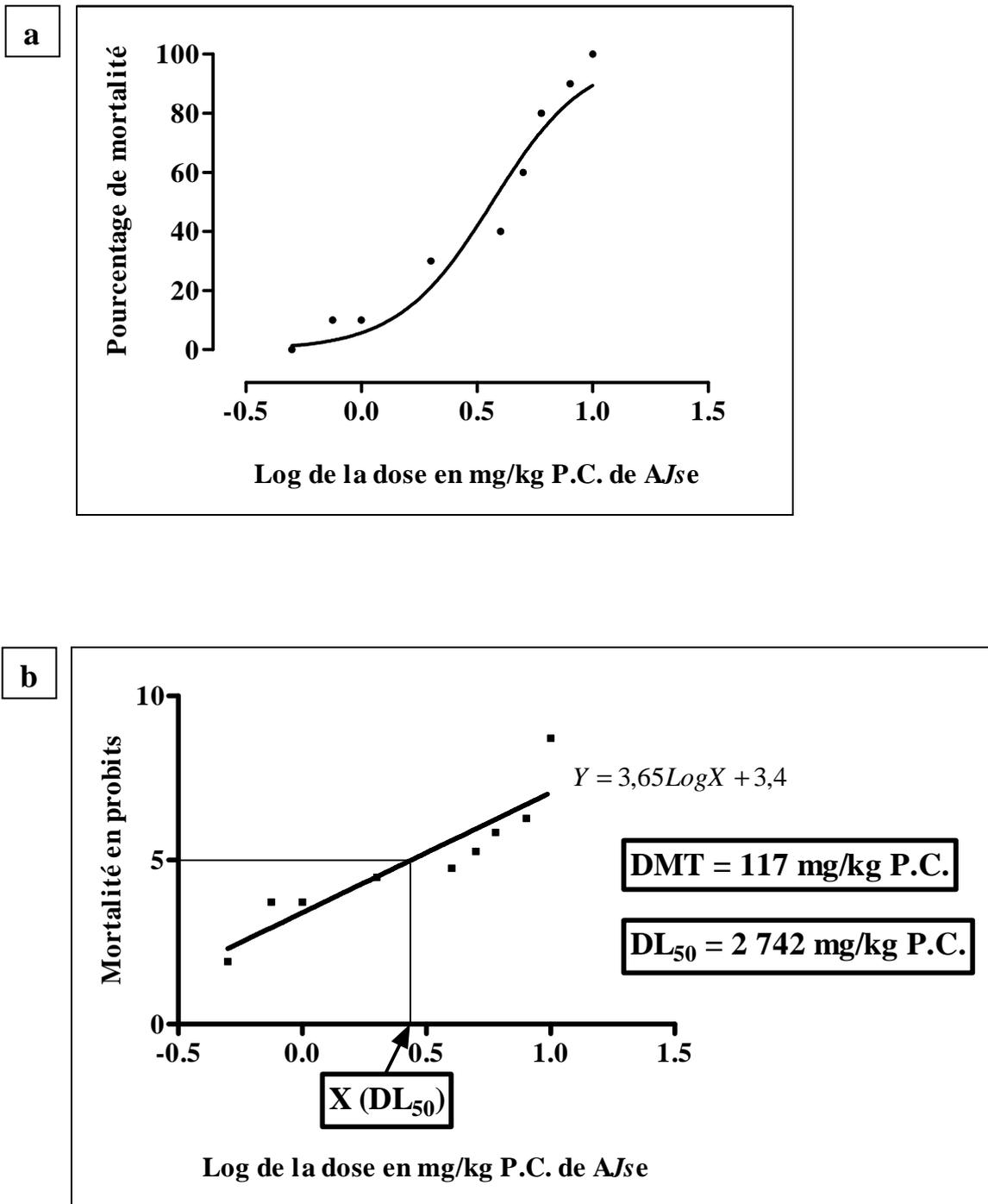
Le **tableau VIII** ci-dessous récapitule les valeurs de DL<sub>50</sub>, obtenues par calcul ou par graphique, et de DMT de AJse.

### **IV<sub>1</sub> – 1 – 2. Cytotoxicité d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda***

Cette étude vise à déterminer la toxicité de AJse au niveau cellulaire.

Pour cela, une étude de cytotoxicité de cet extrait est réalisée sur des neutrophiles péritonéaux de rats, des neutrophiles humains et des macrophages de souris, dans les conditions expérimentales décrites en III – 3 – 1 – 2 (cf. matériel et méthodes).

Il ressort de cette étude que la cytotoxicité de AJse est supérieure ou égale à 6 400 µg/ml et sa DL<sub>50</sub> supérieure ou égale à 10 700 µg/ml.



**Figure 37 : variation de la mortalité des souris en fonction de la dose de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) injectée**

**a – Courbe dose-réponse** (courbe sigmoïde de Trevan, 1927)

**b – Courbe linéarisée** (transformation "probit" de Bliss, 1938)

**Tableau VIII : récapitulatif des valeurs de DL<sub>50</sub> et DMT obtenues**

---

Doses uniques d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* à des souris

<b>DL<sub>50</sub> calculée</b>	<b>DL<sub>50</sub> graphique</b>	<b>DMT graphique</b>
2 250 ± 327 mg/kg P.C. (n = 3)	2 742 mg/kg P.C.	117 mg/kg P.C.

---

### IV<sub>1</sub> – 1 – 3. Discussion

Des expériences pour déterminer la toxicité de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse), ont été réalisées sur des souris (toxicité aiguë) et sur des cellules sanguines humaines et de souris.

✓ Au niveau des souris "in situ"

La toxicité aiguë est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques susceptibles d'être induits après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament (Dragsted et Lang, 1957). Une substance engendrant une toxicité aiguë est donc capable de provoquer un dommage biologique grave ou mortel chez le sujet considéré, peu après une exposition unique ou l'absorption d'une dose. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux, et fournit par ailleurs une indication sur la dose létale 50 %, (DL<sub>50</sub>) avec ses limites de confiance (95 %).

Nos résultats montrent que des doses de 0,5 à 10 g/kg P.C. de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* font apparaître, chez la souris, une diminution de la mobilité. Les doses mortelles induisent, en plus, une diminution de l'activité respiratoire. Ces effets de AJse suggèrent une action probable de cet extrait sur le système de locomotion et le système nerveux.

Des doses de AJse supérieures ou égales à 0,75 g/kg P.C. sont mortelles pour les souris. Dans cette gamme de doses, le taux de mortalité augmente de façon dose dépendante, et 100 % de mortalité sont obtenus pour la dose de 10 g/kg P.C. Cette dose correspond à la dose létale 100 % (DL<sub>100</sub>).

La courbe des pourcentages de souris mortes par lot (mortalité) en fonction du logarithme de la dose de AJse injectée (Trevan, 1927) présente une allure sigmoïde. Ceci, d'une part, confirme que l'effet de AJse est dose-dépendante et, d'autre part, suggère que son activité pourrait passer par l'activation de récepteurs (Miller et Tainter, 1944).

L'étude de la toxicité aiguë permet aussi d'exprimer la dose qui tue 50 % des animaux d'expérience (DL<sub>50</sub>) ainsi que la dose maximale sans effet toxique ou dose maximale tolérée (DMT), c'est à dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au lot témoin.

La méthode graphique de Miller et Tainter (1944) a permis de déterminer pour AJse la DMT de 117 mg/kg p.c. et la DL<sub>50</sub> de 2 742 mg/kg P.C.

La méthode de calcul de Dragsted et Lang (1957) a permis de déterminer pour cet extrait une DL<sub>50</sub> de 2 250 ± 327 mg/kg P.C.

Les valeurs des  $DL_{50}$  de *AJse*, déterminées selon les deux méthodes : graphique (2 742 mg/kg P.C.) et par calcul ( $2\,250 \pm 327$  mg/kg P.C.) sont assez proches (différence non significative,  $P > 0,05$ ). Cela indique que les résultats sont concordants et que les méthodes utilisées sont crédibles.

La  $DL_{50}$ , indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance, permet de mesurer le potentiel toxique, à court terme (toxicité aiguë), d'une substance.

Selon les travaux de Diezi (1989), la valeur de la  $DL_{50}$  permet une classification de la substance en fonction de son degré de toxicité.

Pour cet auteur, les substances dont les  $DL_{50}$  sont :

- supérieures à 5 000 mg/kg P.C., sont dites non toxiques ;
- comprises entre 5 000 mg/kg P.C. et 500 mg/kg P.C., sont rangées dans la gamme des substances peu ou faiblement toxiques ;
- comprises entre 500 mg/kg P.C. et 50 mg/kg P.C., sont des substances toxiques ;
- comprises entre 50 mg/kg P.C. et 5 mg/kg P.C., sont des substances très toxiques ;
- inférieures à 5 mg/kg P.C., sont classées dans la gamme des substances extrêmement toxiques.

Selon cette classification, *AJse*, avec une  $DL_{50}$  de 2 250 mg/kg P.C., est peu ou faiblement toxique. En conséquence, cette drogue a une forte tolérance à l'égard des souris.

Le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) de cet extrait est inférieur à ceux de certains extraits de plantes telles que *Securidaca longepedunculata* (Polygalaceae), *Swartzia madagascariensis* (Caesalpiniaceae), *Tamarindus indica* (Caesalpiniaceae) et *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) qui sont aussi utilisées en médecine traditionnelle. En effet, l'extrait aqueux de feuilles de *Securidaca longepedunculata* (Kone, 1980), l'extrait aqueux des écorces de racines de *Swartzia madagascariensis* (Traore *et al.*, 2002), l'extrait aqueux des écorces de tiges de *Tamarindus indica* (Souza, 2005) et la fraction active F2 de l'extrait aqueux des feuilles de *Bidens pilosa* (Kouakou, 2008) ont des  $DL_{50}$  respectives de 64 mg/kg P.C. ; 5,99 mg/kg P.C. ; 377 mg/kg P.C. et 429,14 mg/kg P.C. Ce sont donc des substances toxiques.

L'étude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur des souris ayant montré que cet extrait est peu ou faiblement toxique, cette substance pourrait donc être préconisée en pharmacologie.

✓ Au niveau cellulaire

Pour déterminer les doses de *AJse* tolérables au niveau cellulaire, une étude de la cytotoxicité de cet extrait a été réalisée en utilisant le test du MTT. Ce test est un indicateur de

l'intégrité et de l'activité mitochondriale assimilable à une mesure de la vitalité cellulaire (Gerlier et Thomasset, 1986). Il permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaires.

En fait, ce test est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale des cellules viables : la succinate déshydrogénase. En présence du substrat MTT (bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium), les sels de tétrazolium du substrat sont transformés en cristaux insolubles de formazan grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase (Mosmann, 1983 ; Gerlier et Thomasset, 1986 ; Monner, 1988). Le MTT est un colorant jaune qui est oxydé par le succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de formazan de couleur bleue. Il s'agit d'une réduction mitochondriale du MTT, par les cellules vivantes, en un composé cristallin bleu (Ho *et al.*, 1990 ; Skehan *et al.*, 1990). La quantité de sel formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée, après dissolution des cristaux, par spectrophotométrie. L'absorbance, c'est-à-dire l'intensité de la coloration mesurée, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes et à leur activité métabolique lors du test, et donc leur viabilité (Mossman, 1983).

L'étude de la cytotoxicité de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, réalisée par le test du MTT, a porté sur trois lignées cellulaires de leucocytes : neutrophiles péritonéaux de rats, neutrophiles humains et macrophages de souris.

Les résultats montrent que la cytotoxicité de *AJse* est supérieure ou égale à 6 400 µg/ml. La DL<sub>50</sub> ou CL<sub>50</sub> (concentration létale 50 %) de cet extrait est supérieure ou égale à 10 700 µg/ml. Cette valeur de cytotoxicité donne une estimation des concentrations tolérables par les cellules en présence de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*.

Cantillo *et al.*, (2007), en étudiant l'activité hématolytique d'un extrait hydro-méthanolique (1 : 8 v/v) de *Justicia secunda*, a déterminé une CL<sub>50</sub> supérieure à 1 000 µg/ml. L'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* est moins toxique qu'un extrait hydro-alcoolique de cette plante dont l'usage en pharmacologie est recommandé par Cantillo *et al.*, (2007).

Ainsi *AJse* paraît approprié pour une utilisation thérapeutique et son usage en phytothérapie pour le traitement de certaines affections peut être conseillé.

L'étude des effets pharmacologiques de cet extrait peut donc être envisagée.

En effet, après avoir mis en évidence que l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* est peu ou faiblement toxique, et défini ses concentrations tolérables "*in vivo*" sur des souris (DMT = 117 mg/kg P.C.) et "*in vitro*" sur des cellules (cytotoxicité  $\geq$  6 400 µg/ml),

il convient de vérifier les propriétés antihypertensives de cette plante qui ont été révélées par la médecine traditionnelle. Ceci se fera par l'étude des effets pharmacologiques de cet extrait sur la pression sanguine artérielle et sur l'hypertension artérielle.

## **IV<sub>1</sub> – 2. Effets pharmacologiques d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) sur la pression sanguine artérielle normale et sur l'hypertension artérielle induite chez le lapin**

### **IV<sub>1</sub> – 2 – 1. Effets dose-réponse de AJse sur la pression artérielle normale de lapin**

L'objectif de cette expérimentation est d'étudier les effets, sur la pression artérielle moyenne de lapin, de l'administration par voie intraveineuse de doses croissantes de AJse, inférieures à la dose maximale tolérée déterminée chez la souris (DMT = 117 mg/kg P.C.).

Ainsi, une fois la pression artérielle moyenne enregistrée et stabilisée, des doses croissantes de AJse (< 117 mg/kg P.C.) sont injectées aux animaux, dans des intervalles de temps de 15 minutes après l'effet de chaque dose administrée.

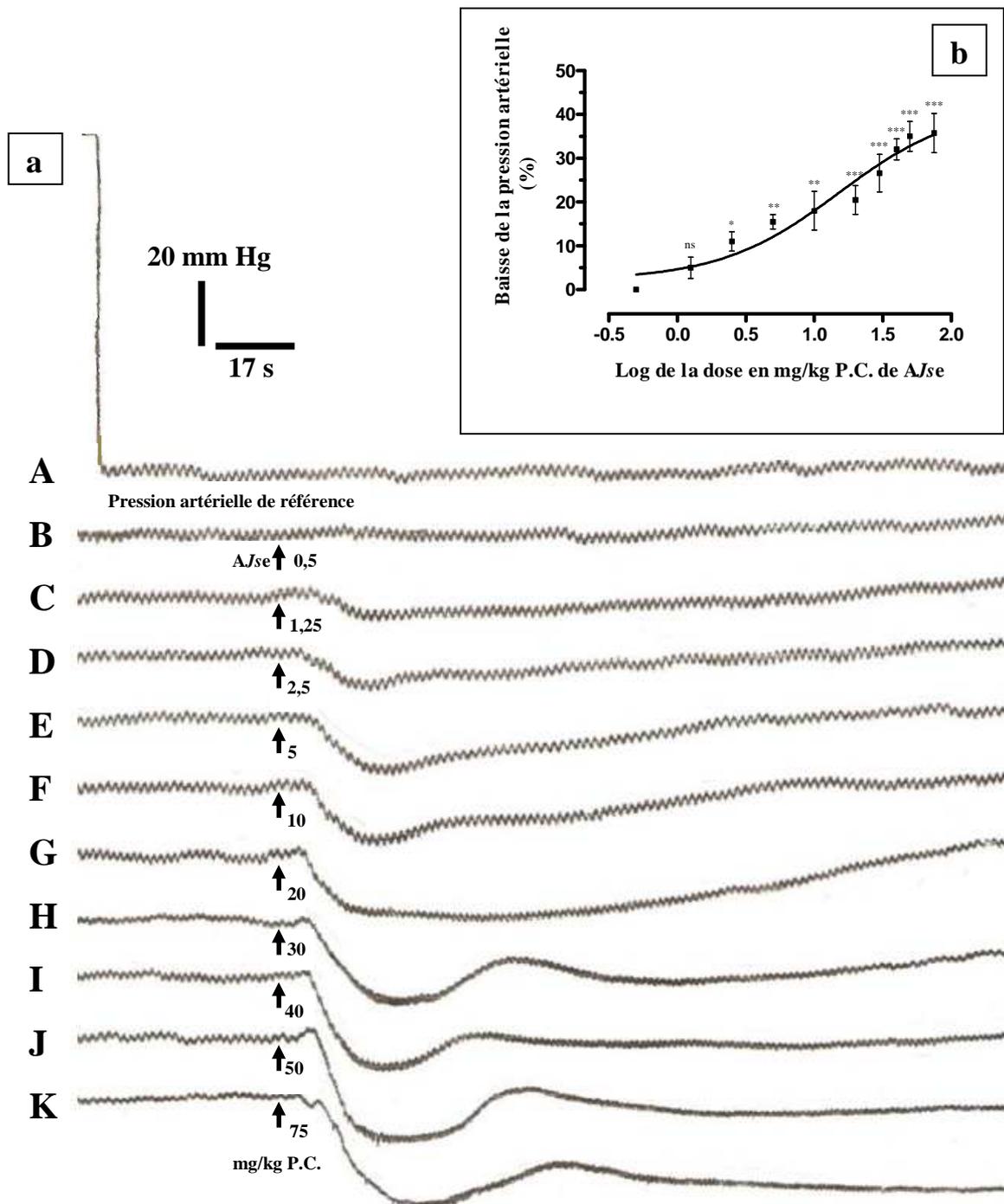
AJse, administrée à des doses croissantes de 1,25 à 75 mg/kg P.C., induit une baisse de la pression artérielle. Cette hypotension artérielle est dose-dépendante et commence à apparaître dans moins de 10 secondes après l'administration de l'extrait. Les doses de AJse inférieures à 1,25 mg/kg P.C. sont sans effet sur la pression sanguine artérielle.

La **figure 38-a** présente un enregistrement type des effets de AJse sur la pression sanguine artérielle de lapin.

Dans la série d'expériences de cette étude (n = 4), la pression artérielle de référence des lapins utilisés est de  $95 \pm 6$  mm Hg. L'administration de AJse permet d'obtenir trois types de résultats en fonction des différentes doses de cet extrait.

- Les doses de AJse comprises entre 1,25 et 40 mg/kg P.C. induisent une hypotension variant de 5 à 28 mm Hg ; soit une chute de pression variant de 5,21 % à 29,17 % par rapport à la pression artérielle de référence du lapin utilisé. A ces doses, les effets de AJse sont totalement réversibles moins de 5 minutes après l'injection.

- Par contre, des doses variant de 50 à 60 mg/kg P.C. induisent une hypotension partiellement réversible. La chute de pression artérielle varie de 33 à 36 mm Hg ; soit une réduction de la pression artérielle variant de 34,35 % à 37,5 % par rapport à la pression artérielle de référence du lapin utilisé.



**Figure 38 : effets dose-réponse d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) sur la pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

**A** - Enregistrement de la pression artérielle de référence

**B à K** - Effets de AJse (après les flèches) à 0,5 (B) ; 1,25 (C) ; 2,5 (D) ; 5 (E) ; 10 (F) ; 20 (G) ; 30 (H) ; 40 (I) ; 50 (J) et 75 (K) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Chutes de la pression en fonction de la dose de AJse administrée**

n = 4 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001.

- Pour des doses de *AJse* supérieures ou égales à 75 mg/kg P.C., l'hypotension induite, supérieure ou égale à 38 mm Hg, est irréversible et devient quelques fois mortelle à partir de la dose de 100 mg/kg P.C.

La courbe de la **figure 38-b** indique les pourcentages de baisses de pressions sanguines artérielles enregistrées, par rapport aux pressions artérielles de référence des lapins utilisés, en présence de doses croissantes de *AJse*, pour 4 expériences. Cette courbe sigmoïde permet de déterminer la valeur de la dose efficace 50 % ( $DE_{50}$ ) de *AJse* sur la pression artérielle. Elle est de 15,17 mg/kg P.C.

## **IV<sub>1</sub> – 2 – 2. Effets de *AJse* sur l'hypertension artérielle induite chez le lapin**

### **IV<sub>1</sub> – 2 – 2 – 1. Effets de *AJse* sur l'hypertension induite par l'adrénaline**

Le but de cette étude est d'observer les effets de *AJse*, substance hypotensive, sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline.

Ainsi, dans une première série d'expériences, l'injection de *AJse* à différentes doses est précédée de celle d'une dose unique d'adrénaline. La **figure 39-a** présente un enregistrement type des résultats de cette série d'expériences.

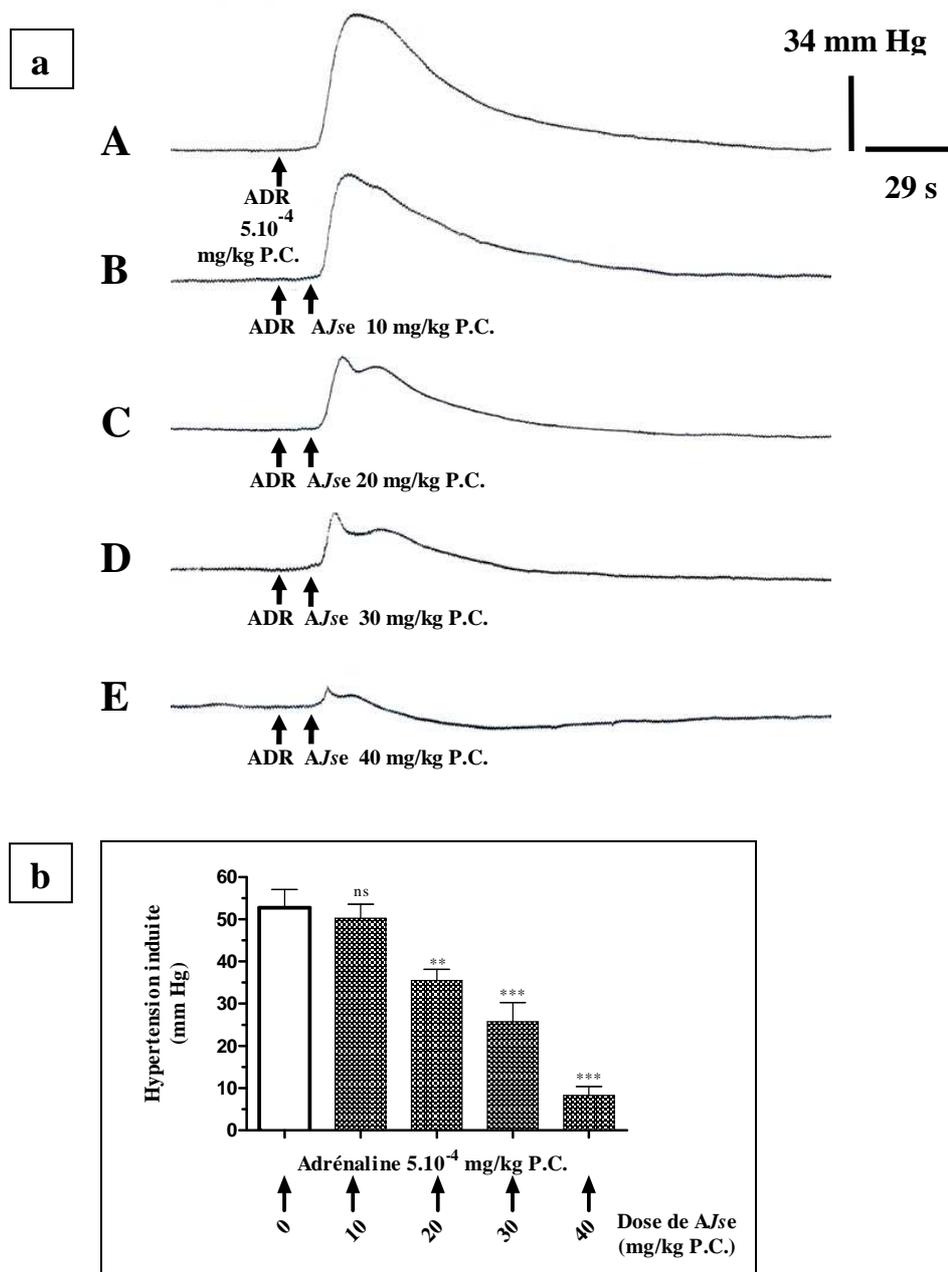
L'adrénaline, à la dose de  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C., induit une augmentation de la pression artérielle de  $52,75 \pm 4,25$  mm Hg (**figure 39-a-A**).

Lorsque l'injection de la même dose d'adrénaline ( $5.10^{-4}$  mg/kg P.C.) est suivie, 10 s après, de celle de *AJse* dans la gamme de concentrations de 10 à 30 mg/kg P.C., l'hypertension induite par l'adrénaline est réduite. Cette réduction est dose-dépendante et varie de 4,74 % à 51,18 %.

Lorsque l'injection de l'adrénaline est suivie de celle de *AJse* à 40 mg/kg P.C., il apparaît une hypertension transitoire de  $8,25 \pm 2,18$  mm Hg, suivie d'une hypotension de  $6,5 \pm 2,04$  mm Hg. Ainsi *AJse*, à 40 mg/kg P.C., reverse totalement l'hypertension induite par l'adrénaline à  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C. et laisse place à une hypotension.

Les effets de *AJse* sur l'hypertension induite par l'adrénaline, pour 4 séries d'expériences, sont présentés par les colonnes de la **figure 39-b**.

Dans une deuxième série d'expériences, l'adrénaline à  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C., associée à des doses croissantes de *AJse*, est administrée aux lapins. La **figure 40-a** présente un enregistrement type des résultats de cette seconde série d'expériences.



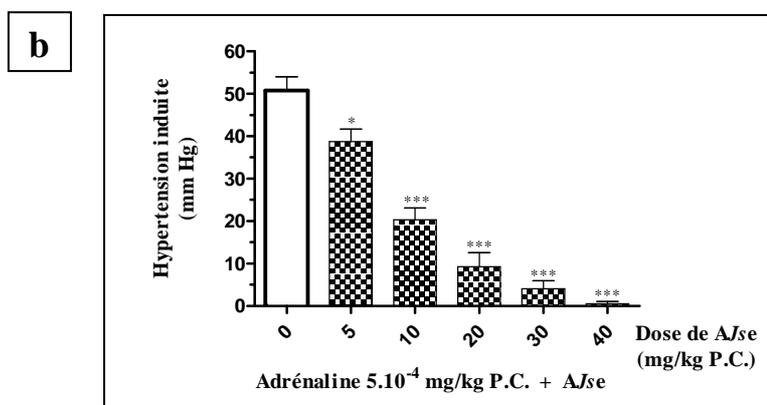
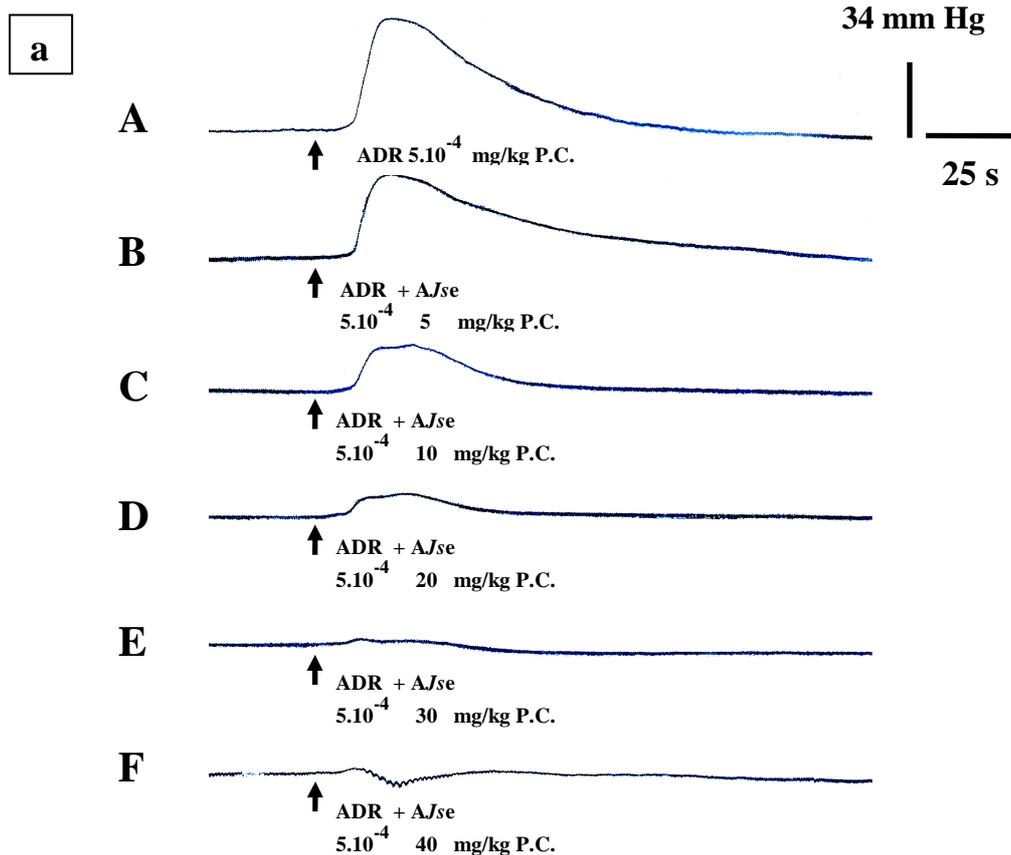
**Figure 39 : effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline au lapin**

**a – Enregistrement type**

- A** - Effets de l'adrénaline (ADR) à  $5.10^{-4}$  mg/kg de poids corporel (P.C.)
- B à E** - Effets de ADR à  $5.10^{-4}$  mg/kg de poids corporel, suivi de l'injection de AJse à 10 (B), 20 (C), 30 (D) et 40 (E) mg/kg de poids corporel

**b – Réduction par AJse de l'hypertension artérielle induite par l'adrénaline**

**n = 4 ; ns P > 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001.**



**Figure 40 : effets cumulés d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et de l'adrénaline sur la pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de ADR à  $5.10^{-4}$  mg/kg de poids corporel (P.C.)

**B à F** - Effets de ADR à  $5.10^{-4}$  mg/kg de poids corporel + AJse à 5 (B), 10 (C), 20 (D), 30 (E) et 40 (F) mg/kg de poids corporel

**b – Hypertension induite par l'adrénaline en présence de AJse**

**n = 4 ; \* P < 0,05 ; \*\*\* P < 0,001.**

L'adrénaline, injectée seule au lapin à la dose de  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C., induit une hypertension de  $50,75 \pm 3,25$  mm Hg. Lorsque cette dose d'adrénaline est associée à différentes doses de *AJse*, l'hypertension est réduite proportionnellement à la dose de l'extrait. Elle s'annule pour une dose de *AJse* de 40 mg/kg P.C. En effet, avec une dose d'adrénaline de  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C. associée à des doses de *AJse* variant de 5 à 30 mg/kg P.C., les augmentations de pression artérielle qui, initialement, étaient de  $50,75 \pm 3,25$  mm Hg en présence d'adrénaline seule diminuent. Pour ces doses de *AJse*, les valeurs d'hypertensions induites par l'adrénaline sont comprises entre  $38,75 \pm 2,95$  mm Hg et  $4 \pm 1,91$  mm Hg ; ce qui correspond à des réductions d'hypertensions allant de 23,65 % à 92,12 %.

La dose de *AJse* de 40 mg/kg P.C. annule totalement l'hypertension induite par l'adrénaline à  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C. En effet, les deux composés, associés à ces doses, ne font pas apparaître d'hypertension (**figure 40-a-F**). Il est plutôt observé une hypotension artérielle de  $4,5 \pm 2,65$  mm Hg.

Les colonnes de la **figure 40-b** représentent l'hypertension induite par l'adrénaline, en absence ou en présence de *AJse*, pour 4 séries expériences.

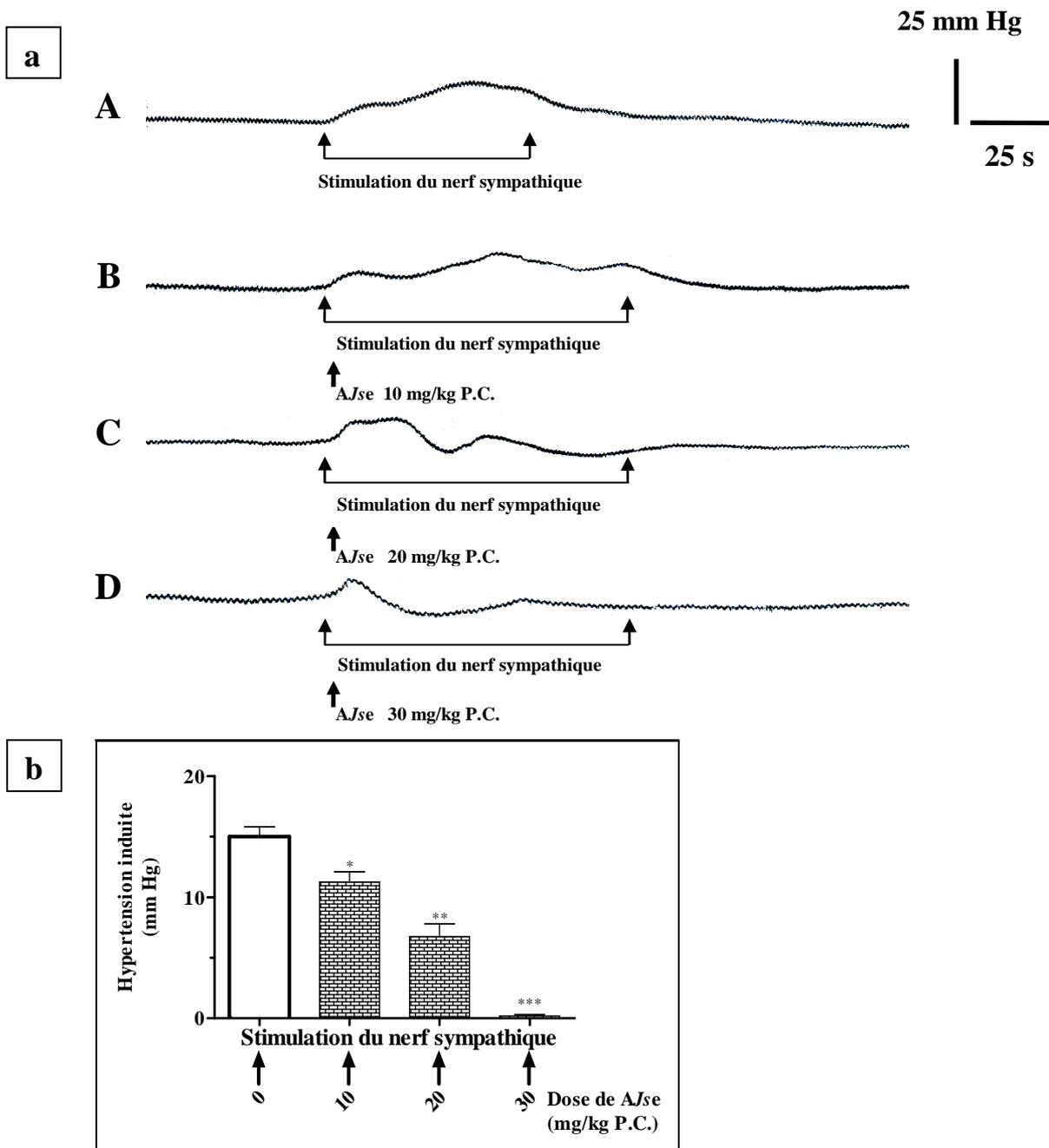
#### **IV<sub>1</sub> – 2 – 2 – 2. Effets de *AJse* sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique**

Dans cette étude, l'objectif est d'étudier les effets de *AJse* sur une hypertension induite par la stimulation du système nerveux périphérique. Ainsi, dans cette série d'expériences, le nerf sympathique du lapin est stimulé et, immédiatement après, différentes doses de *AJse* sont administrées. Un enregistrement type des résultats de cette série d'expériences est présenté par la **figure 41-a**.

Une stimulation électrique du nerf sympathique du lapin induit, pendant toute la durée de la stimulation (45 s), une augmentation de la pression artérielle de  $15 \pm 2,82$  mm Hg (**figure 41-a-A**).

Lorsque la stimulation du nerf sympathique est suivie, 3 s après, de l'administration de *AJse* à 10 mg/kg P.C., l'augmentation de la pression artérielle obtenue est de  $11,25 \pm 3,82$  mm Hg ; soit une réduction de l'hypertension induite de 25 %, alors que la stimulation est maintenue (1 mn).

*AJse*, administré à la dose de 20 mg/kg P.C., juste après le début de la stimulation du nerf sympathique, induit une baisse transitoire de pression artérielle de  $6,76 \pm 3,86$  mm Hg, suivie d'un retour à la pression artérielle normale, malgré le maintien de la stimulation du nerf sympathique (pendant 1 mn).



**Figure 41 : effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique de lapin**

**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de la stimulation du nerf sympathique

(intensité = 6 mV ; durée = 0,6 ms ; fréquence = 25 Hz)

**B à D** - Effets de la stimulation du nerf sympathique et de l'injection de AJse

à 10 (B), 20 (C) et 30 (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Réduction par AJse de l'hypertension artérielle induite par la stimulation du nerf sympathique (n = 4 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)**

Dans les mêmes conditions expérimentales, l'injection de *AJse* à 30 mg/kg P.C. fait disparaître, de manière immédiate, l'hypertension induite, remplacée, moins de 20 s plus tard, par une hypotension de  $4,5 \pm 2,66$  mm Hg.

Ainsi, *AJse* réduit significativement et même annule l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique.

Les résultats de 4 séries d'expériences ont permis de tracer les colonnes de la **figure 41-b** montrant les effets de *AJse* sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique.

#### **IV<sub>1</sub> – 2 – 3. Discussion**

L'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (*AJse*), à des doses comprises entre 1,25 et 75 mg/kg P.C., doses inférieures à la dose maximale tolérée déterminée chez la souris (DMT = 117 mg/kg P.C.), induit chez le lapin une hypotension artérielle dose-dépendante.

L'allure sigmoïde de la courbe de la chute de la pression sanguine artérielle en fonction de la dose de *AJse* et la détermination de la DE<sub>50</sub> permettent de suggérer qu'il s'agit d'une substance à effets pharmacologiques. Par ailleurs, elle met en évidence, selon Miller et Tainter (1944), que les mécanismes d'action de cette substance pourraient passer par une activation de récepteurs.

Cet extrait réduit jusqu'à annuler l'hypertension induite aussi bien par l'adrénaline à  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/kg P.C. que par la stimulation électrique des fibres nerveuses sympathiques du lapin. *AJse*, en plus de ses effets hypotenseurs, serait donc une substance antihypertensive.

La stimulation des fibres orthosympathiques entraîne la libération, à partir des terminaisons nerveuses, de l'adrénaline. Cette substance, pour agir sur le système cardio-vasculaire se fixe sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Castaigne, 1988 ; Rang *et al.*, 2001). Selon Lands *et al.* (1967 et 1976), il existe deux sous-types de récepteurs  $\beta$  :  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénergiques.

Au niveau de la cellule myocardique, les récepteurs  $\beta_1$  sont prédominants. La liaison d'un agoniste adrénergique  $\beta_1$  à son récepteur spécifique entraîne une augmentation du débit cardiaque due à une augmentation de la contractilité cardiaque qui entraîne une augmentation du volume d'éjection (Lompre *et al.*, 1990 ; Witchitz, 1994 ; Brown, 1995 ; Cohen, 1997 ; Almange, 1998 ; Moulin et Coquerel, 2002 ; Westfall et Westfall, 2006).

Classiquement, les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques vasculaires sont de type  $\beta_2$  et leur stimulation engendre une vasoconstriction (Berdeaux et Edouard, 1997 ; Guimaraes et Moura, 2001).

Les effets cardioactivateurs et vasoconstricteurs de l'adrénaline engendrent une hypertension artérielle (Castaigne, 1988 ; Berdeaux et Edouard, 1997 ; Rang *et al.*, 2001).

L'inhibition par AJse de l'hypertension artérielle induite par l'adrénaline administrée ou libérée à la suite de la stimulation des fibres nerveuses sympathiques indique que cet extrait agirait en inhibant les effets de l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. L'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* contiendrait donc des substances agissant comme des bêtabloquants.

En effet, les bêtabloquants, ou bêtabloqueurs ou adrénolytiques bêta ou anti-adrénergiques bêta sont des inhibiteurs compétitifs des effets des catécholamines sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Giudicelli, 1984 ; Castaigne, 1988 ; Witchitz, 1994 ; Brown, 1995 ; Westfall et Westfall, 2006 ; Wiysonge *et al.*, 2007). Les bêtabloquants inhibent de façon spécifique et compétitive les récepteurs bêta-adrénergiques périphériques, mais aussi centraux s'ils passent la barrière hémoméningée. Ils ont des effets communs qui sont essentiellement cardio-vasculaires. Ils agissent principalement en réduisant l'activité des catécholamines sur le cœur et les vaisseaux sanguins et diminuent aussi la pression artérielle (Giudicelli, 1984 ; Waeber *et al.*, 1990 ; Bradley *et al.*, 2006 ; Heusser *et al.*, 2007 ; Wiysonge *et al.*, 2007).

Les propriétés antihypertensives de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* ayant été confirmées, il convient de rechercher les grands groupes chimiques que contient cet extrait et qui seraient à l'origine de ces effets pharmacologiques et thérapeutiques.

#### **IV<sub>1</sub> – 3. Mise en évidence de quelques composés de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

##### **IV<sub>1</sub> – 3 – 1. Mise en évidence de quelques métabolites secondaires**

La mise en évidence des métabolites secondaires consiste en des essais de caractérisation des principaux groupes chimiques contenus dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (Acanthaceae). Ces différentes catégories de métabolites secondaires recherchés sont choisies en fonction de la nature chimique commune partagée par les principes actifs majeurs auxquels elles donnent accès et de leur utilisation en thérapeutique.

Le but de ces tests est d'identifier les classes de métabolites secondaires qui entrent dans la composition de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*.

Les techniques de détection des métabolites secondaires ont permis de rechercher dans cet extrait la présence de stérols et polyterpènes, de saponosides, d'alcaloïdes, d'anthocyanes, de composés quinoniques, de polyphénols, de flavonoïdes, de tanins et de glycosides cardiaques.

La mise en évidence des grands groupes chimiques a été réalisée par les réactions en tubes et confirmée par des révélations sur plaques de chromatographie sur couche mince (CCM).

#### **IV<sub>1</sub> – 3 – 1 – 1. Réactions en tubes**

Les tests en tubes réalisés ont permis de mettre en évidence la présence des stérols et polyterpènes, des alcaloïdes, des saponosides et des anthocyanes dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*. En effet :

- le test au réactif de Liebermann-Burchard fait apparaître, à l'interface, un anneau violet caractéristique de la présence de stérols et polyterpènes dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* ;

- à la suite d'une agitation vigoureuse du tube à essai contenant *AJse* en solution aqueuse, il apparaît une mousse résiduelle persistante d'une hauteur supérieure à 1 cm (indice de mousse = 275), montrant la présence de saponosides dans cet extrait ;

- la réaction de Dragendorff et celui de Bouchardât font apparaître respectivement un précipité orangé et une coloration brun-rougeâtre indiquant la présence d'alcaloïdes dans l'extrait ;

- la présence d'anthocyanes dans *AJse* a été mise en évidence par l'apparition d'une coloration bleue par la réaction à l'ammoniaque.

Par contre, cet extrait ne contient pas de composés quinoniques, de polyphénols, de flavonoïdes totaux, de tanins (tanins catéchiques et galliques) et de glycosides cardiaques. Ceci a été prouvé par l'utilisation respectivement du réactif de Borntraeger, du réactif au chlorure ferrique, du réactif à la cyanidine, du réactif de Stiasny et du réactif de Kedde qui donnent des tests négatifs.

Les résultats des essais phytochimiques réalisés par les réactions en tubes sont donnés dans le **tableau IX** ci-dessous. Ils sont représentatifs de trois expérimentations.

La présence ou pas des métabolites, mise en évidence par les tests en tubes, a été vérifiée par des tests de révélations réalisés sur CCM.

**Tableau IX : résultats des réactions en tube pour la mise en évidence de quelques métabolites secondaires dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda***

<b>Composés recherchés</b>	<b>Réactif</b>	<b>Résultat</b>	<b>Témoin</b>
<b>Stérols et polyterpènes</b>	Réactif de Liebermann-Burchard	++ (anneau violet)	Cholestérol
<b>Saponosides</b>	Agitation vigoureuse (solution aqueuse)	+++ (mousse visible)	Mousse > 1 cm
<b>Alcaloïdes</b>	Réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium)	+++ (précipité orangée)	Quinine
	Réactif de Bouchardât (iodure de potassium)	++ (coloration brun-rougeâtre)	Quinine
<b>Anthocyanes</b>	Réactif au tampon phosphate	++ (couleurs variées)	Vin rouge
Composés quinoniques	Réactif de Borntraeger	-	Vitamine E
Polyphénols	Réactif au chlorure ferrique	-	Phénol
Flavonoïdes	Réactif à la cyanidine	-	Quercétol
Tanins catéchiques	Réactif de Stiasny	-	Catéchine
Tanins galliques		-	Acide gallique
Glycosides cardiaques	Réactif de Kedde	-	Digoxine

- : composé non détecté (test négatif)

+ : composé présent (test positif). Le nombre de « + » est fonction de l'intensité de la coloration et/ou des précipités.

#### IV<sub>1</sub> – 3 – 1 – 2. Chromatographie sur couche mince

L'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (Acanthaceae) a été solubilisé dans de l'eau distillée à raison de 10 mg/ml. 10 µl de l'extrait est spoté sur plaque de gel de silice 60 F<sub>254</sub> et élué avec le mélange de solvants suivants : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (9 : 2 v/v).

La **figure 42** donne la photographie des plaques, après élution de l'extrait, observées à la lumière du jour (A) et sous lampe UV à 254 nm(B) et 366 nm (C).

La CCM a permis de faire apparaître plusieurs constituants dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*.

L'observation des chromatogrammes de l'extrait de la plante à l'UV a permis de noter la présence de constituants UV actives à 254 nm et multiples fluorescences à 366 nm.

Outre les observations à la lumière du jour et sous rayonnements UV à 254 nm et 366 nm, les plaques ont été révélées à l'aide de réactifs chimiques présentés dans matériel et méthodes (cf. III – 3 – 7 – 2., page 105, révélation des CCM), dans le but de vérifier la présence des composés chimiques mis en évidence par les réactions en tubes dans l'extrait.

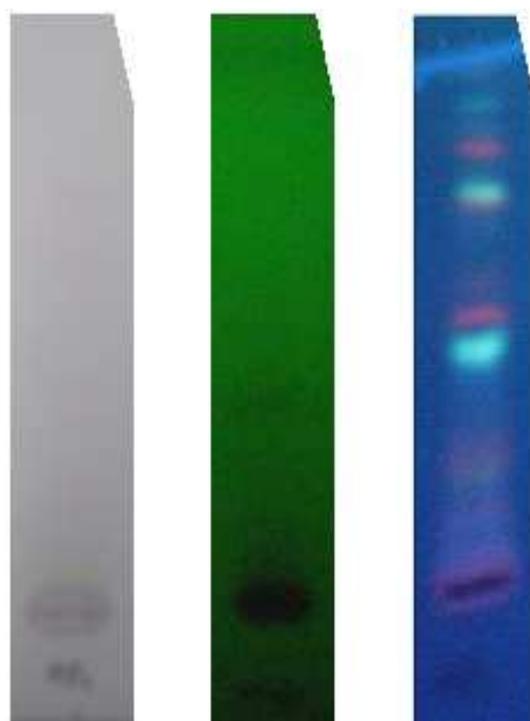
Le screening phytochimique effectué sur l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* a permis d'obtenir les résultats suivants :

- après pulvérisation du réactif de Liebermann-Burchard, apparaissent sur la plaque CCM des taches de colorations diverses : rouge, jaune orangée et jaune vert, à la lumière UV à 365 nm, indiquant respectivement la présence dans l'extrait de triterpènes de type oléanane et ursane, de triterpènes de type lupane et de stéroïdes ;

- la révélation du chromatogramme à la vanilline sulfurique donne, sous lumière UV (366 nm), une coloration rose-violacée témoignant la présence dans l'extrait de saponosides de nature triterpénique ;

- le réactif de Dragendorff donne sur les CCM deux bandes majeures d'une légère coloration orange observable en lumière visible. La révélation des chromatogrammes par le réactif à l'iodoplatinate de potassium a permis d'observer en lumière visible des bandes majeures de coloration violette. Ceci indique la présence d'alcaloïdes dans l'extrait ;

- les CCM de la phase butanolique d'un extrait au n-butanol de *AJse* mettent en évidence deux bandes majoritaires de colorations pourpre et rouge témoignant de la présence d'anthocyanidines dans cet extrait aqueux brut de *Justicia secunda* ;



A (lumière du jour) B (254 nm) C (366 nm)

**Figure 42 : photographies des plaques CCM après élution d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) en solution aqueuse**

Support : gel silice 60 F<sub>254</sub> Merck

Echantillon : 100 µg de AJse

Phase mobile : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (9 : 2 v/v).

A – Observation à la lumière du jour

B – Extinction de fluorescence à 254 nm

C – Fluorescence à 366 nm

- le réactif à l'hydroxyde de potassium, le réactif de Fast Blue Salt B, le réactif de NEU, le réactif à l'anisaldéhyde sulfurique et celui de Kedde ont permis de montrer l'absence dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, respectivement, de composés quinoniques (anthraquinones et anthrones), de polyphénols, de flavonoïdes totaux, de tanins catéchiques et de glycosides cardiaques.

Le **tableau X** répertorie les résultats des criblages chimiques sur plaques CCM. Ils sont représentatifs de trois expérimentations.

#### **IV<sub>1</sub> – 3 – 2. Mise en évidence par le DPPH de composés antioxydants**

La mise en évidence de composés antioxydants dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) a été réalisée par le test de réduction du radical 1,1 diphenyl-2 picrylhydrazyle (test antiradicalaire sur le DPPH) sur des plaques CCM de gel de silice F254 en aluminium (**figure 43**).

Le chromatogramme de AJse sur plaque de CCM, révélé par une solution de DPPH à la concentration de 2 mg/ml dans le méthanol, présente une tâche jaune sur un fond violet. Cette tâche est la zone d'inhibition qui indique la présence de constituants capables de réduire le radical DPPH oxydant, ce qui démontre une activité antiradicalaire et donc une activité antioxydante de AJse. Le témoin utilisé est la quercétine (**figure 43-C**).

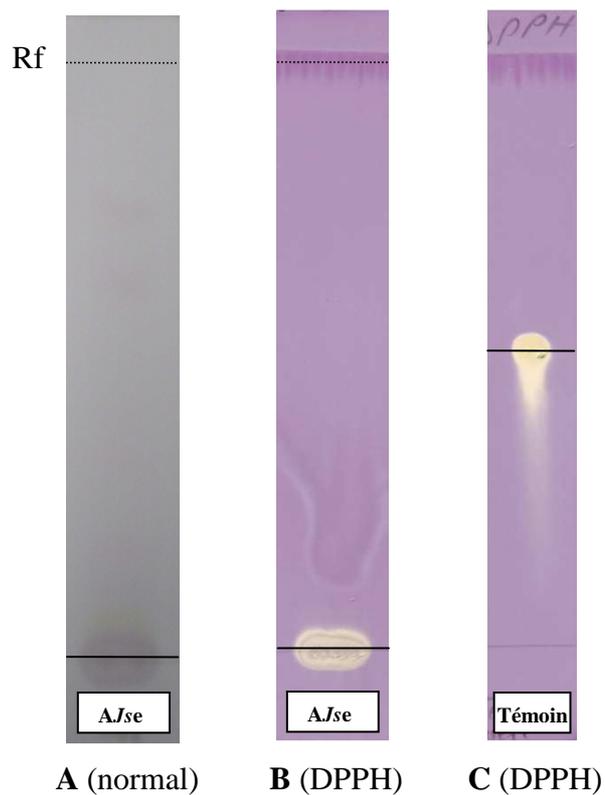
La **figure 43-B** donne la photographie d'un chromatogramme montrant l'activité antiradicalaire de AJse.

**Tableau X : résultats des révélations sur CCM pour la mise en évidence de quelques  
métabolites secondaires dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda***

<b>Composés recherchés</b>	<b>Réactif</b>	<b>Résultat</b>	<b>Témoin</b>
<b>Stérols et triterpènes</b>	Réactif de Liebermann- Burchard	+  (apparition de taches de colorations : - jaune - rouge et jaune-orangée)	Sitostérol
<b>Saponosides</b>	Réactif à la vanilline sulfurique	+  (apparition de tâches de coloration bleu-violacée)	Easine
<b>Alcaloïdes</b>	Réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium)	+  (apparition de taches de coloration orange)	Résérpine
	Réactif d'iodoplatinate de potassium	+  (apparition de taches de coloration violette)	Diphenyl- dramine
<b>Anthocyanes</b>	Extraction au n-butanol	+  (apparition de taches de colorations pourpre et rouge)	Cyanidine
Composés quinoniques	Réactif à l'hydroxyde de potassium	-	Rhéine
Polyphénols	Réactif de Fast Blue Salt B (3,3'-diméthoxy-biphényl- 4,4'-bis (diazonium- dichloride))	-	Thymol
Flavonoïdes	Réactif de NEU (2- aminoéthyl- diphénylborate) : NST/PEG (Naturstoff- Polyethylenglykol)	-	Rutine
Tanins catéchiques	Réactif à l'anisaldéhyde sulfurique	-	Catéchine
Glycosides cardiaques	Réactif de Kedde	-	k-strophanthine

- : composé non détecté (test négatif)

+ : composé présent (test positif).



**Figure 43 : photographies des plaques CCM à la lumière du jour montrant l'activité antiradicalaire (DPPH) d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

Support : gel silice 60 F254 Merck

Echantillon : 100 µg de AJse

Phase mobile : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (9 : 2 v/v).

**A** – Chromatogramme de AJse avant le test

**B** – Activité antiradicalaire de AJse révélée par le DPPH

**C** – Témoin (quercétine) révélé par le DPPH

### IV<sub>1</sub> – 3 – 3. Discussion

La mise en évidence de métabolites secondaires réalisée par réactions en tubes avec des réactifs chimiques appropriés, et basée sur des réactions différentielles de coloration, de précipitation et d'apparition de mousse, a montré la présence, dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, de stéroïdes et polyterpènes, d'anthocyanes, d'alcaloïdes et de saponosides. Par contre, les composés quinoniques, les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins catéchiques et les glycosides cardiaques n'ont pas été observés avec les réactions en tubes.

Il est à signaler que pour les tests en tubes, l'appréciation des activités est faite de manière visuelle. C'est donc une analyse basée sur une échelle relative et non absolue.

Dans ce criblage, il ne faut pas perdre de vue que les tests sont réalisés avec un extrait brut et qu'un résultat positif est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité relative dans l'extrait. Il convient également de souligner qu'une activité observée pour ces tests, appréciée visuellement par une coloration donnée, pourrait apparaître subjective, vue la coloration rouge-violacée intense de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* en solution aqueuse. Par conséquent, les résultats de telles investigations doivent toujours être considérés prudemment.

Les révélations sur plaques CCM ont confirmé la présence de stéroïdes et polyterpènes, d'anthocyanes, d'alcaloïdes et de saponosides dans l'extrait. De même, les composés dont la présence n'a pas été mise en évidence par les tests en tubes n'ont pas, non plus, été révélés par les criblages chimiques sur plaques CCM.

La confirmation des résultats obtenus lors des tests en solution par le criblage chimique sur plaques CCM a été motivée par le fait que l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* en solution aqueuse à une vive coloration rouge violacée. Cette vive coloration pourrait quelque peu masquer des changements probables de colorations en présence des réactifs lors des tests en tube. La CCM, en permettant la séparation des composés présents dans l'extrait, pourrait permettre, lors des révélations sur plaques CCM, une plus grande réactivité de ces composés séparés avec les réactifs, et donc une meilleure appréciation des changements probables. De plus, ce support présente l'avantage de permettre la solubilisation des échantillons dans le solvant le plus approprié, contrairement aux tests en solution souvent réalisés en milieu aqueux.

Les résultats de la mise en évidence des métabolites secondaires obtenus par réaction en tubes sont conformes à ceux obtenus par criblage chimique sur plaques CCM. Cela montre la fiabilité des techniques de détection utilisées.

Toutefois, la bonne corrélation entre les résultats obtenus par le biais de tests sur CCM et de tests en solution n'a pas toujours été démontrée. Or, les tests en solution sont de manières générales plus fiables, d'une part à cause de leur nature, en se rapprochant plus des conditions réelles et, d'autre part, du fait que les résultats sont quantifiables (Rouessac et Rouessac, 2004).

La présence, dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, d'alcaloïdes et de polyterpènes a été également montrée par Calderon (2002) qui a mis en évidence dans cette plante la présence d'alcaloïdes peptidiques, d'alcaloïdes indoquinolés, de triterpènes et de dérivés de phénylalanine. De même, Toussou *et al.* (2008) ont mis en évidence la présence d'alcaloïdes, d'anthocyanes et de tanins dans un extrait hydro-alcoolique de *Justicia secunda*. Ils ont en plus révélé la présence des ilovonoïdes et des leucoanthocyanes dans cet extrait. Des anthocyanes ont été isolés par Mpiana *et al.* (2010) dans des extraits partiellement éthanolique (95 %) et aqueux de feuilles de *Justicia secunda*, preuve que cette plante contient ce composé.

Les différents groupes chimiques retrouvés dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, à savoir les stérols et polyterpènes, les alcaloïdes, les anthocyanes et les saponosides, substances couramment utilisées dans la thérapeutique, de par leurs propriétés, seraient responsables des effets faiblement ou peu toxiques sur les souris traitées à l'extrait et des effets hypotenseurs et antihypertenseurs induits par cet extrait.

Les alcaloïdes sont des substances naturelles basiques dont les structures polycycliques complexes présentent de puissants effets physiologiques. Cette importante activité biologique revêt un intérêt pharmacologique et, à ce titre, ces substances entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principes actifs. Ils sont particulièrement utilisés dans l'industrie pharmaceutique.

Qing Li et Blevins (2004) indiquent que les principes actifs importants d'un grand nombre de remèdes asiatiques (plantes et autres) sont des alcaloïdes. Leurs propriétés anticholinergiques, bronchodilatatrices, antihypertensives, antipaludéennes, antitussives, analgésiques et cytotoxiques sont le reflet de leur grande activité biologique (Rasoanaivo *et al.* 1996). Ce sont également des substances toxiques (surtout à l'état pur), et parfois à faibles doses, qui ont des effets thérapeutiques connues. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité.

Des auteurs ont montré que certaines drogues contenant des alcaloïdes telles que les liliacées, les papavéracées, les rutacées et les apocynacées agissent sur le système

cardio-vasculaire et sur le système nerveux central et présentent par ailleurs des propriétés anticancéreuses (Quevauviller et Hamonniere, 1977). Des effets cardioinhibiteurs et hypotenseurs induits par les alcaloïdes ont également été décrits par Prieto *et al.* (1998). Des drogues à alcaloïdes isoquinoléiques type tropolonique telle que la Colchique sont myorelaxantes (Hamon *et al.*, 1985).

Ainsi, les alcaloïdes contenus dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* seraient en partie responsable de la cardiodépression et de la vasorelaxation à l'origine de l'effet hypotenseur de cet extrait. Ils pourraient être également la cause de l'effet faiblement toxique de cette plante et de la diminution de la motricité des animaux traité avec AJse.

La révélation du chromatogramme à la vanilline sulfurique donne une coloration rose violette témoignant de la nature triterpénique des saponosides mis en évidence dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*.

Les saponosides (saponines) sont des hétérosides naturels dont la matière est un composé hydrosoluble, qui la rend moussante comme une eau de savon. Ils modifient la tension superficielle de l'eau. Les saponosides existent dans les plantes, condensées à de nombreux sucres, sous forme « inactive ». Elles sont hydrolysées, en cas de nécessité, et prennent alors leurs formes actives ; ce qui leur confère tout l'intérêt thérapeutique comme antimicrobien, antibactérien, antivirale, antifongique, parasiticide, anti-inflammatoire, anti-hémorroïdaire, antispasmodique, diurétique, cicatrisant et protecteur veineux (Lacaille-Dubois et Wagner, 1996 ; Sparg *et al.*, 2004 )

Ces plantes à saponines auraient plus d'effets sur le vivant :

- elles facilitent la pénétration des autres substances au niveau de la peau, de l'intestin et de toutes les muqueuses ;
- elles dissolvent les graisses, et par voie de conséquence, elles sont irritantes pour les muqueuses.

Les saponosides ont une autre propriété caractéristique : celle d'hémolyser les globules rouges, (érythrocytes), c'est-à-dire de libérer leur hémoglobine, ce qui explique l'effet toxique de certaines d'entre elles.

Des saponosides sont décrits dans la littérature comme possédant une forte activité cytotoxique prouvée. Ces saponosides sont connues pour leur action hémolytique et leur toxicité sur les animaux à sang froid (Pettit *et al.*, 1991).

La présence de saponosides dans l'extrait de *Justicia secunda* pourrait justifier l'effet faiblement toxique de cette plante, relevé précédemment. Ils n'ont pas d'effets révélés sur le

système cardio-vasculaire et ne seraient donc certainement pas directement à l'origine des effets de AJse sur la pression sanguine artérielle. Toutefois, les effets diurétiques des saponosides (Sparg *et al.*, 2004 ; Lacaille-Dubois et Wagner, 1996) présents dans cet extrait pourraient être bénéfiques dans le traitement de l'hypertension artérielle par AJse.

Le rôle le plus connu des anthocyanes est la coloration des fleurs et des fruits. Mais leur présence est également révélée dans les feuilles, les racines, les tiges et les graines. Il est indiqué que les anthocyanes sont des substances qui préviendraient l'hypertension artérielle. En effet, selon Cassidy *et al.* (2011), la consommation de polyphénols de type anthocyanes permettrait de réduire le risque d'hypertension. Une étude publiée dans l'*American Journal of Clinical Nutrition* a mis en évidence les bienfaits des anthocyanes sur la tension artérielle. Il ressort de cette étude portant sur 34 647 personnes que le risque de développer une hypertension est réduit de 8 % chez les personnes qui consomment plus d'anthocyanes. Par ailleurs, les bénéfices des anthocyanes semblent plus importants chez les moins de 60 ans, puisque dans cette population, le risque d'hypertension est réduit de 12 % chez les plus gros consommateurs d'anthocyanes (Cassidy *et al.*, 2011). Pour ces scientifiques, l'activité anti-hypertensive des anthocyanes pourrait être liée au processus de vasodilatation.

Ainsi, les anthocyanes, présents dans l'extrait aqueux de *Justicia secunda*, auraient des propriétés vasodilatatrices qui pourraient contribuer aux effets hypotenseurs et antihypertenseurs de cet extrait.

Les stérols contenus dans l'extrait aqueux de *Justicia secunda* pourraient être à l'origine des effets hypotenseurs de cette plante. En effet, l'effet hypotenseur induit par les stérols a été rapporté par Lorenzana-Jiménez *et al.* (2006). Ils ont en effet montré que les polyphénols de l'extrait de *Struthanthus venetus* (Loranthaceae) ont des effets hypotenseurs et cardioinhibiteurs.

Les stérols végétaux, en réduisant le taux de cholestérol à lipoprotéines de basse densité (LDL, *Low Density Lipoprotein*), font baisser la cholestérolémie (Ling *et Jones*, 1995 ; Gill *et al.*, 2008 ; Derdemezis *et al.*, 2010), renforcent le système immunitaire, et réduisent les risques de coronaropathie et de certains cancers (Steinberg, 1997 ; Hu, 2003 ; Ettinger *et al.*, 2004 ; Trautwein et Demonty, 2007 ; Murphy et Johnson, 2008 ; Cooney *et al.*, 2009 ; Rog *et al.*, 2009). Il est en effet bien établi un lien entre l'augmentation du taux de cholestérol sanguin, et plus particulièrement du cholestérol à lipoprotéines de faible densité

(cholestérol LDL : mauvais cholestérol), et l'augmentation du risque de coronaropathie. Sur la base de données épidémiologiques, on estime qu'une diminution de 10 % du cholestérol LDL permet de réduire de 20 % le risque de maladie coronarienne à vie. Des études montrent que la consommation quotidienne de 1 à 3 grammes de stérols végétaux fait baisser le cholestérol LDL de 8 à 15 % (Gylling et Miettinen, 1996 ; Hendriks *et al.*, 1999 ; Katan *et al.*, 2003) sur une période de 3 à 6 semaines (Hendriks *et al.*, 2003).

Les stérols végétaux ou phytostérols forment une catégorie de composés naturels ressemblant à des corps gras et structurellement semblables au cholestérol. Ils réduisent le cholestérol LDL parce que, pour l'absorption à travers la paroi intestinale, ils entrent en concurrence avec le cholestérol issu de l'alimentation et du cycle du cholestérol. Ainsi, les phytostérols, en inhibant de façon compétitive l'absorption et le captage du cholestérol dans l'intestin grêle (Heinemann *et al.*, 1993 ; Gylling et Miettinen, 1996 ; Trautwein *et al.*, 2003 ; Wang, 2007), réduisent de façon notable l'apport en cholestérol dans le sang et le risque de coronaropathie. Etant donné que des taux sanguins élevés de cholestérol brut et de cholestérol à lipoprotéines de basse densité sont les principaux facteurs de risque pour la coronaropathie (Trautwein et Demonty, 2007 ; Derdemezis *et al.*, 2010) et d'autres maladies liées à l'athérosclérose (Schaller, 2003 ; Vaya et Schipper, 2007), la réduction du taux de cholestérol diminue le risque de coronaropathie.

Ainsi, la présence de stérols dans l'extrait aqueux de *Justicia secunda* pourrait être bénéfique dans la prévention des maladies cardio-vasculaires en faisant baisser le taux de LDL.

Des composés tels que les polyphénols totaux et les flavonoïdes, dont les propriétés hypotensives et antihypertensives ont été largement montrées par plusieurs auteurs (Arora *et al.*, 1998 ; Geleijnse *et al.*, 1999 ; Chan *et al.*, 2000 ; Duarte *et al.*, 2001-a ; Duarte *et al.*, 2001-b ; Javorkoua *et al.*, 2004 ; Jun-hua *et al.*, 2006 ; Ojewole, 2006), ne sont pas présents dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* qui, pourtant, fait apparaître ces effets.

Une activité antiradicalaire sur le DPPH a été obtenue avec l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, mettant en évidence l'existence de composés antioxydants dans cet extrait. Ces substances antioxydantes entrent dans l'arsenal thérapeutique de la lutte contre l'athérosclérose, la polyarthrite chronique, l'asthme et les cancers (Takao *et al.*, 1994 ; Potterat, 1997 ; Chevalley, 2000), ainsi que la protection contre les accidents cardio-vasculaires (Hertog *et al.*, 1993 ; Tangirala *et al.*, 1995 ; Cao *et al.*, 1997 ; Cai et Harrison, 2000 ;

Griendling *et al.*, 2000 ; Zalba *et al.*, 2000 ; Sudesh et Vicki, 2005). Tous les facteurs de risque cardio-vasculaire ont un effet commun au niveau de la paroi artérielle : ils augmentent la production de radicaux libres et entraînent ainsi une diminution de la disponibilité de NO qui se manifeste par une atténuation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Par ailleurs, la production excessive de radicaux libres oxyde les lipoprotéines de basse densité. Ces LDL oxydées jouent un rôle de premier plan dans la pathogenèse de l'athérosclérose et de ses complications.

Ainsi, la présence de composés antioxydants dans *Justicia secunda*, rend utile cette plante dans la lutte contre le stress oxydatif pouvant endommager ou détruire les cellules et préviendrait en conséquence certaines pathologies cardio-vasculaires.

Toutefois, les réactions en tubes et les révélations sur CCM ont montré la présence, dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, de stérols et polyterpènes, d'alcaloïdes et de saponosides dont les activités anti-radicalaires n'ont pas été indiquées dans la bibliographie.

Seuls les anthocyanes présents dans cet extrait sont connus comme des antioxydants. L'activité antioxydante des anthocyanes est due à leur structure de base, constituée par un système tricyclique aromatique à quinze atomes de carbone ainsi que du cation flavylum, dont la réactivité est illustrée par la formation du dérivé bisulfite et d'une réaction d'oxydoréduction (antioxydant).

Aussi, l'activité antiradicalaire marquée de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* pourrait provenir des anthocyanes ou d'un autre composé présent dans cet extrait, mais non identifié par les tests phytochimiques utilisés.

Le résultat observé lors de l'évaluation de l'activité d'un extrait brut provient de deux paramètres : d'une part, l'activité intrinsèque d'un produit et, d'autre part, sa quantité relative dans l'extrait. Ainsi, l'activité marquée de AJse peut tout aussi bien provenir d'une faible quantité de constituants très actifs, que d'une grande quantité de constituants peu actifs. Il se peut également que l'activité observée résulte de la somme d'activités de plusieurs constituants.

L'ensemble des résultats démontre l'intérêt de poursuivre des recherches visant à approfondir la détermination des composés responsables de ces activités hypotensives, antihypertensives et antioxydantes de *Justicia secunda*.

Mais, avant cela, il importe de voir l'effet de cet extrait brut sur les paramètres du système cardio-vasculaire qui peuvent influencer la pression artérielle.

#### **IV<sub>1</sub> – 4. Effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

##### **sur le système cardio-vasculaire de Mammifères**

La Pression Artérielle (PA) est la pression qui règne sur la paroi interne des vaisseaux pendant la circulation sanguine. Elle est physiologiquement définie comme le produit de la résistance du vaisseau (essentiellement artériolaire) dans lequel se trouve le sang et le débit imposé par le cœur qui, lui, est lié à la fréquence de décharge du pacemaker sinusal et la force avec laquelle les fibres musculaires des ventricules se contractent à chaque décharge (Folkow, 1982 ; Royer, 1985 ; Chemla et Lecarpentier, 2001).

Ainsi, la pression artérielle est une grandeur qui dépend des paramètres du système cardio-vasculaire. Ces paramètres sont au nombre de 5 :

- le débit cardiaque, donc l'activité du cœur ;
- les résistances périphériques (surtout dues à la contractilité des artérioles ou vasomotricité) ;
- l'élasticité des parois des grosses artères ;
- la viscosité du liquide sanguin ;
- le volume de sang ou volémie.

Ces facteurs qui déterminent la pression artérielle peuvent varier dans de très nombreuses circonstances. En effet, tout facteur qui entraînera une variation de l'un des paramètres cités ci-dessus provoquera une modification de la pression artérielle.

Ainsi, pour comprendre les effets de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur la pression sanguine artérielle, il convient d'étudier, sur l'animal entier, l'action de cette substance sur les paramètres cardio-vasculaires tels que l'activité cardiaque, la vasomotricité et la viscosité du sang. Vu que AJse, administré à l'animal, agit rapidement sur la pression sanguine artérielle (temps de latence inférieur à 10 secondes) et que ces effets sont tout aussi rapidement réversibles, il est peu probable que, dans les conditions expérimentales, à court terme, l'action de cette substance passe par une modification de la volémie.

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 1. Effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda***

##### **sur l'activité cardiaque**

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 1. Effets de AJse sur l'électrocardiogramme (ECG) de lapin**

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 1 – 1. Effets dose-réponse de AJse sur l'ECG de lapin**

Les effets de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur l'ECG ont été étudiés en administrant à des lapins des doses croissantes et cumulées de cet extrait,

variant de 1,25 à 50 mg/kg de poids corporel. Des intervalles de temps de 15 min sont respectés entre les différentes injections.

L'analyse de l'ECG révèle un certain nombre de paramètres biologiques parmi lesquels la fréquence cardiaque, l'amplitude des différentes ondes et la durée des intervalles séparant ces ondes (**figure 44**).

Cette étude nous a amené à mesurer ces paramètres avant et après l'administration de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*.

La **figure 45** est un enregistrement type des effets de *AJse*, administré à des doses variant de 1,25 à 50 mg/kg de poids corporel, sur l'électrocardiogramme.

Il apparaît que, dans cette gamme de concentrations administrées aux lapins, *AJse* n'a pas d'effet notable sur la durée des intervalles PR et QT et du segment ST séparant les différentes ondes de l'ECG. Les effets de *AJse*, en fonction de la dose, sont essentiellement remarquables sur l'amplitude des ondes P et T, l'amplitude du complexe QRS et sur la fréquence cardiaque.

La **figure 45-A** représente l'ECG témoin de l'enregistrement type, qui montre une apparition rythmique et régulière des ondes P et T et le complexe QRS dont les amplitudes sont respectivement de 125, 100 et 650  $\mu$ V, avec une fréquence cardiaque, donnée par le nombre de complexes QRS par unité de temps, constante de 231 cycles/min.

*AJse*, administré à des doses inférieures à 5 mg/kg de poids corporel n'a pas d'effet notable sur l'activité électrique globale du cœur du lapin.

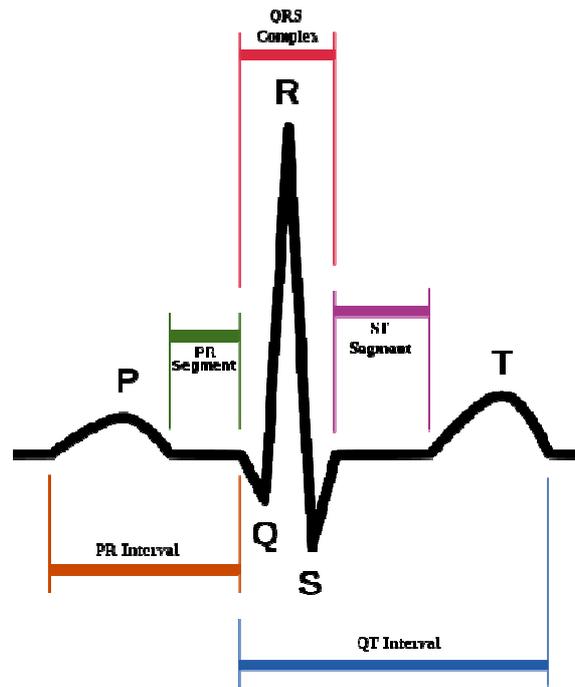
A partir de la dose de 5 mg/kg P.C., *AJse* induit une diminution de la fréquence des battements cardiaques de  $4,33 \pm 2,3$  % (n = 4).

Pour une dose de 10 mg/kg P.C., l'effet sur la fréquence cardiaque s'accroît et s'accompagne d'une diminution de l'amplitude de l'onde T de  $24,6 \pm 2,3$  %.

Les doses de *AJse* supérieures à 10 mg/kg P.C. entraînent sur l'ECG une diminution dose-dépendante de l'amplitude des ondes P et T et une diminution de la fréquence cardiaque.

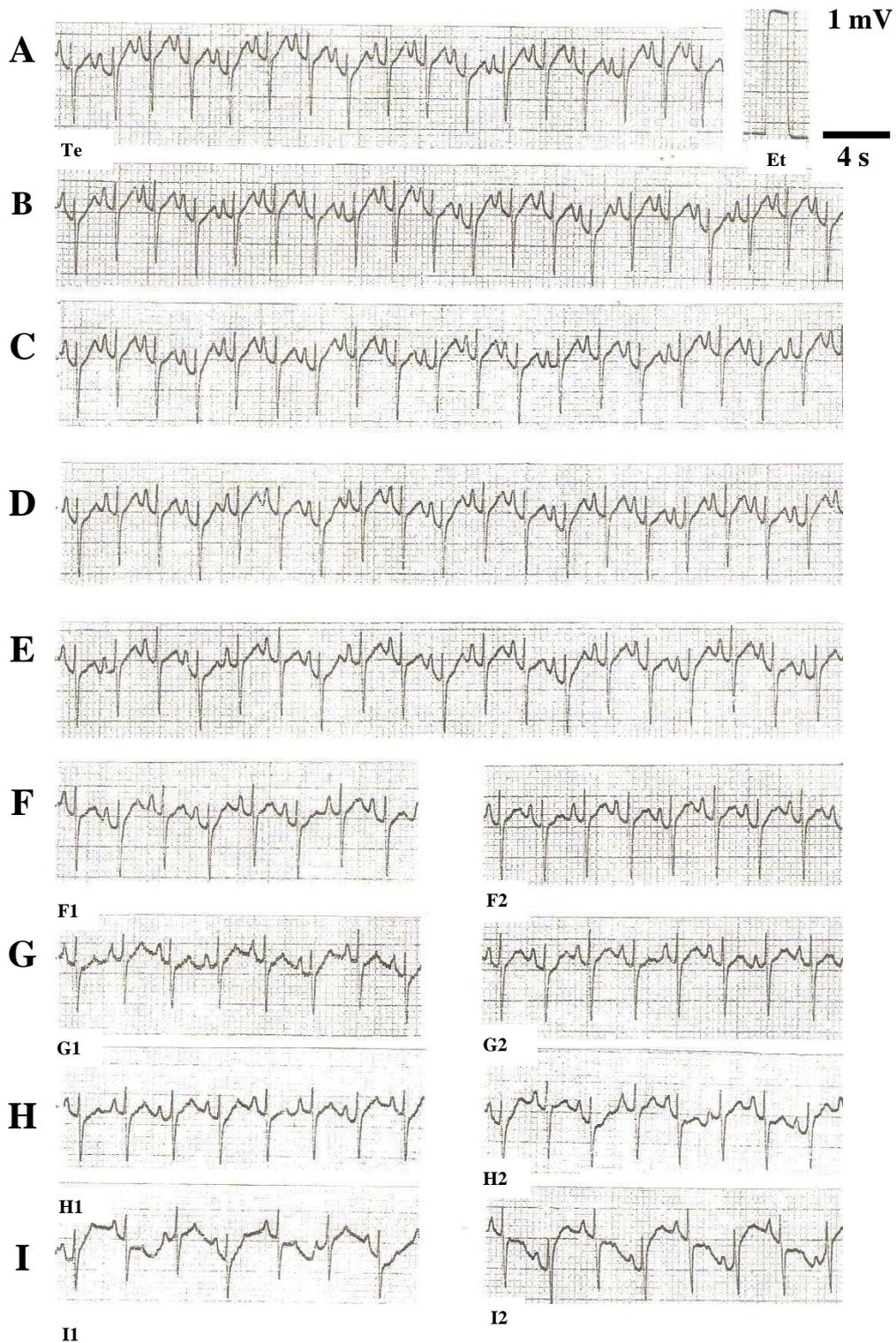
Pour les doses variant de 5 à 50 mg/kg P.C., les effets de *AJse* sur le complexe QRS sont variables. En effet :

- les doses de *AJse* inférieures à 30 mg/kg P.C. font apparaître une augmentation de l'amplitude du complexe QRS ( $15,4 \pm 2,5$  % d'augmentation pour la dose de 20 mg/kg P.C.) ;
- par contre, la dose de *AJse* de 30 mg/kg P.C. entraîne, transitoirement, une baisse du complexe QRS de  $12,25 \pm 2,4$  %, puis survient une augmentation de ce complexe de  $6,1 \pm 1,7$  % ;



**Figure 44 : enregistrement de l'ECG normal montrant les différentes ondes, intervalles et segments**

(D'après <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:SinusRhythmLabels.svg>)



**Figure 45 : effets dose-réponse de AJse sur l'ECG de lapin**

**A** - Enregistrement témoin (Te) de l'ECG normal et étalonnage (Et)

**B à I** - Effets de AJse à 1,25 (B) ; 2,5 (C) ; 5 (D) ; 10 (E) ; 20 (F) ; 30 (G) ; 40 (H) et 50 (I)  
mg/kg de poids corporel

**F1, G1, H1 et I1** - Effets après 15 s

**F2, G2, H2 et I2** - Effets après 3 min

- une dose de *AJse* de 40 mg/kg P.C. et les doses supérieures induisent uniquement une diminution de l'amplitude du complexe QRS. En plus, ces doses entraînent des perturbations de la ligne isoélectrique de l'ECG qui ne reste plus stable. Ces perturbations de la ligne isoélectrique de l'ECG, induite par *AJse* à partir de la dose de 40 mg/kg de poids corporel, s'accroissent avec l'augmentation de la dose de l'extrait et l'onde T tend à disparaître en administrant des doses supérieures à 40 mg/kg P.C.

Les effets sur l'ECG des doses de *AJse* variant de 5 et 30 mg/kg P.C. sont totalement réversibles. La diminution des paramètres de l'ECG sont partiellement réversibles avec la dose de *AJse* de 40 mg/kg P.C. et irréversibles pour les doses plus fortes.

Le **tableau XI** donne, pour une expérience type, les variations de l'amplitude des ondes P et T, du complexe QRS et de la fréquence de l'ECG en fonction de la dose de *AJse* administrée au lapin.

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 1 – 2. Effets de doses uniques de *AJse* sur l'ECG de lapin**

Les **figures 46, 47, et 48** représentent les effets en fonction du temps de l'injection de doses uniques de *AJse*, respectivement à 20, 30 et 40 mg/kg de poids corporel sur l'ECG de lapin. Ces doses représentent celles qui induisent les trois types d'effets de cet extrait sur l'ECG.

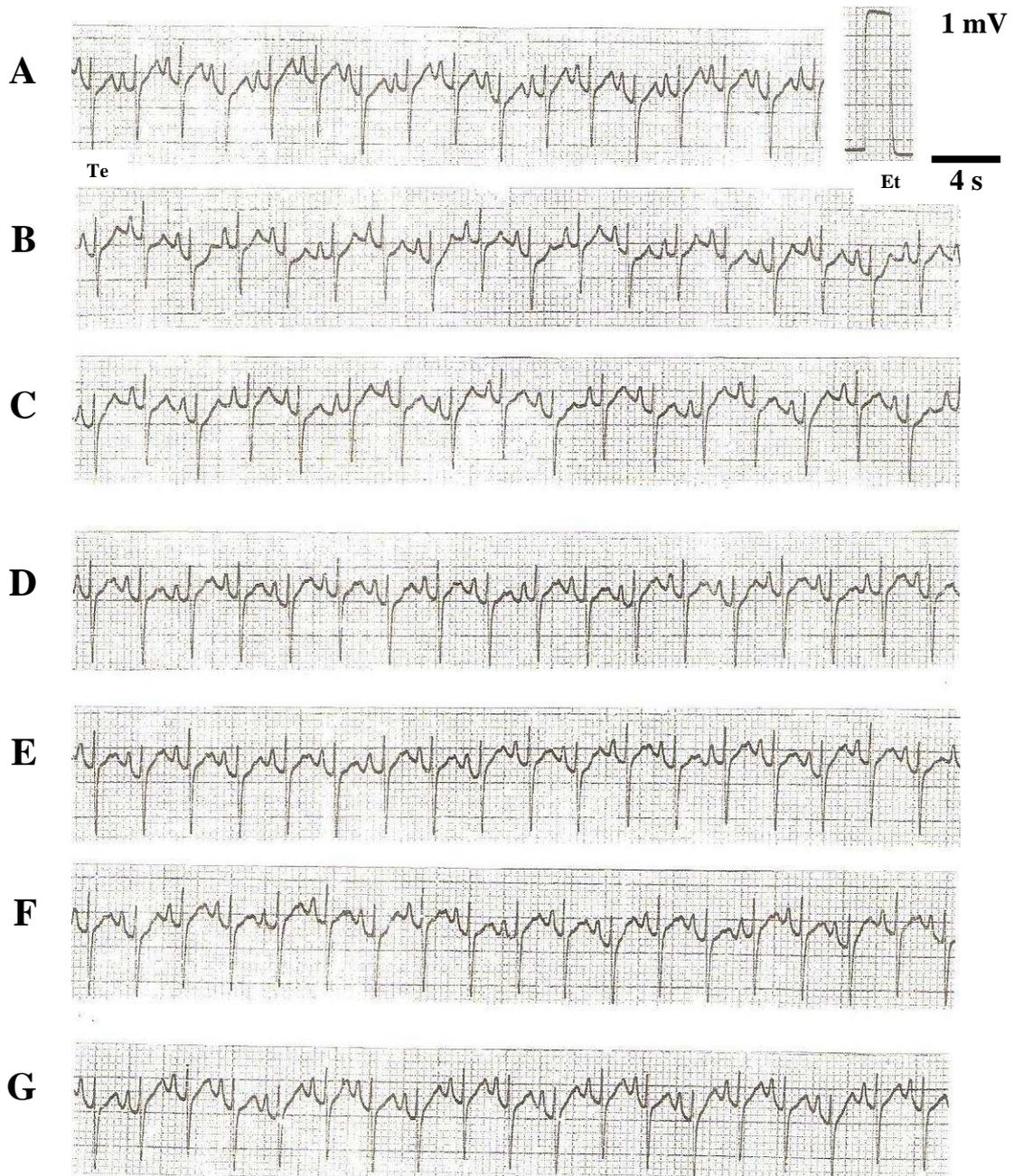
En effet, ces doses de *AJse* induisent une diminution dose-dépendante de l'amplitude des ondes P et T et une diminution de la fréquence cardiaque. En plus de ces effets, *AJse* fait apparaître :

- à 20 mg/kg P.C., une augmentation de l'amplitude du complexe QRS, et ces effets sont totalement réversibles, moins de 5 min après d'administration de l'extrait ;
- à 30 mg/kg P.C., on assiste d'abord à une baisse de l'amplitude du complexe QRS, suivie, 30 secondes après, d'une augmentation de l'amplitude de ce complexe. Ces effets sont totalement réversibles moins de 10 min après d'administration de l'extrait ;
- à 40 mg/kg P.C., on observe uniquement une diminution de l'amplitude du complexe QRS. Cet effet est partiellement réversible.

Le **tableau XII** donne les effets de *AJse*, aux doses de 20, 30 et 40 mg/kg P.C., pour 4 expériences, sur l'amplitude des ondes P, T et du complexe QRS et sur la fréquence cardiaque durant 5 min.

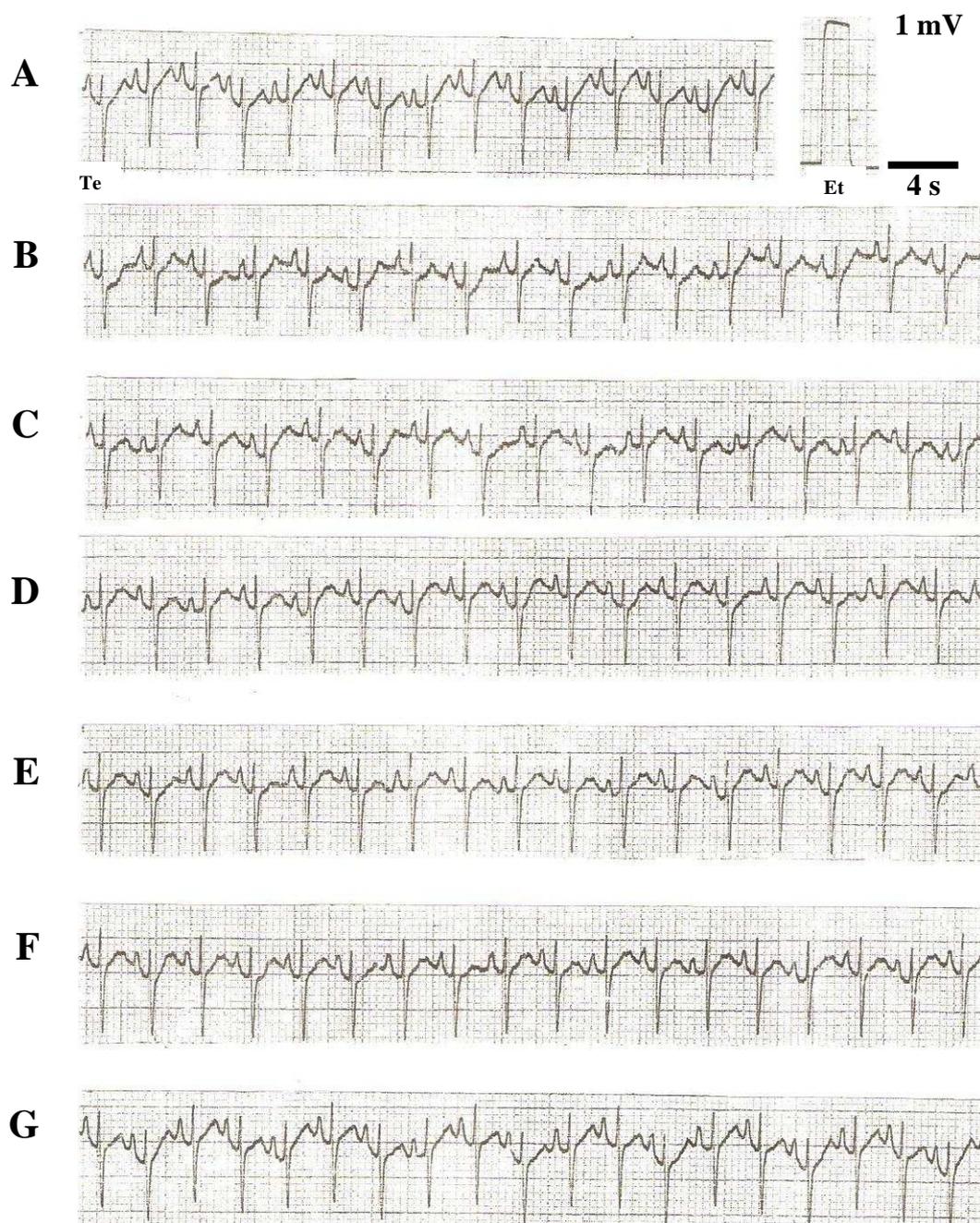
**Tableau XI : effets dose-réponse de AJse sur l'amplitude des ondes P et T, du complexe QRS et sur la fréquence de l'ECG chez le lapin**

Concentration de AJse (mg/kg P.C.)	0	1,25	2,5	5	10	20	30	40	50
<b>Paramètre de l'ECG</b>									
<b>Onde P (μV)</b>	125	125	125	125	125	100	75	62,5	50
<b>Complexe QRS (μV)</b>	650	650	650	675	675	750	600 / 725	575	550
<b>Onde T (μV)</b>	100	100	100	100	75	50	37,5	25	12,5
<b>Fréquence (cycle/min)</b>	233	233	231	225	221	203	194	190	187



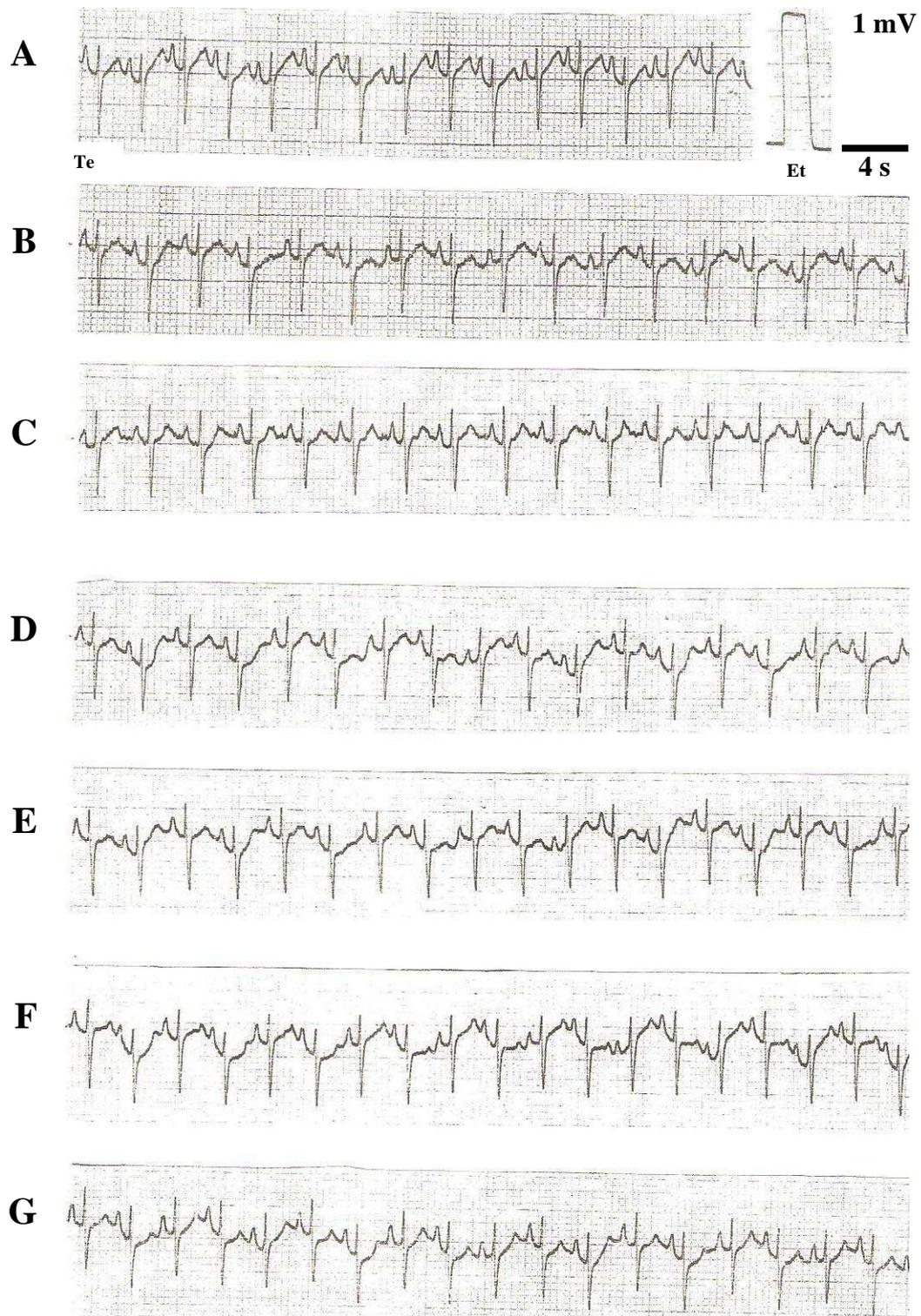
**Figure 46 : effets de AJse à 20 mg/kg de poids corporel en fonction du temps sur l'ECG de lapin**

- A** - Enregistrement témoin (Te) de l'ECG normal et étalonnage (Et)  
**B à G** - Effets de AJse à 20 mg/kg de poids corporel sur l'ECG après 15 s (B) ; 30 s (C) ; 45 s (D) ; 1 min (E) ; 3 min (F) et 5 min (G)



**Figure 47 : effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel en fonction du temps sur l'ECG de lapin**

- A** - Enregistrement témoin (Te) de l'ECG normal et étalonnage (Et)  
**B à F** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel sur l'ECG après 15 s (B) ; 30 s (C) ; 45 s (D) ; 1 min (E) ; 3 min (F) et 5 min (G)



**Figure 48 : effets de AJse à 40 mg/kg de poids corporel en fonction du temps sur l'ECG de lapin**

**A** - Enregistrement témoin (Te) de l'ECG normal et étalonnage (Et)

**B à F** - Effets de AJse à 40 mg/kg de poids corporel sur l'ECG après 15 s (B) ; 30 s (C) ; 45 s (D) ; 1 min (E) ; 3 min (F) et 5 min (G)

**Tableau XII : effets durant 5 min de doses uniques de AJse sur l'amplitude des ondes P et T, du complexe QRS et sur la fréquence de l'ECG chez le lapin (n = 4)**

Concentration de AJse	Temps Paramètre de l'ECG	0 s	15 s	30 s	45 s	1 min	3 min	5 min
		Effets de AJse (%)						
<b>20 mg/kg P.C.</b>	Onde P	0	- 10 ± 2,4 **	- 20 ± 3,2 ***	- 10 ± 1,4 **	- 10 ± 1,8 *	0 ns	0 ns
	Complexe QRS	0	0 ns	+ 3,8 ± 0,7 ns	+15,4 ± 1,2 ***	+11,5 ± 2,1 ***	+ 7,7 ± 1,5 **	0 ns
	Onde T	0	- 37,5 ± 3,5 ***	- 50 ± 4,2 ***	- 50 ± 2,5 ***	- 50 ± 3,4 ***	- 25 ± 2,6 ***	0 ns
	Fréquence	0	- 6,2 ± 2,5 ns	- 12,6 ± 2,6 **	- 9,8 ± 2,4 *	- 7,7 ± 2,1 ns	- 3,6 ± 2,5 ns	0 ns
<b>30 mg/kg P.C.</b>	Onde P	0	- 10 ± 2,1 *	- 30 ± 2,3 ***	- 40 ± 3,1 ***	- 20 ± 2,6 ***	- 10 ± 2,4 *	- 5 ± 3,5 ns
	Complexe QRS	0	- 11,5 ± 2,1 *	- 7,7 ± 1,3 ns	+ 7,7 ± 2,2 ns	+ 11,5 ± 3,1 *	+ 7,7 ± 3,5 ns	+ 7,7 ± 2,3 ns
	Onde T	0	- 37,5 ± 4,5 ***	- 50 ± 3,7 ***	- 75 ± 4,1 ***	- 75 ± 5,2 ***	- 50 ± 4,1 ***	- 37,5 ± 3,6 ***
	Fréquence	0	-11,6 ± 1,7 *	- 16,7 ± 3,1 **	- 13,7 ± 2,7 **	-11,5 ± 1,8 *	- 9,5 ± 2,1 *	- 8,8 ± 3,4 *
<b>40 mg/kg P.C.</b>	Onde P	0	- 20 ± 2,6 ***	- 30 ± 3,7 ***	- 50 ± 2,8 ***	- 40 ± 3,5 ***	- 20 ± 3,4 ***	- 40 ± 4,6 ***
	Complexe QRS	0	- 3,8 ± 2,5 ns	- 6,2 ± 2,7 ns	- 11,5 ± 3,1 *	- 7,7 ± 2,2 ns	- 7,7 ± 1,8 ns	- 3,8 ± 1,7 ns
	Onde T	0	- 75 ± 3,5 ***	- 50 ± 4,6 ***	- 75 ± 3,3 ***	- 87,5 ± 3,8 ***	- 75 ± 2,6 ***	- 87,5 ± 4,3 ***
	Fréquence	0	- 12,2 ± 3,2 *	- 17,9 ± 3,4 ***	- 10,5 ± 2,8 *	- 9,2 ± 2,4 *	- 11,4 ± 1,9 *	- 11,8 ± 2,3 *

ns P > 0.05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001

- : diminution                      + : augmentation

## **IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 2. Effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur les contractions du cœur isolé de rat**

### **IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 2 – 1. Effets de AJse sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat**

Les effets de AJse sur l'amplitude et la fréquence des contractions cardiaques ont été étudiés en perfusant le cœur isolé avec des doses de cet extrait allant de 20<sup>-20</sup> à 10<sup>-2</sup> mg/ml.

Il ressort de cette étude que AJse, pour des concentrations inférieures à 10<sup>-18</sup> mg/ml, est sans effet sur les contractions cardiaques.

Pour les doses supérieures à 10<sup>-18</sup> mg/ml, AJse entraîne une réduction de la fréquence des contractions. Ces effets sur la fréquence des contractions sont faibles (moins de 16 % de réduction). A ces doses, les effets de l'extrait sont plus perceptibles et variables sur l'amplitude des contractions. En effet, les effets de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat varient selon 5 gammes de concentrations de cet extrait.

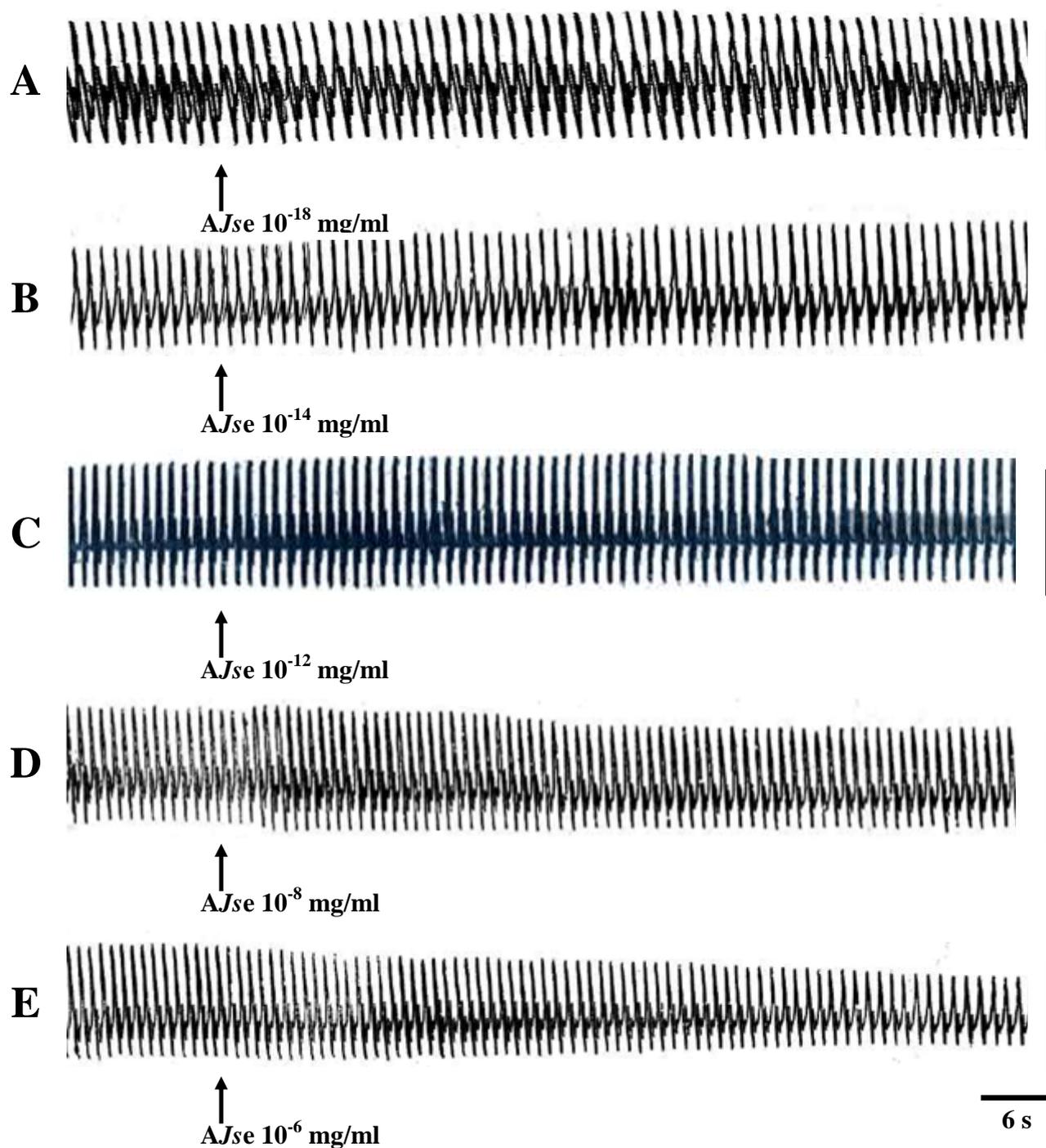
La **figure 49** présente des enregistrements types montrant les 5 effets différents de AJse, en fonction de la dose, sur les contractions du cœur isolé de rat.

- La concentration de 10<sup>-18</sup> mg/ml est la dose minimale de AJse agissant sur le cœur. Cela se traduit par une faible augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques de l'ordre de  $7,7 \pm 1,6$  % (**figure 49-A**). A cette dose, l'effet de l'extrait sur la fréquence des contractions n'est pas significatif ( $p > 0,05$ ).

- Pour des doses entre 10<sup>-16</sup> et 10<sup>-14</sup> mg/ml, AJse induit une augmentation de l'amplitude et une baisse de la fréquence des contractions du cœur. La **figure 49-B** qui représente les effets de AJse à la dose de 10<sup>-14</sup> mg/ml est un enregistrement type des effets de cet extrait dans cette gamme de concentration. A cette dose, AJse induit des effets inotrope positif et chronotrope négatif.

- Pour la dose de AJse de 10<sup>-12</sup> mg/ml (**figure 49-C**), des effets inotrope positif et chronotrope négatif sont également observés dans un premier temps et, par la suite, cet extrait n'a plus d'effet sur l'amplitude des contractions cardiaques qui revient à la normale et il ne subsiste qu'un effet chronotrope négatif.

- Dans la gamme de concentrations de 10<sup>-10</sup> à 10<sup>-8</sup> mg/ml, les effets de AJse sur les contractions se traduisent d'abord par des effets inotrope positif et chronotrope négatif, puis l'amplitude des contractions diminue et il apparaît des effets inotrope et chronotrope négatifs. La **figure 49-D** est un enregistrement type montrant les effets de AJse à 10<sup>-8</sup> mg/ml.



**Figure 49 : effets dose-réponse de AJse sur les contractions du cœur isolé de rat**

Enregistrements témoins (avant les flèches) et effets de AJse à  $10^{-18}$  (A),  $10^{-14}$  (B),  $10^{-12}$  (C),  $10^{-8}$  (D) et  $10^{-6}$  (E) mg/ml.

A cette dose, il apparaît, au début de la perfusion du cœur avec cet extrait, des effets inotrope positif et chronotrope négatif, et dans un second temps, des effets inotrope et chronotrope négatifs.

- Les effets des doses de *AJse* supérieures à  $10^{-8}$  mg/ml se traduisent uniquement par des effets inotrope et chronotrope négatifs. La **figure 49-E**, qui est un enregistrement type des effets de *AJse* à la dose de  $10^{-6}$  mg/ml, montre les effets de cet extrait sur les contractions cardiaques dans la gamme de doses variant de  $10^{-8}$  à  $10^{-2}$  mg/ml. A cette dose de  $10^{-6}$  mg/ml, *AJse* induit des effets inotrope et chronotrope négatifs de  $32,4 \pm 4,7$  % et  $13,2 \pm 2,5$  % respectivement.

Le **tableau XIII** donne les effets de *AJse*, en fonction de la dose, sur l'amplitude et la fréquence des contractions du cœur isolé de rat ( $n = 4$ ).

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 2 – 2. Effets de *AJse* sur le débit coronaire du cœur isolé de rat**

Il ressort de cette étude que le *AJse*, pour des doses inférieures à  $10^{-16}$  mg/ml, n'a pas d'effet notable sur le débit coronaire cardiaque qui reste quasiment constant avec une valeur de  $1,09 \pm 0,26$  ml/min. Pour les doses de *AJse* variant de  $10^{-16}$  à  $10^{-12}$  mg/ml le débit coronaire diminue avec une réduction maximale à la dose de *AJse* de  $10^{-16}$  mg/ml ( $41,6 \pm 6,5$  % de réduction). Dans cette gamme de concentration de *AJse*, la réduction du débit coronaire est inversement proportionnelle à l'augmentation de la dose de l'extrait et varie de  $41,6 \pm 6,5$  % (à  $10^{-16}$  mg/ml) à  $14,7 \pm 4,2$  % (à  $10^{-12}$  mg/ml).

Les doses de *AJse* supérieures à  $10^{-12}$  mg/ml entraînent une augmentation dose-dépendante du débit coronaire cardiaque, allant de  $14,9 \pm 6,5$  % à  $80,7 \pm 7,3$  % pour des doses de *AJse* qui varient de  $10^{-10}$  à  $10^{-2}$  mg/ml.

Le **tableau XIV** indique les effets de *AJse* sur le débit coronaire cardiaque de rat pour 4 expériences.

**Tableau XIII : effets dose-réponse de AJse sur l'amplitude et la fréquence des contractions du cœur isolé de rat (n = 4)**

Concentration de AJse	Effets sur l'amplitude et la fréquence des contractions cardiaques
< 10 <sup>-18</sup> mg/ml	Sans effet
10 <sup>-18</sup> mg/ml	I + (+ 7,7 ± 1,6 %)
10 <sup>-16</sup> à 10 <sup>-14</sup> mg/ml	I + (+ 12,3 ± 2,5 % à + 20,6 ± 3,8 %) et C - (- 3,2 ± 1,4 % à - 8,5 ± 2,4 %)
10 <sup>-12</sup> mg/ml	I + (+ 10,4 ± 3,5 %) et C - (- 9,2 ± 4,6 %) puis C - (- 10,7 ± 3,5 %)
10 <sup>-10</sup> à 10 <sup>-8</sup> mg/ml	I + (+ 7,7 ± 1,6 % à + 4,5 ± 3,2 %) et C - (- 9,5 ± 3,5 % à - 10,8 ± 2,8 %) puis I - (- 5,4 ± 2,2 % à - 11,5 ± 2,4 %) et C - (- 11,2 ± 3,3 % à - 12,3 ± 4,3 %)
> 10 <sup>-8</sup> mg/ml	I - (≥ - 32,4 ± 4,7 %) et C - (≥ - 13,2 ± 2,5 %)

I + : effet inotrope positif

I - : effet inotrope négatif

C + : effet chronotrope positif

C - : effet chronotrope négatif

**Tableau XIV : variations du débit coronaire du cœur isolé de rat en fonction de la dose de AJse (n = 4)**

Concentration de AJse (mg/ml)	10 <sup>-18</sup>	10 <sup>-16</sup>	10 <sup>-14</sup>	10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>
Effets sur le débit coronaire cardiaque (%)	0	- 41,6 ± 6,5 ***	- 25,2 ± 4,6 **	- 14,7 ± 4,2 *	+ 18,9 ± 6,3 *	+ 32,8 ± 7,3 **	+ 47,9 ± 5,5 ***	+ 56,2 ± 8,1 ***	+ 80,7 ± 7,3 ***

\* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001

- : diminution du débit

+ : augmentation du débit

### **IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 3. Discussion**

L'étude des effets de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur l'activité cardiaque a été réalisée en testant cet extrait sur l'activité électrique globale du cœur (ECG) "in situ" de lapin et sur les contractions rythmiques du cœur isolé de rat.

L'analyse de l'électrocardiogramme comprend la mesure de la fréquence, des amplitudes et durées des ondes P et T, du complexe QRS, des intervalles PR et QT et du segment ST, ainsi que l'examen de la morphologie de ces ondes (Fisch, 1980 ; Wellens, 1986 ; Pipberger *et al.*, 1990).

De l'analyse de l'ECG, avant et après administration de *AJse*, il ressort que cet extrait n'a pas d'effet notable sur les intervalles séparant les ondes, mais agit essentiellement sur l'amplitude de ces ondes et sur la fréquence cardiaque.

Ces intervalles et segments du tracé électrocardiographique sont des paramètres importants, permettant d'évaluer la normalité ou non de l'espace entre 2 évènements électriques (Kent, 1914 ; Mann, 1920 ; Durrer, 1968 ; Pipberger *et al.*, 1990 ; Li *et al.*, 1995). En effet, l'intervalle PR correspond au délai entre la dépolarisation des oreillettes et celle des ventricules (temps de conduction auriculo-ventriculaire) ou encore le temps de propagation de l'onde de dépolarisation (à travers les oreillettes, le nœud atrio-ventriculaire, le faisceau de His, ses branches et le réseau de Purkinje) aux cellules myocardiques ventriculaires, jusqu'au début de l'activation ventriculaire. Il est le témoin du temps nécessaire à la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules. L'intervalle QT, qui va du début de l'excitation des ventricules jusqu'à la fin de leur relaxation, correspond au temps de systole ventriculaire

Le segment ST représente le temps de stimulation complète des ventricules correspondant à la phase 2 de la repolarisation ventriculaire, phase pendant laquelle les cellules ventriculaires sont toutes dépolarisées (Luo et Rudy, 1994).

Le cœur est le centre d'une activité électrique intense à l'origine de la contraction cardiaque (Waller, 1887). L'activité électrique globale du cœur, due à une dépolarisation de la membrane des cellules cardiaques, exprime les variations de potentiel pendant le cycle cardiaque. L'enregistrement de ces variations de potentiel constitue l'électrocardiogramme (ECG).

Chaque cycle de dépolarisation/repolarisation du cœur correspond au passage du courant électrique des oreillettes vers les ventricules qui se contractent dans le même ordre. Sur le plan électrocardiographique, cela se traduit par l'enregistrement, toujours dans le même

ordre, des différentes ondes P, Q, R, S et T (Mann, 1920 ; Henson, 1971; Snellen, 1995 ; Guenard, 1996) qui traduisent chaque battement cardiaque, au rythme sinusal normal (Krikler, 1987 ; Hurst, 1991).

Il est connu qu'au cours du rythme sinusal normal, la dépolarisation du myocarde auriculaire procède à partir du nœud sino-auriculaire ou nœud sinusal de Keith et Flack qui est situé dans la partie supérieure de l'oreillette droite, à proximité de l'abouchement de la veine cave supérieure. De là, l'excitation se propage de proche en proche pour dépolariser toute l'oreillette droite, ensuite le septum inter-auriculaire et l'oreillette gauche, par l'intermédiaire de trois faisceaux intra-auriculaires antérieur, moyen et postérieur. C'est le faisceau antérieur (faisceau de Bachman) qui donne une branche rejoignant l'oreillette gauche et assurant ainsi la conduction inter-auriculaire. La dépolarisation des oreillettes se traduit par l'onde P. Cette dépolarisation auriculaire précède et déclenche la contraction (systole) auriculaire (Bers, 2002).

La dépolarisation va ensuite traverser le nœud auriculo-ventriculaire avant de gagner le faisceau de His. Cette traversée est freinée, ralentie, et l'amplitude de la dépolarisation est trop faible pour pouvoir être visible sur l'ECG. De ce fait, l'onde P est suivie d'un retour à la ligne isoélectrique qui est la traduction électrocardiographique du passage nodal.

Les trois faisceaux auriculaires se rejoignent à la partie postéro-basale du septum inter-auriculaire, en avant de l'abouchement du sinus coronaire, y formant le nœud auriculo-ventriculaire d'Aschoff-Tawara par où passe l'activation. A son extrémité inférieure, les fibres conductrices se réunissent en faisceaux parallèles pour former le faisceau de His. Le tronc commun du faisceau de His court le long de la partie postéro-inférieure du septum inter-ventriculaire membraneux et, après un court trajet, au sommet du septum inter-ventriculaire musculaire, il se divise en deux branches principales. Les deux branches du faisceau de His envoient d'innombrables ramifications à l'intérieur de la musculature septale et sous l'endocarde ventriculaire gauche et droit. Ces fines ramifications forment le réseau de Purkinje dont la trame s'étend pratiquement à toutes les couches sous-endocardiques des ventricules, un peu moins au niveau de leur partie postéro-supérieure.

Après le passage nodo-hissien débute la dépolarisation ventriculaire au niveau du septum. Ce dernier est dépolarisé en commençant par son endocarde gauche pour se poursuivre vers son endocarde droit ; puis les deux ventricules se dépolarisent simultanément. Cela se traduit par un complexe polyphasique : le complexe QRS qui est le ventriculogramme

ou potentiel d'action ventriculaire (Cain *et al.*, 1996). Cette dépolarisation ventriculaire précède et déclenche la systole ventriculaire (Bers, 2002).

La dépolarisation ventriculaire ayant permis la contraction ventriculaire, le myocarde doit retrouver ses conditions antérieures au phénomène qui lui permettent à nouveau le cycle dépolarisation/contraction : c'est la repolarisation (Yan *et al.*, 2003 ; Hlaing *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2009 ; Xue *et al.*, 2010). Elle est inscrite sur l'ECG par l'onde T. Cette repolarisation ventriculaire précède le relâchement musculaire ou diastole (Brutsaert et Sys, 1989).

La courbe ainsi enregistrée représente les variations des courants de dépolarisations et de repolarisations des tissus auriculaires et ventriculaires, au cours de chaque cycle cardiaque (Durrer, 1968).

L'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* agit sur le cœur en diminuant la fréquence des battements. Cette bradycardie induite par *AJse* est dose-dépendante.

La fréquence de l'ECG peut être évaluée par le nombre de complexes QRS (donc de dépolarisations des ventricules par une impulsion électrique) à chaque minute. Celle-ci correspond au nombre de battements cardiaques par minute (Durrer, 1968 ; Fisch, 1980) ; le rythme cardiaque normal étant commandé par la fréquence intrinsèque du nœud sinusal, ensemble de cellules situées dans l'oreillette droite, qui se dépolarise rythmiquement (Durrer, 1968).

La bradycardie observée en présence de *AJse* est révélatrice d'un probable trouble de la conduction cardiaque ou, plus rarement, d'un trouble du rythme cardiaque. Cet extrait n'ayant pas d'effets notables sur les intervalles séparant les différentes ondes, cette bradycardie induite par cet extrait serait d'origine sinusale, car l'électrocardiogramme montre un tracé d'aspect normal avec un rythme ralenti (Pipberger *et al.*, 1990 ; Keating et Sanguinet, 2001).

Selon Fisch (1980), les causes non-cardiaques d'une arythmie telle que la bradycardie sinusale sont habituellement secondaires à l'usage de drogue ou de médicaments (bêtabloquant, digitalique, inhibiteur calcique bradycardisant), à une endocrinopathie (Hypothyroïdie), un déséquilibre électrolytique (hypokaliémie, acidose), des facteurs situationnels tels un repos au lit prolongé, et des problèmes auto-immunitaires. L'arythmie qui apparaît suite à l'administration de *AJse* peut donc être liée à la présence dans cet extrait de composés bêtabloquants, digitaliques, inhibiteurs calcique bradycardisants.

Les effets de *AJse* sur les ondes de l'ECG se traduisent essentiellement par une diminution dose-dépendante de l'amplitude des ondes P et T et, en fonction de la dose, une augmentation ou une diminution de l'amplitude du complexe QRS.

En effet, dans la gamme de doses comprises entre 5 et 20 mg/kg P.C., *AJse* induit essentiellement une diminution de l'amplitude de l'onde T et une augmentation de celle du complexe QRS. Les effets de *AJse* sur l'onde P ne sont apparents qu'à partir de la dose de 20 mg/kg P.C., avec une faible réduction de l'amplitude de cette onde. L'onde P correspond à la dépolarisation (et la contraction) des oreillettes depuis le nœud sinusal vers le nœud atrio-ventriculaire, le complexe QRS indique la dépolarisation (et la contraction) des ventricules et l'onde T est consécutive au courant de repolarisation (et la relaxation) des ventricules.

L'augmentation de l'amplitude du complexe QRS pour certaines doses de *AJse* traduit une augmentation de la dépolarisation ventriculaire (Kadambe *et al.*, 1999) et donc une augmentation de sa contraction et justifierait ainsi une augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques en présence de certaines doses de cet extrait. En effet, une action cardiotonique est également observée sur les contractions cardiaques en présence de faibles doses de *AJse*. Cet extrait, à la dose de  $10^{-18}$  mg/ml, fait apparaître un effet cardiotonique qui se traduit par une augmentation de l'amplitude des contractions du cœur isolé et perfusé de rat.

A la dose de 10 mg/kg P.C., *AJse* induit, en plus de l'augmentation de l'amplitude du complexe QRS, une diminution de l'amplitude de l'onde T. Cette diminution indique une réduction de la repolarisation ventriculaire et pourrait expliquer la baisse de la fréquence des battements cardiaques. Les effets inotropes positifs et chronotropes négatifs, induits par *AJse* pour certaines doses, laissent supposer l'existence dans cet extrait de composés de type digitalique. Cet effet "digitalique-like" est également observé sur les contractions cardiaques. En effet, les doses de *AJse* de  $10^{-16}$  à  $10^{-14}$  mg/ml font apparaître une augmentation de l'amplitude et une diminution de la fréquence des contractions du cœur isolé et perfusé de rat.

Ces effets inotrope positif et chronotrope négatif entraînés par *AJse* sont semblables à ceux des substances cardiotoniques telles que l'extrait chloroformique des écorces de *Mansonia altissima* (Guede-Guina et Attias, 1977 ; Aka, 1980 ; Allam *et al.*, 1990), la digoxine (Allam *et al.*, 1990 ; Mensah, 1992 ; Itsuo *et al.*, 1996), la mansonine (Ehile *et al.*, 1990 ; Mensah, 1992 ; Guede-Guina *et al.*, 1995). Ces substances ont surtout une activité inhibitrice de l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  qui provoque l'augmentation de l'amplitude des

contractions des fibres myocardiques des Mammifères, suite à une intensification de l'influx calcique (Coraboeuf, 1960 ; Rougier *et al.*, 1968 ; Aka, 1980 ; Ehile, 1983). Cette propriété des glycosides cardiotoniques est concomitante à l'effet chronotrope négatif qui résulterait alors d'une intensification du flux sortant potassique entraînant ainsi une baisse de l'excitabilité du muscle cardiaque (Vassort et Rougier, 1972). Il ne faut pas ignorer qu'en plus, l'activation de l'influx calcique entraîne une sortie massive de  $K^+$  ; ce qui induit donc une hyperpolarisation de la membrane et une baisse de la fréquence des contractions mécaniques (Lenfant *et al.*, 1968 ; Fauconnier *et al.*, 2003 ; Perrier *et al.*, 2004 ; Richard *et al.*, 2007).

Cependant, nos études phytochimiques n'ont pas montré la présence de glycosides cardiaques dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*. Les effets cardiotoniques et ceux de type digitalique ne relèveraient donc pas de ceux de glycosides cardiotoniques, mais d'autres composés contenus dans cet extrait.

Les doses de *AJse* supérieures à 20 mg/kg P.C., induisent la diminutions de toutes les ondes de l'ECG.

Les réductions des amplitudes de l'onde P, du complexe QRS et de l'onde T indiquent des réductions respectives de la dépolarisation auriculaire, de la dépolarisation ventriculaire et de la repolarisation ventriculaire (Durrer, 1968 ; Fisch, 1980 ; Pipberger *et al.* 1990). Ces réductions de dépolarisations et repolarisation induites par l'extrait seraient à l'origine d'une baisse de l'activité cardiaque. Dans cette gamme de concentration, *AJse* est ainsi exclusivement cardioinhibiteur.

La cardioinhibition induite par *AJse* est mise en évidence, au niveau des contractions cardiaques, pour les fortes doses de cet extrait.

Il est en effet connu que les courants électriques qui circulent dans le cœur entraînent des potentiels électriques et sont responsables de l'activité musculaire cardiaque. Chaque cycle de dépolarisation/repolarisation du cœur a pour conséquence de permettre la contraction cardiaque. Ainsi, l'inhibition de l'activité électrique induite par *AJse* et mise en évidence par les réductions de la fréquence cardiaque et de l'amplitude des ondes P, T et du complexe QRS, justifie les effets inotropes et chronotropes négatifs induits par cet extrait sur les contractions du cœur isolé et perfusé de rat pour des doses de cet extrait supérieures à  $10^{-12}$  mg/ml.

Les effets variés de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, en fonction de la dose de l'extrait administré, sur les contractions rythmiques du cœur, suggèrent que *AJse* contient

plusieurs composés dont certains seraient cardioactivateurs et d'autres cardiodépresseurs, avec des effets dominants pour les composés cardiotoniques pour les faibles doses ( $10^{-18}$  à  $10^{-14}$  mg/ml) et des effets cardioinhibiteurs prédominants pour les doses plus fortes (supérieures à  $10^{-8}$  mg/ml). Les doses intermédiaires entraînent, transitoirement, des effets cardiotoniques suivis d'effets cardioinhibiteurs. L'action des composés cardiotoniques serait donc précoce ; celles des composés cardioinhibiteurs s'installent tardivement, avec un effet prépondérant.

Les effets de *AJse*, qui diffèrent en fonction de la dose, sont également observés au niveau du débit coronaire. En effet, la mesure du débit coronaire fait apparaître, pour des doses de *AJse* inférieures à  $10^{-12}$  mg/ml, une diminution de ce paramètre, alors que les doses supérieures induisent son augmentation.

Dans la technique d'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé et perfusé qui dérive de celle de Langendorff (1895), le cœur est perfusé en lui faisant parvenir le liquide nourricier par la circulation coronaire qui fournit la totalité du sang qui irrigue le myocarde. Les artères coronaires, au nombre de 2 (droite et gauche), sont des branches de l'aorte dont elles se détachent à un niveau un peu supérieur de celui du bord libre des valvules sigmoïdes. Elles cheminent à la surface du cœur, dans le sillon cardiaque, et se ramifient pour pénétrer à l'intérieur du myocarde. Elles ont une partie de leur trajet à la surface du cœur et donnent naissance à des artérioles qui pénètrent dans le myocarde perpendiculairement à la surface épocardique. Dans la technique de perfusion, la solution physiologique parvient dans l'aorte sous une pression suffisante (quelques cm Hg). Ainsi, les valvules sigmoïdes se ferment, le liquide emprunte donc le circuit coronaire et, après l'avoir traverser, aboutit dans l'oreillette droite, puis dans le ventricule droit avant d'être déversé à l'extérieur.

Dans la gamme de concentration allant de  $10^{-16}$  à  $10^{-12}$  mg/ml, *AJse* induit une diminution du débit coronaire cardiaque. Cette diminution pourrait être relative à une constriction des coronaires. De même, l'augmentation du débit coronaire, pour des doses de *AJse* variant de  $10^{-10}$  à  $10^{-2}$  mg/ml, pourrait provenir d'une vasodilatation. Ainsi, pour les faibles doses, *AJse* induirait une vasoconstriction et donc une diminution du débit coronaire. Par contre, les effets de cet extrait pour les fortes doses seraient une vasodilatation, et donc un écoulement plus aisé du liquide nourricier dans les coronaires (Segal, 2005), et ainsi une augmentation du débit coronaire (L'Abbate *et al.*, 2002 ; Wei et Kaul, 2004).

Cette action vasodilatatrice de *AJse* au niveau coronaire qui augmente le débit coronaire favoriserait un apport en oxygène au myocarde. Les actions inotrope et chronotrope

négatives de cet extrait sur les contractions cardiaques diminueraient la consommation myocardique en oxygène. Ces deux actions de *AJse* auraient l'avantage de rendre cet extrait aqueux brut de *Justicia secunda* potentiellement anti-ischémique.

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 2. Effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur les contractions de l'artère aorte isolée de cobaye**

Le but de ces expériences est d'étudier les effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur la force contractile du muscle lisse aortique. Pour cela, différentes doses de *AJse* sont cumulativement administrées aux fragments d'artères aortes isolées de cobaye, intacts ou dépourvus d'endothélium.

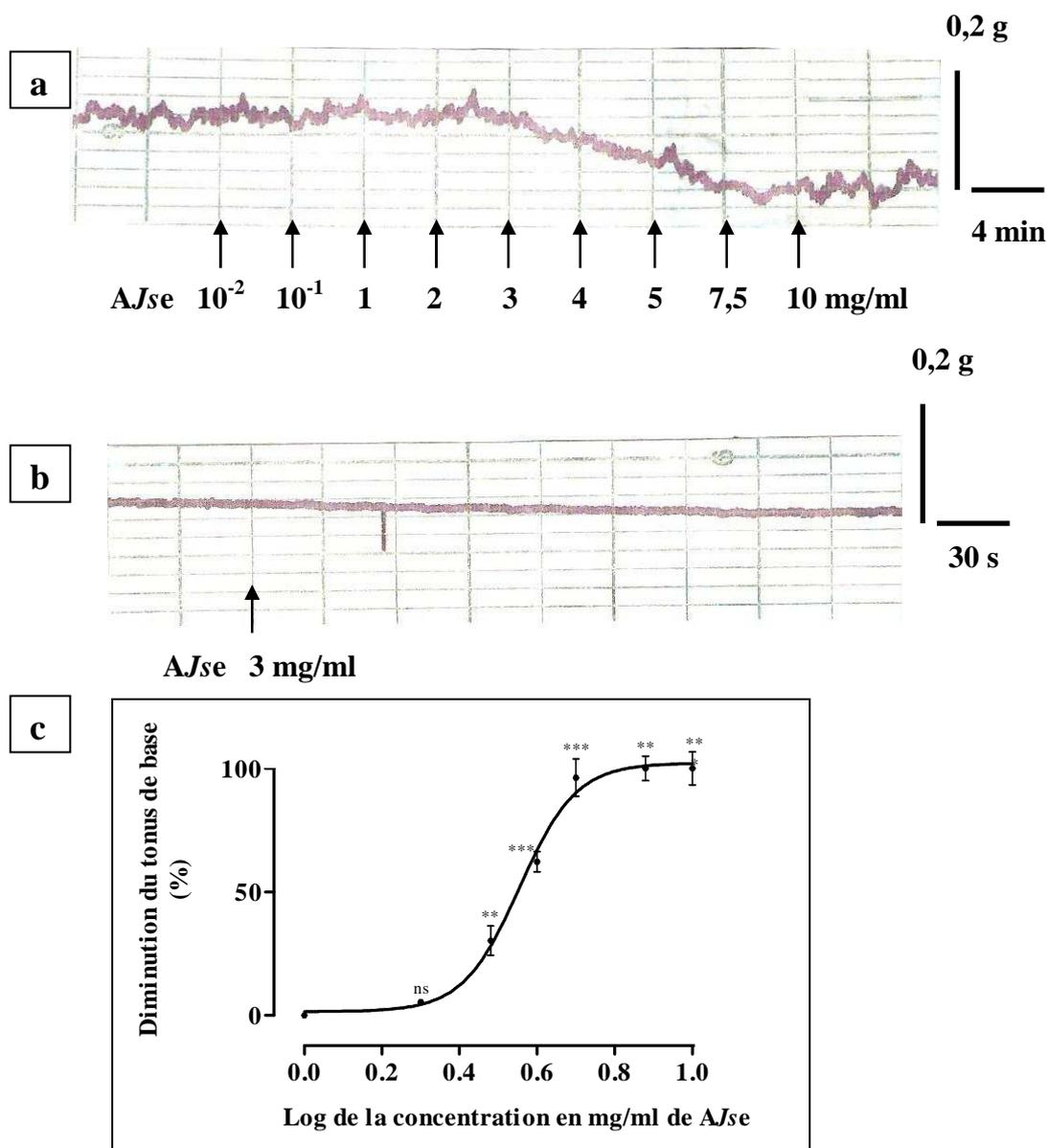
##### **IV<sub>1</sub> – 4 – 2 – 1. Effets dose-réponse de *AJse* sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée intacte de cobaye**

Des doses croissantes et cumulées de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, variant de  $10^{-2}$  à 10 mg/ml, ont été testées sur des fragments de l'artère aorte isolée de cobaye, dont l'endothélium est resté intact. Les résultats de cette série d'expériences sont présentés par la **figure 50**. Cette figure montre en (a) et (b) deux enregistrements types des effets de *AJse* sur les contractions toniques, et en (c), les résultats pour 4 expériences.

Il apparaît que, pour des doses inférieures à 2 mg/ml, *AJse* est sans effet notable sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye.

Des doses de *AJse*, allant de 2 à 7,5 mg/ml, entraînent une diminution de la force contractile de l'artère aorte isolée intacte de cobaye. Pour ces doses de *AJse*, la vasorelaxation induite est dose-dépendante, avec une baisse maximale du tonus de base de  $112,12 \cdot 10^{-3} \pm 5,6 \cdot 10^{-3}$  g à la dose de 7,5 mg/ml. Les doses de *AJse* supérieures à 7,5 mg/ml, administrées ensuite, ne modifient plus le tonus musculaire aortique qui reste stable.

La **figure 50-b** montre qu'une dose unique de *AJse* de 3 mg/ml induit une vasorelaxation de  $30,30 \cdot 10^{-3} \pm 3,7 \cdot 10^{-3}$  g après 3,5 min. A cette dose, tout comme les autres doses actives, l'effet maximum de cette substance est obtenu moins de 4 minutes après avoir administré l'extrait. C'est pourquoi les doses cumulées de *AJse* sont successivement ajoutées après 4 minutes.



**Figure 50 : effets dose-réponse de AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée intacte de cobaye**

**a – Enregistrement type**

Enregistrement témoin (avant la première flèche) et effets cumulés de AJse successivement à 0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7,5 et 10 mg/ml sur les contractions.

**b – Effet d'une dose unique de AJse**

Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de AJse à 3 mg/ml sur les contractions.

**c – Pourcentage de diminution du tonus musculaire aortique en fonction du logarithme de la concentration de AJse**

**n = 4** ; ns  $P > 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

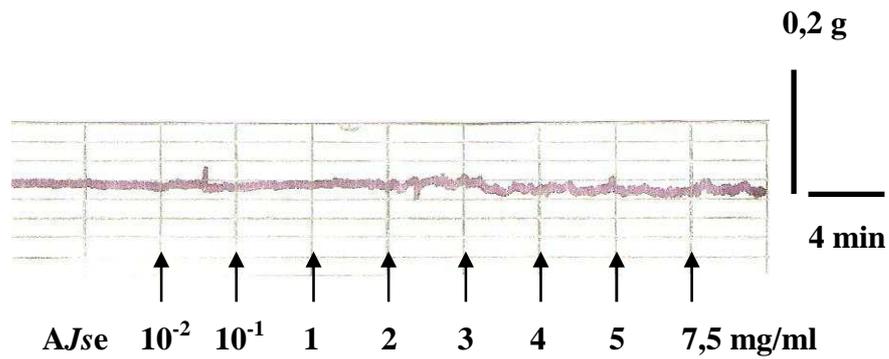
La courbe de la baisse du tonus musculaire en fonction du logarithme de la concentration de *AJse* (**figure 50-c**) est une sigmoïde qui présente un plateau pour les fortes doses de l'extrait. Cette courbe permet de déterminer pour cet extrait une concentration efficace 50 % (CE<sub>50</sub>) de 3,588 mg/ml.

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 2 – 2. Effets dose-réponse de *AJse* sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée dépourvue d'endothélium de cobaye**

Dans cette série d'expériences, des doses croissantes et cumulées de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, variant de 10<sup>-2</sup> à 7,5 mg/ml, ont été testées sur des fragments de l'artère aorte isolée de cobaye, dépourvus d'endothélium.

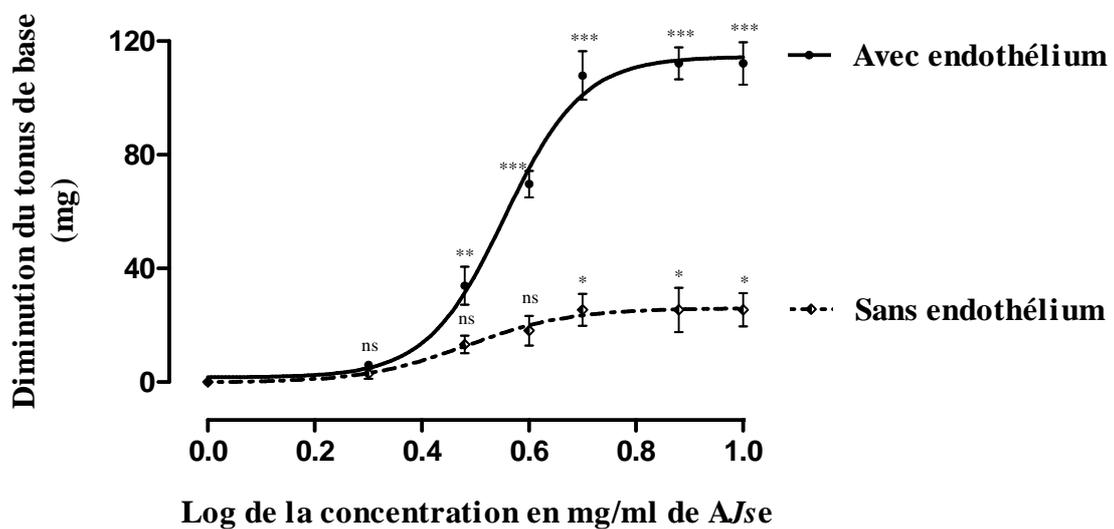
La **figure 51**, qui représente un enregistrement type des résultats de ces expériences, montre que *AJse* à partir de la concentration de 2 mg/ml, entraîne une faible diminution du tonus de base de l'artère aorte dépourvue d'endothélium. Cette diminution est dose-dépendante et est de  $25,45.10^{-3} \pm 5,8.10^{-3}$  g pour la dose maximale de *AJse* de 7,5 mg/ml.

Les valeurs obtenues pour 4 expériences ont permis de tracer les deux courbes de la **figure 52** qui présentent les effets de *AJse*, en fonction de la dose, sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye, en présence et en absence d'endothélium.



**Figure 51 : effets dose-réponse de AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye, dépourvue d'endothélium**

Enregistrement témoin (avant la première flèche) et effets cumulés de AJse successivement à 0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 et 7,5 mg/ml sur les contractions toniques.



**Figure 52 : effets dose-réponse de AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye, en présence et en absence d'endothélium**

(n = 4 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)

### IV<sub>1</sub> – 4 – 2 – 3. Discussion

L'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, pour des doses variant de 2 à 5 mg/ml, agit sur l'artère aorte isolée intacte de cobaye en diminuant ses contractions toniques. *AJse* est donc une substance vasorelaxante.

Cette relaxation des artères, induite par *AJse*, justifie l'augmentation du débit coronaire induite par de fortes doses de cet extrait sur le cœur isolé et perfusé par ses artères coronaires. Cette augmentation pourrait en effet résulter d'une relaxation de ces vaisseaux coronaires en présence de l'extrait.

Les effets vasorelaxants de *AJse* sur l'artère aorte ne sont importants que si l'endothélium de cet organe est intact. En effet, lorsque l'aorte est dépourvue d'endothélium, *AJse* a peu d'effet sur l'activité contractile du muscle lisse aortique. Il entraîne une baisse peu significative du tonus aortique. Les effets vasorelaxants de *AJse* sur le muscle lisse aortique passeraient donc par une action de cette substance sur d'endothélium vasculaire.

L'allure sigmoïde de la courbe montrant les effets de *AJse* sur le tonus musculaire de l'artère aorte intact en fonction du logarithme de la dose de l'extrait indique que l'action de *AJse* sur l'artère aorte pourrait passer par une activation de récepteurs (Miller et Tainter, 1944).

Le faible effet de *AJse* sur le tonus vasculaire de l'artère aorte isolée dépourvue d'endothélium indique que cette substance aurait peu ou pas d'effet notable sur la musculature des vaisseaux sanguins. Les récepteurs des principes actifs contenus dans *AJse* seraient donc localisés sur l'endothélium, d'où son importance dans l'action vasorelaxante de cette substance. On peut suggérer que les principes actifs de *AJse* forment un complexe qui est de type enzyme-substrat avec un facteur localisé dans l'endothélium. Cette hypothèse est en conformité avec l'évolution de la courbe de la variation de la vasorelaxation du muscle aortique en fonction de la concentration de *AJse* qui tend à se stabiliser aux fortes doses de l'extrait (supérieures à 5 mg/ml). La vasorelaxation qui demeure constante à ces fortes doses exprime l'état de saturation des complexes.

Furchgott et Zawadzki (1980) ont montré le rôle obligatoire de l'endothélium dans la relaxation vasculaire. Le rôle de l'endothélium dans la vasorelaxation a été également relevé par d'autres auteurs (Baisch *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2005). L'endothélium vasculaire est une couche de cellules tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins. De par son équipement enzymatique, l'endothélium vasculaire joue un rôle prédominant dans le contrôle de la pression artérielle et de la vasomotricité (Roupie et Berdeaux, 1992).

L'activité de l'endothélium s'étend au contrôle du tonus, de la réactivité vasculaire et la libération des médiateurs vasorelaxants. En effet, les cellules endothéliales régulent activement le tonus vasculaire basal et la réactivité dans des conditions physiologiques et pathologiques, en répondant aux forces mécaniques et aux médiateurs neuro-humoraux par la libération d'une variété de facteurs relaxants et contractants (Cosentino et Luscher, 1999). Les facteurs relaxants issus de l'endothélium (*endothelium-derived relaxing factors*, EDRF) comprennent l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline et un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*endothelium-derived hyperpolarizing factors*, EDHF). Les cellules endothéliales peuvent également produire des vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, l'endothéline-1 (ET-1), la thromboxane A2 (Quyyumi, 1998) et des promoteurs de croissance tel que la prostaglandine H2 (PGH2).

*AJse*, substance vasorelaxante, pourrait ainsi agir sur le muscle lisse aortique par l'un de ces mécanismes. Aussi, la suppression de l'endothélium inhibe l'action de cet extrait.

Les tests tri-phytochimiques ayant révélé la présence dans *AJse* de stérols qui, ayant la capacité de lutter contre l'athérosclérose, milite en faveur de l'implication dans le mécanisme d'action de cet extrait de l'oxyde nitrique. En effet, selon Ross (1993), l'oxyde nitrique est le facteur principal impliqué dans les propriétés anti-athérosclérose de l'endothélium. NO interfère « in vitro » avec des événements clé du développement de l'athérosclérose (Wever et al., 1998 ; Cosentino et Luscher, 1999), comme l'adhésion des monocytes et des leucocytes à l'endothélium, ainsi que l'interaction paroi vasculaire-plaquettes. NO décroît aussi la perméabilité endothéliale et réduit le tonus du vaisseau.

La présence des anthocyanes dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* pourrait être l'une des causes de l'effet vasodilatateur de *AJse*. En effet, Cassidy *et al.* (2011) ont montré que l'activité antihypertensive des anthocyanes pourrait être liée à un processus de vasodilatation.

Les polyterpènes mis en évidence dans *AJse*, qui sont réputés être des substances vasorelaxantes (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2004), pourraient également favoriser les effets vasorelaxants de cet extrait.

### **IV<sub>1</sub> – 4 – 3. Effets d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* sur la viscosité du sang de bœuf**

#### **IV<sub>1</sub> – 4 – 3 – 1. Effets dose-réponse de AJse sur le temps d'écoulement du sang**

La viscosité du sang est déterminée par la mesure du temps d'écoulement de 100 ml de sang de bœuf, contenant ou pas différentes doses de AJse.

Au cours de cette série d'expériences, le sang utilisé a une viscosité moyenne de degré Engler de 1,09 ; c'est-à-dire 1,09 fois celle de l'eau.

Il apparaît que, l'extrait aqueux de *Justicia secunda* additionnées au sang de bœuf, à des concentrations variant de  $5.10^{-3}$  à 24 mg/ml, induit une augmentation du temps d'écoulement du sang et donc une diminution de la vitesse d'écoulement de ce sang. Cet effet est dose-dépendant et caractérise ainsi une augmentation dose-dépendante de la viscosité sanguine.

Les valeurs de temps d'écoulement et de viscosités relatives, déterminées à partir de l'écoulement de 100 ml de sang, contenant ou pas AJse, sont données dans le **tableau XV**.

Les résultats obtenus pour 10 tests ont permis de tracer la courbe de la variation de la viscosité sanguine, exprimée en % d'augmentation de la viscosité relative, en fonction du logarithme de la concentration de AJse (**figure 53**). Cette courbe est une sigmoïde et montre qu'à partir de la dose de 20 mg/ml, la viscosité reste constante. La dose correspondante à la CE<sub>50</sub> est de 4,407 mg/ml.

Tableau XV : temps d'écoulement de 100 ml de sang de bœuf et viscosité en fonction de la concentration de AJse (n = 10)

	Concentration de AJse (mg/ml)														
	0 (T H <sub>2</sub> O)	0 (T sang)	10 <sup>-3</sup>	5.10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5.10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	5.10 <sup>-1</sup>	1	4	8	12	16	20	24
<b>Temps d'écoulement de 100 ml (s)</b>	<b>11,59</b>	<b>12,69</b>	12,70	12,93	13,01	13,10	13,36	13,49	13,61	14,27	14,81	15,26	15,98	16,13	16,13
	± <b>0,29</b>	± <b>0,46</b>	± 0,65	± 1,15	± 1,45	± 1,11	± 0,80	± 1,26	± 1,20	± 1,03	± 1,23	± 0,86	± 1,33	± 0,75	± 0,63
<b>Viscosité (D.E.)</b>	<b>1</b>	<b>1,09</b>	1,09	1,11	1,12	1,13	1,15	1,16	1,17	1,23	1,27	1,32	1,38	1,39	1,39
		± <b>0,06</b>	± 0,04	± 0,06	± 0,03	± 0,05	± 0,11	± 0,06	± 0,06	± 0,10	± 0,04	± 0,05	± 0,06	± 0,03	± 0,05

T H<sub>2</sub>O : témoins eau

T sang: témoins sang

D.E. : degré Engler

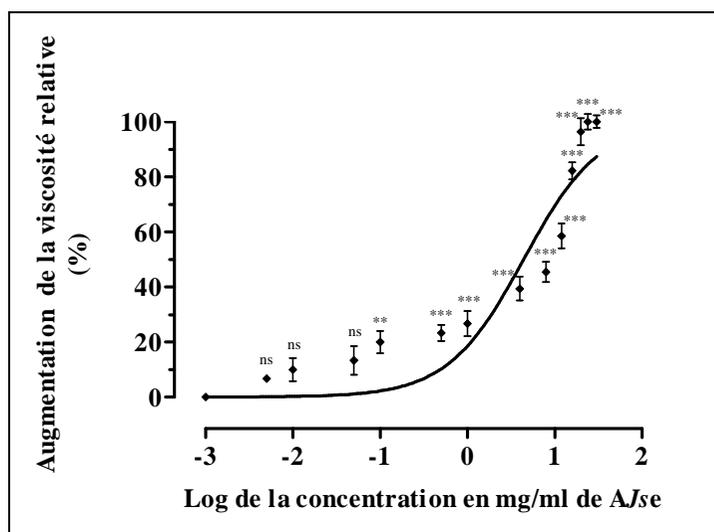


Figure 53 : augmentation de la viscosité relative du sang de bœuf en fonction de la concentration de AJse

(n = 10 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)

#### IV<sub>1</sub> – 4 – 3 – 2. Discussion

Soumis à son poids, un liquide s'écoule d'autant mieux que sa viscosité est faible. Ainsi, le temps d'écoulement, et donc la vitesse d'écoulement d'une quantité donnée de liquide est donc un indicateur de sa viscosité.

La mesure du temps d'écoulement du sang en fonction de la concentration de AJse fait ressortir que la vitesse d'écoulement du sang de bœuf, additionné de l'extrait aqueux de *Justicia secunda*, diminue avec l'augmentation de la concentration de cet extrait. En d'autres termes, AJse induit une augmentation dose-dépendante de la viscosité du sang, comparativement à celle du sang de référence. Il est donc permis de penser que AJse pourrait modifier les caractéristiques hémodynamiques "in vivo"; en particulier, la circulation sanguine dans le système cardio-vasculaire.

Une diminution de la vitesse d'écoulement du sang et donc une augmentation de la viscosité du sang qui entraînerait une augmentation de la résistance périphérique des artéioles pourrait entraîner une augmentation de la pression sanguine artérielle. Ainsi, AJse, en augmentant la viscosité du sang devrait induire une hypertension artérielle. Cependant, cet extrait entraîne un effet contraire, c'est à dire une hypotension artérielle. On peut donc suggérer que, dans l'organisme, AJse n'entraîne pas une augmentation de la résistance périphérique des artéioles.

Dans les tests physiologiques "in vivo" la résistance à l'écoulement du sang n'est pas provoquée par le frottement du sang contre les parois des vaisseaux sanguins, mais aux frottements entre les couches adjacentes du sang, c'est-à-dire le frottement interne lié à la viscosité du sang lorsque ces couches glissent l'une contre l'autre avec des vitesses différentes. En effet, les forces de cohésion entre le sang et la paroi du vaisseau sanguin empêchent le déplacement de la couche de plasma, d'épaisseur infinitésimale, directement en contact avec la paroi endothéliale. Il n'y a donc pas de glissement du sang au niveau de la paroi. Dans la quasi-totalité des vaisseaux sanguins, le sang se déplace de manière très organisée selon un écoulement linéaire ou "Poiseuillien". Les écorces de sang ou cylindres creux concentriques se déplacent avec une vitesse de plus en plus grande au fur et à mesure que l'on se déplace vers le centre axial d'un vaisseau sanguin cylindrique. La vitesse maximale du sang est donc atteinte au centre du vaisseau alors que, au niveau de la paroi, la vitesse est nulle (Artigou et Monsuez, 2007).

Ainsi, la diminution de la vitesse d'écoulement, et donc l'augmentation de la viscosité induite par l'extrait aqueux de *Justicia secunda*, ne devrait pas entraîner une augmentation de

la résistance vasculaire et donc pas d'augmentation de la pression sanguine artérielle dans les expériences de mesure de la pression sanguine artérielle en présence de *AJse*.

Le sang contenant une phase liquide et une phase avec des éléments cellulaires, protéiniques et minéraux, sa viscosité est fonction de la concentration relative de ces deux phases. La viscosité du sang augmente lorsque l'hématocrite augmente ou lorsque la vitesse d'écoulement du sang diminue. La viscosité d'un fluide caractérise les modifications transversales que subit la vitesse de déplacement de ce fluide. L'augmentation de la viscosité sanguine exprime donc la difficulté qu'ont les éléments figurés à circuler à travers le plasma. Il est également connu, d'une part, que la viscosité sanguine croît lorsque la solvataion des molécules augmente grâce aux particules du soluté entraînant ainsi une augmentation des frottements entre particules. D'autre part, elle croît suite à une polymérisation ou toute autre association de molécules (Gaboriaudr, 1996 ; Garrett, 2000).

*AJse*, en réduisant la vitesse d'écoulement du sang, augmenterait la force de cisaillement. Ceci pourrait aussi entraîner la libération d'oxyde nitrique (NO) par l'endothélium vasculaire et donc induire une vasodilatation et une hypotension artérielle. En effet, selon Zeiher (1996), l'endothélium sain, libère du NO en réponse à divers stimuli physiques et chimiques, le plus important étant la force de cisaillement, assurant ainsi la vasodilatation.

Il est à relever que la circulation du sang dans l'organisme dépend de nombreux facteurs, à la fois biochimiques et mécaniques. Ce sont : l'onde de pression et la vitesse au sortir du cœur, la visco-élasticité des parois vasculaires, les ramifications successives des vaisseaux, la nature du fluide en lui-même (à savoir la suspension concentrée de particules déformables), les propriétés mécaniques des cellules circulantes, les interactions de ces cellules entre elles ou avec les cellules endothéliales qui tapissent la paroi interne des vaisseaux.

En fait, les effets de *AJse* sur la pression artérielle sont dus à des effets sur plusieurs paramètres cardio-vasculaires, chacun étant sensible à cet extrait et réagissant de façon spécifique ; l'ensemble aboutit à une hypotension artérielle.

La variation de la viscosité en présence de *AJse* promet un intérêt certain dans les investigations sur les caractéristiques hémodynamiques du sang dans la circulation sanguine qui pourraient avoir un impact au niveau du système cardio-vasculaire.

Après avoir montré que *AJse* agit sur plusieurs paramètres du système cardio-vasculaire qui concourent à ses effets hypotenseur et antihypertenseur, il importe de connaître son mécanisme d'action sur la pression artérielle.

#### **IV<sub>1</sub> – 5. Mécanisme d'action de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (*AJse*) sur la pression artérielle**

Les études effectuées ont montré que l'extrait aqueux de *Justicia secunda* (*AJse*) contient des substances hypotensives, cardioinhibitrices, vasodilatatrices et antihypertensives.

Les effets hypotenseurs, cardioinhibiteurs et vasodilatateurs induits par *AJse* sont semblables à ceux des substances cholinomimétiques. Pour vérifier si cet extrait contient des substances cholinergiques, une étude de l'interaction entre *AJse* et l'atropine, un antagoniste des récepteurs cholinergiques, a été effectuée.

De plus, il a été montré que *AJse* est une substance antihypertensive. Les effets antihypertenseurs révélés en présence de *AJse* ont permis de préconiser cette substance dans le traitement de l'hypertension artérielle.

Ainsi, à l'instar des médicaments antihypertenseurs, cet extrait pourrait être :

- un diurétique ;
- un bêtabloquant ;
- un inhibiteur calcique ou inhibiteur des canaux calciques ;
- un antihypertenseur à action centrale ;
- un antihypertenseur vasodilatateur périphérique ;
- un  $\alpha_1$ -bloquant périphérique ;
- un bloqueur du système rénine-angiotensine-aldostérone qui est soit un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), soit un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II ou Sartan).

La caractérisation pharmacodynamique d'un nouveau médicament est l'étude de l'effet de ce médicament sur l'organisme. Cet effet est lié à l'interaction du médicament avec son site d'action, qui est généralement un récepteur, mais qui peut aussi être une enzyme, une protéine de transport, un canal ionique, une substance endogène ou un élément non encore identifié (Landry et Gies, 2009). L'interaction du médicament avec son site d'action va entraîner, *via* des mécanismes de signalisation intracellulaire, un effet pharmacologique quantifiable au niveau de la cellule, d'un organe isolé ou de l'organisme entier.

Aussi, pour vérifier le type d'antihypertenseur que serait AJse et ainsi comprendre son mécanisme d'action, cette substance, à une dose de 30 mg/kg P.C. qui entraîne une hypotension de  $26,6 \pm 4,3$  mm Hg, significative ( $P < 0,001$ ) et totalement réversible, est testée en présence d'atropine ou des antagonistes des récepteurs des classes d'antihypertenseurs principaux, "in vivo" sur la pression sanguine artérielle de lapin.

#### **IV<sub>1</sub> – 5 – 1. Interaction AJse – atropine sur la pression artérielle de lapin**

L'objectif de cette étude est de vérifier l'existence ou pas de composés de type cholinergique dans l'extrait aqueux de *Justicia secunda*, vu que cet extrait présente des effets hypotenseurs, vasodilatateurs et cardioinhibiteurs qui sont semblables à ceux de substances cholinergiques.

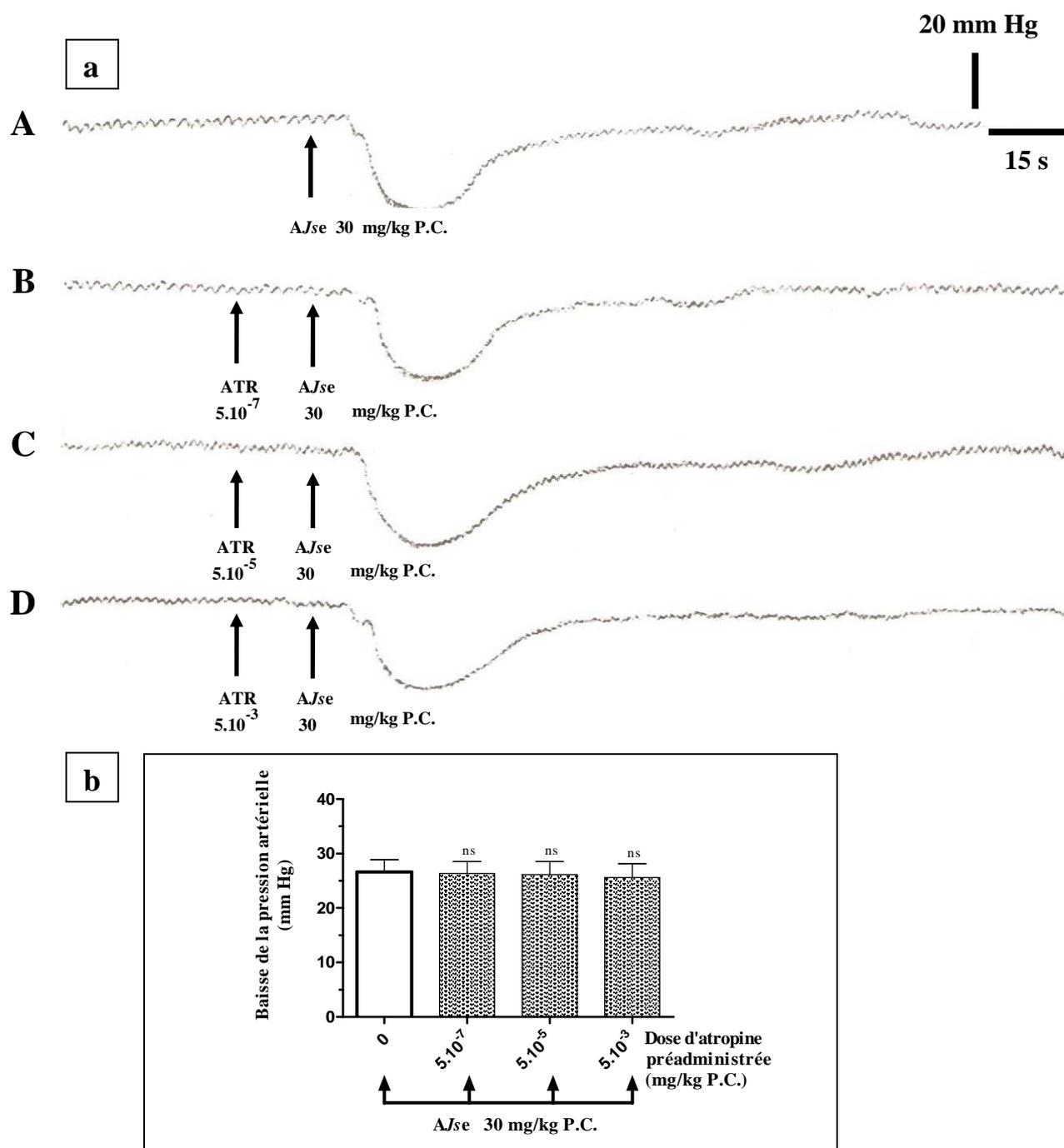
Ainsi, dans cette étude, l'administration de AJse à la dose de 30 mg/kg P.C. est précédée de celle de doses variables d'atropine (ATR). Les doses d'ATR utilisées ( $5.10^{-7}$ ,  $5.10^{-5}$  et  $5.10^{-3}$  mg/kg P.C.) n'ont pas d'effet propre sur la pression artérielle des lapins utilisés.

La **figure 54-a** est un enregistrement type des résultats de cette série d'expériences.

Il apparaît que, l'atropine, dans des gammes de doses variant de  $5.10^{-7}$  à  $5.10^{-3}$  mg/kg P.C. n'a pas d'effet notable sur l'hypotension induite par AJse. En effet, l'ATR à  $5.10^{-7}$  mg/kg P.C., est sans effet notable sur l'hypotension induite par AJse à 30 mg/kg P.C. (**figure 54-a-B**). Lorsque l'injection de AJse à la dose de 30 mg/kg P.C. est précédée de celle de l'ATR à  $5.10^{-5}$  et  $5.10^{-3}$  mg/kg P.C., l'hypotension induite par cette dose de AJse ( $26,6 \pm 4,3$  mm Hg) est faiblement réduite, avec respectivement 1,82 % et 3,77 % (**figures 54-a-C et a-D**) de réductions d'hypotension pour ces deux doses de l'ATR.

Les colonnes de la **figure 54-b** présentent les effets non significatifs ( $P > 0,05$ ) de l'atropine sur l'hypotension induite par AJse pour 4 expériences. Les baisses de pression artérielle sont quasi identiques en absence et en présence d'ATR.

Ainsi, l'ATR n'agit pas de façon significative sur l'hypotension induite par l'extrait aqueux de *Justicia secunda*.



**Figure 54 : interaction AJse-atropine sur pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

- A** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (P.C.) (après la flèche)
- B à D** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration d'atropine (ATR) à  $5 \cdot 10^{-7}$  (B),  $5 \cdot 10^{-5}$  (C) et  $5 \cdot 10^{-3}$  (D) mg/kg P.C

**b – Effets de AJse sur la pression artérielle en présence d'atropine**

**n = 4 ; ns P > 0,05.**

## IV<sub>1</sub> – 5 – 2. Interaction AJse – propranolol sur la pression artérielle de lapin

Le but de cette expérience est de voir si l'extrait aqueux de *Justicia secunda* agit sur la pression sanguine artérielle par l'intermédiaire des récepteurs bêta-adrénergiques. Ainsi, AJse est administré à un animal prétraité avec un antagoniste des récepteurs bêta-adrénergiques : le propranolol.

La **figure 55-a** est un enregistrement type des résultats de cette étude. La **figure 55-b**, qui montre les colonnes représentant les effets du propranolol sur l'hypotension induite par l'extrait, est construite à partir des résultats de 4 expériences.

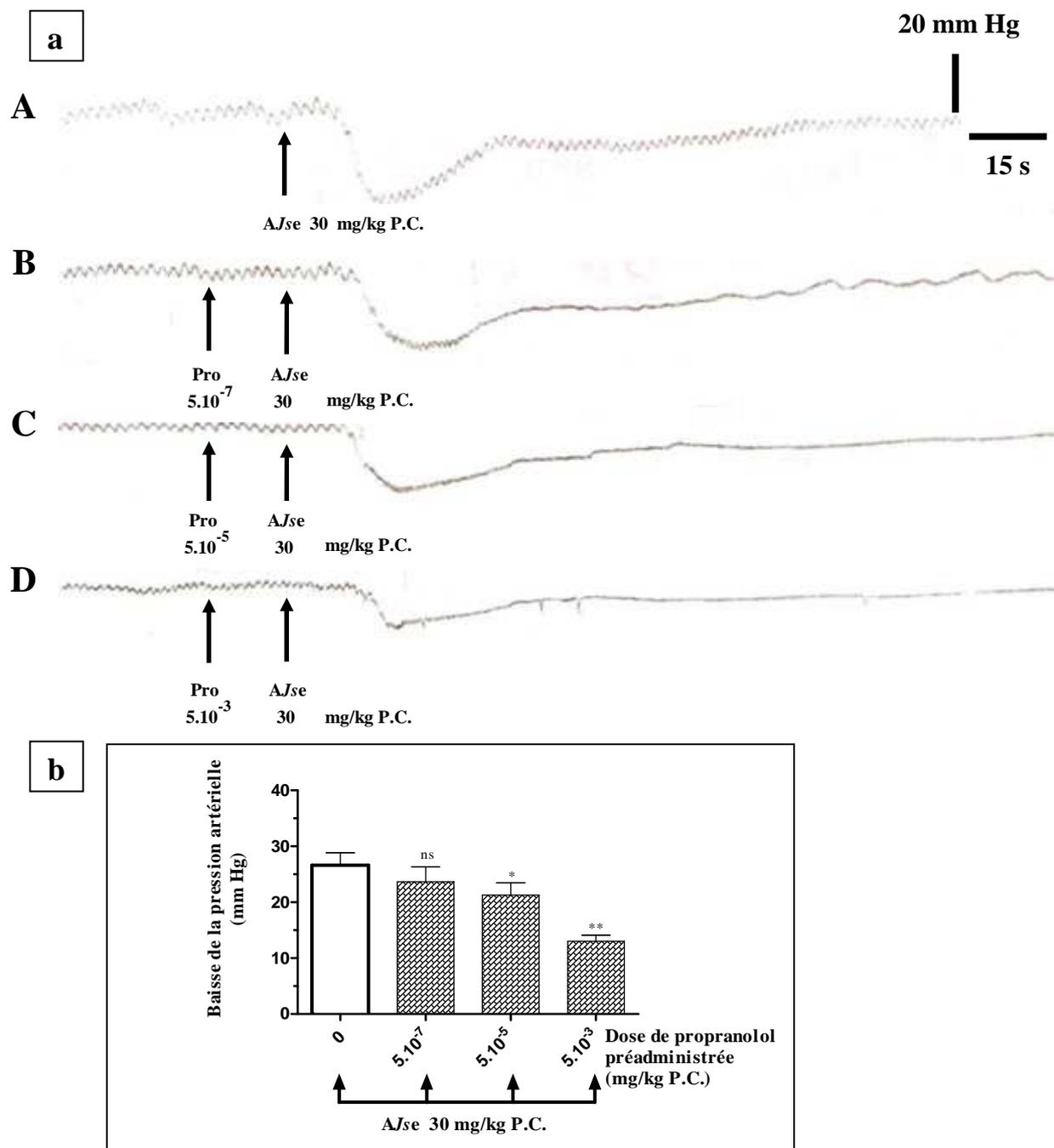
Il apparaît que AJse, administré seule au lapin à la dose de 30 mg/kg P.C., entraîne une hypotension artérielle de 22,5 mm Hg (**figure 55-a-A**). Mais, lorsque les animaux sont prétraités avec des doses croissantes et successives de propranolol de  $5.10^{-7}$ ,  $5.10^{-5}$  et  $5.10^{-3}$  mg/kg P.C. avant de recevoir, après chaque dose de propranolol, AJse à la dose de 30 mg/kg P.C., les hypotensions qui apparaissent sont respectivement 20,18 et 11 mm Hg (**figures 55-a-B et a-C**) ; soient des réductions respectives d'hypotension de 11,11 %, 20 % et 51,11 %.

Le propranolol réduit donc significativement, proportionnellement à la dose, comme le montrent les colonnes de la **figure 55-b**, l'hypotension induite par l'extrait aqueux de *Justicia secunda* chez le lapin, mais ne l'annule pas.

## IV<sub>1</sub> – 5 – 3. Interaction AJse – vérapamil sur la pression artérielle de lapin

Le vérapamil est un anticalcique à effets sinusal et coronaire prédominants. Dans cette étude, pour vérifier si l'extrait aqueux de *Justicia secunda* contient des composés anticalciques, le vérapamil est antagonisé avec cette substance. Cette série d'expériences consiste donc à administrer préalablement différentes doses de vérapamil qui, seules, n'ont pas d'effet propre sur la pression artérielle, avant l'administration de AJse à dose unique.

AJse, à la dose de 30 mg/kg P.C., fait apparaître une hypotension artérielle de 26 mm Hg (**figure 56-a-A**). Cette hypotension induite par AJse est réduite respectivement de 11,54 %, 26,92 % et 61,15 % (**figures 56-a-B, a-C et a-D**) lorsque l'animale reçoit préalablement les doses successives de vérapamil de  $5.10^{-7}$ ,  $5.10^{-5}$  et  $5.10^{-3}$  mg/kg P.C. Cette **figure 56-a** est un enregistrement type des résultats de cette série d'expériences et la **figure 56-b** donne les résultats pour 4 expériences. Les colonnes de cette dernière figure représentent les hypotensions induites par AJse, en absence ou en présence de vérapamil.



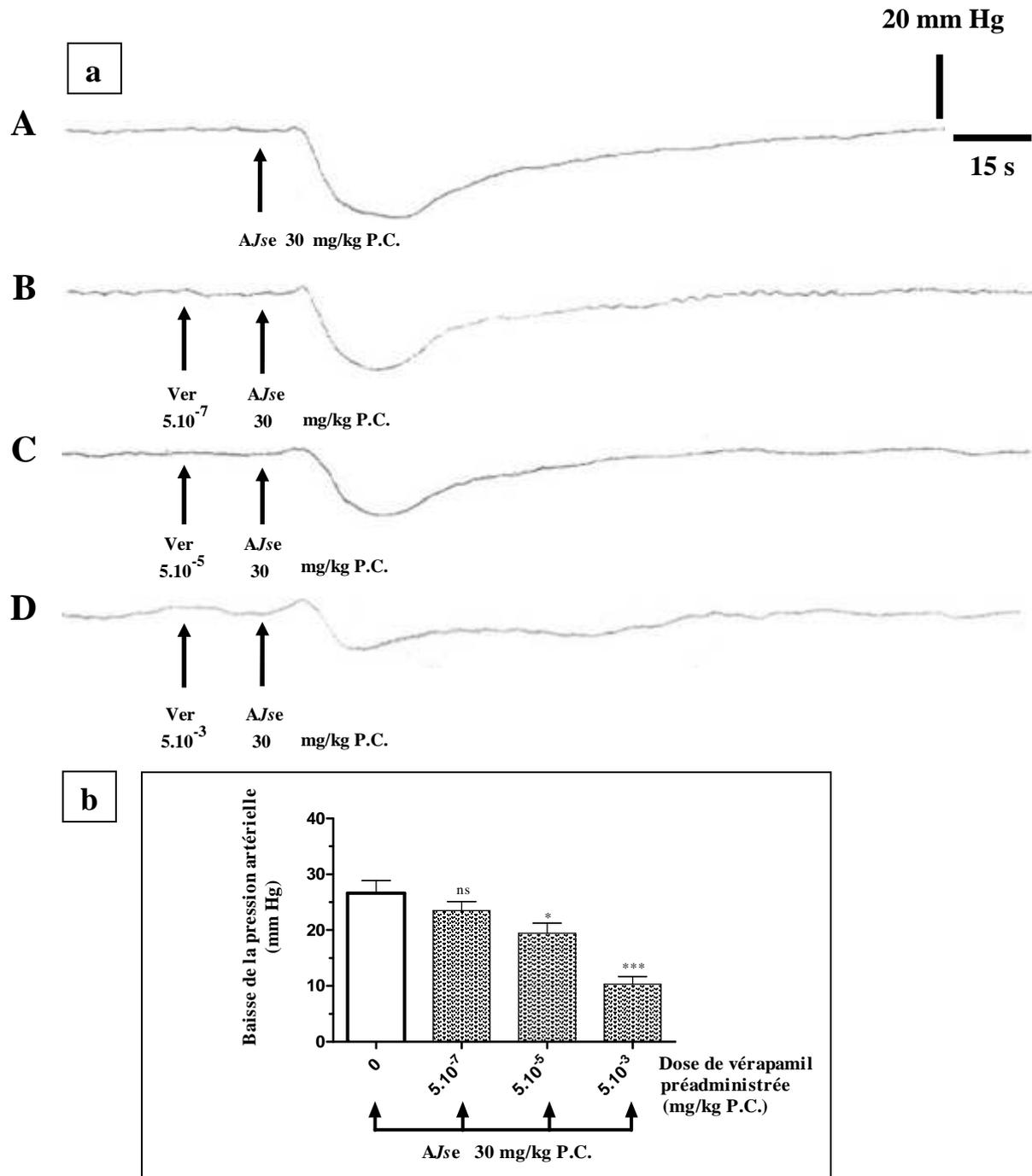
**Figure 55 : interaction AJse-propranolol sur pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

- A** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après la flèche)
- B à D** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration du propranolol (Pro) à  $5 \cdot 10^{-7}$  (B),  $5 \cdot 10^{-5}$  (C) et  $5 \cdot 10^{-3}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de AJse sur la pression artérielle en présence du propranolol**

**n = 4 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01.**



**Figure 56 : interaction AJse-vérapamil sur pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

- A** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après la flèche)
- B à D** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration du vérapamil (Ver) à 5.10<sup>-7</sup> (B), 5.10<sup>-5</sup> (C) et 5.10<sup>-3</sup> (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de AJse sur la pression artérielle en présence du vérapamil**

n = 4 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\*\* P < 0,001.

Elles montrent que la baisse de la pression artérielle est réduite par le vérapamil proportionnellement à sa dose.

Il ressort donc de ces expériences que le vérapamil réduit significativement, et de manière dose-dépendante, les effets hypotenseurs de l'extrait aqueux de *Justicia secunda*, mais ne les annule pas.

#### **IV<sub>1</sub> – 5 – 4. Interaction AJse – nifédipine sur la pression artérielle de lapin**

Pour vérifier si l'extrait agit sur la pression artérielle, comme un anticalcique, par l'intermédiaire de récepteurs localisés sur les vaisseaux sanguins, cette étude est réalisée en antagonisant AJse avec la nifédipine, un anticalcique à effet vasculaire prédominant.

Ainsi, les animaux sont prétraités avec des doses croissantes de nifédipine avant d'administrer une dose unique de AJse (30 mg/kg P.C.) qui, seule induit une hypotension artérielle de  $26,6 \pm 4,3$  mm Hg. La **figure 57-a** est un enregistrement type des effets de la nifédipine sur l'hypotension induite par AJse. Ces effets, pour 4 expériences, sont représentés par les colonnes de la **figure 57-b**. Ces figures montrent que, de façon dose-dépendante, la nifédipine réduit l'hypotension induite par AJse.

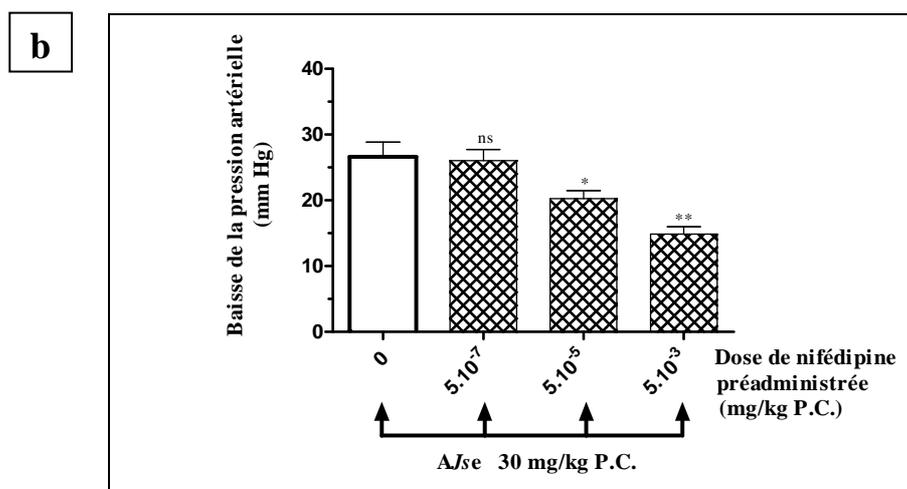
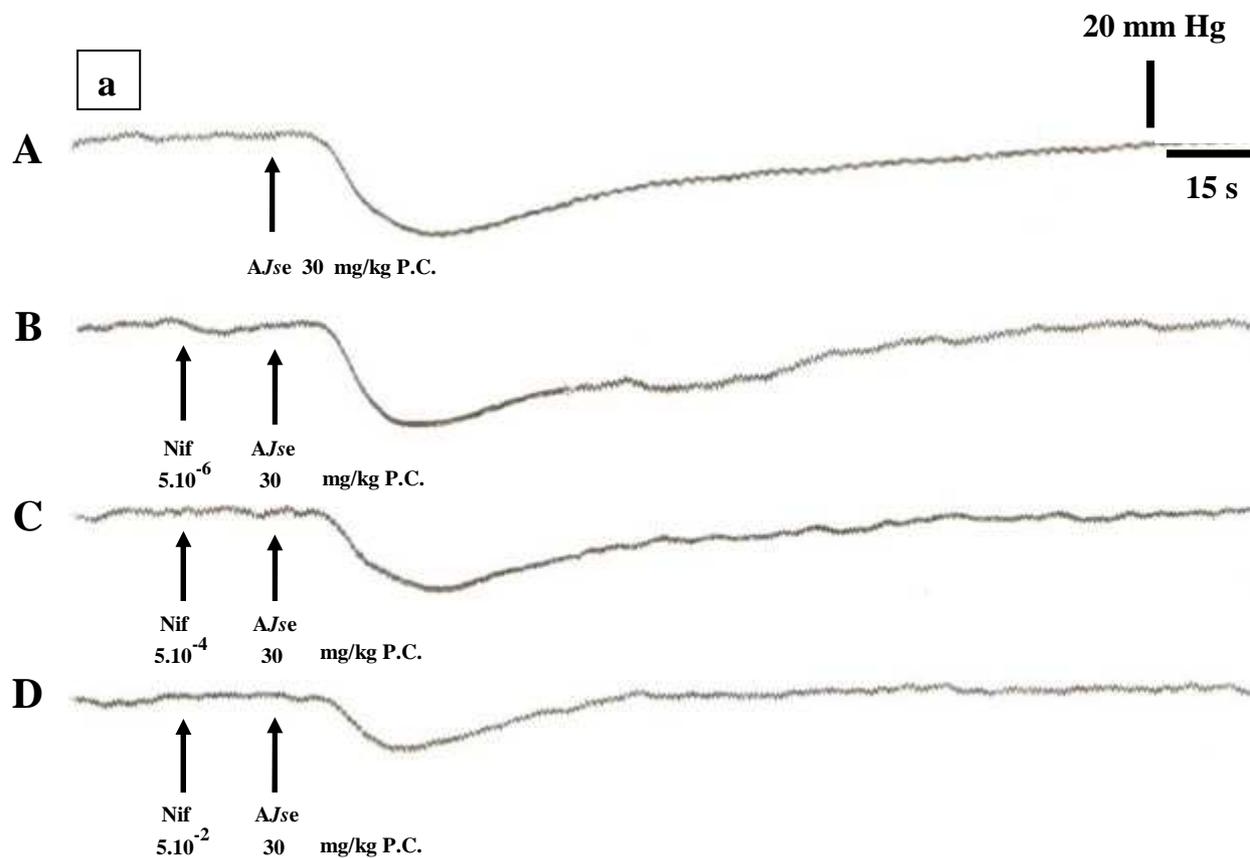
Les doses de nifédipine utilisées, seules, n'ont pas d'effets propres sur la pression artérielle. A la dose de  $5 \cdot 10^{-7}$  mg/kg P.C. (**figure 57-a-A**), la nifédipine n'a pas d'effet sur l'hypotension induite par AJse (25 mm Hg). Par contre, lorsque l'administration de nifédipine à  $5 \cdot 10^{-5}$  et  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/kg P.C. précède celle de AJse à 30 mg/kg P.C., les hypotensions qui apparaissent sont respectivement de 20 et 14 mm Hg (**figures 57-a-C et a-D**) ; soient des réductions d'hypotension respectives de 20 % et 44 %.

Ainsi, la nifédipine ne supprime pas l'hypotension induite par l'extrait aqueux de *Justicia secunda*, mais la réduit significativement, de façon dose dépendante.

#### **IV<sub>1</sub> – 5 – 5. Interaction AJse – prazosine sur la pression artérielle de lapin**

L'objectif de cette étude est de vérifier si AJse est  $\alpha_1$ -un bloquant tout comme la prazosine (alpress® LP) qui est l' $\alpha_1$ -bloquant de référence à indication vasculaire.

Pour cela, le lapin est prétraité avec la prazosine, puis, 1min, 10 min et 1 heure après, une dose de AJse est administrée à l'animal. La prazosine est utilisée aux doses respectives de  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/kg P.C. et, l'administration de chacune de ces doses est suivie de celle de AJse à 30 mg/kg P.C. Ces doses de la prazosine, seules, sont sans effet propre sur la pression artérielle.



**Figure 57 : interaction AJse-nifédipine sur pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

- A** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après la flèche)
- B à D** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration de la nifédipine (Nif) à  $5 \cdot 10^{-5}$  (B),  $5 \cdot 10^{-4}$  (C) et  $5 \cdot 10^{-2}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de AJse sur la pression artérielle en présence de la nifédipine**

**n = 4 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01.**

Il ressort de cette étude que la prazosine ne modifie quasiment pas les effets hypotenseurs de *AJse* sur la pression artérielle.

En effet, comme le montre la **figure 58-a** qui est un enregistrement type de cette série d'expériences, les effets de la prazosine sur l'hypotension induite par *AJse* se traduisent par de faibles réductions (non significatives,  $P > 0,05$ ) de cette hypotension respectivement de 7,14 et 3,57 % avec les doses successives de la substance  $\alpha_1$ -bloquant (prazosine) de  $5 \cdot 10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/kg P.C. (**figures 58-a-C et a-D**). La dose de prazosine de  $5 \cdot 10^{-5}$  mg/kg P.C. (**figure 58-a-B**) est sans effet sur l'hypotension induite par *AJse* à 30 mg/kg P.C. (28 mm Hg).

Ces effets sont identiques lorsque *AJse* est administré 1min, 10 min ou 1 heure après le prétraitement de l'animale avec la prazosine.

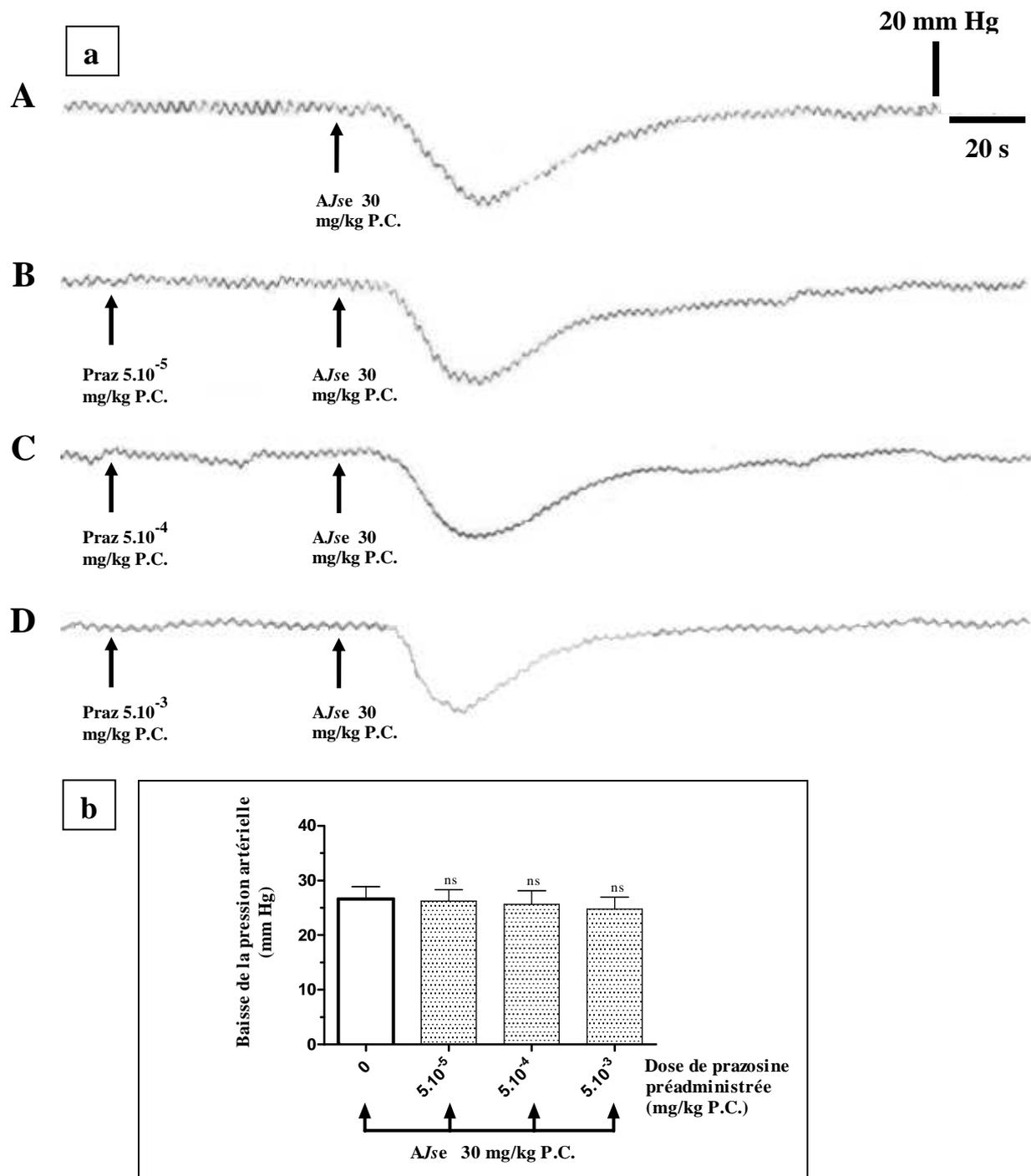
Pour 4 expériences, les colonnes de la **figure 58-b**, qui présentent les effets de la prazosine sur l'hypotension induite par *AJse*, a été tracées. Elles montrent que les baisses de pressions artérielles induites par *AJse* sont quasi identiques en absence et en présence de prazosine.

Ainsi, la prazosine est sans effet notable sur l'action de *AJse* sur la pression artérielle.

#### **IV<sub>1</sub> – 5 – 6. Interaction *AJse* – losartan sur la pression artérielle de lapin**

Cette étude vise à montrer si *AJse* agit sur les récepteurs de l'angiotensine II pour induire ses effets. Ainsi, l'étude de l'interaction entre *AJse* et le losartan (Cozaar®), un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II), a consisté, dans une première série d'expériences, à prétraiter l'animal avec des doses variables de la substance pharmacologique avant de lui administrer, 1min, 10 min et 1 heure après (pic sérique du losartan à 1 heure), *AJse* à la dose unique de 20 mg/kg P.C. Les doses de losartan utilisées seules sont sans effets propres sur la pression artérielle des lapins.

Il ressort de cette série d'expériences (**figure 59-a**) que *AJse*, seul, à la dose de 20 mg/kg P.C., fait apparaître une hypotension artérielle de 18,75 mm Hg (**figure 59-a-A**). Lorsque l'administration de cette dose de *AJse* est précédée de celle du losartan à  $5 \cdot 10^{-10}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$  et  $5 \cdot 10^{-7}$  mg/kg P.C., l'hypotension induite par l'extrait augmente, proportionnellement à la dose de l'ARA II. En effet, les doses successives de losartan, indiquée ci-dessus, induisent des augmentations respectives de 28 % (**figure 59-a-B**), 48 % (**figure 59-a-C**), 76 % (**figure 59-a-D**) et 84 % (**figure 59-a-D**).



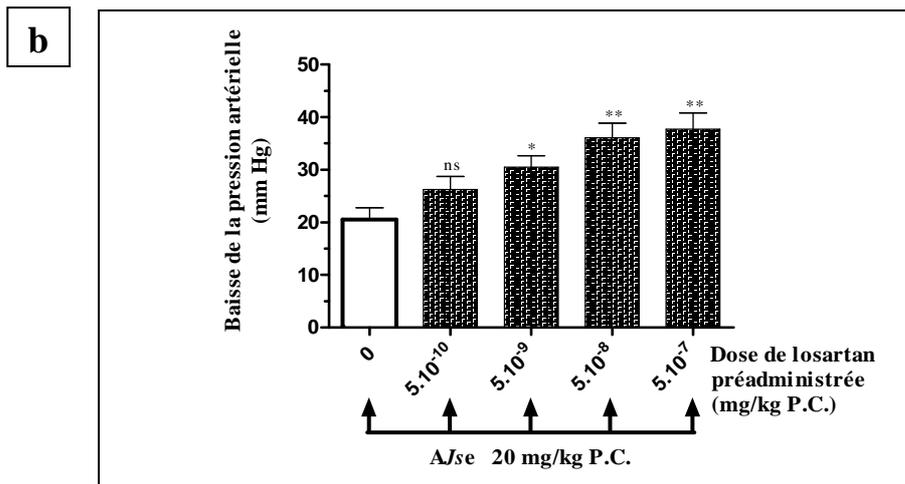
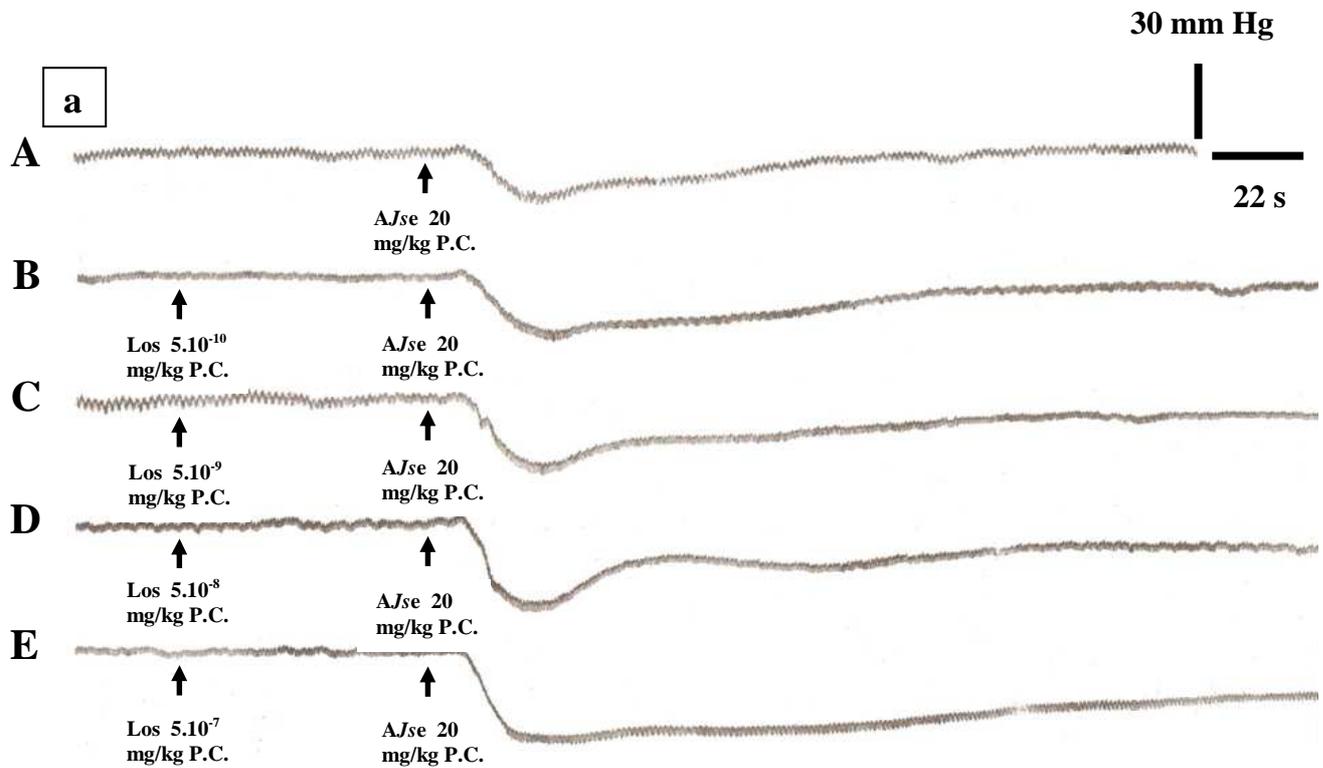
**Figure 58 : interaction AJse-prazosine sur pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

- A** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après la flèche)
- B à D** - Effets de AJse à 30 mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration de la prazosine (Praz) à  $5 \cdot 10^{-5}$  (B),  $5 \cdot 10^{-4}$  (C) et  $5 \cdot 10^{-3}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de AJse sur la pression artérielle en présence de la prazosine**

**n = 4 ; ns P > 0,05.**



**Figure 59 : interaction A/Jse-losartan sur pression sanguine artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

- A** - Effets de A/Jse à 30 mg/kg de poids corporel (après la flèche)
- B à E** - Effets de A/Jse à 30 mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration du losartan (Los) à 5.10<sup>-10</sup> (B), 5.10<sup>-9</sup> (C), 5.10<sup>-8</sup> (D) et 5.10<sup>-7</sup> (E) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de A/Jse sur la pression artérielle en présence du losartan**

**n = 4** ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01.

Ces effets du losartan sur l'hypotension entraînée par *AJse* sont identiques lorsque cet extrait est administré 1 min ou 10 min après le traitement de l'animale avec cette substance. Par contre, après 1 heure, cette substance est sans effet sur l'action de *AJse*.

Dans cette étude, la réversibilité de l'hypotension induite par *AJse* est d'autant plus lente que la dose de losartan augmente. En effet, plus la dose de losartan administrée augmente, plus l'hypotension induite par l'extrait est durable.

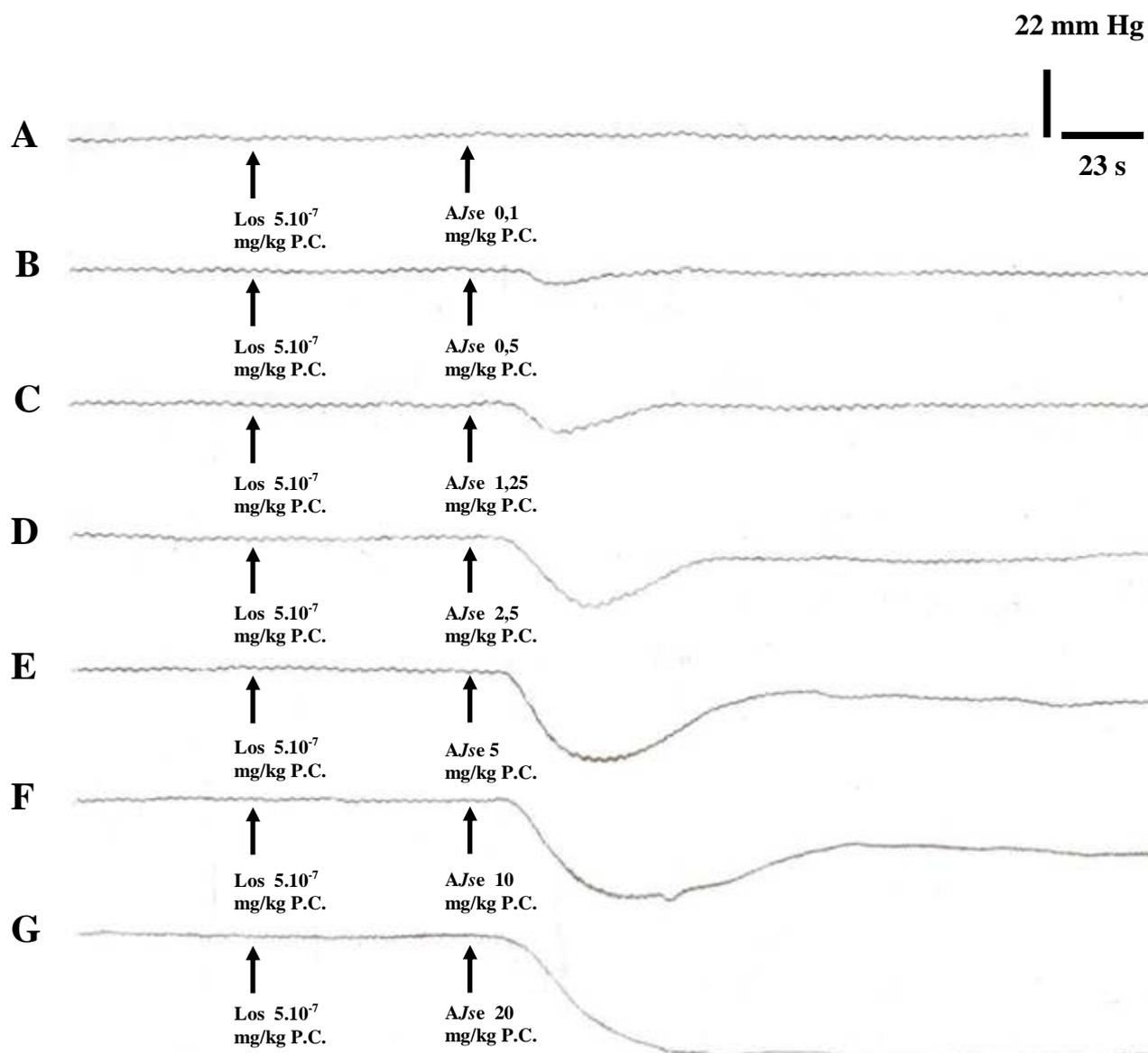
Les colonnes de la **figure 59-b** représentent les effets du losartan sur l'hypotension induite par *AJse* pour 4 expériences. Elles montrent que l'hypotension induite par *AJse* augmente proportionnellement à la dose de losartan.

Dans une deuxième série d'expériences, une dose de losartan ( $5 \cdot 10^{-7}$  mg/kg P.C.) est d'abord administrée à l'animal et, 1 min après, une dose de *AJse* est injectée. Cette expérience est reprise avec l'administration de la dose unique de losartan suivie, à chaque fois, de celle de doses variables de *AJse* allant de 0,1 à 20 mg/kg P.C.

Il ressort de cette deuxième étude qu'en présence du losartan à  $5 \cdot 10^{-7}$  mg/kg P.C., les doses de *AJse* inférieures à 0,5 mg/kg P.C. sont sans effets sur la pression sanguine artérielle du lapin. La dose de 0,5 mg/kg P.C. entraîne une chute de la pression de 4 mm Hg (**figure 60-B**). Cette hypotension augmente avec l'augmentation de la dose de *AJse* pour atteindre une chute de pression artérielle de 38 mm Hg avec la dose de l'extrait de 20 mg/kg P.C. (**figure 60-G**).

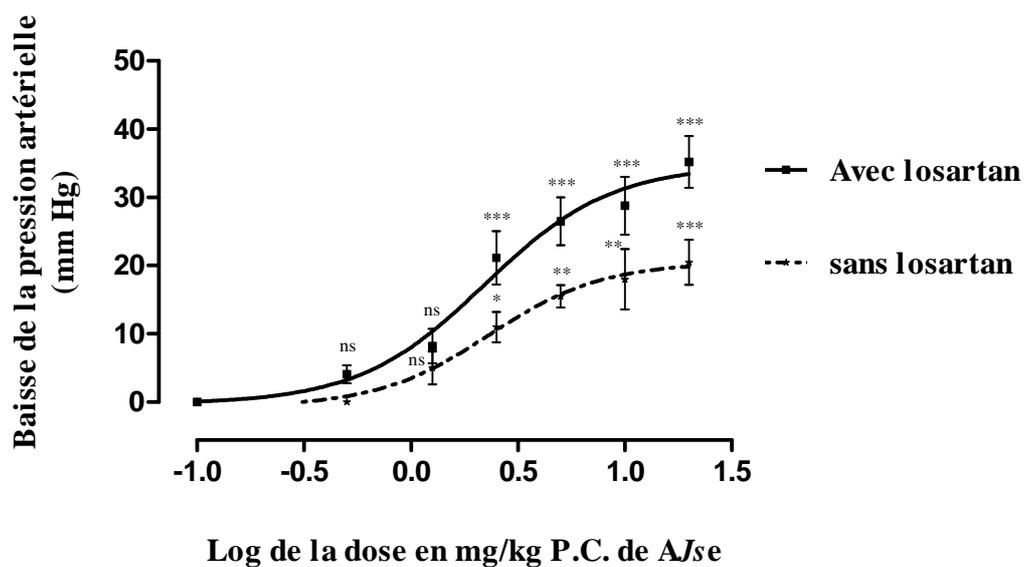
Ces hypotensions induites par *AJse* sont totalement réversibles pour des doses variant de 0,5 à 5 mg/kg P.C. Par contre, l'hypotension devient partiellement réversible pour la dose de l'extrait de 10 mg/kg P.C., et irréversible pour les doses plus fortes.

Les courbes de la **figure 61** montrent les baisses de pression artérielle de lapins en fonction du logarithme de la dose de *AJse*, chez des animaux prétraités avec le losartan à  $5 \cdot 10^{-7}$  mg/kg P.C. pour l'une, et chez des animaux n'ayant pas reçu cette substance pour l'autre courbe. Il apparaît que la baisse de pression artérielle enregistrée, pour chaque dose active de *AJse*, est plus importante en présence du losartan. De plus, la dose minimale active de *AJse* est plus faible (0,5 mg/kg P.C.) en présence du losartan qu'en son absence (1,25 mg/kg P.C.).



**Figure 60 : effets dose-réponse de AJse en présence du losartan sur la pression sanguine artérielle de lapin**

**A à G** - Effets de AJse à 0.1 (A), 0.5 (B), 1.25 (C), 2.5 (D), 5 (E), 10 (F) et 20 (G) mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches) après l'administration du losartan (Los) à  $5.10^{-7}$  mg/kg de poids corporel (1<sup>ères</sup> flèches).



**Figure 61 : effets dose-réponse de AJsé sur la pression sanguine artérielle de lapin en présence et en absence du losartan**

(n = 4 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)

## IV<sub>1</sub> – 5 – 7. Discussion

Nos résultats ont mis en évidence que l'extrait aqueux de *Justicia secunda* agit en entraînant des effets hypotenseurs, cardioinhibiteurs et vasodilatateurs qui sont semblables à ceux de l'acétylcholine et de substances contenant des composés de type cholinergique tels que *Mareya micrantha* (Euphorbiaceae) (Abo, 1996), *Bidens pilosa* (Asteraceae) (Kouakou, 2008) et *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) (Kassi, 2009). *AJse* serait donc une substance cholinomimétique.

Le terme d'acétylcholinomimétique désigne l'ensemble des médicaments qui, par des mécanismes directs ou indirects, reproduisent les effets de l'acétylcholine (Duchene-Marulhaz, 1973 ; Galper *et al.*, 1977 ; Fields *et al.*, 1978 ; Nargeot, 1978 ; Hartzell, 1980 ; Gocayne *et al.*, 1987 ; Nathanson, 1987 ; Peralta *et al.*, 1987).

L'acétylcholine a des effets muscariniques périphériques (ce sont les mieux connus) et centraux (Fields *et al.*, 1978 ; Nargeot, 1978 ; Peralta *et al.*, 1987 et 1988 ; Doods *et al.*, 1989). Ces effets sont inhibés par l'atropine. En effet, l'atropine est un antagoniste non sélectif qui bloque tous les sous-types de récepteurs muscariniques (Peralta *et al.*, 1988).

L'étude de l'interaction *AJse*-atropine montre que cette dernière n'a pas d'effet significatif sur l'hypotension induite par l'extrait. En conséquence, l'extrait aqueux de *Justicia secunda* ne contient pas de substances cholinergiques de type muscarinique et son action ne fait pas intervenir des récepteurs cholinergiques muscariniques.

De même, cet extrait ne contiendrait pas de substances  $\alpha_1$ -bloquants. Les  $\alpha_1$ -bloquants sont des médicaments utilisés en pharmacologie pour traiter l'hypertension artérielle. Ce sont des antagonistes compétitifs des effets  $\alpha_1$ -adrénergiques des catécholamines. La prazosine est le médicament de référence à indications vasculaires de ce groupe. Leur activité  $\alpha_1$ -bloquant très sélective antagonise la noradrénaline de façon compétitive au niveau des récepteurs postsynaptiques périphériques (Patel *et al.*, 2007). Les  $\alpha_1$ -bloquants réduisent la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques périphériques, entraînant une diminution de la vasoconstriction artérielle et veineuse et une diminution des résistances périphériques, et conséquemment, abaisse la pression artérielle (Patel *et al.*, 2007).

Les effets vasodilatateurs et hypotenseurs de *AJse*, de même que ses effets inhibiteurs de l'hypertension artérielle produite par l'adrénaline, sont semblables à ceux de la prazosine. Cependant, l'étude de l'interaction entre *AJse* et la prazosine, un  $\alpha_1$ -bloquant de référence à indications vasculaires, révèle que cette dernière n'a pas d'effet notable sur l'hypotension induite par l'extrait aqueux de *Justicia secunda*. Cela suggère que les effets de *AJse* ne sont

non plus pas médiés par des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, et que cette substance ne serait donc pas un  $\alpha_1$ -bloquant.

Il est donc à envisager que *AJse* puisse agir, non pas par l'intermédiaire de récepteurs cholinergiques ou  $\alpha_1$ -adrénergiques, mais par d'autres sites récepteurs à travers lesquels il induirait ses effets.

Il peut être suggéré que *AJse*, substance hypotensive, cardioinhibitrice, vasodilatatrice et antihypertensive, pourrait agir comme un anticalcique ou une substance  $\beta$ -bloquante. Ces hypothèses sont sous-tendues par l'étude de l'interaction entre *AJse* et, respectivement, le vérapamil, la nifédipine et le propranolol.

Les inhibiteurs calciques, encore appelés anticalciques ou bloqueurs des canaux calciques, représentent une classe pharmacologique relativement importante car largement utilisés dans l'hypertension artérielle et dans l'insuffisance coronaire (Izzo et case, 1995 ; Legalerey, 2001 ; Partouche, 2001). Ils inhibent l'entrée du calcium dans les cellules musculaires du cœur et les vaisseaux sanguins et, en diminuant les résistances périphériques des vaisseaux, ils abaissent la pression artérielle (Cohen, 1997; Gired *et al.*, 1998 ; Lüllmann *et al.*, 1998 ; Moulin et Coquerel, 2002).

Le vérapamil et la nifédipine représentent deux classes pharmacologiques d'inhibiteurs calciques.

La nifédipine est l'inhibiteur calcique à effet vasculaire prédominant de référence (Frishman *et al.*, 1984 ; Klein, 1984). En agissant sur les canaux calciques de type L, ces inhibiteurs entraînent une dilatation des artères, y compris des coronaires, réduisent des résistances périphériques et abaissent la pression artérielle (Ishii *et al.*, 1980 ; Karaki et Weiss, 1988 ; Stoll et Spector, 1989 ; Michiru et Quentin, 2003).

Le vérapamil a un tropisme mixte, à la fois vasculaire et myocardique, avec une prédominance de l'action cardiaque sur l'action artério-dilatatrice périphérique. C'est l'inhibiteur calcique ayant l'effet inotrope négatif le plus marqué (Motte *et al.*, 1996 ; Legalerey, 2001). En effet, le vérapamil, en inhibant l'entrée du calcium, provoque, au niveau des cellules musculaires cardiaques, un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire et une diminution de la force contractile (Godfraind *et al.*, 1986 ; Cosma, 1989 ; Schwinger *et al.*, 1990 ; Cohen, 1997). Il induit également une diminution de la fréquence de décharges, entraînant un effet chronotrope négatif ou bradycardisant (Kawai *et al.*, 1981 ; Caron *et al.*, 1993 ; Laurent *et al.*, 1994).

Chacun des deux types d'inhibiteur calcique (vérapamil et nifédipine) réduit l'hypotension induite par l'extrait aqueux de *Justicia secunda*. Ceci laisse supposer que *AJse* contiendrait des inhibiteurs calciques ayant un tropisme mixte, à la fois vasculaire et myocardique.

Des effets similaires ont été observés par Dar *et al.* (1999) avec *Mimusops elengi* (Sapotaceae). Ces auteurs ont en effet montré que l'hypotension induite par l'extrait méthanolique de *Mimusops elengi* est réduite chez le rat anesthésié en présence de nifédipine (0,9 mg/kg P.C.) et de vérapamil (3,9 mg/kg P.C.). Ils ont donc évoqué la présence de substances anticalciques dans cet extrait.

Selon Guazzi *et al.* (1980), Slonick et Frishman (1989), Laurent *et al.* (1994), Gired *et al.* (1998), Legalerey (2001) et Moulin et Coquerel (2002), les antagonistes des canaux calciques agissent de façon générale en empêchant l'entrée du calcium extracellulaire dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux ou dans les cellules musculaires cardiaques, diminuant ainsi le tonus musculaire vasculaire et la force de contraction du myocarde, ce qui provoque une hypotension.

Ainsi *AJse*, tout comme les autres anticalciques, aurait la propriété de bloquer de façon sélective l'entrée du calcium au travers des canaux calciques lents ou voltage dépendants (canaux de types L) situés dans la membrane plasmique des cellules du myocarde et des cellules musculaires lisses des vaisseaux. Cette diminution de l'influx calcique causée par *AJse* dans les cellules musculaires cardiaques et les cellules musculaires vasculaires aurait pour conséquence une cardioinhibition, une vasodilatation et ainsi une baisse de la pression artérielle.

Cependant, les effets inhibiteurs du vérapamil et de la nifédipine sur l'hypotension induite par *AJse* ne sont que partiels. En effet, sur des animaux prétraités avec chacune de ces substances pharmacologiques, l'hypotension induite par *AJse* est significativement réduite, mais il subsiste une hypotension résiduelle.

L'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* contiendrait donc, en plus des composés anticalciques, d'autres types de substances responsables de l'hypotension artérielle qui persiste en présence des antagonistes calciques que sont le vérapamil et la nifédipine.

Par ailleurs, l'étude de l'influence du propranolol sur l'hypotension induite par *AJse* a révélé le caractère  $\beta$ -bloquant partiel de cet extrait.

Le propranolol est un  $\beta$ -bloqueur dit « non sélectif » car il inhibe à la fois les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques (Witchitz, 1994 ; Brown, 1995 ; Moulin et Coquerel, 2002).

Les bêtabloquants agissent principalement en réduisant l'activité des catécholamines et, diminuant la sécrétion de rénine, diminue aussi la pression artérielle (Giudicelli, 1984 ; Castaigne, 1988 ; Witchitz, 1994 ; Brown, 1995).

L'étude de l'interaction entre *AJse* et le propranolol montre que le propranolol réduit l'hypotension induite par *AJse*, mais ne l'annule pas. Ainsi, cet extrait contiendrait, en plus de composés anticalciques, des substances  $\beta$ -adrénergiques et agirait donc en partie par le biais de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

La réduction des effets hypotenseurs par le propranolol a également été observée par Kouakou, (2008) avec une fraction aqueuse chromatographique de l'extrait de *Bidens pilosa* (Asteraceae), par Srinivas *et al.*, (2003) avec l'extrait alcoolique de *Terminalia arjuna* (Combretaceae) et par Amos *et al.*, (2003) avec l'extrait éthanolique des feuilles de *Pavetta crassipes* (Rubiaceae). Ces auteurs ont donc suggéré la présence de substances agonistes  $\beta$ -adrénergiques dans ces extraits.

En fait, en plus de leur action hypotensive, les bêtabloquants diminuent la fréquence cardiaque (effet chronotrope négatif), la contractilité du myocarde (effet inotrope négatif), le débit cardiaque et la vitesse de conduction auriculo-ventriculaire (effet dromotrope négatif) (Witchitz, 1994 ; Brown, 1995).

Ainsi, *AJse*, tout comme les bêtabloquants, pourrait également réduire la transmission d'influx nerveux au cœur et aux vaisseaux sanguins. Ainsi, le cœur bat moins vite et avec moins de force, et la tension artérielle chute. L'effet hypotenseur pourrait être associé à un abaissement de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection ventriculaire gauche. Ce mécanisme d'action probable de l'extrait est confirmé par la baisse de la fréquence de l'activité électrique globale (ECG) du cœur, les effets inotropes négatifs et, pour certaines doses de *AJse*, la baisse du débit coronaire du cœur isolé et perfusé.

Une étude de l'interaction entre *AJse* et le losartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II ou sartan), a montré que ce dernier potentialise les effets hypotenseurs de *AJse*.

Un tel effet additif d'antihypertenseurs a été obtenu par Azizi *et al.*, (1997-a et 1997-b) en associant le losartan à un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II.

Le losartan est indiqué dans le traitement de l'hypertension artérielle essentielle (Nelson *et al.*, 1992 ; Tsunoda *et al.*, 1993 ; Gradman *et al.*, 1995 ; Oparil et Guthrie, 1998), mais également légère ou modérée (Mancini, 1997 ; Roffman, 1998). Son activité antihypertensive est la conséquence du blocage spécifique et compétitif des

récepteurs  $AT_1$  de l'angiotensine II (Doig *et al.*, 1993 ; Johnston, 1995 ; Goodfriend *et al.*, 1996 ; Nicholls *et al.*, 1997 ; Roffman, 1998 ; Boutouyrie, 1999). En effet, le losartan est un antagoniste des récepteurs de type  $AT_1$  de l'angiotensine II. L'angiotensine II se lie sélectivement aux récepteurs  $AT_1$  existant dans de nombreux tissus, en particulier les cellules musculaires lisses vasculaires, les surrénales, les reins et le cœur. Elle entraîne plusieurs effets biologiques importants dont la vasoconstriction, la sécrétion d'aldostérone par la corticosurrénale et la libération de noradrénaline (Brasch *et al.* 1993 ; Touyz et Schiffrin, 2000). Du fait de la réduction des résistances artérielles et artériolaires périphériques (réduction de la vasoconstriction due à l'angiotensine II), le losartan induit une baisse de la pression artérielle. Le losartan et son métabolite acide carboxylique pharmacologiquement actif (E-3174), en se fixant sur les récepteurs  $AT_1$ , bloquent les effets que l'angiotensine II exerce sur ces récepteurs. Le blocage de ces récepteurs réduit la vasoconstriction et la libération de noradrénaline causées normalement par l'angiotensine II (Maeso *et al.*, 1997). Il s'oppose également aux processus d'hypertrophie cardiaque et artérielle causés par l'angiotensine II.

Dans l'étude de l'interaction *AJse*-losartan, les doses de losartan n'ont pas d'effet propre sur la pression artérielle, néanmoins, elles potentialisent les effets hypotenseurs de l'extrait. Cette action pourrait résulter du fait que les faibles doses de losartan utilisées agissent en inhibant la vasoconstriction et la libération de noradrénaline qui entrainerait une hypertension et ainsi s'opposeraient aux effets vasodilatateur et hypotenseur de *AJse*. La suppression par le losartan des effets antagonistes de ceux de *AJse* permettrait donc une plus forte expression des effets de cet extrait. Ainsi, l'action hypotensive de *AJse* est potentialisée, et donc plus importante chez les animaux prétraités avec le losartan. Cette potentialisation des effets de *AJse* en présence du losartan, un antihypertenseur, conforte l'idée que l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* agit comme un antihypertenseur.

#### **IV<sub>1</sub> – 6. Conclusion**

Les études toxicologiques, qui ont consisté à l'étude de la toxicité aigüe chez des souris et de la cytotoxicité sur trois lignées cellulaires, ont montré que l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* est une substance peu toxique qui pourrait être utilisée en pharmacologie.

Les études pharmacologiques avec *AJse* ont révélé un fort potentiel antihypertenseur de cet extrait brut, ce qui pourrait justifier, en partie, son utilisation en médecine traditionnelle

contre l'hypertension artérielle. Ainsi, l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* pourrait être préconisé dans le traitement de cette affection.

Outre l'effet antihypertenseur, cet extrait brut présente des effets hypotenseurs, cardioinhibiteurs et vasodilatateurs. Il entraîne également une augmentation de la viscosité sanguine. Tous ces effets sont dose-dépendants.

Il est à noter, pour certaines doses, sur l'activité cardiaque, un double effet de *AJse*. En effet, les faibles doses de cet extrait induisent une augmentation de l'amplitude du complexe QRS de l'ECG et un effet inotrope positif sur les contractions rythmiques du cœur isolé. Ces effets sont accompagnés par des effets chronotropes négatifs. Par contre, les fortes doses de *AJse* font apparaître une diminution de l'amplitude du complexe QRS de l'ECG et un effet inotrope négatif sur les contractions cardiaques, en plus des effets chronotropes négatifs sur ces deux paramètres. Ces résultats suggèrent la présence d'au moins deux types de composés dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* :

- des composés cardioinhibiteurs, prédominants ;
- des composés cardiotoniques de type digitalique.

La présence de deux types de principes actifs est également mise en évidence par l'étude du débit coronaire qui montre que, pour les faibles doses de l'extrait, le débit coronaire diminue, alors que l'effet est contraire (augmentation) pour les fortes doses.

Tous ces effets de *AJse* seraient dus aux alcaloïdes, saponosides, stérols et polyterpènes, anthocyanes et antioxydants que renferme l'extrait. En effet, des tests phytochimiques réalisés par des réactions en tubes et confirmés par criblage sur CCM ont permis de mettre ces composés en évidence dans cet extrait. Toutefois, il n'est pas exclu que d'autres composés, qui n'ont pas été révélés par les tests utilisés, puissent participer, en partie, à l'apparition des effets de *AJse*.

Il est à noter que si les principes actifs à effet pharmacologique sont bien souvent connus depuis longtemps, il est beaucoup plus difficile d'identifier tous les constituants actifs dans une plante médicinale, notamment dans un extrait brut. Bien souvent, dans ces cas, l'effet ne peut pas être attribué à un seul constituant, mais plutôt à une ou plusieurs classes de substances présentes dans l'extrait.

Cette dernière hypothèse est confortée par les effets de type digitalique observés avec *AJse*, alors qu'il a été montré l'absence de glycosides cardiotoniques dans cet extrait.

L'étude de la pression sanguine artérielle montre que les substances pharmacologiques telles que l'atropine et la prazosine sont sans effet notable sur l'hypotension induite par *AJse*. Ceci indique que l'extrait ne contient pas significativement de composés cholinergiques et n'est pas un  $\alpha_1$ -bloquant.

Par contre, le propranolol, le vérapamil et la nifédipine inhibent partiellement l'hypotension induite par *AJse*. Aucune de ces substances utilisées ne supprime entièrement les effets hypotenseurs de cet extrait. Ainsi, *AJse* contiendrait des substances  $\beta$ -bloquants, des substances anticalciques à prédominance cardiaque et vasculaire et d'autres substances non mises en évidence.

Suite à un prétraitement des animaux d'expérimentation avec le losartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, utilisé à des doses qui n'ont pas d'effets propres sur la pression artérielle, les effets hypotenseurs de *AJse* sont potentialisés. L'extrait devient alors actif à des doses plus faibles et entraîne des baisses plus importantes de la pression artérielle.

Ainsi, dans le traitement de l'hypertension artérielle avec l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*, l'association d'un autre antihypertenseur tel qu'un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II pourrait donc être recommandée en bithérapie.

Ces différents mécanismes d'action de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* ne sont toutefois pas exclusifs, et cet extrait pourrait emprunter l'ensemble de ces mécanismes et bien d'autres, qui n'ont pas été mis en évidence, à des degrés divers, pour induire les effets observés.

Ces résultats restent préliminaires et pourraient constituer une base scientifique pour la recherche de nouveaux composés efficaces dans le traitement de l'hypertension artérielle. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour rendre ce travail utilisable dans le cadre de la mise au point d'un nouveau phytomédicament.

Compte tenu de la complexité des composants de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (Acanthaceae), et de ses divers effets et mécanismes d'action sur le l'activité cardio-vasculaire, il est nécessaire de purifier les composés contenus dans cet extrait brut.

Cette étude sera donc complétée dans le but de purifier et d'identifier des composés bioactifs de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (Acanthaceae). La démarche consistera, par l'utilisation de techniques séparatives et analytiques rigoureuses, à séparer les composés de l'extrait brut, à tester l'activité des fractions chromatographiques sur la pression sanguine

artérielle, à purifier les fractions les plus actives et à isoler les molécules qui sous-tendent les diverses activités détectées dans les différentes fractions. En plus, des études complémentaires approfondies, concernant l'identification de la structure de composés purifiés bioactifs seront menées et les effets pharmacologiques ainsi que les mécanismes d'action sur le système cardio-vasculaire de Mammifère du composé responsable des effets hypotenseur et antihypertenseur seront mis en évidence.

## IV<sub>2</sub> – Deuxième partie :

### **Purification, identification structurale, étude toxicologique, effets pharmacologiques et mécanisme d'action cardio-vasculaire de substances contenues dans un extrait aqueux de *Justicia secunda* (Acanthaceae)**

La deuxième partie de notre étude consistera à :

- séparer d'abord, puis purifier quelques composés de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* ;
- au cours des différentes étapes de la purification, tester les différents composés sur la pression artérielle et retenir les substances les plus actives ;
- identifier ensuite la substance purifiée la plus active en déterminant sa masse moléculaire, sa formule brut, sa structure chimique et son nom ;
- enfin, étudier la toxicité, vérifier les propriétés antihypertensives et déterminer le mécanisme d'action sur le système cardio-vasculaire de Mammifères de cette substance purifiée.

Plusieurs méthodes de séparation et d'analyse (cf. II – 2, revue bibliographique) facilitent l'obtention de composés purs. La combinaison judicieuse de ces différentes techniques est la clef d'une purification efficace.

Ainsi, pour la purification de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse), différentes techniques de séparation et d'analyse sont utilisées. Ce sont :

- la séparation liquide-liquide (LLE) ;
- la chromatographie sur couche mince (CCM) analytique ;
- la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique ;
- la chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) ;
- la chromatographie sur colonne ouverte (CC) ;
- la chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative).

Une étude bioguidée permettra de retenir les substances bioactives au cours des différentes étapes de la purification.

## **IV<sub>2</sub> – 1. Purification bioguidée de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et identification de la structure chimique d'un composé purifié bioactif**

### **IV<sub>2</sub> – 1 – 1. Séparation liquide-liquide (LLE) de AJse**

Avec 50 g de feuilles fraîches de *Justicia secunda* (Acanthaceae), 15 ± 1 g d'un extrait aqueux brut sont obtenus par décoction, filtration et lyophilisation ; soit un rendement de 30 %.

Une séparation liquide-liquide de 10 g de cet extrait, en solution aqueuse, dans du chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et de l'acétate d'éthyle (AcOEt), a permis d'obtenir les phases chloroformique, acétatique et aqueuse. Les masses de chaque phase, après évaporation des solvants, ainsi que le rendement de ce partage, sont indiquées à la **figure 62**.

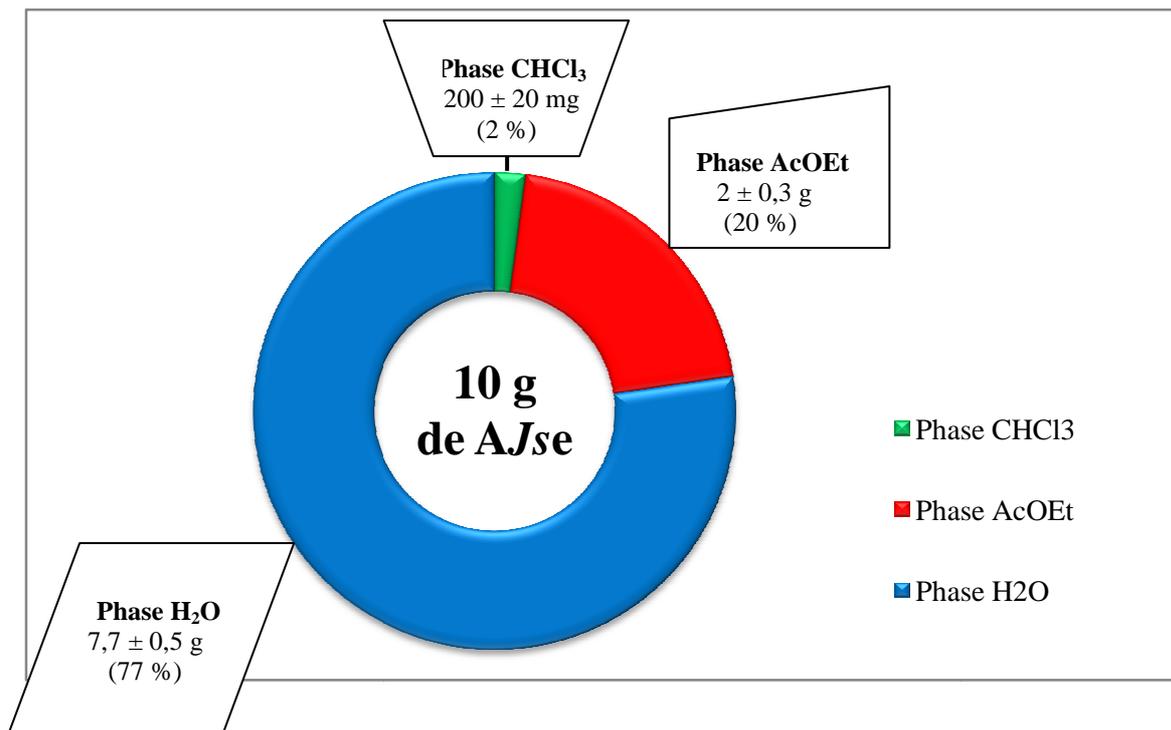
### **IV<sub>2</sub> – 1 – 2. Analyses chromatographiques de l'extrait brut de *Justicia secunda* (AJse) et des phases chloroformique, acétatique et aqueuse issues de la séparation liquide-liquide (LLE) de AJse**

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 2– 1. Chromatographie sur couche mince (CCM) de AJse et des phases issues de la LLE de cet extrait**

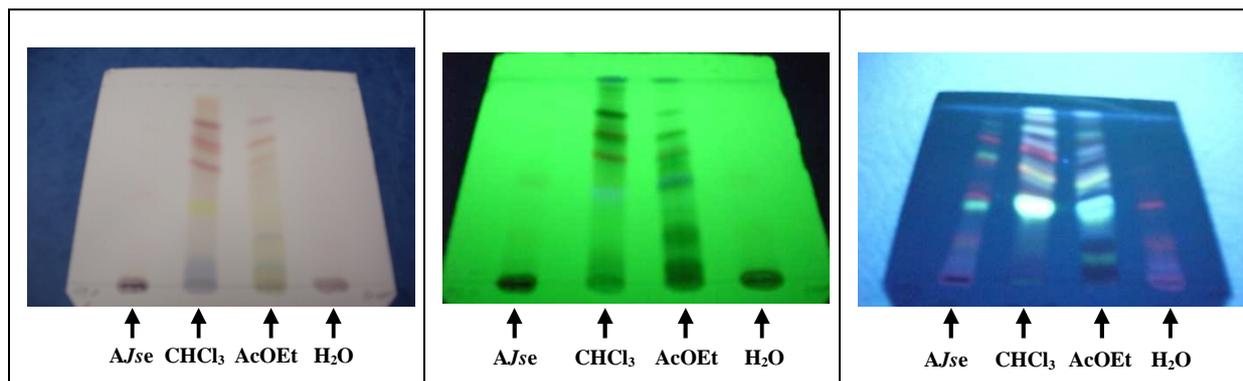
L'extrait brut et les différentes phases obtenues sont solubilisés dans un solvant adéquat : méthanol-eau (1 : 1 v/v). Ils sont ensuite analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Un chromatogramme de la CCM de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* a été présenté et analysé en IV<sub>1</sub> – 3 – 1 – 2 (cf. résultats, **figure 42**, page 152).

La **figure 63** montre les photographies des plaques CCM de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* et des phases (CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et H<sub>2</sub>O) issues de la LLE de AJse, observées après migration des composés, à la lumière visible, en extinction de fluorescence à 254 nm (rayonnement UV à 254 nm) et sous fluorescence à 366 nm (rayonnement UV à 366 nm).

Les CCM font apparaître plusieurs constituants dans l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et dans les phases issues de sa séparation liquide-liquide. Certaines taches sont observables uniquement sous UV à 254 et/ou 366 nm. D'autres le sont uniquement à la lumière visible.



**Figure 62 : bilan de masse et rendement de la séparation liquide-liquide de 10 g de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) (n = 4)**



**A** – Lumière visible

**B** – Détection UV à 254 nm

**C** – Détection UV à 366 nm

**Figure 63 : photographies des plaques CCM des phases  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt et  $\text{H}_2\text{O}$  issues de la séparation liquide-liquide de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et de AJse**

Support : gel silice 60 F<sub>254</sub> Merck

Echantillons : 100  $\mu\text{g}$

Phase mobile :  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$  (9 : 2 v/v).

L'observation des plaques CCM à la lumière visible montre plusieurs taches à différents niveaux de migration. Des taches sombres apparaissent également, séparées les unes des autres lorsque les plaques CCM sont observées au rayonnement UV, en extinction de fluorescence, à 366 nm. Ces taches sont plus nombreuses et plus apparentes pour les phases  $\text{CHCl}_3$  et AcOEt. L'observation des plaques CCM à l'UV a permis de noter la présence de plusieurs constituants UV actives à 254 nm, avec de multiples fluorescences, principalement pour l'extrait brut et les phases  $\text{CHCl}_3$  et AcOEt. Ces taches sont de colorations variées, principalement pour les phases  $\text{CHCl}_3$  et AcOEt.

Certaines taches présentes dans l'extrait brut sont également présentes dans les autres phases, particulièrement dans la phase aqueuse, avec des colorations moins intenses et des fluorescentes plus ou moins faibles.

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 2– 2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de AJse et des différentes phases de la LLE**

Pour les analyses par HPLC/DAD-UV, l'extrait brut de *Justicia secunda* a été solubilisé dans un solvant adéquat : méthanol-eau (1 : 1 v/v). Après dissolution et filtration, les solutions ont été injectées dans un système HPLC et analysées.

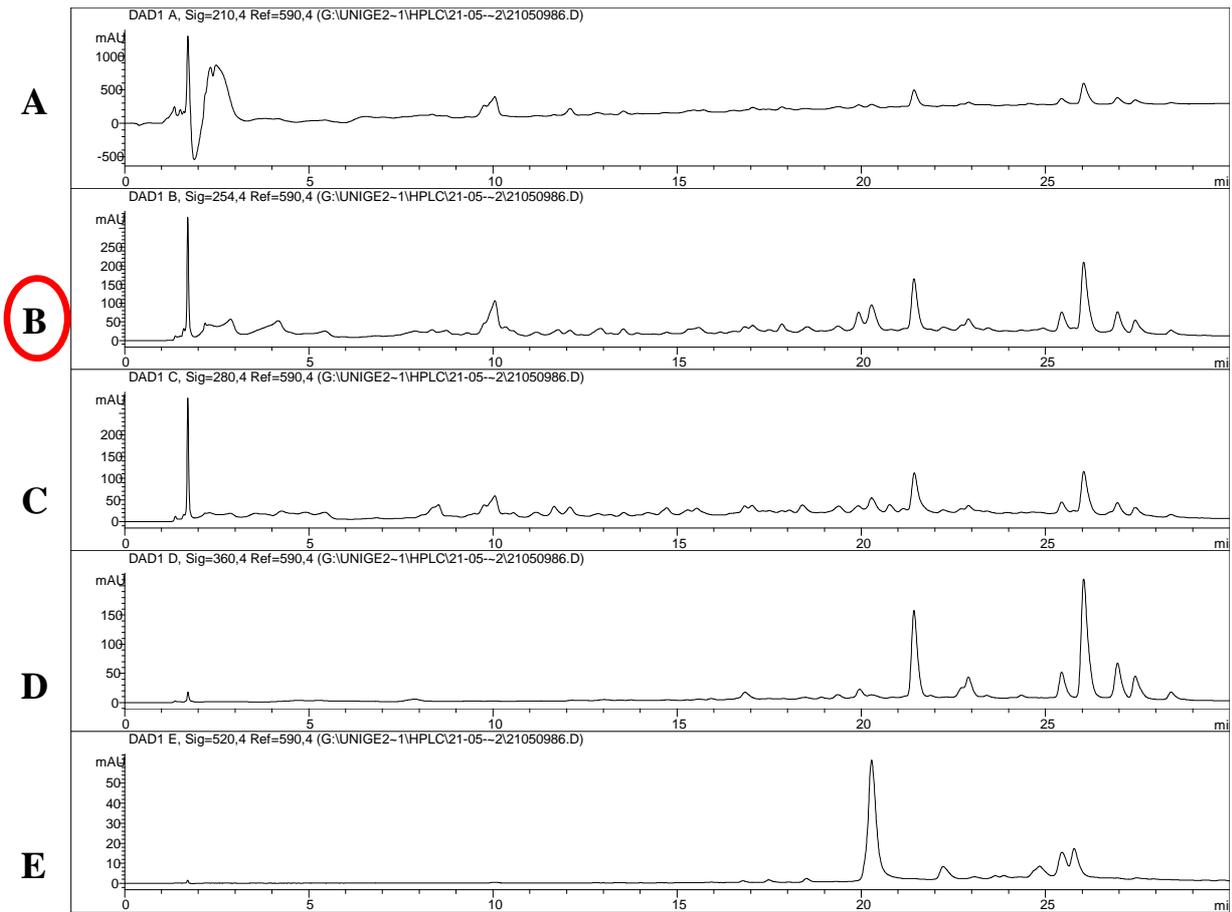
Les chromatogrammes de AJse obtenus par analyse HPLC/DAD-UV à 210, 254, 280, 360 et 520 nm sont présentés à la **figure 64**.

Tous les produits de cet extrait brut, aux longueurs d'ondes utilisées pour l'HPLC/DAD-UV, apparaissent sur le chromatogramme en moins de 30 min d'analyse. Ainsi, les analyses par la chromatographie liquide à haute performance sont réalisées durant 30 min.

Les analyses par HPLC/DAD-UV des phases issues de la LLE ont été réalisées dans les mêmes conditions que celle de l'extrait brut. Mais la détection DAD-UV a été faite uniquement à 254 nm, longueur d'onde à laquelle les composés de AJse sont les mieux détectés (**figure 64-B**).

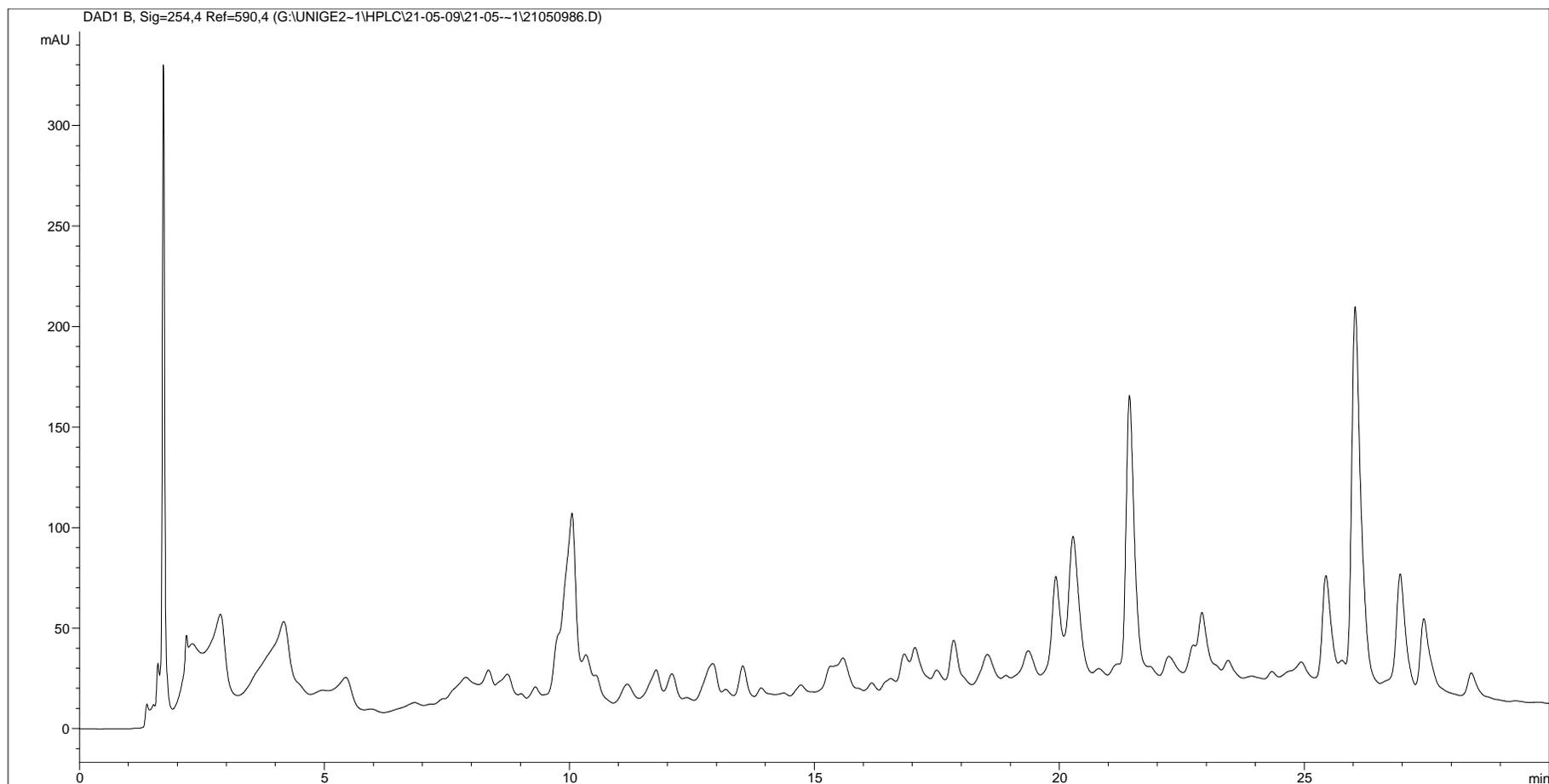
Les chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm, obtenus pour AJse et pour les phases chloroformique, acétatique et aqueuse, sont présentés respectivement par les **figures 65, 66, 67 et 68**.

La **figure 69** donne les chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV de l'extrait brut et des trois phases issues de la LLE de AJse. Elle montre que, pour chacune des phases, les pics apparaissent à des temps d'analyse différents.



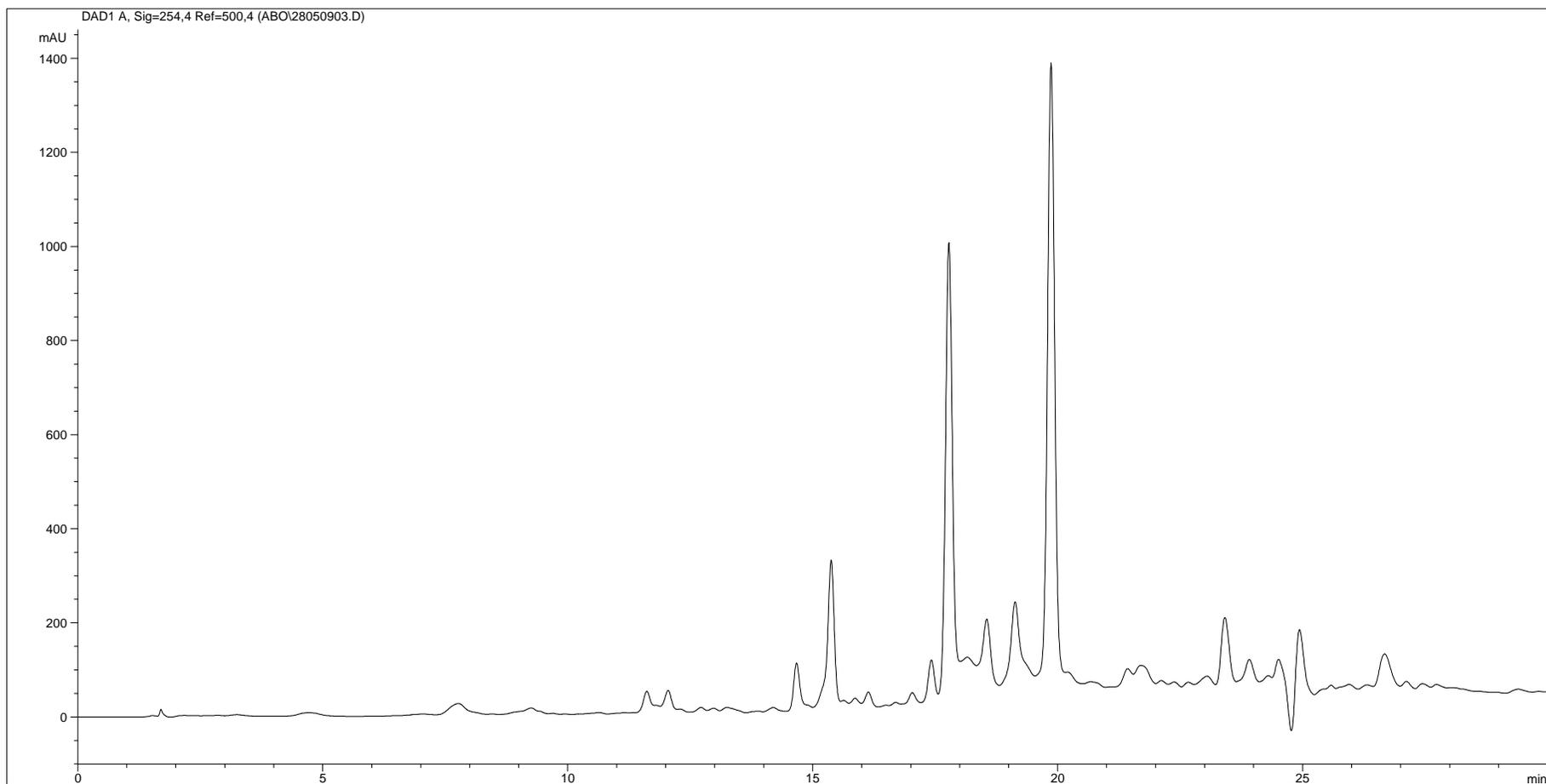
**Figure 64 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV de l'extrait brut de *Justicia secunda* à 210 (A), 254 (B), 280 (C), 360 (D) et 520 (E) nm**

Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O  
 (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ;  
débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 5  $\mu$ g.



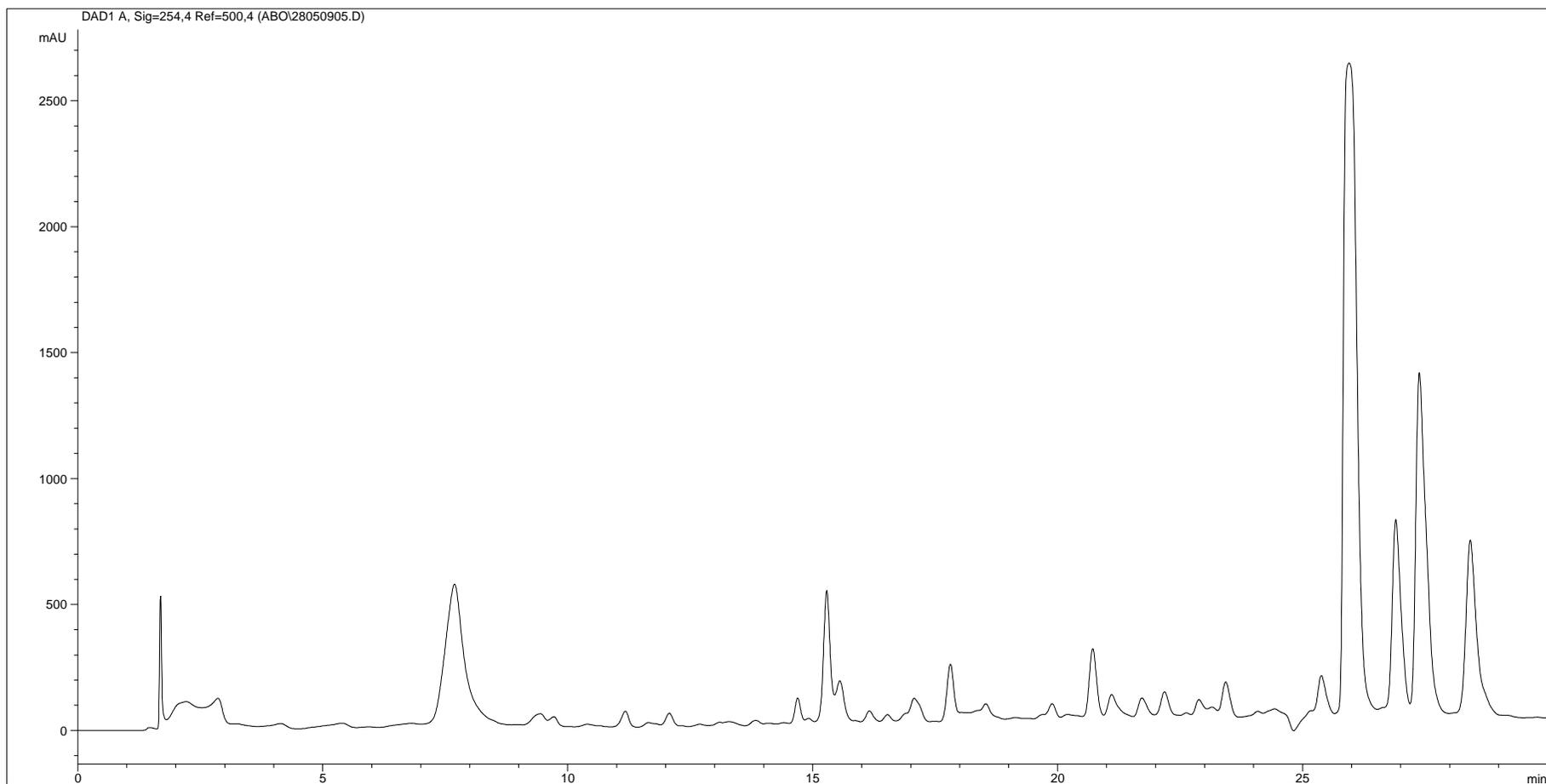
**Figure 65 : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 254 nm de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10  $\mu$ g.



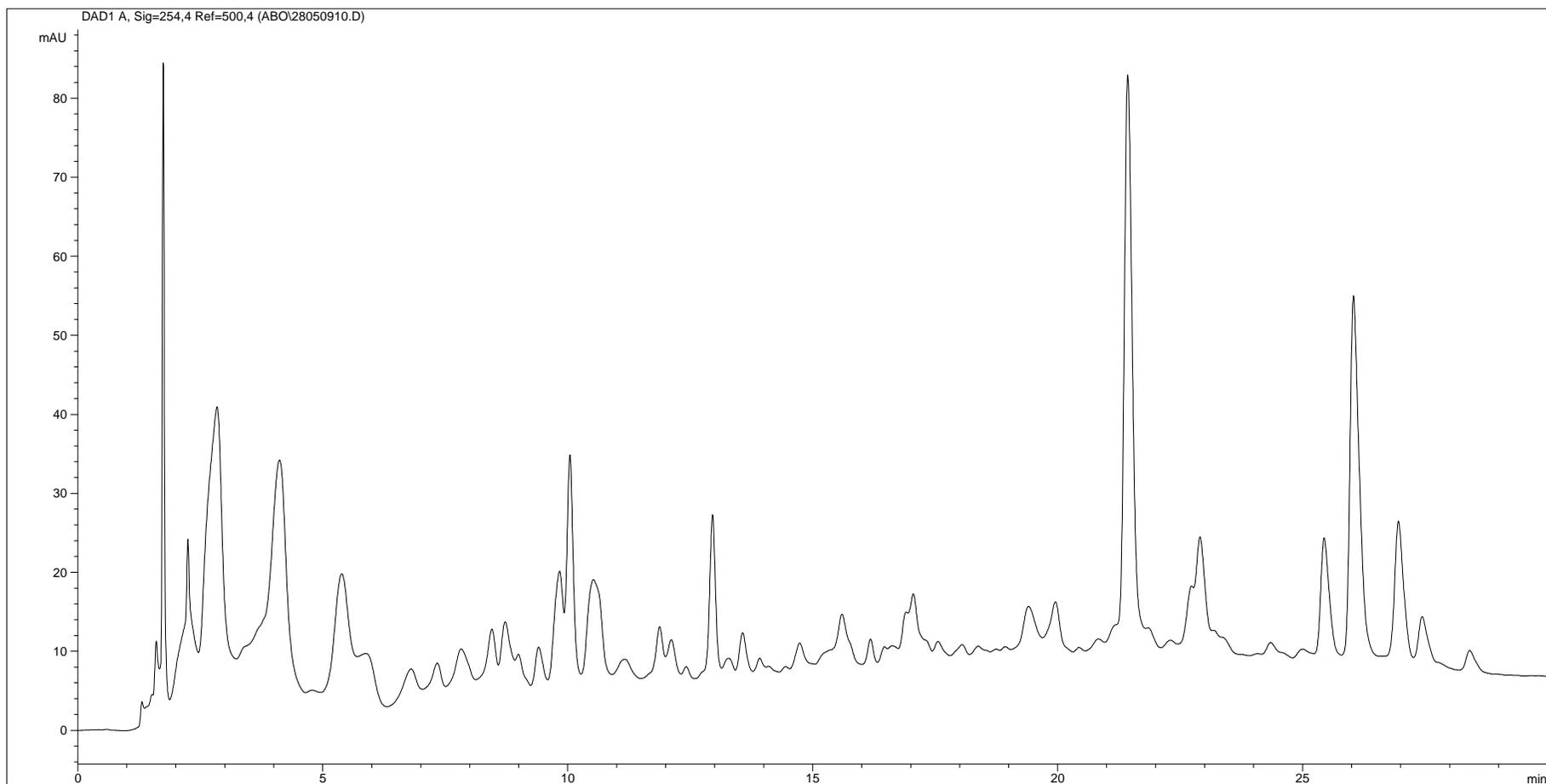
**Figure 66 : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 254 nm de la phase chloroformique ( $\text{CHCl}_3$ ) issue de la LLE de AJse**

*Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 3,9 mm d.i.,  $\text{H}_2\text{O}$ ) ; éluant :  $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}$  : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10  $\mu\text{g}$ .*



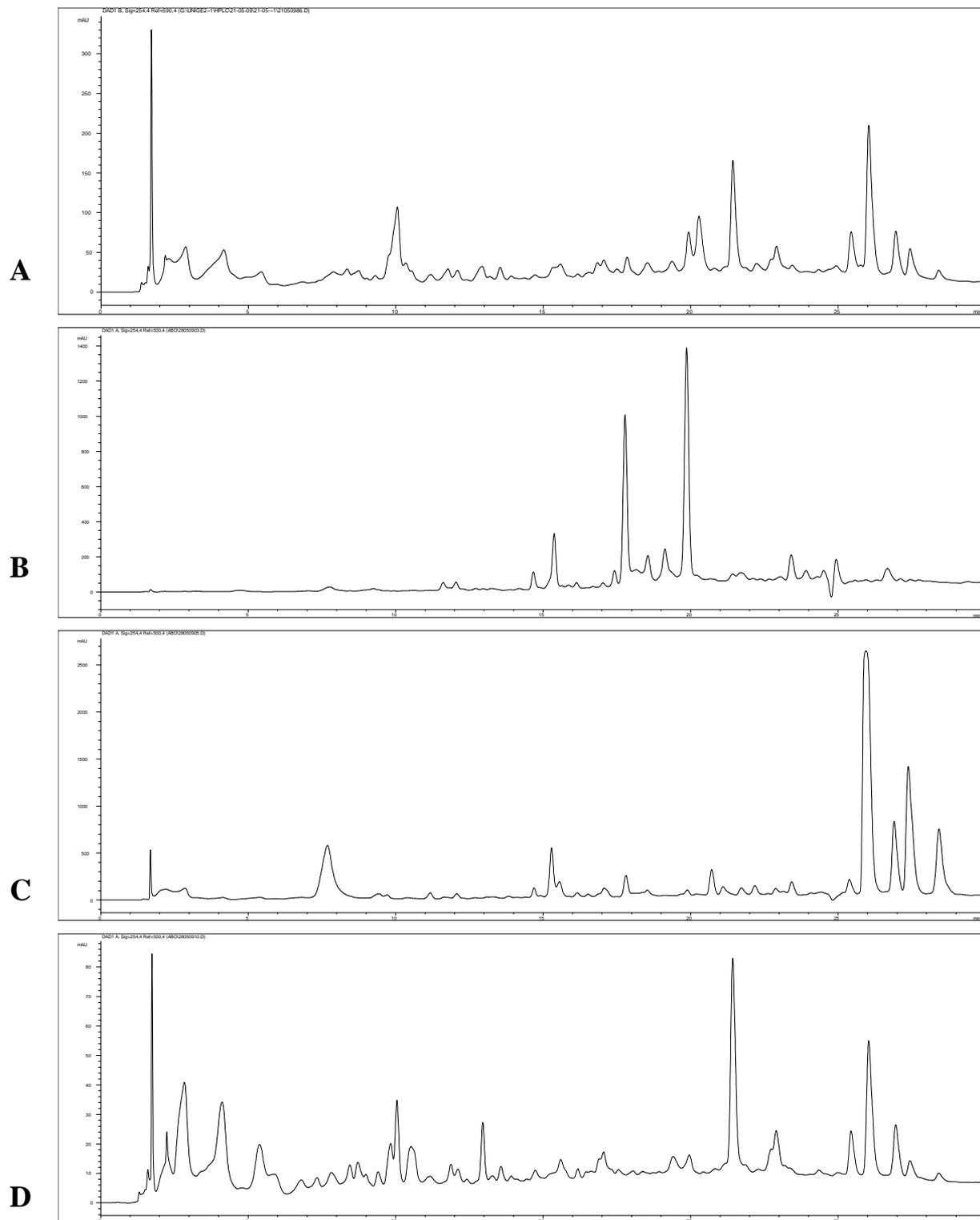
**Figure 67 : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 254 nm de la phase acétatique (AcOEt) issue de la LLE de AJse**

*Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10  $\mu$ g.*



**Figure 68 : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 254 nm de la phase aqueuse (H<sub>2</sub>O) issue de la LLE de AJse**

*Colonne : Symmetry C 18 (5 μm, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10 μg.*



**Figure 69 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm de A/Je (A)  
et des phases  $\text{CHCl}_3$  (B), AcOEt (C) et  $\text{H}_2\text{O}$  (D)**

*Colonne* : Symmetry C 18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 3,9 mm d.i.,  $\text{H}_2\text{O}$ ) ; *éluant* :  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$

( $\text{CH}_3\text{OH}$  : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ;

*débit de la phase mobile* : 1 ml/min ; *injection* : 10  $\mu\text{g}$ .

Après avoir séparé les composés de *AJse* en trois phases, il importe de vérifier les effets pharmacologiques de ces phases sur la pression artérielle.

### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3. Effets pharmacologiques des phases issues de la séparation liquide-liquide (LLE) de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (*AJse*) sur la pression artérielle de lapin**

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 1. Effets dose-réponse des phases issues de la LLE de *AJse* sur la pression artérielle de lapin**

La séparation liquide-liquide (LLE) de *AJse* a donné trois (3) phases chromatographiques ( $\text{CHCl}_3$ , AcOEt et  $\text{H}_2\text{O}$ ) de compositions différentes. Les effets de chacune de ces phases ont été étudiés sur la pression sanguine artérielle de lapin, à des doses croissantes, allant jusqu'à 20 mg/kg P.C., qui sont des doses physiologiques pour lesquelles les effets de l'extrait brut (*AJse*) sont totalement réversibles.

Cette étude a pour but de voir, tout comme pour l'extrait brut, les effets pharmacologiques de chacune de ces phases sur la pression sanguine artérielle de lapin.

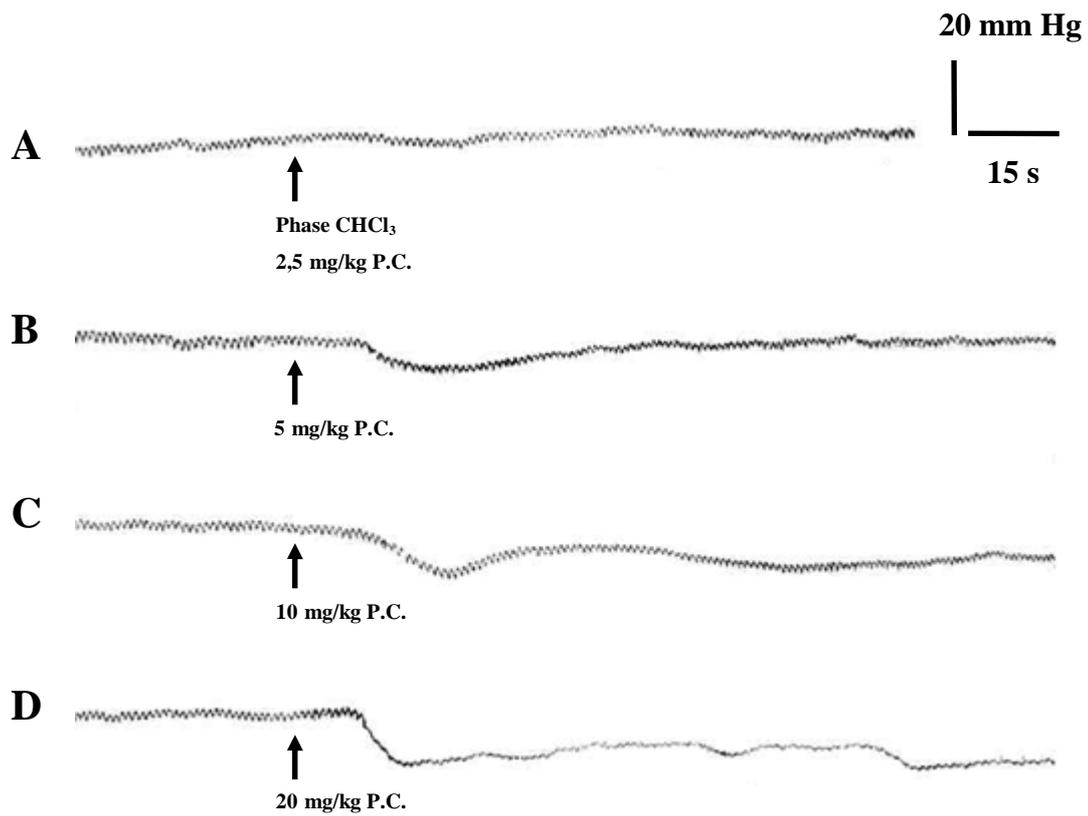
#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 1 – 1. Effets dose-réponse de la phase chloroformique sur la pression artérielle de lapin**

La phase chloroformique ( $\text{CHCl}_3$ ), à des doses inférieures à 5 mg/kg P.C., est sans effet sur la pression artérielle. Les doses comprises entre 5 mg/kg P.C. et 20 mg/kg P.C. induisent une hypotension allant de  $6 \pm 2,3$  à  $11 \pm 3,1$  mm Hg (**figure 70**).

A partir de la dose de 10 mg/kg P.C., l'hypotension induite par cette phase  $\text{CHCl}_3$  devient irréversible, et la dose de 20 mg/kg P.C. est mortelle.

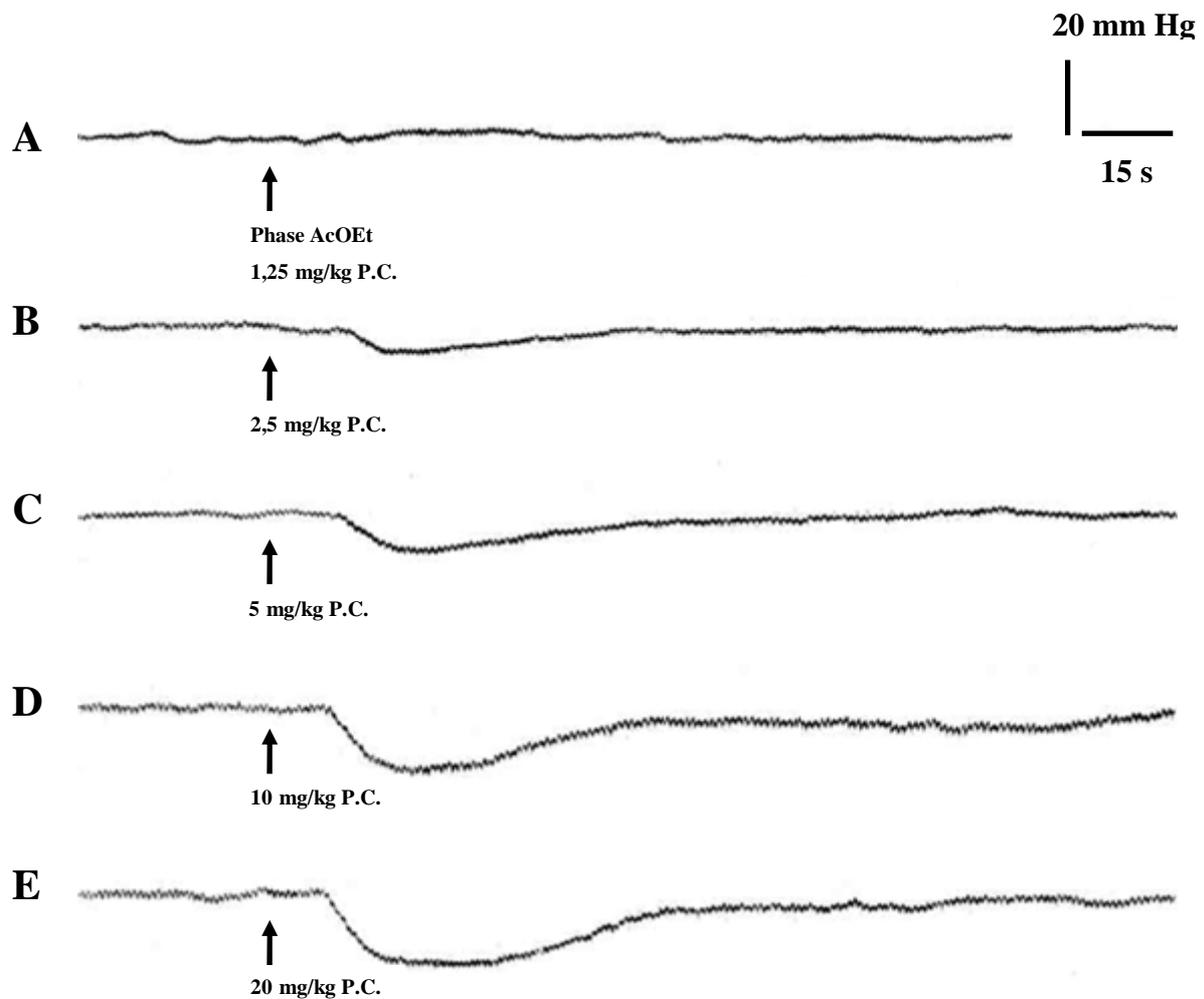
#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 1 – 2. Effets dose-réponse de la phase acétatique sur la pression artérielle de lapin**

La phase acétatique (AcOEt), aux doses allant de 2,5 mg/kg P.C. à 20 mg/kg P.C., induit une hypotension artérielle dose-dépendante (**figure 71**). A ces doses, les baisses de pression artérielle, qui varient de  $6 \pm 1,3$  à  $17 \pm 3,8$  mm Hg, sont totalement réversibles. Cette phase acétatique est sans effet sur la pression artérielle, pour des doses inférieures à 2,5 mg/kg P.C.



**Figure 70 : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin de la phase chloroformique ( $\text{CHCl}_3$ ) issue de la LLE de A/Je**

**A à D** - Effets de la phase  $\text{CHCl}_3$  à 2,5 (A), 5 (B), 10 (C) et 20 (D) mg/kg de poids corporel (après chaque flèche)



**Figure 71 : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin de la phase acétatique (AcOEt) issue de la LLE de A/Je**

**A à E** - Effets de la phase AcOEt à 1,25 (A), 2,5 (B), 5 (C), 10 (D) et 20 (E) mg/kg de poids corporel (après chaque flèche)

### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 1 – 3. Effets dose-réponse de la phase aqueuse sur la pression artérielle de lapin**

La phase aqueuse (H<sub>2</sub>O), pour des doses inférieures à 2,5 mg/kg P.C., n'a pas d'effet sur la pression sanguine artérielle. Les effets de cette phase aqueuse apparaissent pour des doses supérieures ou égales à 2,5 mg/kg P.C., et se traduisent par une hypotension artérielle dose-dépendante allant de  $3 \pm 1,2$ , pour la dose de 2,5 mg/kg P.C., à  $14 \pm 3,6$  mm Hg, pour celle de 20 mg/kg P.C. (**figure 72**). Ces effets sont totalement et rapidement réversibles (moins de 30 s) pour les doses variant de 2,5 à 10 mg/kg P.C., et deviennent partiellement réversibles à la dose de 20 mg/kg P.C.

Les courbes de la **figure 73** donnent les effets dose-réponse de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* et des trois phases issues de la LLE de *AJse*. Cette figure montre que, parmi les phases issues de la LLE de *AJse*, la phase acétatique (courbe en rouge) est la plus active sur la pression artérielle, alors que la phase chloroformique (courbe inférieure, en vert) est la moins active. Toutefois, chacune des trois phases reste moins active que l'extrait brut (courbe supérieure, en noir)

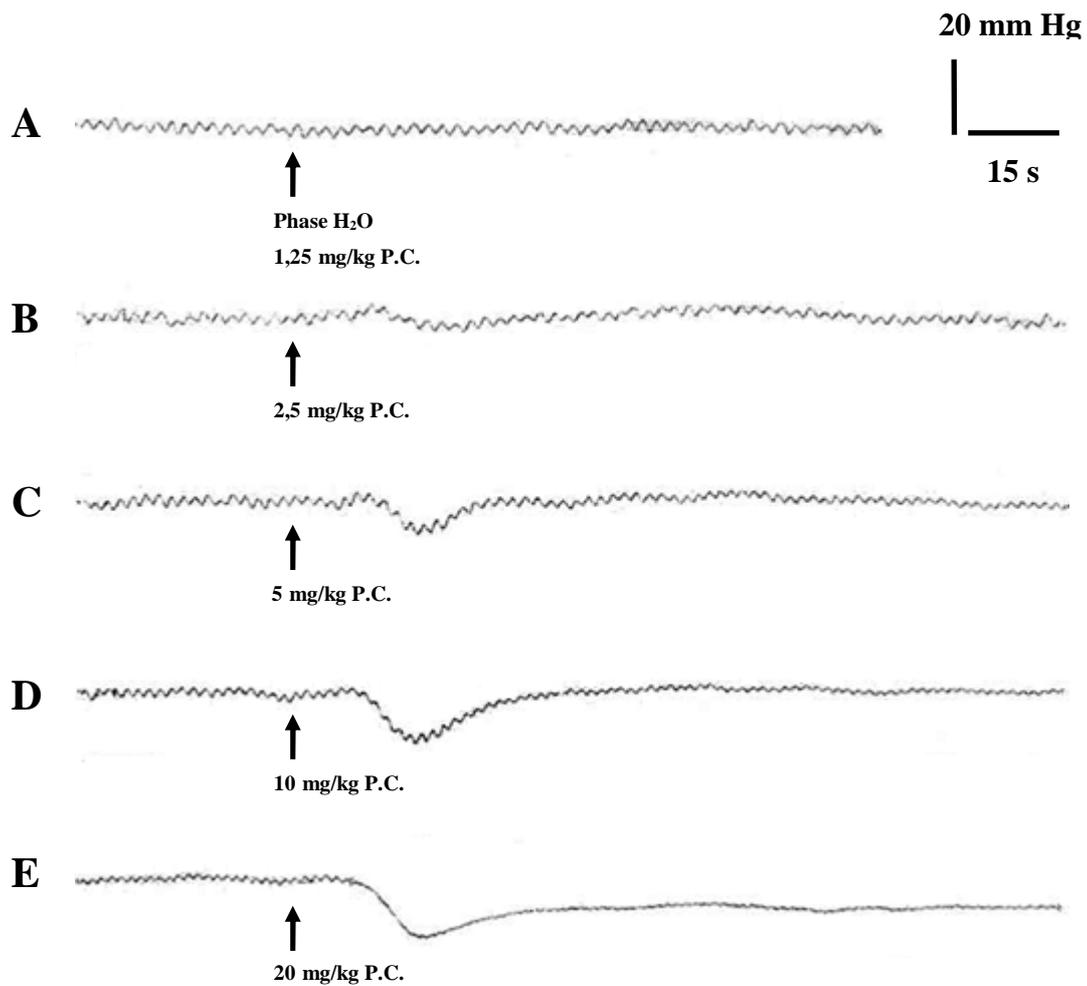
### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 2. Effets sur la pression sanguine artérielle de lapin des phases, issues de la LLE de *AJse*, cumulées deux à deux**

Cette étude consiste à tester les effets des phases issues de la LLE de *AJse*, cumulées deux à deux. Pour cela, les solutions des deux phases à cumuler sont additionnées après la LLE, puis évaporées et le produit obtenu est testé sur la pression artérielle de lapin (n = 3), à des doses variant de 1,25 à 20 mg/kg P.C.

Le but de cette étude est de voir si les effets des phases sont cumulatifs ou non. Ceci permettra de vérifier si la technique de séparation utilisée (séparation liquide-liquide) a entraîné des pertes de principes actifs de l'extrait brut ou les a conservés mais repartis dans les trois phases de la LLE, vu que les effets de ces phases sont plus faibles que ceux de l'extrait brut.

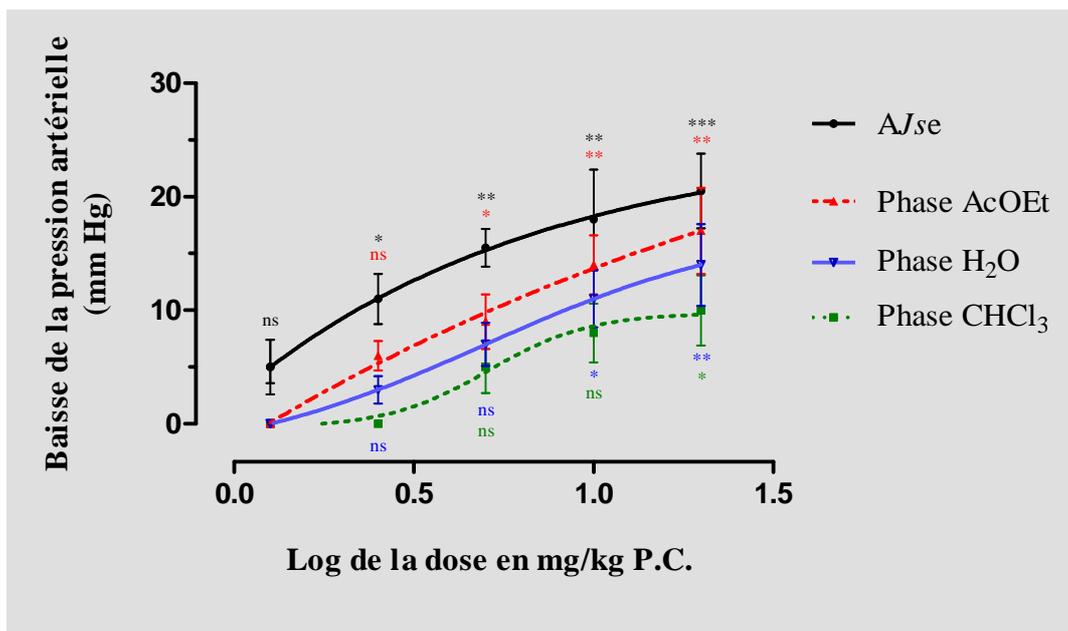
### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 2 – 1. Effets sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique et acétatique cumulées**

La **figure 74** est un enregistrement type des effets dose-réponse des phases CHCl<sub>3</sub> et AcOEt cumulées, à des doses variant de 1,25 à 20 mg/kg P.C. Il apparaît, à partir de la dose de 2,5 mg/kg P.C., une hypotension artérielle dose-dépendante, allant de  $6 \pm 1,6$  mm Hg, pour cette dose, à  $18 \pm 3,2$  mm Hg pour la dose de 20 mg/kg P.C. Ces effets sont totalement



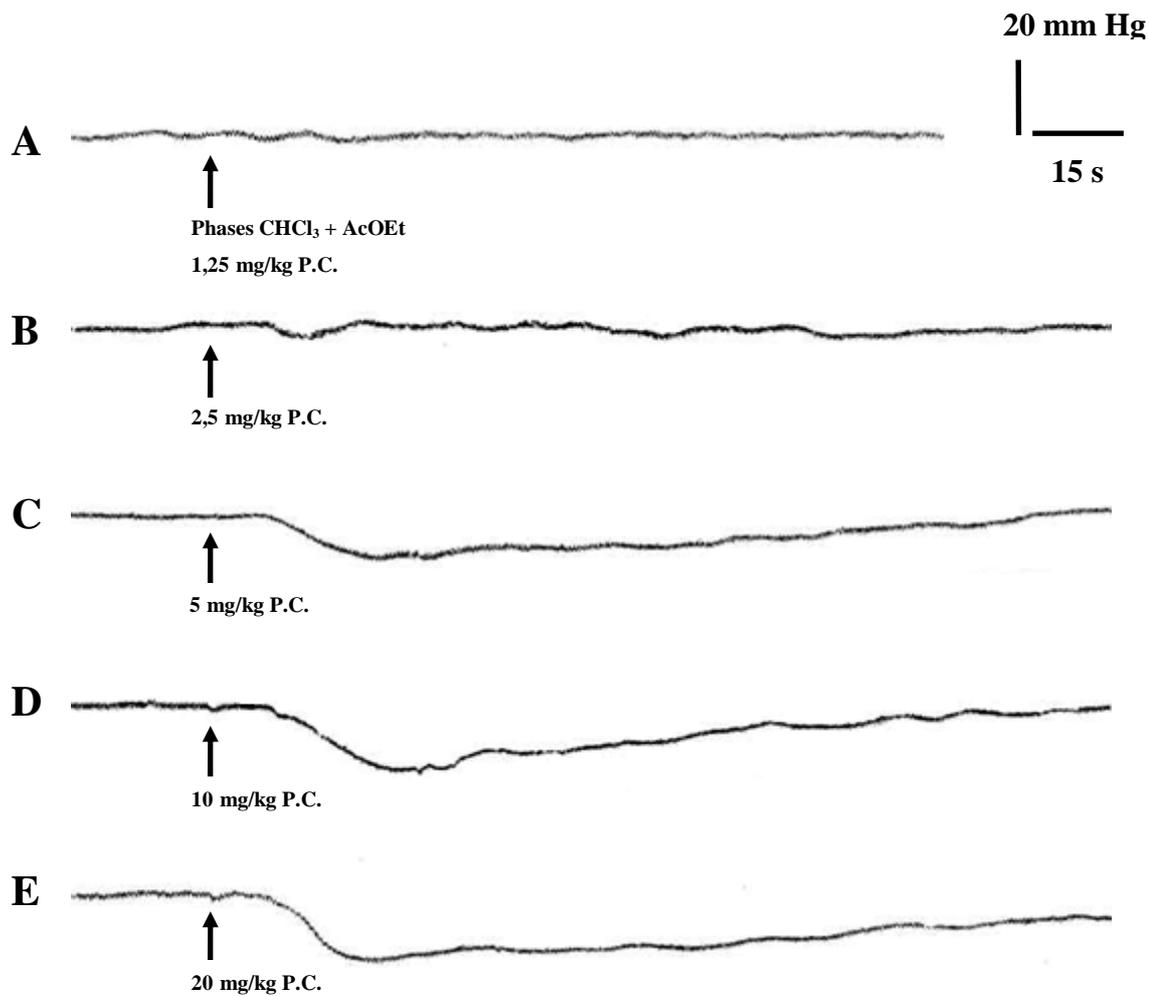
**Figure 72 : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin de la phase aqueuse (H<sub>2</sub>O) issue de la LLE de AJse**

**A à E** - Effets de la phase H<sub>2</sub>O à 1,25 (A), 2,5 (B), 5 (C), 10 (D) et 20 (E) mg/kg de poids corporel (après chaque flèche)



**Figure 73 : baisses de la pression artérielle de lapin en fonction de la concentration de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et des phases chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), acétatique (AcOEt) et aqueuse (H<sub>2</sub>O) issues de la LLE de AJse**

(n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)



**Figure 74 : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique (CHCl<sub>3</sub>) et acétatique (AcOEt) cumulées**

**A à E** - Effets des phases CHCl<sub>3</sub> + AcOEt à 1,25 (A), 2,5 (B), 5 (C), 10 (D) et 20 (E) mg/kg de poids corporel (après chaque flèche)

réversibles pour les doses inférieures ou égales à 10 mg/kg P.C., et partiellement réversibles à la dose de 20 mg/kg P.C.

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 2 – 2. Effets sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique et aqueuse cumulées**

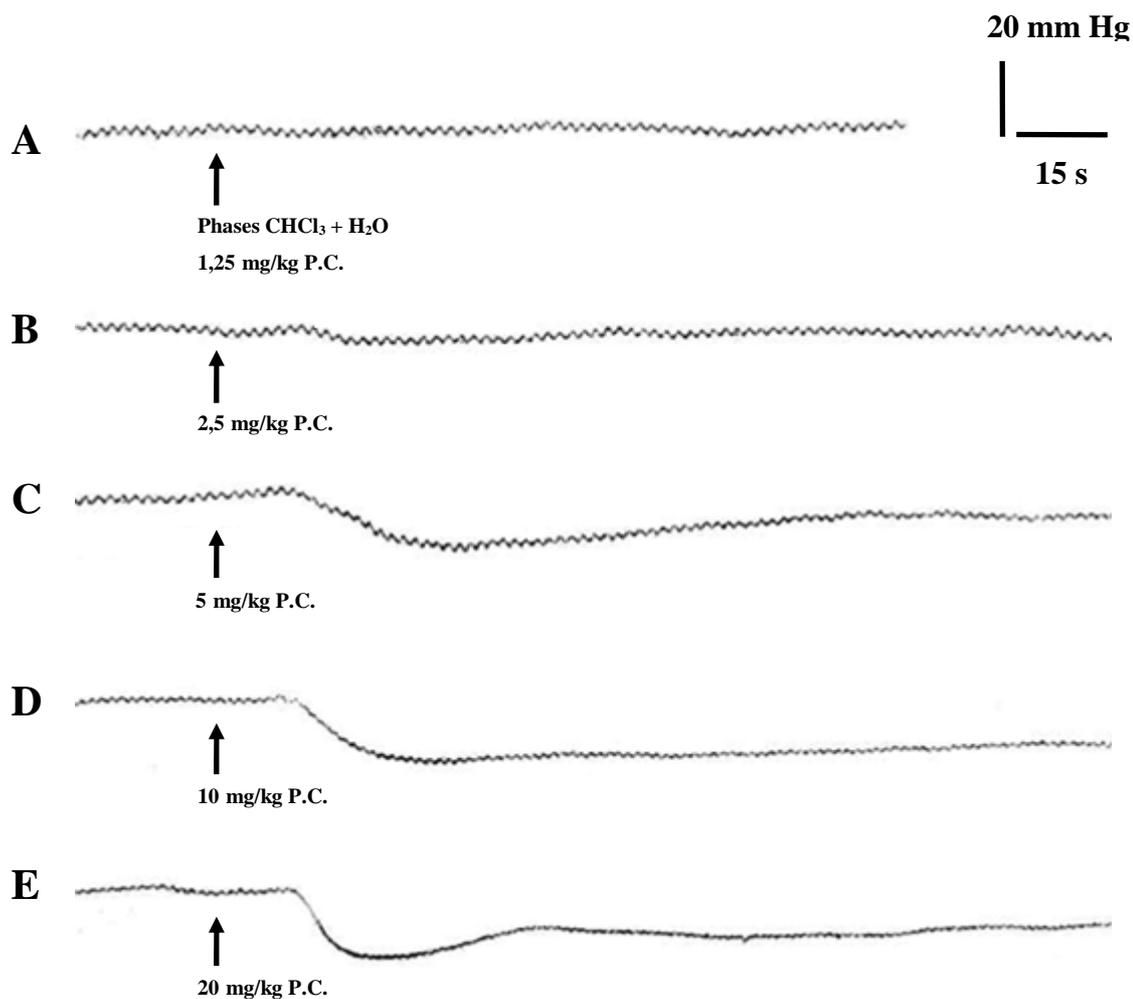
Les phases chloroformique et aqueuse cumulées, pour des doses supérieures ou égales à 2,5 mg/kg P.C., induisent une hypotension artérielle dose-dépendante. Des doses plus faibles sont sans effet sur la pression artérielle. Les hypotensions induites, qui varient de  $4 \pm 1,1$  mm Hg, pour la dose de 2,5 mg/kg P.C. (**figure 75-B**), à  $16 \pm 3,3$  mm Hg, pour celle de 20 mg/kg P.C. (**figure 75-E**), sont totalement réversibles pour les doses inférieures ou égales à 10 mg/kg P.C. Elles deviennent partiellement réversibles à la dose de 20 mg/kg P.C.

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 2 – 3. Effets sur la pression artérielle de lapin des phases acétatique et aqueuse cumulées**

Les phases acétatique et aqueuse cumulées, testées sur la pression artérielle, entraînent une hypotension dose-dépendante, pour les doses variant de 1,25 mg/kg P.C. à 20 mg/kg P.C. A ces doses, ces effets hypotenseurs qui varient de  $3 \pm 1,2$  mm Hg à  $20 \pm 3,2$  mm Hg sont totalement réversibles (**figure 76**).

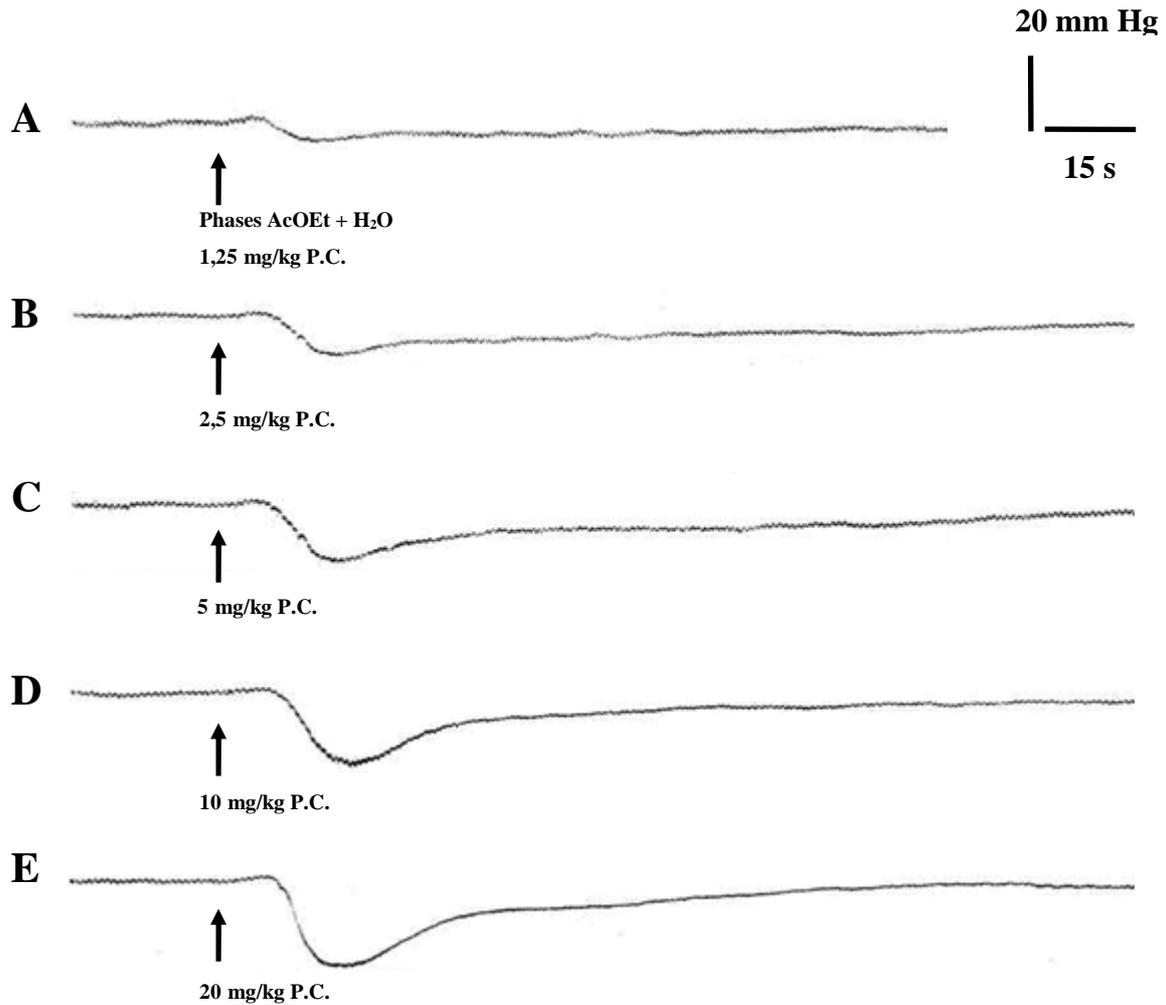
Les courbes de la **figure 77** donnent les effets, sur la pression artérielle de lapin, des trois phases issues de la LLE de *AJse*, cumulées deux à deux, et ceux de cet extrait brut. Cette **figure 77** indique que les phases AcOEt et H<sub>2</sub>O cumulées sont les plus actives, mais présentent des effets hypotenseurs légèrement inférieurs à ceux de l'extrait brut. La dose minimale active de ces deux phases cumulées (1,25 mg/kg P.C.) est identique à celle de l'extrait aqueux brut. Les phases CHCl<sub>3</sub> et H<sub>2</sub>O cumulées ont le plus faible effet sur la pression sanguine artérielle. Cette figure montre également que les trois phases, cumulées deux à deux restent toujours moins actives que l'extrait brut.

Le chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV de la phase AcOEt, la plus active des phases issues de la LLE de *AJse*, présente quatre (4) composés majoritaires (1, 2, 3 et 4) (**figure 78-B**) avec les absorbances les plus importantes (> 600 mAU). Lorsque ces phases sont cumulées deux à deux et testées sur la pression artérielle, le mélange AcOEt + H<sub>2</sub>O est le plus actif. Son chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV présente trois (3) pics majoritaires (1, 2 et 3) (**figure 78-A**) avec des absorbances les plus importantes (> 1 000 mAU). Ces trois produits correspondent aux composés 1, 2 et 3 de la phase AcOEt.



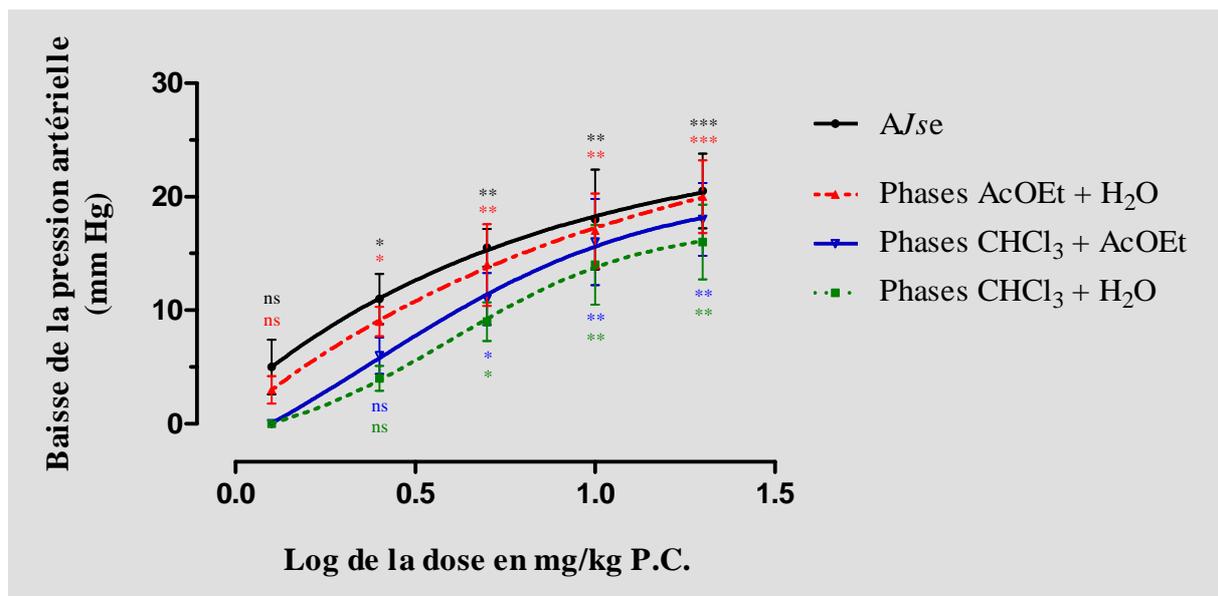
**Figure 75 : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des phases chloroformique (CHCl<sub>3</sub>) et aqueuse (H<sub>2</sub>O) cumulées**

**A à E** - Effets des phases CHCl<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O à 1,25 (A), 2,5 (B), 5 (C), 10 (D) et 20 (E) mg/kg de poids corporel (après chaque flèche)



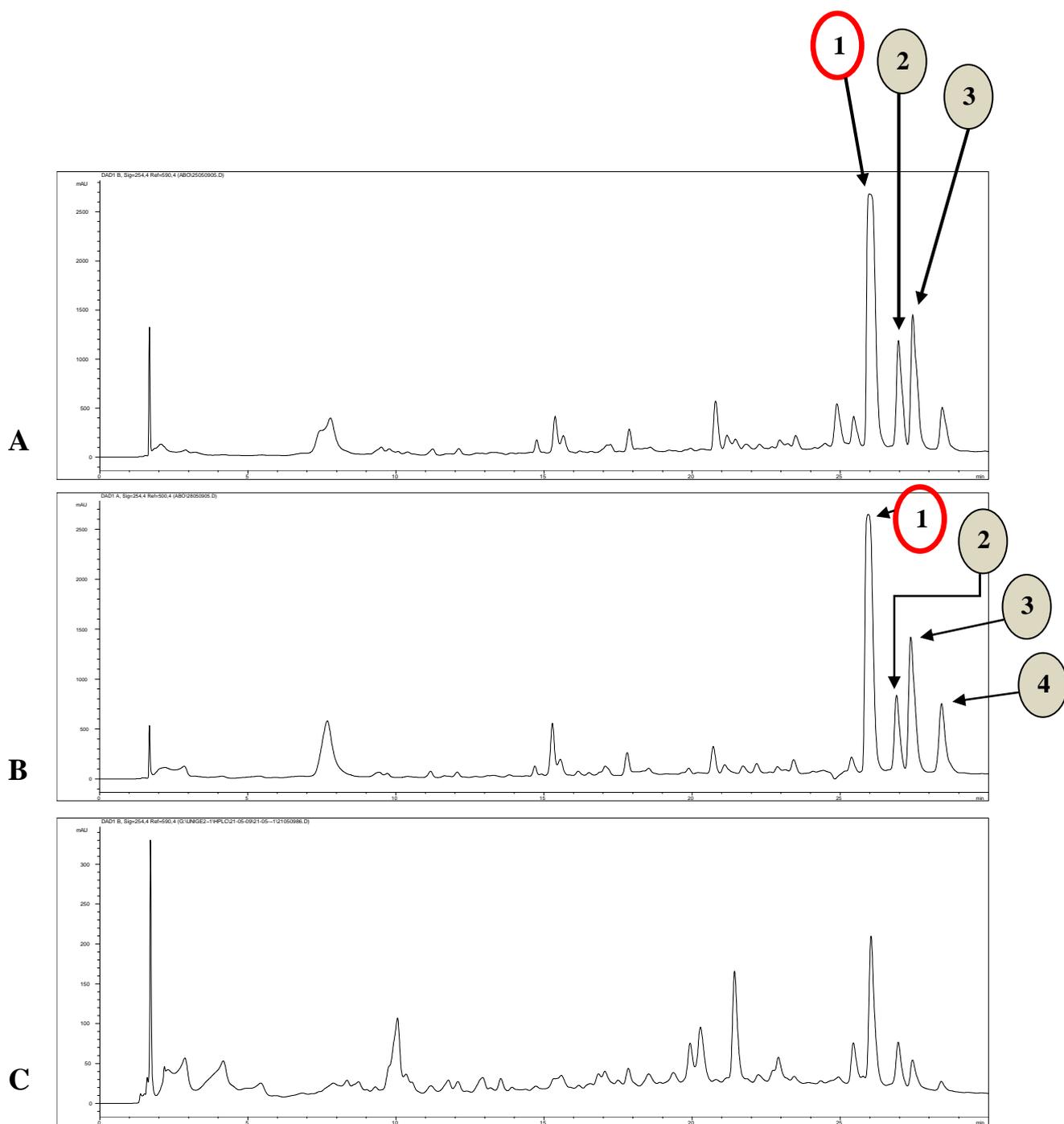
**Figure 76 : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des phases acétatique (AcOEt) et aqueuse (H<sub>2</sub>O) cumulées**

**A à E** - Effets des phases AcOEt + H<sub>2</sub>O à 1,25 (A), 2,5 (B), 5 (C), 10 (D) et 20 (E) mg/kg de poids corporel (après chaque flèche)



**Figure 77 : baisses de la pression artérielle de lapin en fonction de la concentration de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et des phases chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), acétatique (AcOEt) et aqueuse (H<sub>2</sub>O) issues de la LLE de AJse, cumulées deux à deux**

(n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)



**Figure 78 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm montrant les composés qui absorbent majoritairement dans les phases AcOEt + H<sub>2</sub>O (A) et la phase AcOEt (B) après la LLE de AJse (C)**

*Colonne* : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; *éluant* : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; *débit de la phase mobile* : 1 ml/min ; *injection* : 10  $\mu$ g.

### **IV<sub>2</sub> – 1 – 3 – 3. Effets sur la pression sanguine artérielle de lapin des trois phases (aqueuse, chloroformique et acétatique) issues de la LLE de AJse, cumulées**

Cette étude a pour but de vérifier si, après la séparation liquide-liquide, les trois phases obtenues renferment toujours la totalité des composés ou principes actifs de l'extrait brut. Ainsi, après la LLE, les trois phases sont cumulées et les solvants sont évaporés. Le produit obtenu est ensuite testé sur la pression artérielle de lapin.

Les tests sont réalisés avec des doses variant également de 1,25 à 20 mg/kg P.C. La **figure 79**, qui donne les résultats de cette étude pour une expérience type, montre que les trois phases, aux doses testées, entraînent une hypotension variant de  $4 \pm 1,4$  mm Hg (**figure 79-A**) à  $20 \pm 4,1$  mm Hg (**figure 79-E**). Ces effets sont dose-dépendants et totalement réversibles.

Les effets de l'extrait brut (AJse) et ceux des trois phases cumulées sont donnés par les courbes de la **figure 80**. Cette figure montre que la courbe de l'extrait brut et celle des trois phases cumulées sont quasiment superposées, particulièrement pour les doses supérieures ou égales à 5 mg/kg P.C. Ceci indique que AJse et les trois phases cumulées ont des effets quasi identiques sur la pression sanguine artérielle.

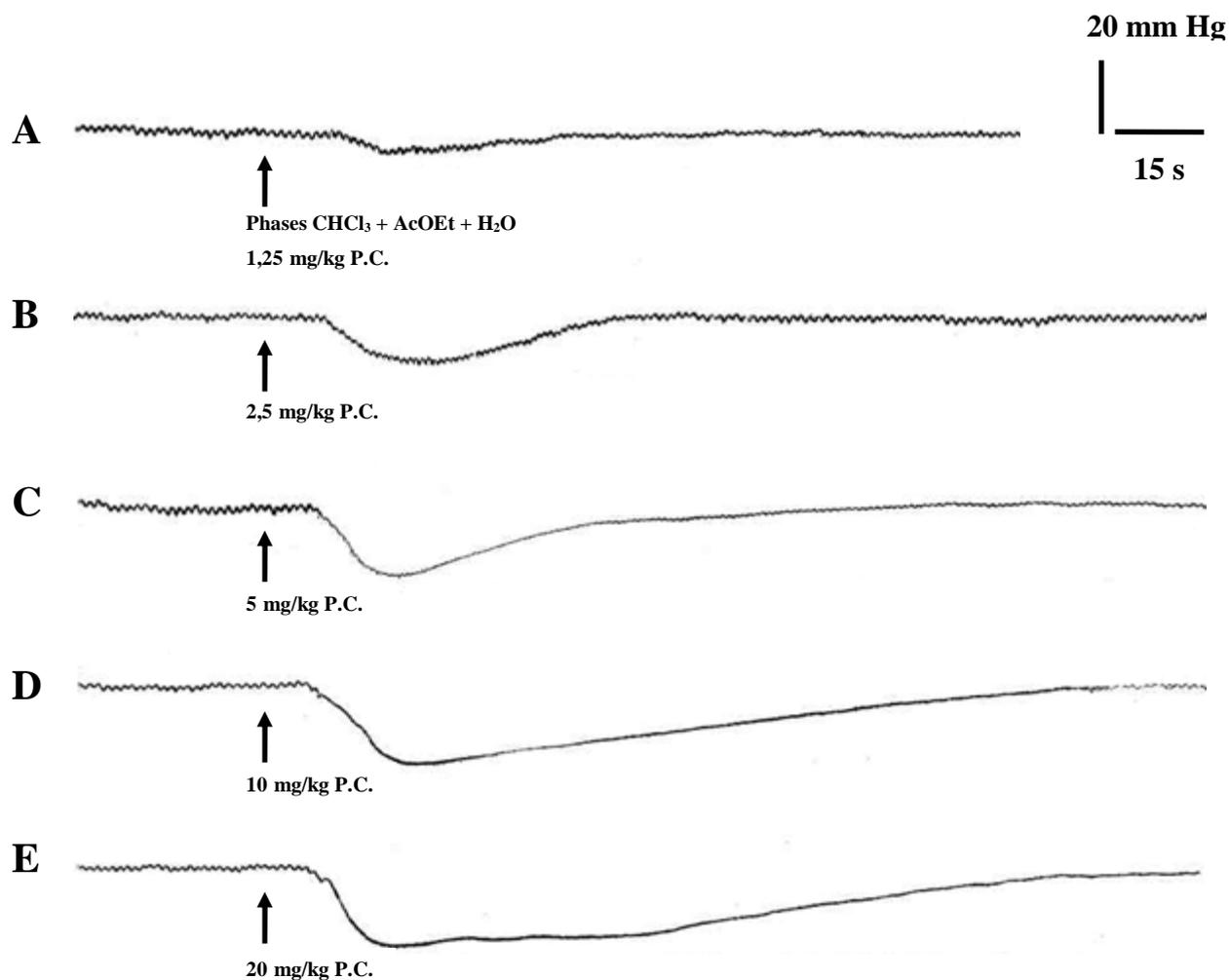
La **figure 81**, qui représente le chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV de AJse et ceux des trois phases cumulées, montre que la quasi-totalité des composés présents dans les phases cumulées sont également présents dans AJse. Seuls quelques composés, qui absorbent faiblement, présents dans AJse, n'apparaissent plus dans les phases cumulées.

### **IV<sub>2</sub> – 1 – 4. Purification de trois produits majoritaires de la phase acétatique (AcOEt) issue de la séparation l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse)**

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 4 – 1. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) de la phase acétatique**

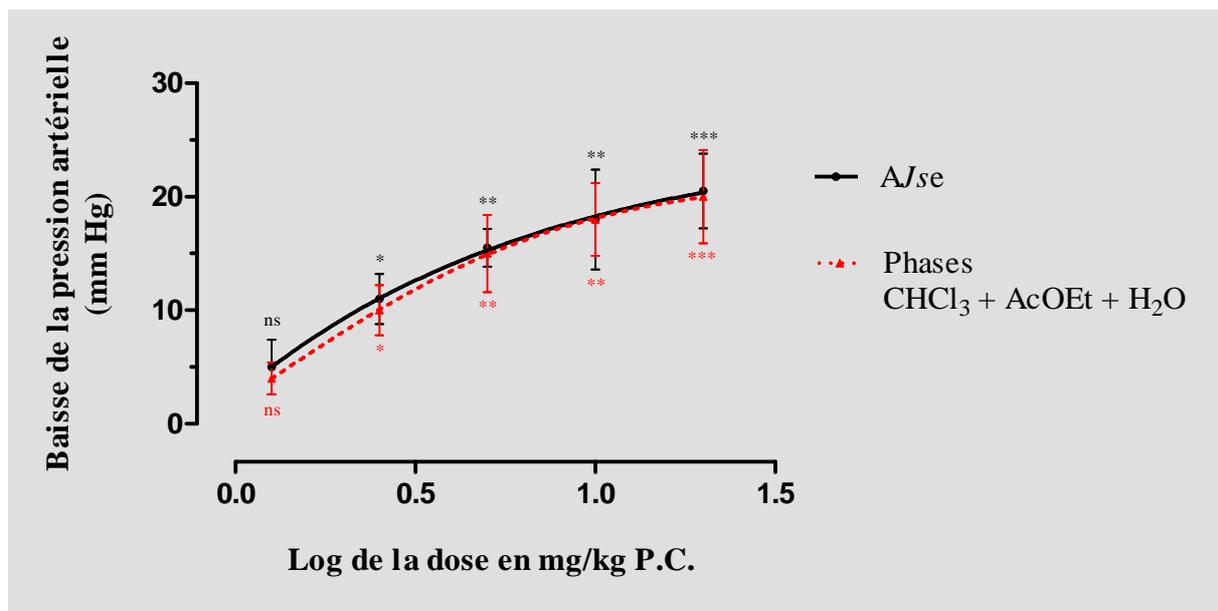
La phase acétatique issue de la LLE de AJse, qui est la phase la plus bioactive sur la pression sanguine artérielle, a été soumise à une séparation par MPLC. Ainsi, avec 2,5 g de phase AcOEt, 300 à 320 fractions de 140 ml sont collectées.

Le **tableau XVI** donne le bilan de masse des fractions ou regroupements de fractions, à l'issue de la MPLC, pour une séparation type.



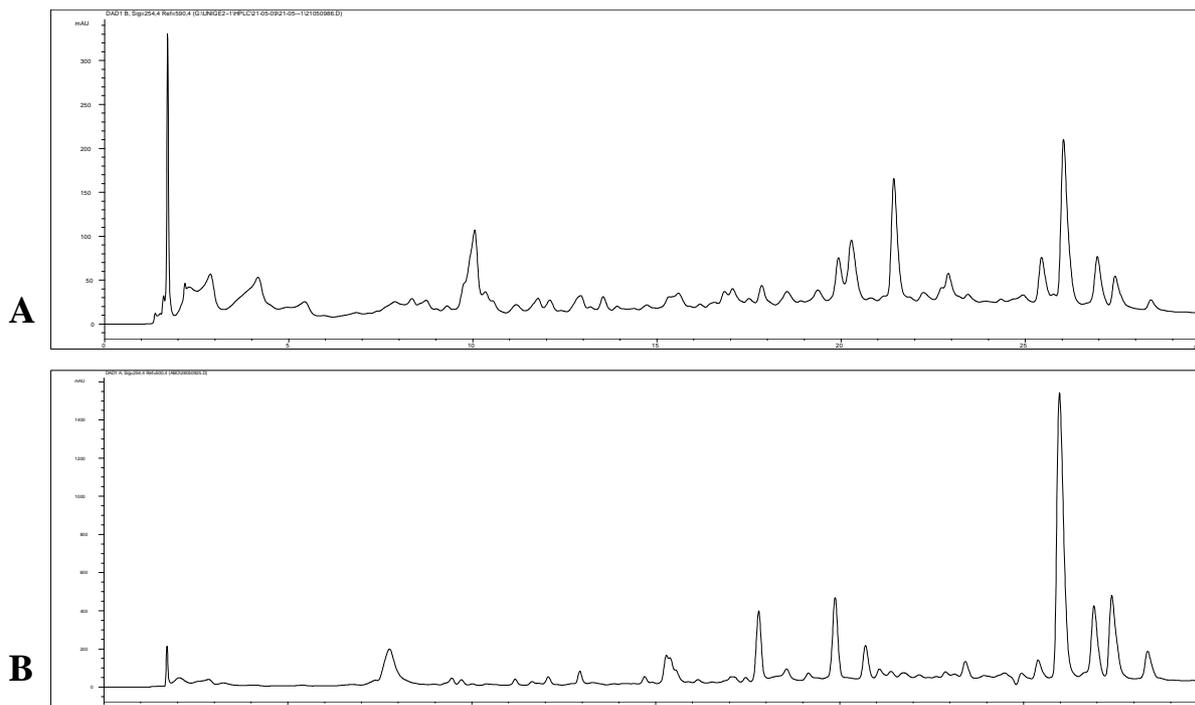
**Figure 79 : effets dose-réponse sur la pression artérielle de lapin des trois phases chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), acétatique (AcOEt) et aqueuse (H<sub>2</sub>O) issues de la LLE de AJse, cumulées**

**A à E** - Effets des phases CHCl<sub>3</sub> + AcOEt + H<sub>2</sub>O à 1,25 (A), 2,5 (B), 5 (C), 10 (D) et 20 (E) mg/kg de poids corporel (après chaque flèche)



**Figure 80 : baisses de la pression artérielle de lapin en fonction de la concentration de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et des trois phases chloroformique (CHCl<sub>3</sub>), acétatique (AcOEt) et aqueuse (H<sub>2</sub>O) issues de la LLE de AJse, cumulées**

(n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)



**Figure 81 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) et des trois phases (CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et H<sub>2</sub>O) issues de la LLE de AJse, cumulées**

Chromatogrammes de AJse (A) et des phases CHCl<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O + AcOEt (B).

Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10  $\mu$ g.

**Tableau XVI : bilan de masse de la MPLC pour 2,5 g de phase AcOEt et identification  
de composés à séparer par CC ou à purifier par HPLC semi-préparative**

<b>Fractions de la MPLC</b>	1 et 2	3	4 à 7	8	+ 9 et 10	++ 11 à 14	15 à 34	++ 35	++ 36 et 37	+ 38 à 40
<b>Masse (mg)</b>	68,69	101,5	35,6	6,3	8	33,7	64,2	6,5	9,8	11,3

**Suite 1 tableau XVI**

<b>Fractions de la MPLC</b>	+ 41 et 42	++ 43 à 47	++ 48 et 49	50 à 56	++ 57 à 72	73 à 86	87 à 98	99 à 110	++ 111 à 117	+ 118 à 125	126 à 131	132 à 142
<b>Masse (mg)</b>	11	11,1	19,4	13,9	8	12,7	17	18,6	7,2	6,2	13,6	8,5

**Suite 2 tableau XVI**

<b>Fractions de la MPLC</b>	143 à 167	++ 168 à 177	178 à 192	193 à 208	209 à 223	224 à 236	237 à 259	++ 260 à 269	270 à 283	+ 284 à 292	293 à 301	302 à 318
<b>Masse (mg)</b>	20,3	18,1	18,5	30,6	47,5	18	35,7	35,9	40,3	34,5	60,9	80,5

+ : fractions susceptibles d'être séparées par chromatographie sur colonne ouverte (CC)

++ : fractions susceptibles d'être purifiées par HPLC semi-préparative

Il ressort de ces analyses que certaines fractions sont composées de produits presque purs. Certaines feront donc l'objet d'une séparation sur colonne ouverte (CC) et d'autres seront purifiés par HPLC semi-préparative.

La **figure 82-B** présente le chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV d'un composé semi-purifié (fraction 11-14), issu de la MPLC de la phase AcOEt de *AJse*, susceptible d'être purifié par HPLC semi-préparative.

Parmi les fractions, collectées seules ou regroupées, deux d'entre elles (fractions 38-40 et 41-42), qui paraissent susceptibles d'être séparées, sont retenues pour une séparation par chromatographie sur colonne ouverte. Trois autres fractions et regroupements de fractions (fractions 35, 36-37 et 48-49), dont certains composés sont susceptibles d'être isolés, sont utilisées pour une purification par HPLC semi-préparative.

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 4 – 2. Chromatographie sur colonne ouverte (CC) de composés issus de la MPLC de la phase AcOEt de *AJse***

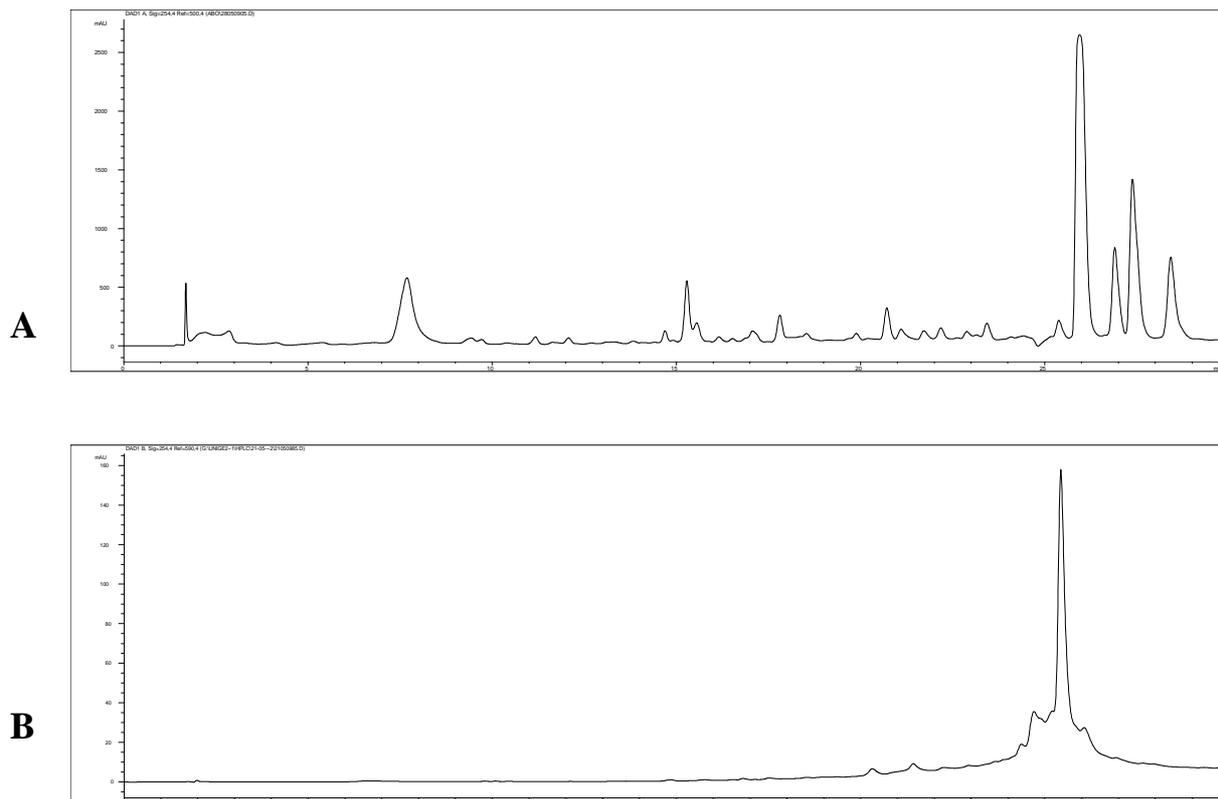
Les fractions 38-40 (11,3 mg) et 41-42 (11 mg) sont séparées sur colonne ouverte de gel de silice 60. Ainsi, pour chaque produit, des fractions de 20 ml sont collectées.

Des analyses sur plaques CCM et par HPLC ont permis de vérifier la pureté de certains composés issues de la CC et regrouper certaines fractions ayant leurs chromatogrammes identiques, avant de purifier par la HPLC semi-préparative celles qui sont susceptibles de l'être.

La **figure 83** présente les chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV de trois composés issus de la CC qui sont susceptibles d'être purifiés par la HPLC semi-préparative.

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 4 – 3. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative) de composés issus de la MPLC et de la CC**

Les fractions 35 (6,8 mg), 36-37 (9,8 mg) et 48-49 (19,4 mg), issues de la MPLC de la phase AcOEt, et des composés collectées de la CC des fractions 38-40 et 41-42 issues de cette MPLC ont été purifiés par HPLC semi-préparative. Cette technique a permis d'isoler trois (3) produits.

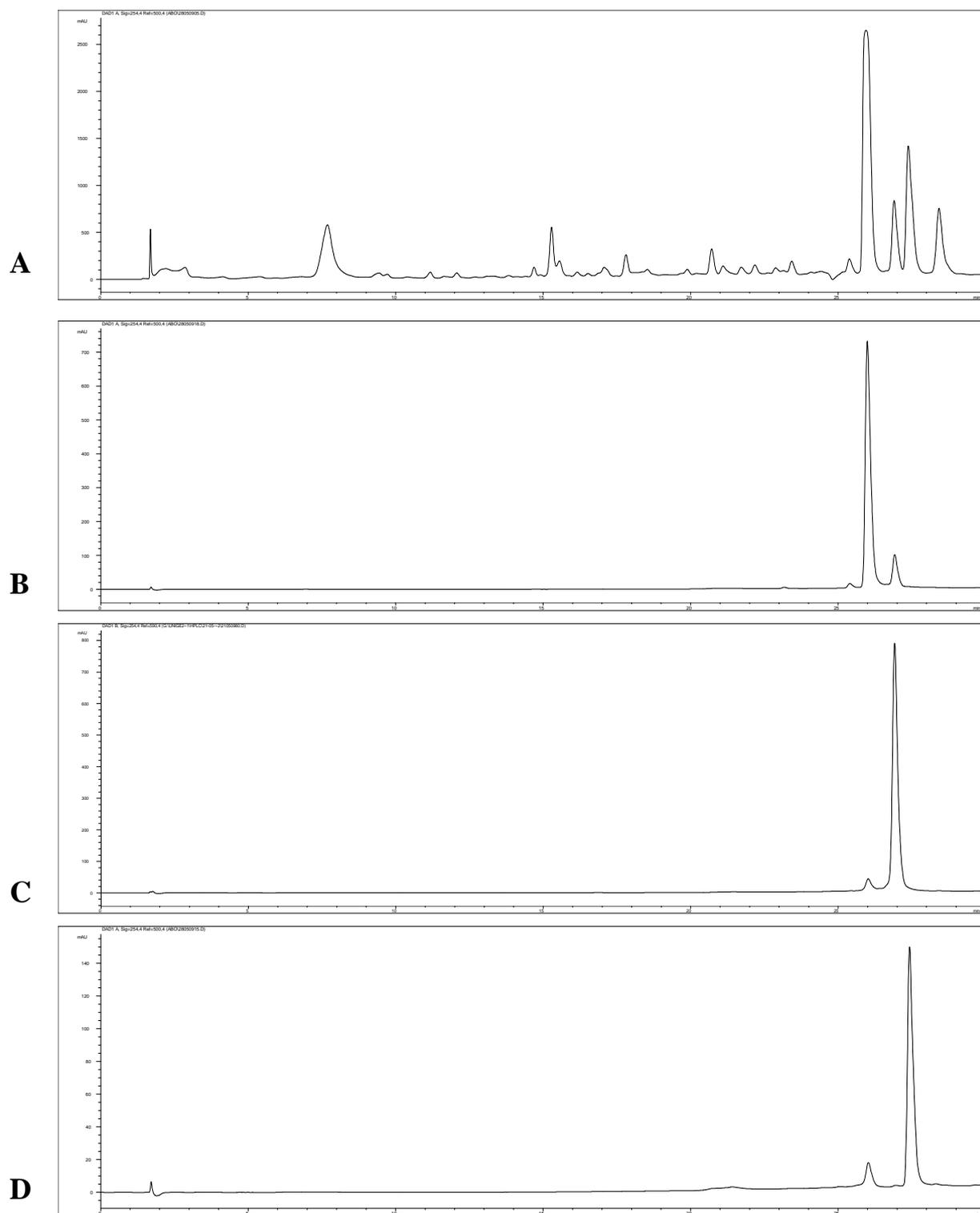


**Figure 82 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm de la phase AcOEt issue de la LLE de AJse (A) et d'un produit semi-purifié (B), issu de la fraction 11-14 de la MPLC de la phase AcOEt**

*Colonne* : Symmetry C 18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; *éluant* : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O

(CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ;

*débit de la phase mobile* : 1 ml/min ; *injection* : 10  $\mu\text{g}$ .



**Figure 83 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm de la phase AcOEt issue de la LLE de *AJse* (A) et de produits semi-purifiés issus de la CC des fractions 38-40 (B et C) et 41-42 (D) de la phase AcOEt**

*Colonne* : Symmetry C 18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 3,9 mm d.i.,  $\text{H}_2\text{O}$ ) ; *éluant* :  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$

( $\text{CH}_3\text{OH}$  : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ;

*débit de la phase mobile* : 1 ml/min ; *injection* : 10  $\mu\text{g}$ .

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 4 – 4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de composés purifiés par HPLC semi-préparative**

La HPLC analytique est utilisée pour vérifier la pureté des produits isolés.

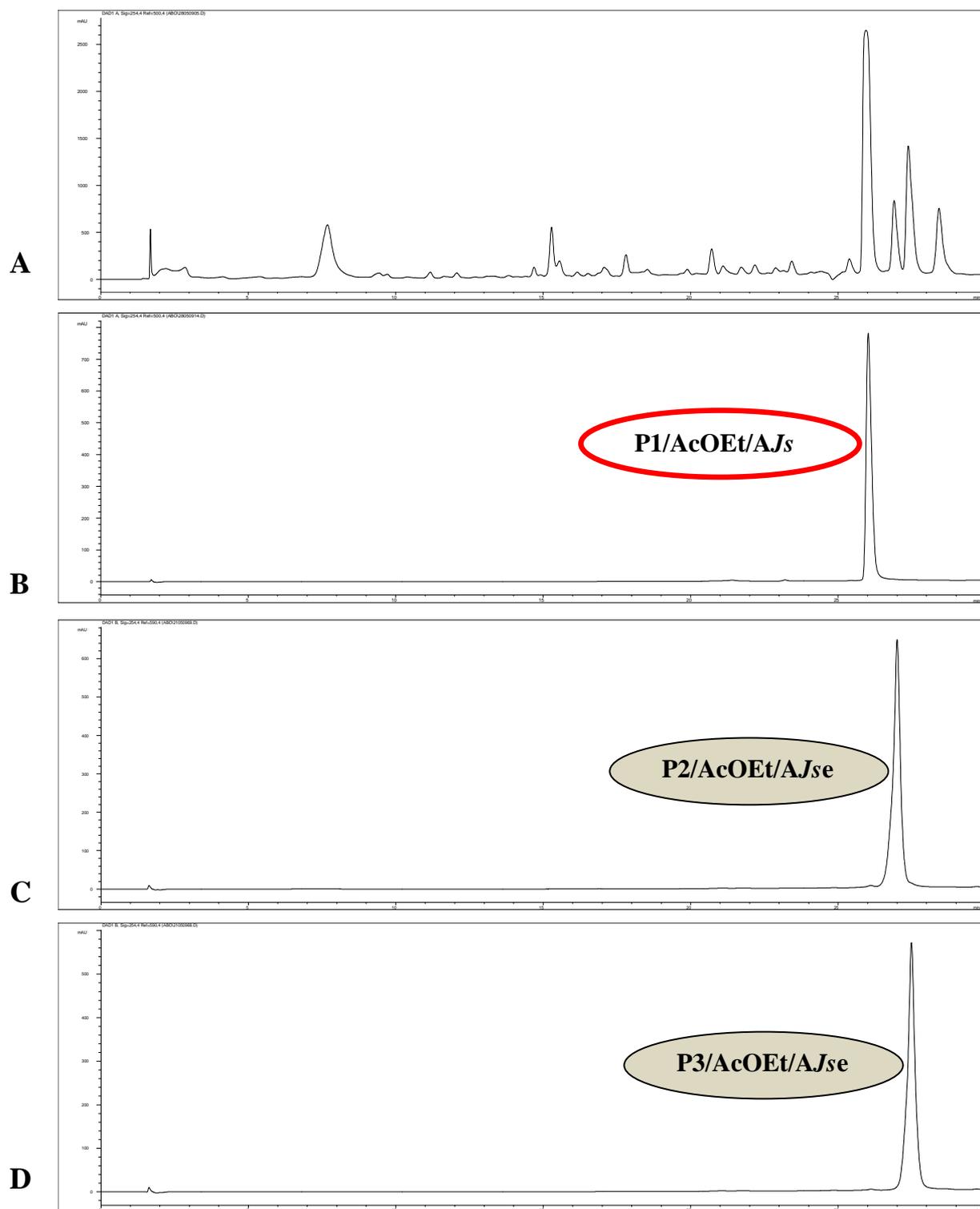
Les trois (3) produits purifiés par HPLC semi-préparative sont nommés P1/AcOEt/AJse, P2/AcOEt/AJse et P3/AcOEt/AJse. Leurs chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV sont donnés à la **figure 84**. Ce sont les trois produits qui absorbent majoritairement dans la phase acétatique issue de AJse (**figure 84-A**).

Ces trois (3) produits (**figure 85-A**) sont ceux présentant les pics les plus élevés dans les chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV des phases AcOEt et H<sub>2</sub>O cumulées (**figure 85-B**) qui donnent les effets physiologiques synergiques les plus importants. Ces trois produits se retrouvent également parmi les quatre composés qui apparaissent avec les pics d'absorption les plus élevés dans le chromatogramme de la phase AcOEt (**figure 85-C**), la plus active des trois phases issues de la LLE de AJse sur la pression sanguine artérielle de lapin.

Les **figures 86, 87 et 88** présentent les chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV des trois composés issus de la phase acétatique, purifiés par HPLC semi-préparative. Ces chromatogrammes montrent que les produits P1/AcOEt/AJse, P2/AcOEt/AJse et P3/AcOEt/AJse isolés sont purs.

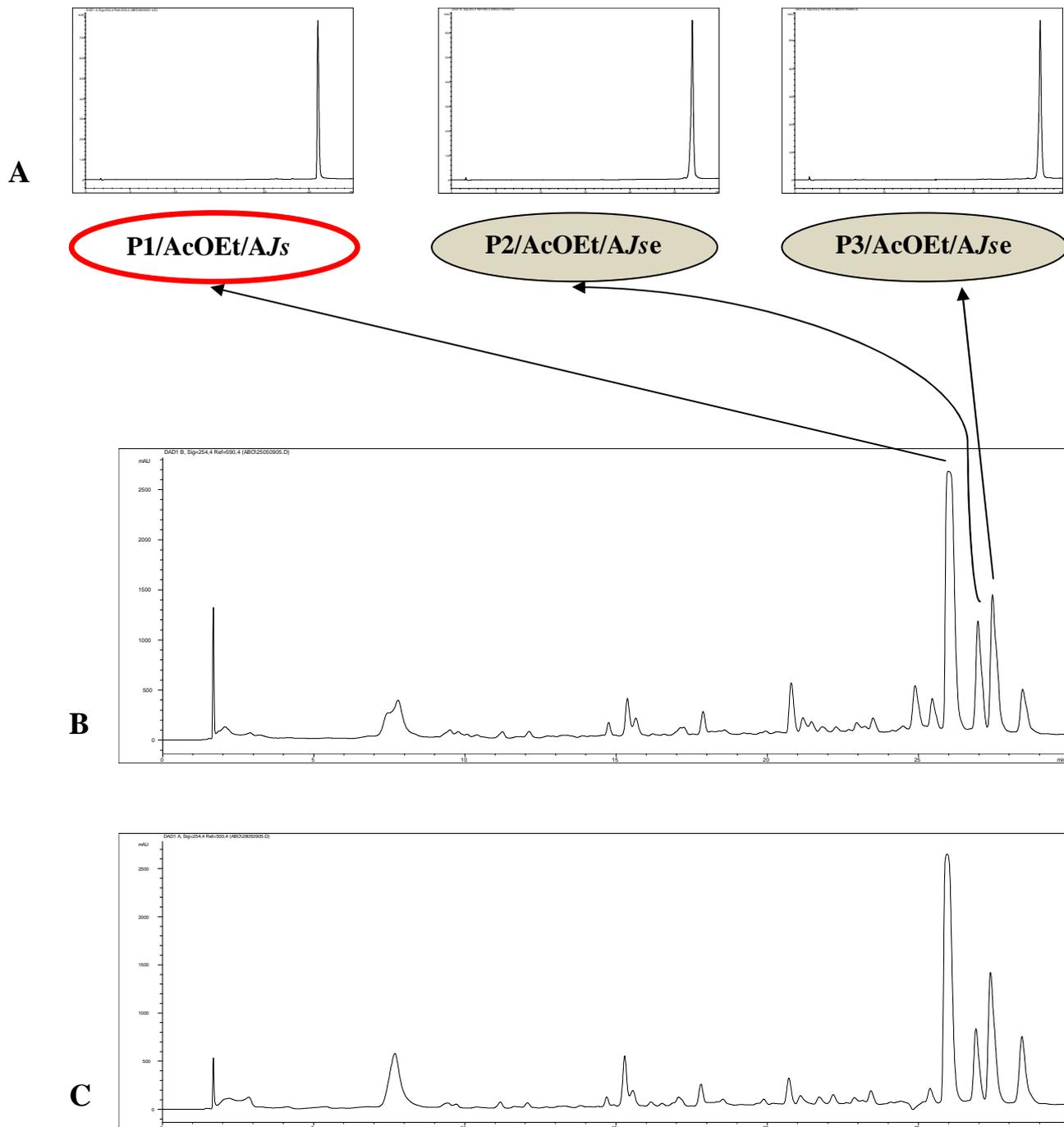
Le **tableau XVII** donne les fractions ou regroupements de fractions issues de la MPLC de la phase AcOEt de AJse qui contiennent les composés purifiés.

Après avoir purifié les produits 1, 2 et 3 (**cf. figure 78**) qui apparaissent majoritairement sur les chromatogrammes des phases les plus biologiquement actives, il convient de vérifier leurs effets pharmacologiques sur la pression artérielle.



**Figure 84 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm de la phase AcOEt issue de la LLE de AJse (A) et des produits purifiés P1/AcOEt/AJse (B), P2/AcOEt/AJse (C) et P3/AcOEt/AJse (D) issus de la phase AcOEt**

*Colonne* : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; *éluant* : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; *débit de la phase mobile* : 1 ml/min ; *injection* : 10  $\mu$ g.

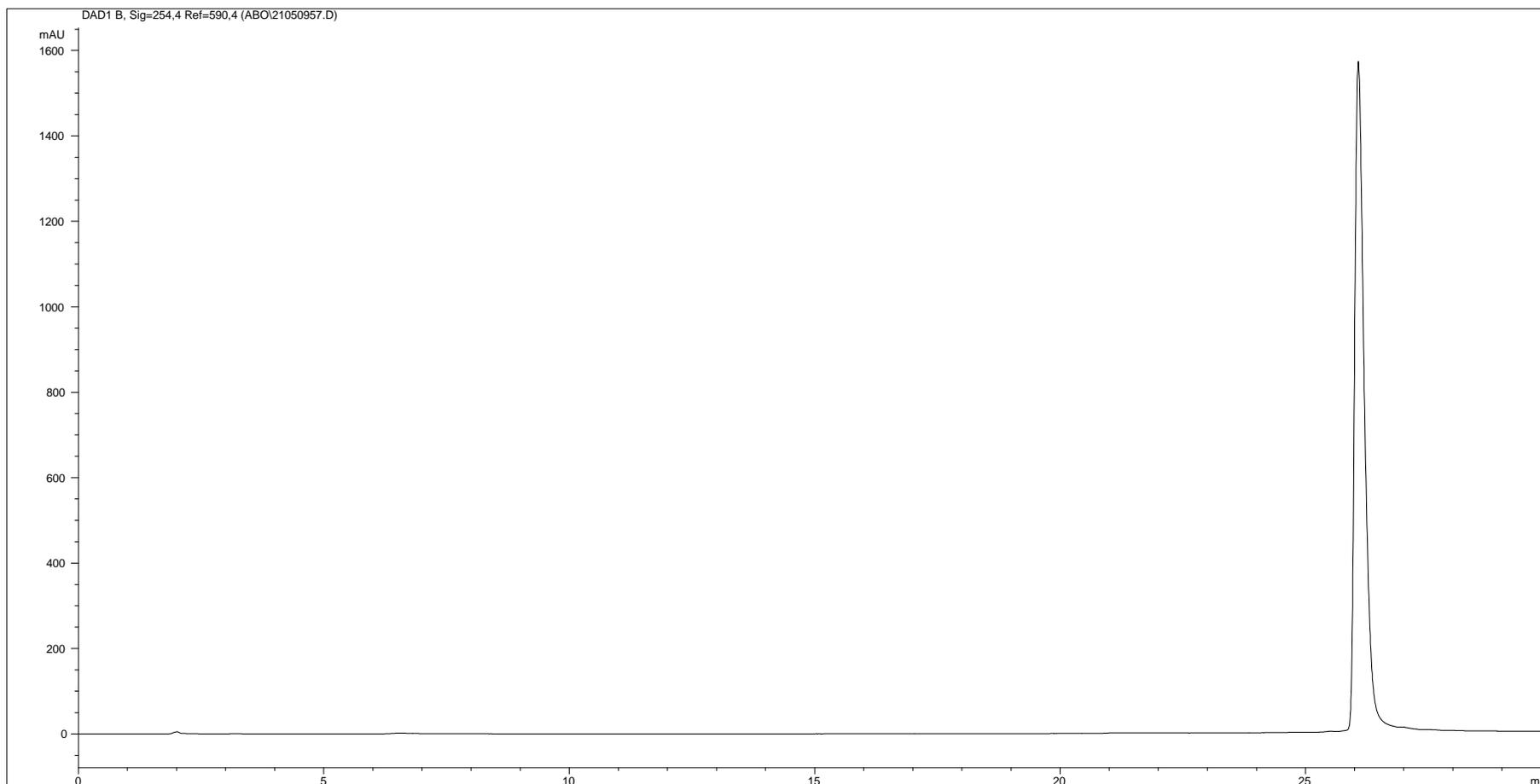


**Figure 85 : chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV à 254 nm des 3 produits purifiés (A), majoritairement présents dans les phases AcOEt et H<sub>2</sub>O cumulées (B) et dans la phase AcOEt (C) issues de la LLE de AJse**

*Colonne* : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; *éluant* : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O

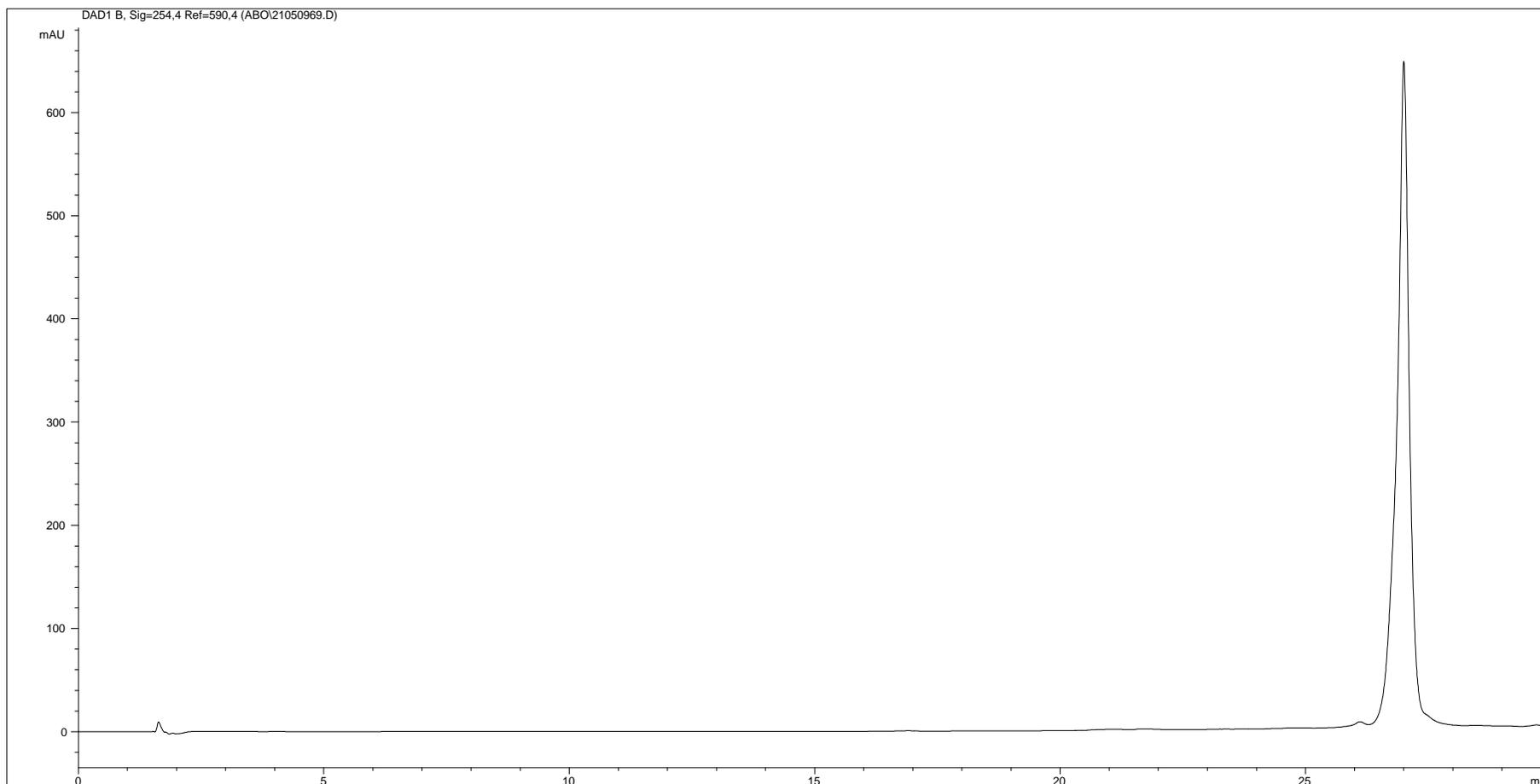
(CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ;

*débit de la phase mobile* : 1 ml/min ; *injection* : 10  $\mu$ g.



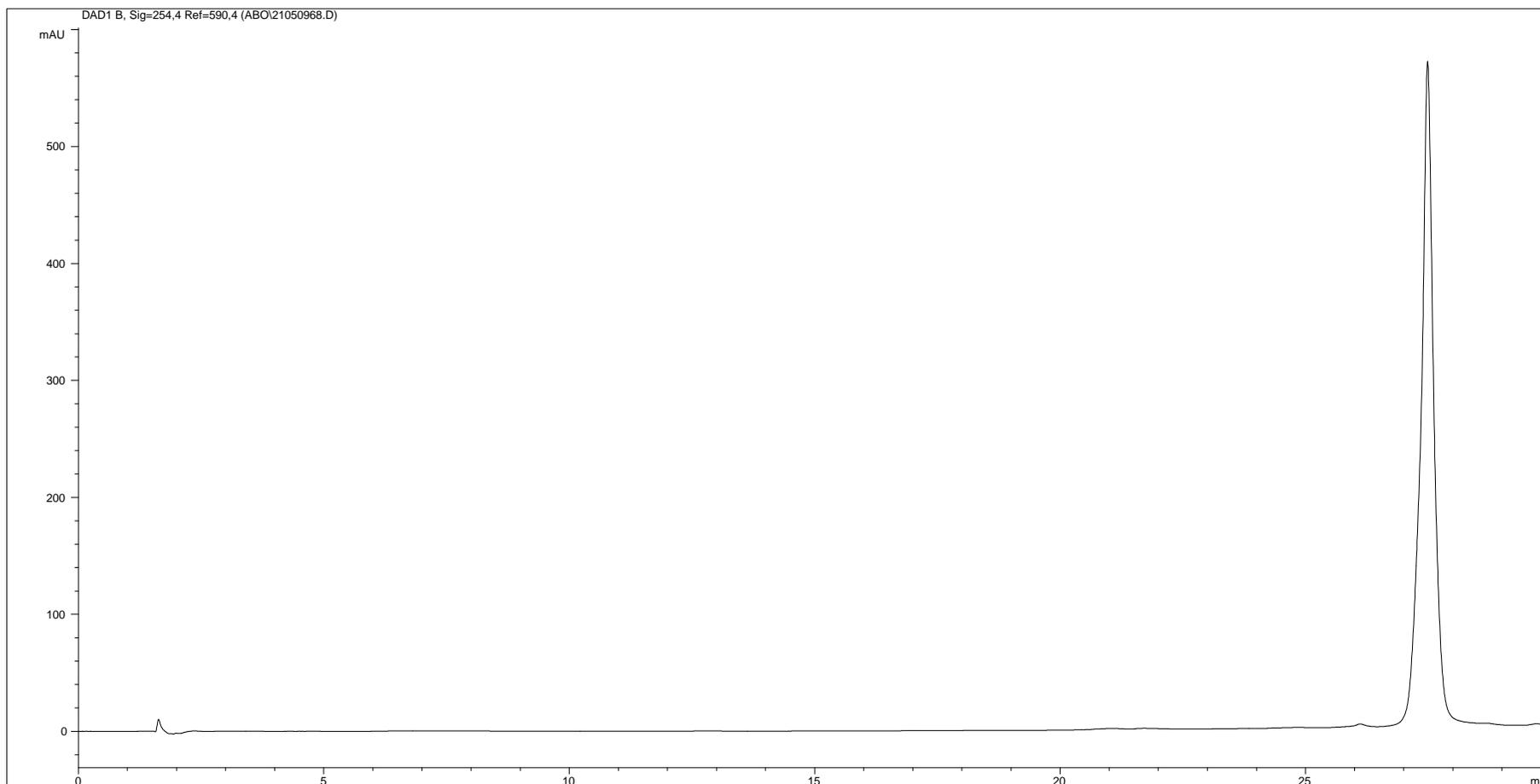
**Figure 86 : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 254 nm du produit purifié P1/AcOEt/AJse issu de la phase AcOEt de AJse**

*Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10  $\mu$ g.*



**Figure 87 : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 254 nm du produit purifié P2/AcOEt/AJse issu de la phase AcOEt de AJse**

*Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10  $\mu$ g.*



**Figure 88 : chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV à 254 nm du produit purifié P3/AcOEt/AJse issu de la phase AcOEt de AJse**

*Colonne : Symmetry C 18 (5  $\mu$ m, 150 x 3,9 mm d.i., H<sub>2</sub>O) ; éluant : CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>OH : 2 % en 3 min ; 2 à 50 % en 30 min ; 50 à 100 % en 5 min ; 100 % en 5 min) ; débit de la phase mobile : 1 ml/min ; injection : 10  $\mu$ g.*

**Tableau XVII : localisation, dans les fractions de la MPLC, des 3 composés isolés de la phase AcOEt de AJse**

<b>Composé pur</b>	<b>Fractions de la MPLC contenant le composé purifié</b>
<b>P1/AcOEt/AJse</b>	35 ; 36-37 ; 38-40.
<b>P2/AcOEt/AJse</b>	35 ; 36-37 ; 38-40 ; 41-42.
<b>P3/AcOEt/AJse</b>	36-37 ; 38-40 ; 41-42 ; 43-47 ; 48-49 ; 57-72.

## **IV<sub>2</sub> – 1 – 5. Effets pharmacologiques, sur la pression sanguine artérielle de lapin, de trois substances purifiées, issues de la phase acétatique de A/Jsé**

Le but de cette étude est de rechercher les effets pharmacologiques des substances purifiées, isolées de la phase acétatique issue de le LLE de A/Jsé, sur la pression sanguine artérielle. Ainsi chacune des trois substances purifiées (P1/AcOEt/A/Jsé, P2/AcOEt/A/Jsé et P3/AcOEt/A/Jsé), à des doses allant de  $10^{-2}$  à  $12,5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C., est testée sur la pression sanguine artérielle de lapin. La dose maximale de  $12,5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C. de produits purifiés administrés correspond à la dose minimale de l'extrait brut (A/Jsé) ayant un effet sur la pression artérielle de lapin.

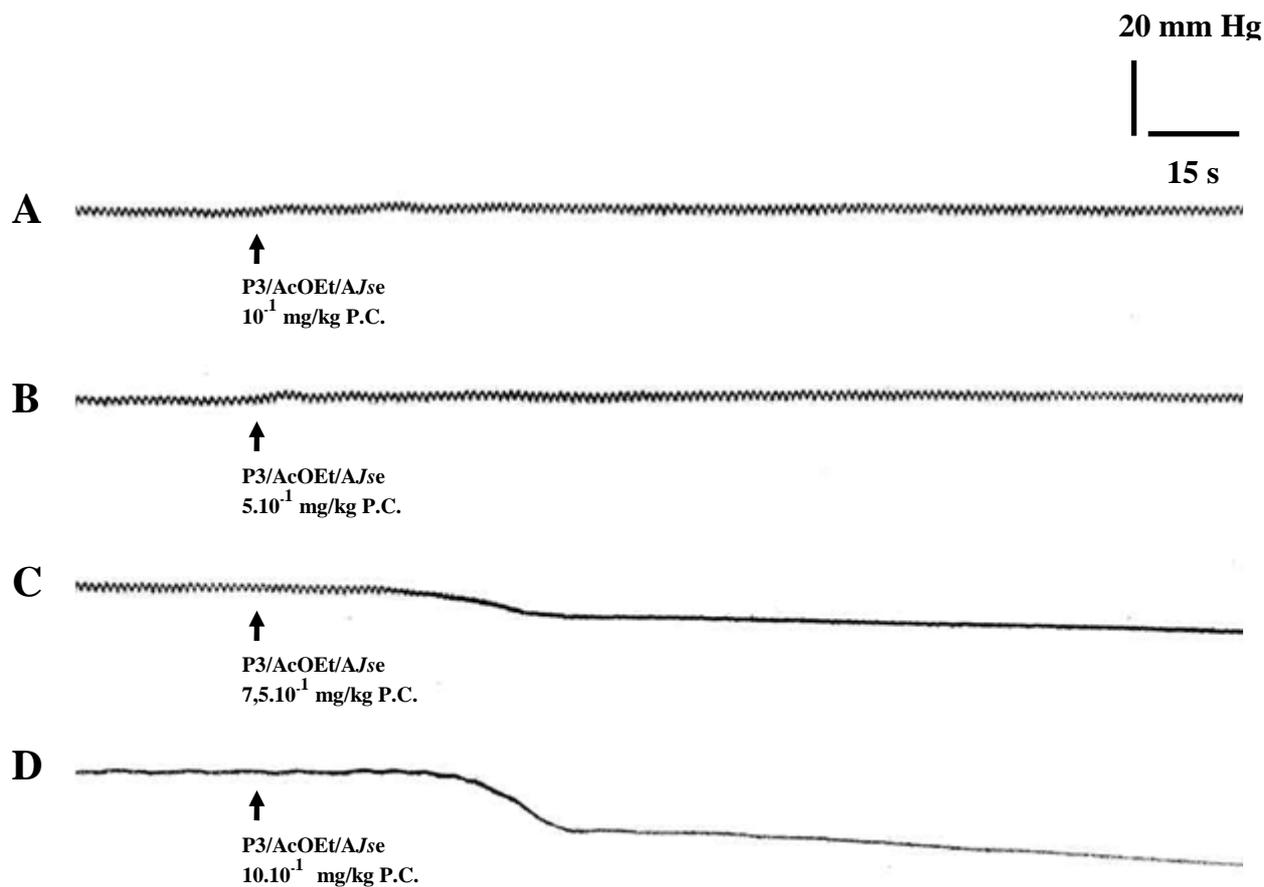
Il apparaît que, dans cette gamme de doses, le produit P3/AcOEt/A/Jsé est sans effet pharmacologique notable sur la pression artérielle de lapin. Seuls les produits P1/AcOEt/A/Jsé et P2/AcOEt/A/Jsé, pour certaines doses, agissent sur la pression artérielle, entraînant une hypotension artérielle.

La **figure 89**, qui montre les effets dose-réponse de P3/AcOEt/A/Jsé, à des doses variant de  $10^{-1}$  à  $10 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C., indique en effet que c'est seulement à partir de la dose de  $7,5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C. que cette substance agit sur la pression artérielle, entraînant une faible hypotension irréversible de  $4 \pm 1,8$  mm Hg, statistiquement non significative ( $p > 0,05$ ). Cette substance est mortelle à partir de la dose de  $10 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C. (**figure 89-D**).

Les effets de P1/AcOEt/A/Jsé sur la pression (**figure 90**) apparaissent à partir de la dose  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/kg P.C. avec une hypotension artérielle  $5 \pm 2,6$  mm Hg. Cette hypotension augmente avec la dose pour atteindre  $36 \pm 2,8$  mm Hg pour une dose de P1/AcOEt/A/Jsé de  $12,5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C. (**figure 90-F**). A toutes ces doses, ces effets sont totalement réversibles.

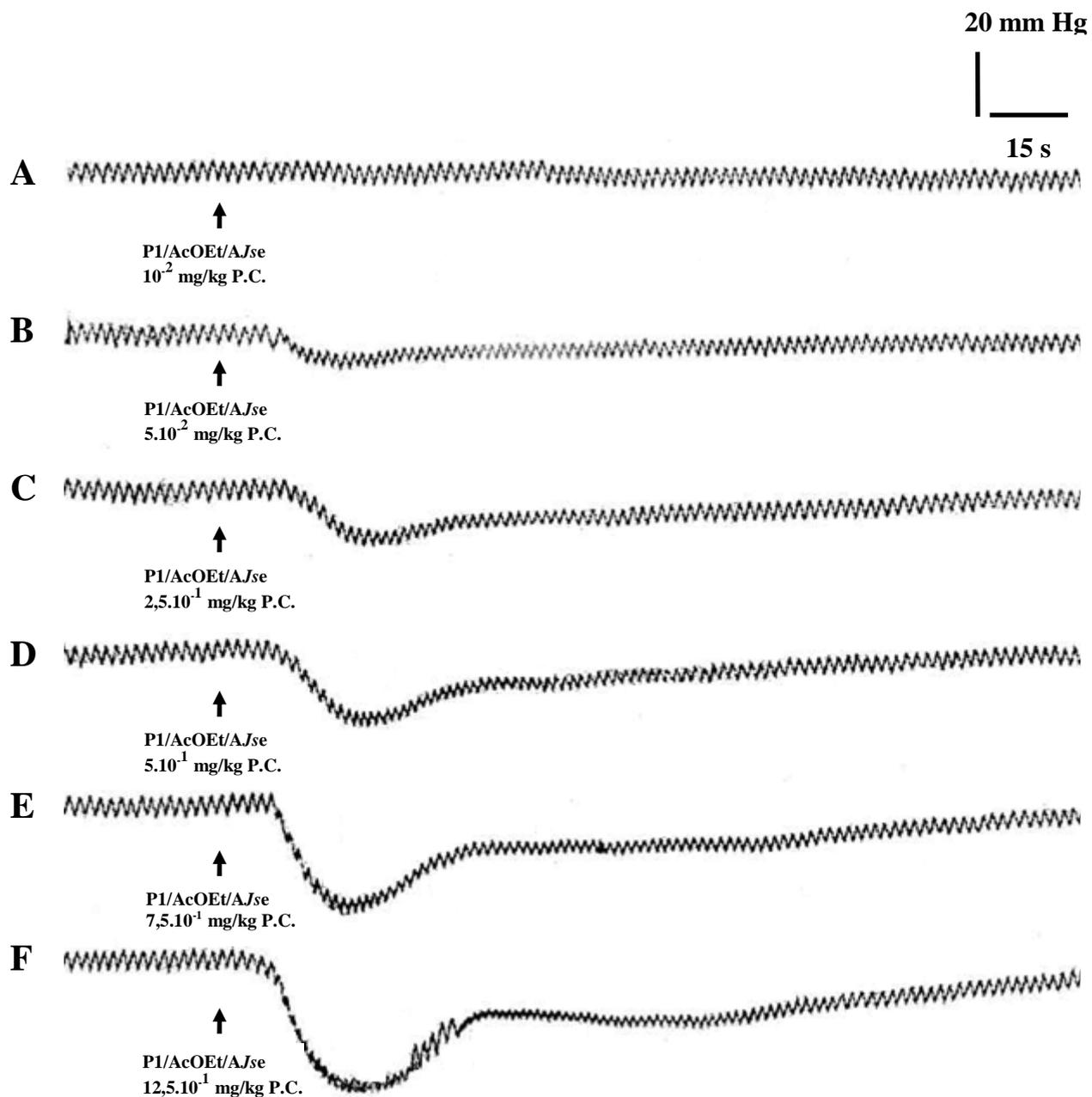
A des doses inférieures à  $2,5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C., P2/AcOEt/A/Jsé est sans effet sur la pression artérielle de lapin. Aux doses comprises entre  $2,5 \cdot 10^{-1}$  et  $12,5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C., cette substance induit une hypotension artérielle variant de  $3 \pm 1,2$  à  $12,5 \pm 2,8$  mm Hg (**figure 91**). Ces effets sont dose-dépendants et totalement réversibles pour les doses inférieures à  $10 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C. Mais, à la dose de  $10 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C., l'hypotension artérielle induite par P2/AcOEt/A/Jsé est partiellement réversible. Les effets hypotenseurs de cette substance sont irréversibles pour la dose  $12,5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C.

Les courbes de la **figure 92** donnent les effets dose-réponse de P1/AcOEt/A/Jsé et P2/AcOEt/A/Jsé sur la pression sanguine artérielle de lapin, pour 3 expériences. Cette figure montre que la substance P1/AcOEt/A/Jsé (courbe supérieure) est nettement plus active que la substance P2/AcOEt/A/Jsé (courbe inférieure).



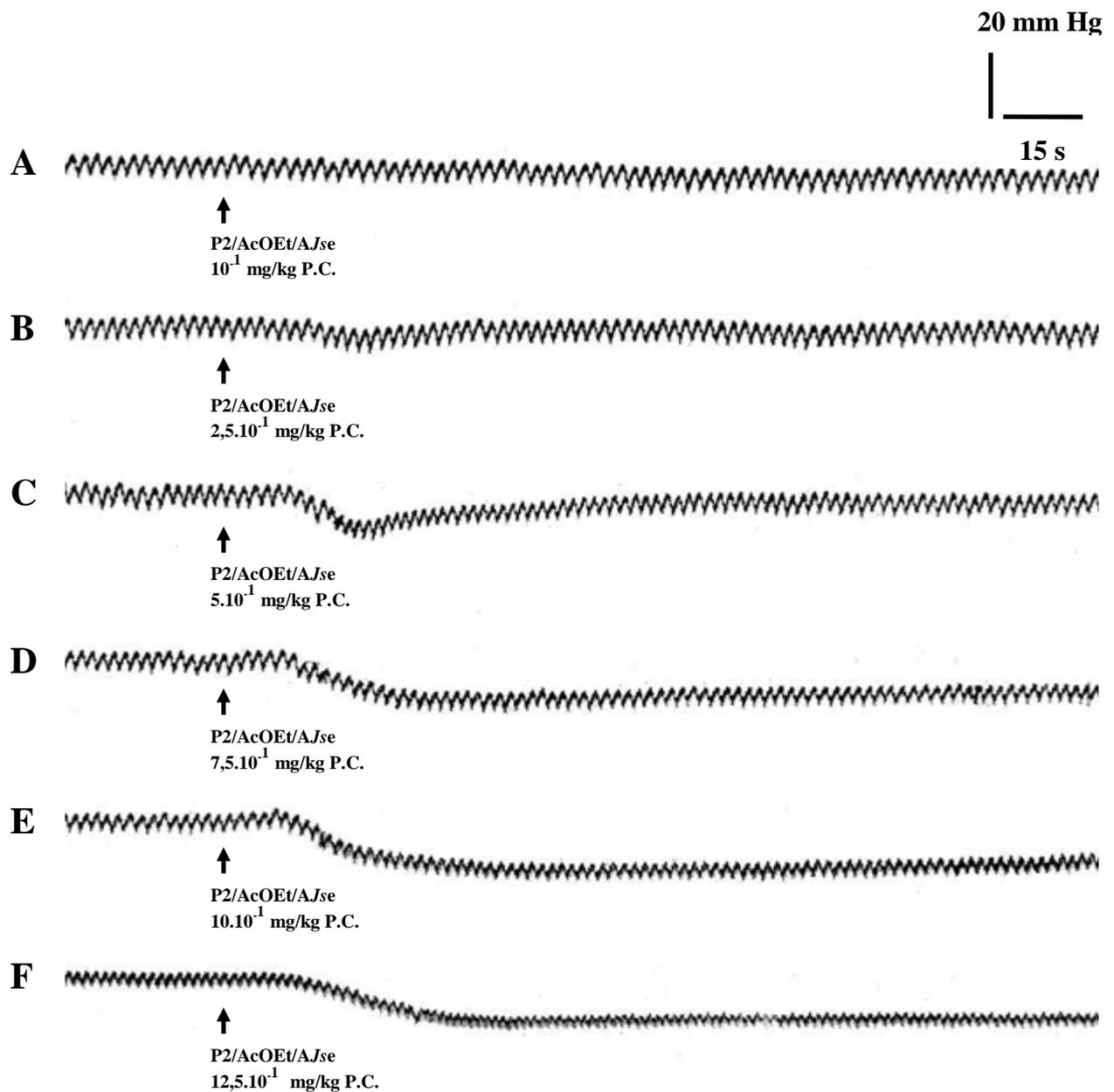
**Figure 89 : effets dose-réponse de la substance pure P3/AcOEt/AJse sur la pression artérielle de lapin**

**A à D** - Effets de P3/AcOEt/AJse (après les flèches) à  $10^{-1}$  (A) ;  $5 \cdot 10^{-1}$  (B) ;  $7,5 \cdot 10^{-1}$  (C) et  $10 \cdot 10^{-1}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)



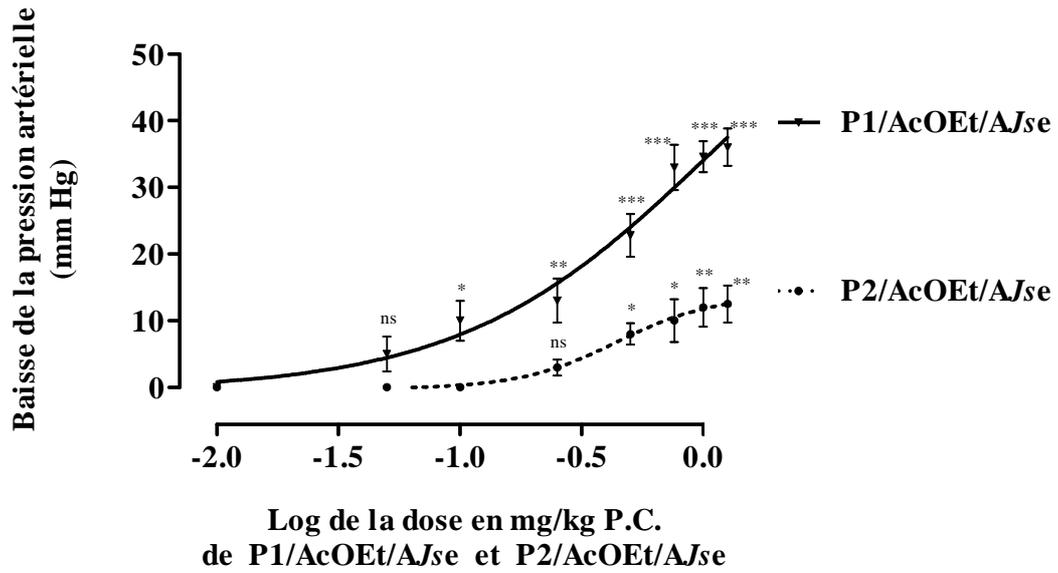
**Figure 90 : effets dose-réponse de la substance pure P1/AcOEt/AJse sur la pression artérielle de lapin**

**A à F** - Effets de P1/AcOEt/AJse (après les flèches) à  $10^{-2}$  (A) ;  $5 \cdot 10^{-2}$  (B) ;  $2,5 \cdot 10^{-1}$  (C) ;  $5 \cdot 10^{-1}$  (D) ;  $7,5 \cdot 10^{-1}$  (E) et  $12,5 \cdot 10^{-1}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)



**Figure 91 : effets dose-réponse de la substance pure P2/AcOEt/AJse sur la pression artérielle de lapin**

**A à F** - Effets de P2/AcOEt/AJse (après les flèches) à  $10^{-1}$  (A) ;  $2,5 \cdot 10^{-1}$  (B) ;  $5 \cdot 10^{-1}$  (C) ;  $7,5 \cdot 10^{-1}$  (D) ;  $10 \cdot 10^{-1}$  (E) et  $12,5 \cdot 10^{-1}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)



**Figure 92 : baisses de la pression sanguine artérielle de lapin en fonction de la concentration de P1/AcOEt/AJse et de P2/AcOEt/AJse**

(n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)

Les doses efficaces 50 % de P1/AcOEt/AJse et P2/AcOEt/AJse sur la pression artérielle sont respectivement 0,63 mg/kg P.C. et 0,44 mg/kg P.C.

Le produit purifié P1/AcOEt/AJse étant le plus pharmacologiquement actif sur la pression artérielle, il importe de l'identifier en déterminant sa masse moléculaire, sa formule brut, sa structure chimique et son nom.

#### **IV<sub>2</sub> – 1 – 6. Identification du composé purifié P1/AcOEt/AJse isolé de la phase AcOEt de AJse**

##### **IV<sub>2</sub> – 1 – 6 – 1. Chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ESI/TOF-MS) du composé purifié P1/AcOEt/AJse**

Le composé P1/AcOEt/AJse a été analysé par chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/ESI/TOF-MS).

La formule brute de ce composé a été déterminée sur la base d'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (ESI/TOF-MS) (**figure 93**). Dans cette **figure 93**, les formules brutes sont données dans l'ordre décroissant d'exactitude.

Ainsi, le composé P1/AcOEt/AJse a une formule brute C<sub>48</sub>H<sub>66</sub>O<sub>5</sub> (masse calculée : 722,491025). Son poids moléculaire est de 723,4993 Da.

##### **IV<sub>2</sub> – 1 – 6 – 2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du composé purifié P1/AcOEt/AJse**

Pour l'élucidation de la structure chimique de P1/AcOEt/AJse, les spectres RMN proton (<sup>1</sup>H) et carbone 13 (<sup>13</sup>C) de ce composé ont été réalisés.

Le **tableau XVIII** indique les données spectroscopiques RMN de ce produit purifié.

##### **IV<sub>2</sub> – 1 – 6 – 3. Détermination de la structure du composé purifié P1/AcOEt/AJse**

La combinaison des résultats de la spectrométrie de masse et de la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire a permis de déterminer la structure chimique du composé P1/AcOEt/AJse (**figure 94**).

Le **tableau XIX** indique les constantes physiques et les données spectrales de ce composé P1/AcOEt/AJse isolé.

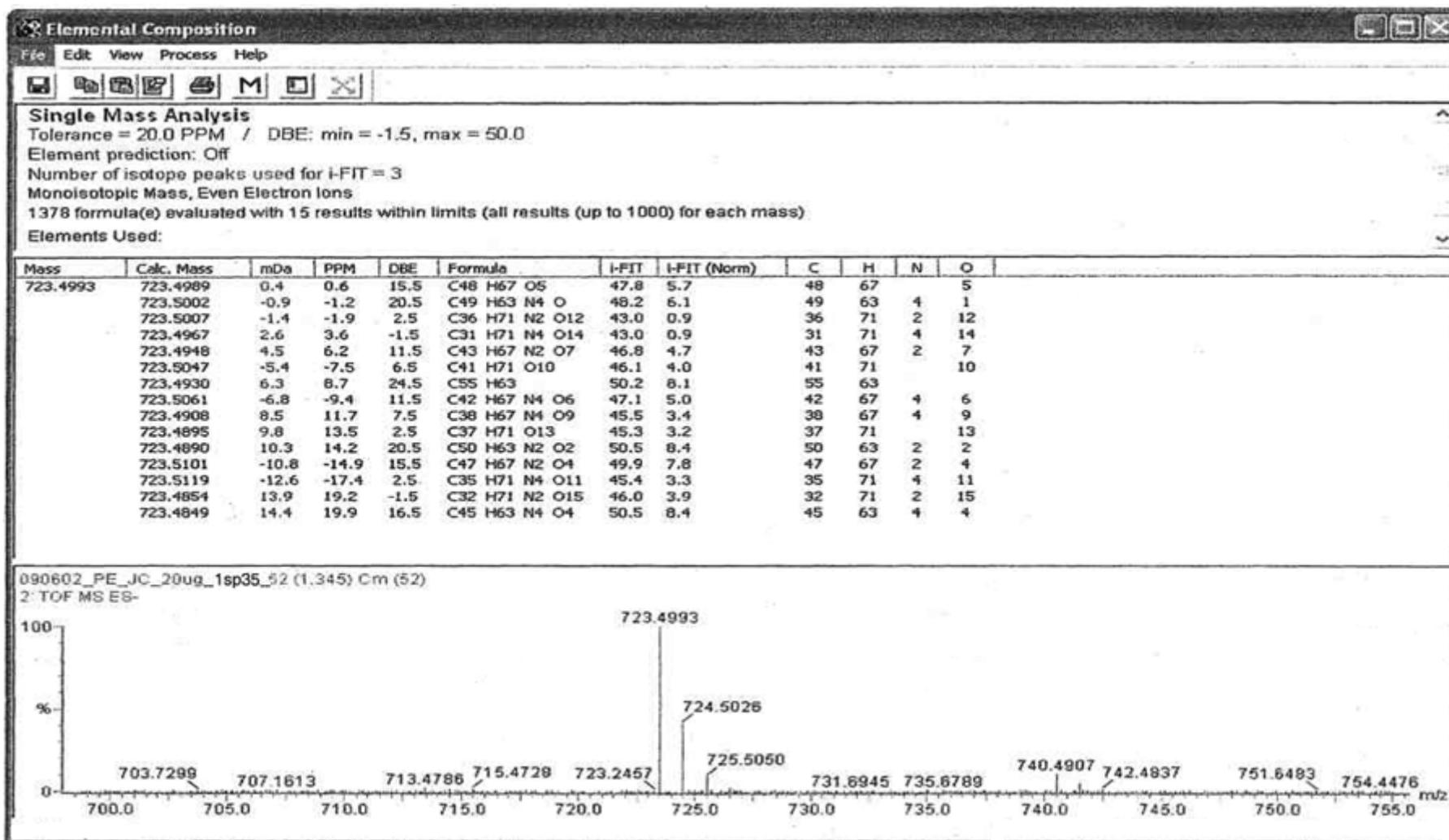
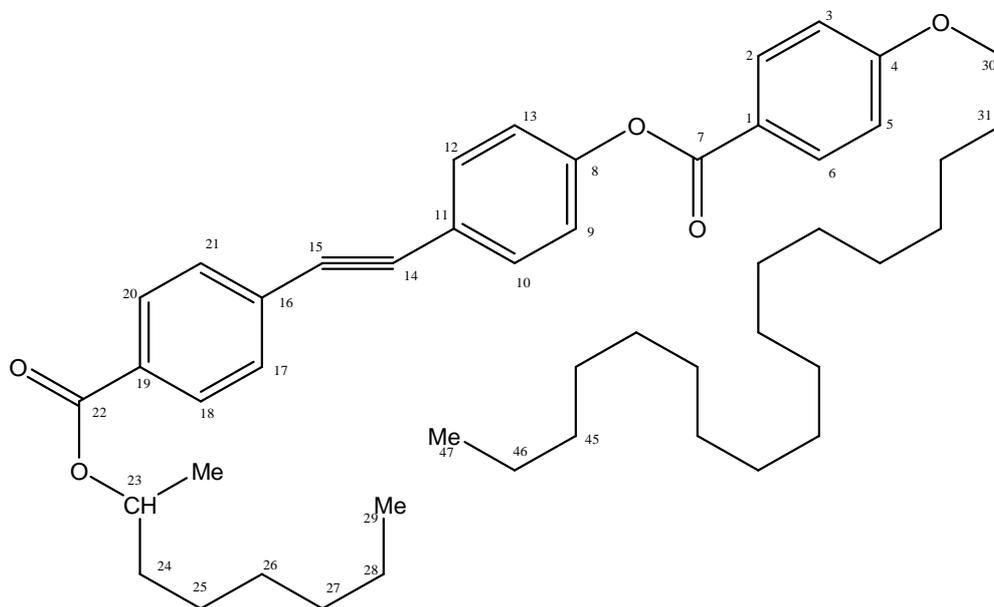


Figure 93 : rapport d'analyse TOF-MS du composé P1/AcOEt/AJse

**Tableau XVIII : données spectroscopiques RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de P1/AcOEt/AJse**

Position	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (mult., J en Hz)
1	121.9	-
2	130.9	8.03 (d, J=8.1)
3	114.3	6.92 (d, J=8.1)
4	162.7	-
5	114.3	6.92 (d, J=8.1)
6	130.9	8.03 (d, J=8.1)
7	165.2	-
8	151.1	-
9	121.2	7.11 (d, J=7.5)
10	132.7	7.53 (d, J=7.5)
11	119.5	-
12	132.7	7.53 (d, J=7.5)
13	121.2	7.11 (d, J=7.5)
14	92.9	-
15	92.9	-
16	127.0	-
17	132.2	7.57 (d, J=8.0)
18	129.5	7.95 (d, J=8.0)
19	129.9	-
20	129.5	7.95 (d, J=8.0)
21	132.2	7.57 (d, J=8.0)
22	166.0	-
23	71.6	4.13 (m)
24	36.8	1.71 (m)
25	23.4	1.29 (m)
26	29.4	1.29 (m)
27	31.9	1.29 (m)
28	22.8	1.33 (m)
29	14.1	0.96 (t, J=5.2)
30	21.7	1.40 (d, J=3.5)
31	68.9	3.94 (t, J=6.1)
32	29.7	1.71 (m)
33	26.0	1.29 (br, s)
34-44	29.7	1.29 (br, s)
45	29.4	1.29 (br, s)
46	31.9	1.29 (br, s)
47	22.8	1.33 (m)
48	14.1	0.96 (t, J=5.2)



**Figure 94 : structure chimique du composé P1/AcOEt/AJse**

**Tableau XIX : constantes physiques et données spectrales du composé P1/AcOEt/AJse**

<b>Composé P1/AcOEt/AJse</b>	
<b>Structure</b>	
<b>Nom chimique</b>	Acide 4-(octadécyloxy)-, 4-[[4-[[[(1-méthylheptyl)oxy]carbonyl]phényl]éthynyl]phényl ester benzoïque
<b>Formule</b>	C <sub>48</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>
<b>ESI/TOF-MS</b>	<i>m/z</i> 723,4993 [M+H] <sup>+</sup> (masse calculée : 722,491025)
<b>Masse exacte</b>	722,491025 Da
<b>Poids moléculaire</b>	723,4993 Da
<b>Aspect</b>	Poudre amorphe de couleur beige
<b>Données RMN <sup>1</sup>H</b>	cf. tableau XVIII
<b>Données RMN <sup>13</sup>C</b>	cf. tableau XVIII

## IV<sub>2</sub> – 1 – 7. Discussion

Les résultats de la séparation liquide-liquide de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* montrent que parmi les différentes phases de l'extrait brut, la phase aqueuse donne le rendement le plus élevé (77 %), suivi de la phase acétatique (20 %) et la phase chloroformique (2 %). L'obtention d'une masse beaucoup plus importante dans la phase aqueuse se justifie par le fait que *AJse*, l'extrait de départ, est un extrait aqueux. Il est par conséquent très riche en composés hydrophiles (composés polaires) qu'en composés lipophiles (composés apolaires).

La somme des pourcentages des trois phases issues de la séparation liquide-liquide (LLE) de *AJse* est de 99 %. Ainsi, seulement 1 % de l'extrait brut a été perdu. Cette perte pourrait provenir de la collecte des produits après la lyophilisation. La faible perte de produit lors de la LLE indique que ce procédé utilisé pour la séparation des composés présents dans l'extrait brut est fiable car conserve la quasi totalité de la masse de produit de cet extrait.

Les composés qui sont observés sous UV à 254 ou 366 nm sur les plaques CCM possèderaient des insaturations simples ou multiples dans leur structure carbonée. Les autres qui ne sont pas visibles sous UV seraient des composés saturés.

Les phases CHCl<sub>3</sub> et AcOEt renferment beaucoup plus de composés qui absorbent mieux sous UV que la phase H<sub>2</sub>O. Cette observation est normale puisque l'AcOEt est le solvant d'extraction par excellence des composés aromatiques ou benzéniques. La phase AcOEt renferme donc les composés insaturés, surtout aromatiques ou benzéniques. La phase CHCl<sub>3</sub>, quant à elle, contient des diterpènes saturés comme insaturés et des stéroïdes. Ceci justifie la présence de stérols et polyterpènes mis en évidence dans l'extrait brut (*AJse*).

La multitude des taches qui apparaissent dans l'extrait brut ont des facteurs de rétention (Rf) différents. Cette différence des Rf des taches indique que les composés présents dans cet extrait brut sont de natures différentes.

Cette nature complexe de l'extrait brut justifie donc sa séparation en composés plus simples.

La différence de coloration et de fluorescence, avec des Rf différents, pour les taches qui apparaissent dans les phases issues de la LLE de *AJse*, confirment que les composés présents dans chacune des phases sont de natures différentes. Ceci montre par ailleurs que les composés se trouvant dans l'extrait brut ont été séparés et se retrouvent différemment dans les trois phases, ce qui indique que la technique de séparation liquide-liquide utilisée est bonne.

La bonne séparation des composés après migration des composés sur les CCM indique également que le solvant utilisé (CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O) et sa composition (9 : 2 v/v) sont convenables pour la séparation des composés présents dans *AJse*. Ce solvant binaire sera donc utilisé pour les autres méthodes chromatographiques de séparation et d'analyse des constituants de l'extrait.

Les analyses chromatographiques HPLC/DAD-UV de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* révèlent la nature composite des constituants, matérialisée par la présence de plusieurs pics sur les chromatogrammes à 210, 254, 280, 360 et 520 nm. Ces pics apparaissent à des temps d'analyse différents, ce qui traduit une fois de plus l'existence de composés de natures différentes.

La longueur d'onde qui fait apparaître le maximum de pics sur les chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV de l'extrait brut, avec des absorbances les plus importantes, est 254 nm. En effet, le chromatogramme, enregistré à cette longueur d'onde fait apparaître plusieurs pics dont une dizaine sont remarquables avec des absorbances nettement plus élevées (> 20 mAU).

La bonne séparation des composés de l'extrait brut par la méthode de séparation liquide-liquide utilisée est confirmée par les chromatogrammes analytiques HPLC/DAD-UV des phases CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et H<sub>2</sub>O, qui apparaissent différents. Mais, le chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV de la phase aqueuse est semblable à celui de l'extrait brut, à la différence que l'absorbance est plus faible avec la phase aqueuse, comparativement à *AJse*. Ceci s'explique par le fait que la phase aqueuse représente les restes de *AJse* qui n'ont pas été séparés par les solvants polaires choisis, ou par cette méthode de séparation liquide-liquide.

L'étude des effets dose-réponse de chacune des trois phases issues de la LLE de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* montre que ces phases entraînent des baisses de la pression artérielle. Mais les effets hypotenseurs de ces trois phases restent inférieurs à ceux de l'extrait brut. Leur efficacité relative par ordre décroissant est :

$$AJse > \text{phase AcOEt} > \text{phase H}_2\text{O} > \text{phase CHCl}_3.$$

La phase CHCl<sub>3</sub> est également la plus mortelle.

Les phases cumulées deux à deux après la LLE, et testées sur la pression artérielle, induisent des effets hypotenseurs plus importants que ceux de ces phases testées individuellement. Ceci indique une synergie des effets des produits contenus dans ces différentes phases issues de la LLE de *AJse*. Mais les effets des phases cumulées deux à deux

restent inférieurs à celui de l'extrait brut. L'efficacité relative de ces composés par ordre décroissant est :



Les trois phases cumulées font apparaître des hypotensions quasi identiques à ceux de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*. Ces deux types de substances contiendraient donc les mêmes principes actifs. De même, le chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV des trois phases cumulées est très semblable à celui de l'extrait brut. En effet, sur les chromatogrammes, les composés présents dans l'extrait brut, principalement ceux ayant des temps de rétention situés entre 14 et 29 minutes, sont également présents dans les trois phases cumulées.

La séparation liquide-liquide n'a donc pas entraîné une perte de constituants et de principes actifs contenus dans l'extrait brut, mais les a séparés et répartis, dans des proportions variées, dans chacune des phases. Des trois phases, la phase acétatique renferme des composés plus actifs ou le plus de composés actifs. La LLE permet donc de conserver la quantité de produits de l'extrait brut, tout en préservant la bioactivité de ses constituants. Cela justifie le fait qu'après la séparation liquide-liquide, les trois phases obtenues, cumulées, donnent quasiment les mêmes effets que ceux de l'extrait brut.

Ces résultats confirment une fois de plus que la technique utilisée (LLE) est bonne pour la séparation des composés de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda*. En effet, une bonne méthode de séparation, en plus de l'aspect quantitatif, doit tenir compte de la qualité des extraits, autrement dit, de la bioactivité de leurs principes actifs.

La phase acétatique, la plus active sur la pression sanguine artérielle parmi les trois phases issue de la LLE de *AJse*, sera donc retenue pour une purification en vue de l'isolement de quelques principes actifs qu'elle contient.

Les produits 1, 2 et 3 qui apparaissent majoritairement lorsque les phases AcOEt et H<sub>2</sub>O (les plus actives des trois phases) sont cumulées, pourraient être à l'origine des effets hypotenseurs les plus importants lorsque les trois phases sont cumulées deux à deux. Ceci est d'autant plus probable que ces trois produits apparaissent également majoritairement dans la phase AcOEt, la plus active des trois phases, qui présente un chromatogramme analytique HPLC/DAD-UV avec quatre pics majoritaires.

Fort de cette étude bioguidée, le choix d'isolement s'est porté sur ces trois composés 1, 2 et 3. Ainsi, par l'utilisation de diverses techniques chromatographiques,

notamment la chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC), la chromatographie sur colonne ouverte (CC) et la chromatographie liquide à haute pression semi-préparative (HPLC semi-préparative), ces trois produits majoritaires ont été isolés puis leurs activités biologiques vérifiées sur la pression artérielle de lapin.

La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique ont aussi été utilisées pour guider le regroupement des fractions comportant des composés identiques et pour vérifier la pureté de certains produits isolés.

Les 3 produits purifiés, provenant de la phase AcOEt issue de la séparation liquide-liquide de *AJse*, sont nommés P1/AcOEt/*AJse*, P2/AcOEt/*AJse* et P3/AcOEt/*AJse*.

De ces trois produits isolés, P3/AcOEt/*AJse* n'a pas d'effet pharmacologique significatif sur la pression artérielle. Seuls P1/AcOEt/*AJse* et P2/AcOEt/*AJse* sont actifs, entraînant une hypotension artérielle dose-dépendante.

Les courbes montrant les chutes de la pression artérielle en fonction des doses de P1/AcOEt/*AJse* et P2/AcOEt/*AJse* sont des sigmoïdes. Les allures sigmoïdes de ces courbes permettent de suggérer que ces deux produits purifiés bioactifs sont des substances à effets pharmacologiques et mettent en évidence, selon Miller et Tainter (1944), que leurs mécanismes d'action passeraient, entre autres, par une activation de récepteurs.

Il apparaît que les effets hypotenseurs de P1/AcOEt/*AJse* sur la pression artérielle sont 5 fois plus importants que ceux induits par P2/AcOEt/*AJse*. La substance P1/AcOEt/*AJse* est donc la plus bioactive sur la pression sanguine artérielle.

P1/AcOEt/*AJse* est également 25 fois plus active que l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (*AJse*) sur la pression artérielle. En effet, la substance P1/AcOEt/*AJse* agit sur la pression artérielle entraînant une hypotension à partir de la dose de  $5.10^{-2}$  mg/kg P.C., alors que les effets hypotenseurs de *AJse* n'apparaissent qu'à partir de la dose de 1,25 mg/kg P.C.

Le produit purifié P1/AcOEt/*AJse* étant le plus pharmacologiquement actif sur la pression artérielle, il est paru nécessaire de l'identifier.

L'analyse par spectrométrie de masse (MS) à haute résolution permet de déterminer la masse et la formule brute du composé. En effet, le spectre de masse ESI-MS indique comme masse du composé 723,499 Da. L'analyse TOF-MS révèle la présence d'un ion

pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  observé à  $m/z$  723,4993. Cet ion détecté correspond à la formule brute  $C_{48}H_{66}O_5$  (masse calculée : 722,491025).

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) renseigne sur la disposition des protons et des carbones dans l'édifice structurale de la molécule.

Sur le spectre RMN  $^1H$ , on observe des signaux entre 8,03 et 6,92 ppm qui font penser à la présence de système aromatique. En outre, le signal intense à 1,29 ppm permet d'annoncer la présence d'une longue chaîne carbonée.

Le signal à 8,03 ppm (2 H, d,  $J = 8,1$  Hz) appartient aux noyaux aromatiques. Il en est de même pour les signaux à 6,92 ppm (2 H, d,  $J = 8,1$  Hz), 7,53 ppm (2 H, d,  $J = 7,5$  Hz), 7,11 ppm (2 H, d,  $J = 7,5$  Hz), 7,57 ppm (2 H, d,  $J = 8,0$  Hz) et 7,95 ppm (2 H, d,  $J = 8,0$  Hz). Il y a au total douze (12) protons aromatiques qui donnent tous des doublets. Cela ne peut s'expliquer que par la présence de trois (3) noyaux aromatiques portant chacun quatre (4) protons, deux à deux chimiquement équivalents.

Le multiplet à 4,13 ppm (1 H,  $m$ ) indique la présence de liaisons du type (-O=C-O-CH-); probablement un ester. Les groupements méthyles ( $CH_3$ -) donnent les signaux à 0,96 et 1,40 ppm.

Sur le spectre RMN  $^{13}C$ , l'hypothèse de noyaux aromatiques est confirmée par les pics entre 162,7 et 114,3 ppm. Les pics à 166,0 et 71,6 ppm d'une part, et 165,2 et 151,1 ppm d'autre part, confirment eux aussi l'hypothèse de fonction ester; deux au total. La longue chaîne carbonée donne le pic intense à 29,7 ppm et ceux des groupements méthyles à 21,7 et 14,1 ppm. Le signal intense à 92,9 ppm indique la présence d'une liaison triple.

En confrontant ces données à celles de la littérature (Nguyen *et al.*, 1996), P1/AcOEt/AJse est identifié à l'Acide 4-(octadecyloxy)-, 4-[[4-[[[(1-méthylheptyl)oxy]carbonyl]phényl]éthynyl]phényl ester benzoïque. Ce composé est une nouvelle molécule qui n'a jamais été décrite ou citée dans la littérature.

Après avoir montré que le composé purifié P1/AcOEt/AJse est une nouvelle substance pharmacologique bioactive, il convient d'étudier sa toxicité.

En effet, l'efficacité d'une substance ne se limite pas à l'évaluation de ses propriétés physiologiques. Ces substances étant destinées à demeurer dans l'organisme, une toxicité peut induire, après des absorptions régulières, une action sur la prolifération cellulaire, néfaste pour l'organisme. Ainsi, il est nécessaire de réaliser des tests non cliniques, c'est-à-dire "*in vitro*", de cytotoxicité du produit purifié bioactif P1/AcOEt/AJse.

## **IV<sub>2</sub> – 2. Etude toxicologique de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse**

### **IV<sub>2</sub> – 2 – 1. Cytotoxicité de P1/AcOEt/AJse**

Pour déterminer les doses de P1/AcOEt/AJse tolérables au niveau cellulaire, une étude de la cytotoxicité de ce composé purifié est réalisée en utilisant le test du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium).

Ainsi, l'étude cytotoxique de P1/AcOEt/AJse, effectuée sur trois lignées cellulaires (neutrophiles péritonéaux de rats, neutrophiles humains et macrophages de souris), a mis en évidence que la cytotoxicité de cette substance purifiée est supérieure ou égale à 2 800 µg/ml. La CL<sub>50</sub> de P1/AcOEt/AJse est supérieure ou égale à 4 200 µg/ml.

### **IV<sub>2</sub> – 2 – 2. Discussion**

Le test au MTT, permettant la détermination quantitative de la viabilité cellulaire (Mosmann, 1983), indique que la cytotoxicité de P1/AcOEt/AJse est supérieure ou égale à 2 800 µg/ml, avec une CL<sub>50</sub> supérieure ou égale à 4 200 µg/ml. La toxicité au niveau cellulaire de P1/AcOEt/AJse est plus importante que celle de l'extrait brut (AJse) dont la cytotoxicité est supérieure ou égale à 6 400 µg/ml, avec une CL<sub>50</sub> supérieure ou égale à 10 700 µg/ml.

Toutefois, la cytotoxicité de P1/AcOEt/AJse reste 4 fois plus faible que celle d'un extrait hydro-alcoolique de *Justicia secunda*, plante d'où est issu ce produit purifié. En effet, Cantillo *et al.*, (2007), ont déterminé une CL<sub>50</sub> supérieure à 1 000 µg/ml pour l'activité hématolytique d'un extrait hydro-méthanolique (1 : 8 v/v) de *Justicia secunda* et, en la comparant à celle des extraits d'autres plantes, sont arrivés à la conclusion que cet extrait de *Justicia secunda* est peu toxique et peut être utilisé en pharmacologie.

Cette conclusion est largement favorable à une utilisation aisée de P1/AcOEt/AJse en pharmacologie.

Le produit purifié P1/AcOEt/AJse étant le plus pharmacologiquement actif sur la pression artérielle et faiblement toxique, il paraît nécessaire de vérifier si celle-ci présente des propriétés antihypertensives, tout comme l'extrait brut (AJse). Ainsi, une étude des effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension artérielle induite chez le lapin est menée.

### **IV<sub>2</sub> – 3. Effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite chez le lapin**

Le but de cette étude est de voir les effets de P1/AcOEt/AJse, substance hypotensive, sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline ou par la stimulation des fibres nerveuses sympathiques de lapin.

#### **IV<sub>2</sub> – 3 – 1. Effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline au lapin**

La **figure 95-a** présente un enregistrement type des résultats de cette série d'expériences.

L'adrénaline, à la dose de  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C., induit une augmentation de pression artérielle de 49 mm Hg (**figure 95-a-A**).

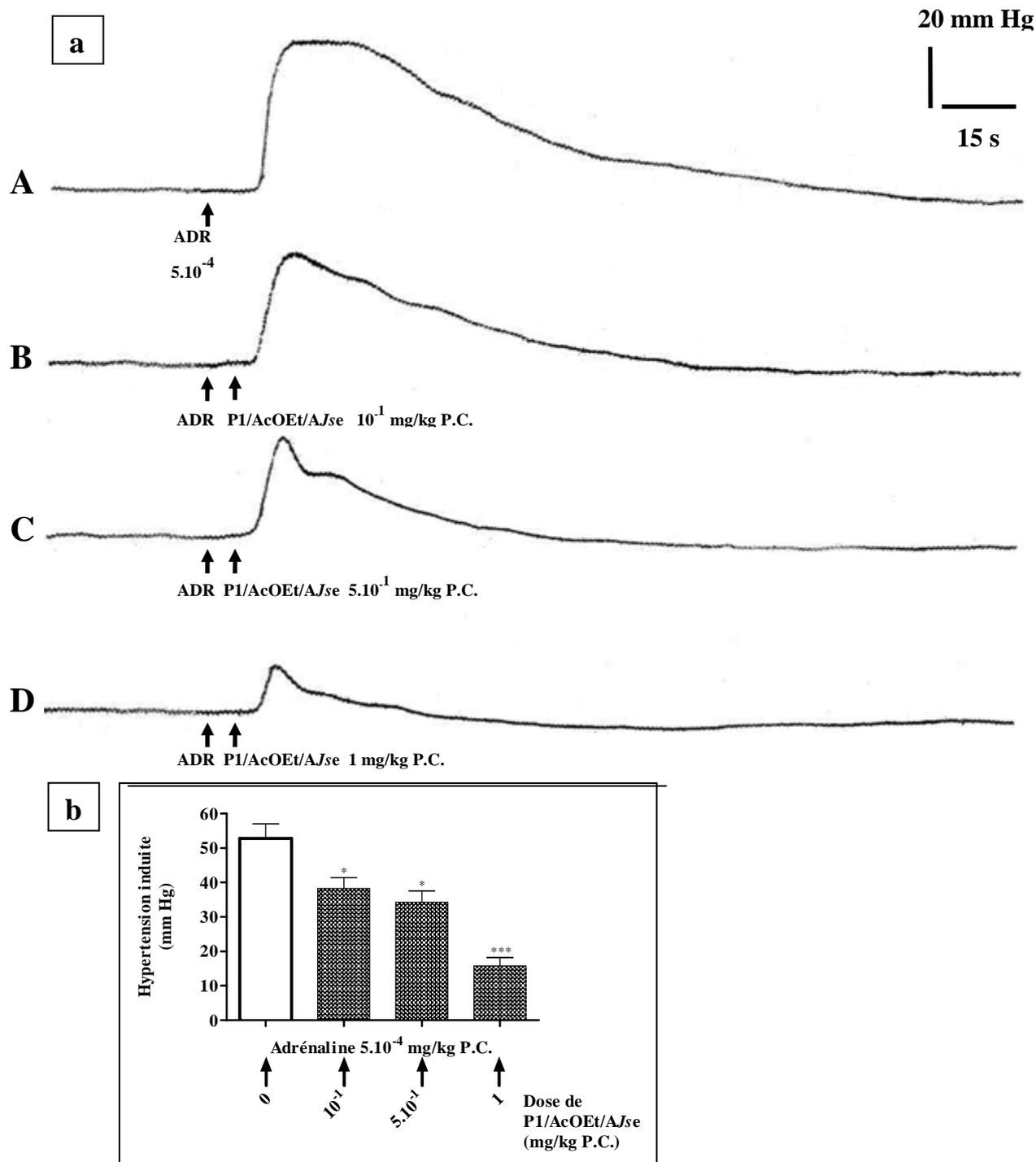
Par la suite, l'administration de l'adrénaline à  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C. est suivie, 5 s après, de celle de doses croissantes de P1/AcOEt/AJse (**figure 95-a -B -C et -D**). Il apparaît qu'en présence de P1/AcOEt/AJse à des doses de  $10^{-1}$ ,  $5.10^{-1}$  et 1 mg/kg P.C., l'hypertension induite par l'adrénaline à  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C. est réduite respectivement de 24,49 %, 32,65 % et 69,39 %. Pour la dose de P1/AcOEt/AJse de 1 mg/kg P.C., en plus de la réduction de l'hypertension artérielle induite par l'adrénaline, il apparaît, à la suite de cet effet, une hypotension artérielle de 3 mm Hg (**figure 95-a-D**).

Les colonnes de la **figure 95-b** présentent les effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline à  $5.10^{-4}$  mg/kg P.C. au lapin, pour 3 expériences.

#### **IV<sub>2</sub> – 3 – 2. Effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique de lapin**

La **figure 96-a** est un enregistrement type de cette série d'expériences. Les effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par la stimulation des fibres nerveuses sympathiques de lapin, pour 3 expériences, sont représentés par les colonnes de la **figure 96-b**.

L'enregistrement type montre que la stimulation électrique du nerf sympathique fait apparaître, pendant toute la durée de la stimulation (40 s), une hypertension artérielle de 19 mm Hg (**figure 96-a-A**).



**Figure 95 : effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par l'administration d'adrénaline au lapin**

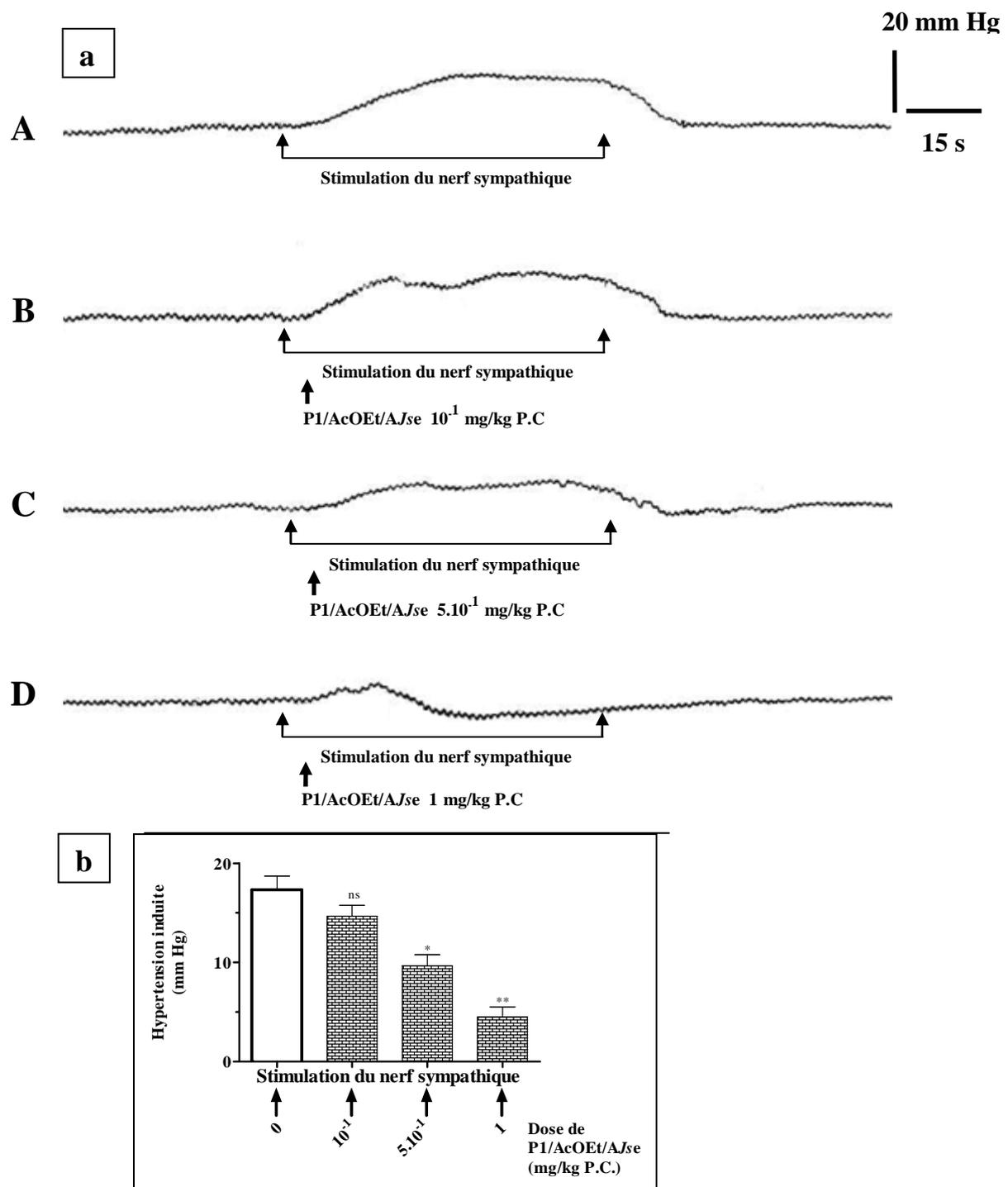
**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de l'adrénaline (ADR) à  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/kg de poids corporel (P.C.)

**B à D** - Effets de ADR à  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/kg de poids corporel, suivi de l'injection de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-1}$  (B) ;  $5 \cdot 10^{-1}$  (C) et 1 (D) mg/kg de poids corporel

**b – Réduction par P1/AcOEt/AJse de l'hypertension artérielle induite par l'adrénaline**

**n = 3 ; \* P < 0,05 ; \*\*\* P < 0,001.**



**Figure 96 : effets de P1/AcOEt/AJse sur l'hypertension induite par la stimulation du nerf sympathique de lapin**

**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de la stimulation du nerf sympathique  
(intensité = 6 mV ; durée = 0,6 ms ; fréquence = 25 Hz)

**B à D** - Effets de la stimulation du nerf sympathique et de l'injection de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-1}$  (B) ;  $5.10^{-1}$  (C) et 1 (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Réduction par P1/AcOEt/AJse de l'hypertension artérielle induite par la stimulation du nerf sympathique (n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01)**

Lorsque cette stimulation du nerf sympathique est suivie, 3 s après, de l'administration de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-1}$  mg/kg P.C. (**figure 96-a-B**),  $5.10^{-1}$  mg/kg P.C. (**figure 96-a-C**) et 1 mg/kg P.C. (**figure 96-a-D**), l'hypertension artérielle est réduite respectivement de 15,79 %, 42,11 % et 73,68 %. Pour la dose de P1/AcOEt/AJse de 1 mg/kg P.C., il apparaît, à la suite de la réduction de l'hypertension artérielle induite par la stimulation du nerf sympathique, une hypotension artérielle de 4 mm Hg (**figure 96-a-D**).

#### **IV<sub>2</sub> – 3 – 3. Discussion**

P1/AcOEt/AJse réduit significativement, proportionnellement à sa dose, l'hypertension artérielle induite par l'adrénaline administrée directement ou libérée suite à la stimulation des fibres nerveuses sympathiques. P1/AcOEt/AJse est donc également une substance antihypertensive. Ces résultats indiquent également que ce composé agirait en inhibant les effets de l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

Le produit purifié P1/AcOEt/AJse présentant des propriétés hypotenseurs et antihypertenseurs, il convient de connaître son mécanisme d'action sur le système cardio-vasculaire. De ce fait, il s'impose une détermination de son site de fixation sur le système cardio-vasculaire. Ceci se fera par l'étude des interactions de P1/AcOEt/AJse avec des antagonistes qui occupent "*in vivo*" les sites d'action des principales classes de médicaments antihypertenseurs. Les expérimentations porteront ainsi sur la pression sanguine artérielle, l'électrocardiogramme, les contractions du cœur isolé et les contractions toniques de vaisseaux isolés.

#### **IV<sub>2</sub> – 4. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur le système cardio-vasculaire de Mammifères**

##### **IV<sub>2</sub> – 4 – 1. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur la pression sanguine artérielle**

L'étude du mécanisme d'action de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) a montré que cet extrait contient des substances anticalciques,  $\beta$ -bloquants et a son effet hypotenseur potentialisé en présence d'un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II. Pour déterminer le(s) site(s) d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse issue de AJse sur le système cardio-vasculaire, celle-ci est donc antagonisée par des antagonistes des sites d'action de chacune des principales classes de médicaments antihypertenseurs que contient l'extrait brut.

Ainsi, dans cette série d'expériences, les animaux sont prétraités avec le propranolol (antagoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques), le vérapamil et la nifédipine (anticalciques) ou le losartan (antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II), à des doses pour lesquelles ces substances n'ont pas d'effets propres sur la pression artérielle, avant de leur administrer P1/AcOEt/AJse à la dose de  $5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C. Cette dose de P1/AcOEt/AJse entraîne une hypotension de  $22,8 \pm 3,2$  mm Hg, significative ( $P < 0,001$ ) et totalement réversible.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 1 – 1. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – propranolol sur la pression artérielle de lapin**

Le but de cette série d'expériences est de voir si P1/AcOEt/AJse agit sur la pression sanguine artérielle par l'intermédiaire des récepteurs bêta-adrénergiques.

Ainsi, dans cette étude, le propranolol, aux doses de  $5 \cdot 10^{-5}$  et  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/kg P.C., est administré au lapin avant l'injection de P1/AcOEt/AJse à la dose de  $5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C.

Il apparaît que, le propranolol, aux doses indiquées ci-dessus, n'a pas d'effet sur l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse.

La **figure 97-a** est un enregistrement type des résultats de cette étude. Pour 3 expériences, les colonnes de la **figure 97-b**, représentant les baisses de la pression artérielle induites par P1/AcOEt/AJse, en absence ou en présence de propranolol, ont été construites.

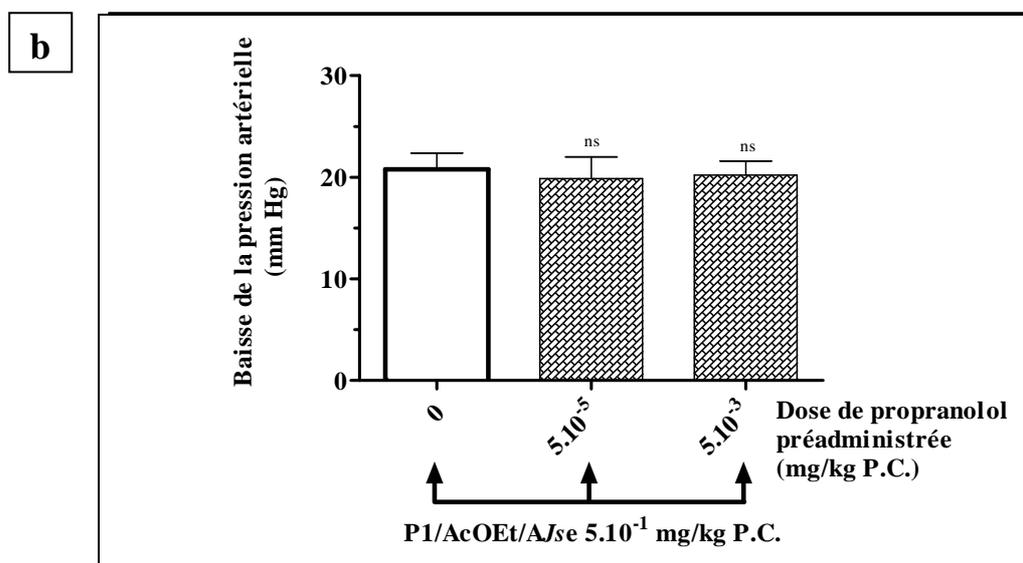
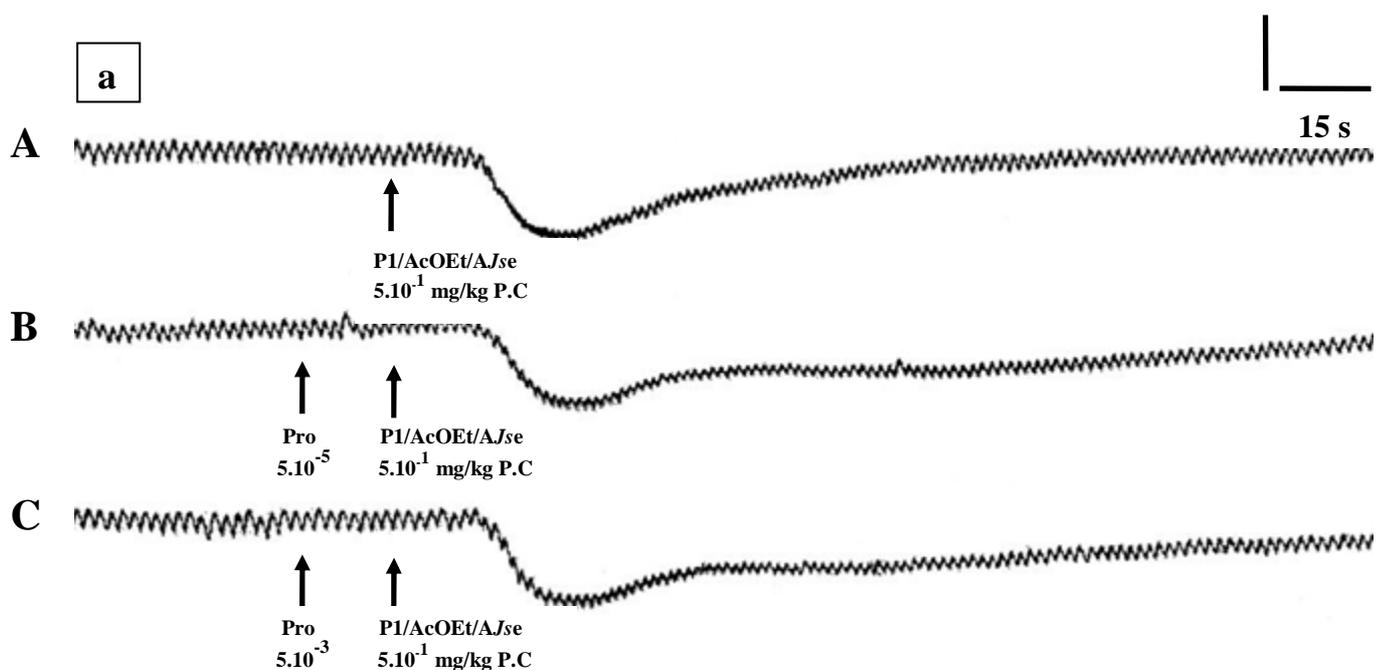
#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 1 – 2. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – vérapamil sur la pression artérielle de lapin**

Pour vérifier si P1/AcOEt/AJse agit sur les canaux calciques localisés au niveau cardiaque, dans cette étude, le vérapamil, un anticalcique à effets sinusal et coronaire prédominants, est antagonisé avec cette substance.

Ainsi, dans cette série d'expériences, l'administration de P1/AcOEt/AJse à la dose de  $5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C. au lapin est précédée de celle de vérapamil à différentes doses. La **figure 98-a** est un enregistrement type des résultats de cette étude.

Il ressort que P1/AcOEt/AJse seul induit une hypotension de 21 mm Hg (**figure 98-a-A**). Lorsque l'animal reçoit préalablement le vérapamil aux doses de  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  et  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/kg P.C., l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse à  $5 \cdot 10^{-1}$  mg/kg P.C., administrée 15 s après, est réduite respectivement de 14,29 %, 52,38 % et 61,19 % (**figure 98-a -B -C et -D**).

La réduction par le vérapamil de l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse, pour 3 expériences, est représentée par les colonnes de la **figure 98-b**.



**Figure 97 : interaction P1/AcOEt/AJse-propranolol sur la pression artérielle de lapin**

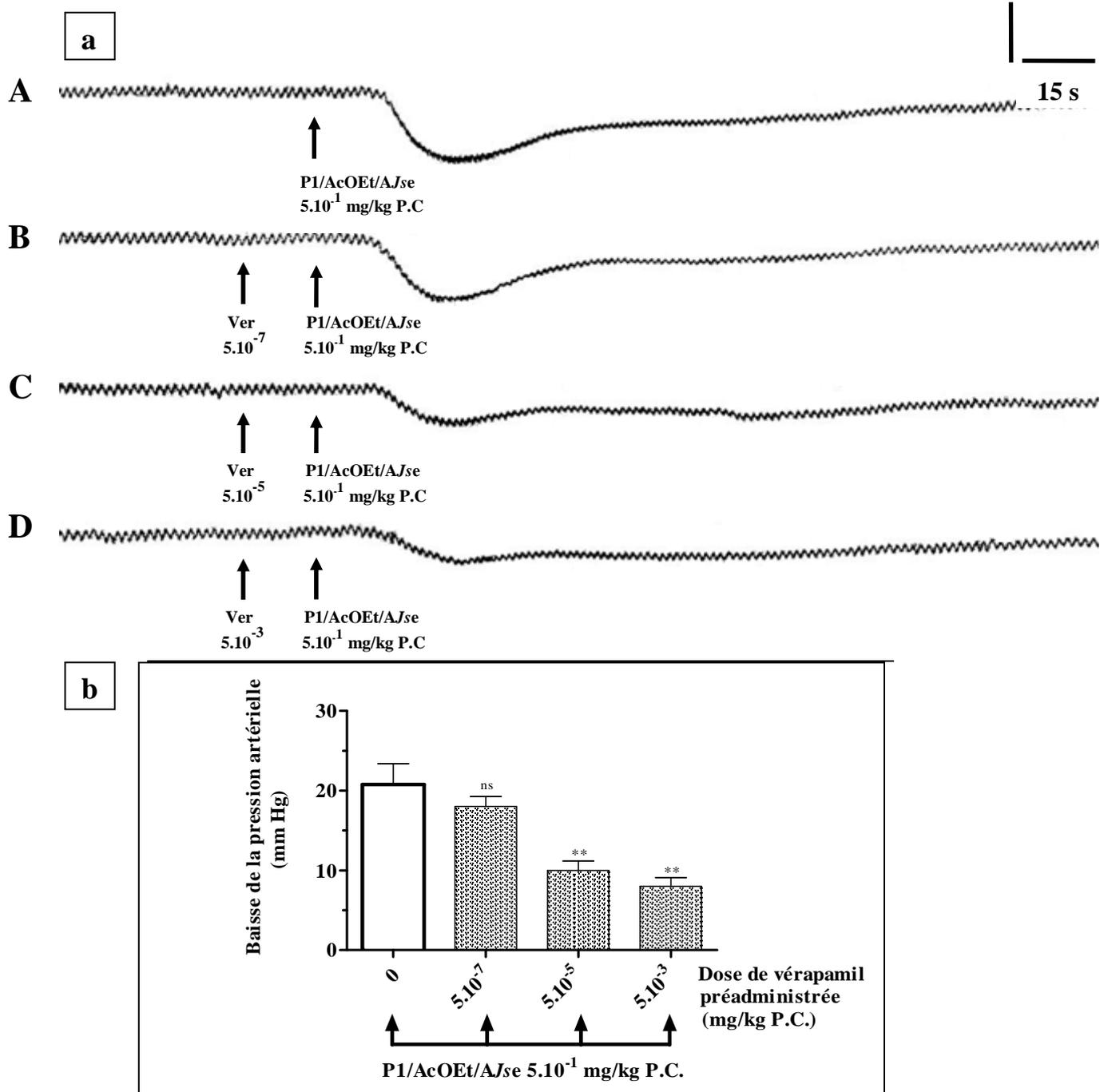
**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel (après la flèche)

**B et C** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration du propranolol (Pro) à  $5.10^{-5}$  (B) et  $5.10^{-3}$  (C) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de P1/AcOEt/AJse sur la pression artérielle en présence du propranolol**

**n = 3 ; ns P > 0,05.**



**Figure 98 : interaction P1/AcOEt/AJse-vérapamil sur la pression artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel (après la flèche)

**B à D** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel

(après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration du vérapamil (Ver)

à  $5.10^{-7}$  (B),  $5.10^{-5}$  (C) et  $5.10^{-3}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de P1/AcOEt/AJse sur la pression artérielle en présence du vérapamil**

**n = 3 ; ns P > 0,05 ; \*\* P < 0,01.**

### **IV<sub>2</sub> – 4 – 1 – 3. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – nifédipine sur la pression artérielle de lapin**

Cette étude de l'antagonisme P1/AcOEt/AJse-nifédipine vise à vérifier si la substance purifiée agit sur la pression artérielle, comme un anticalcique, par l'intermédiaire de récepteurs localisés sur les vaisseaux sanguins ; la nifédipine étant un anticalcique à effet vasculaire prédominant.

Les résultats de cette série d'expériences (**figure 99**) montrent que cet anticalcique réduit significativement l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse. En effet, lorsque la nifédipine est préalablement administrée au lapin à des doses de  $5.10^{-7}$ ,  $5.10^{-5}$  et  $5.10^{-3}$  mg/kg P.C. avant d'administrer, 15 s après, P1/AcOEt/AJse à la dose de  $5.10^{-1}$  mg/kg P.C., l'hypotension de 22 mm Hg qu'entraîne cette substance pure est réduite de 13,63 %, 36,36 % et 59,09 % pour les doses respectives de nifédipine utilisée (**figure 99-a**).

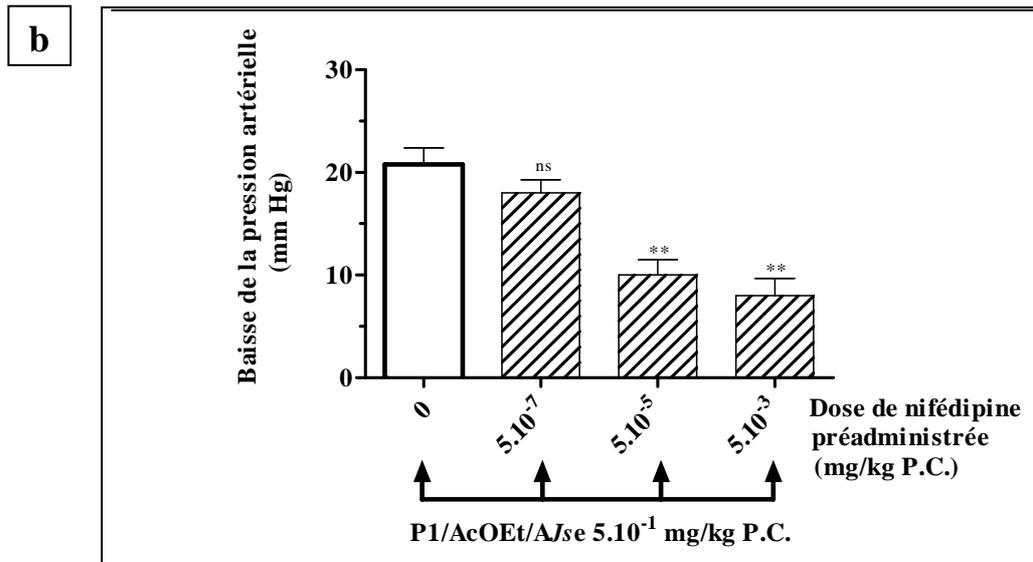
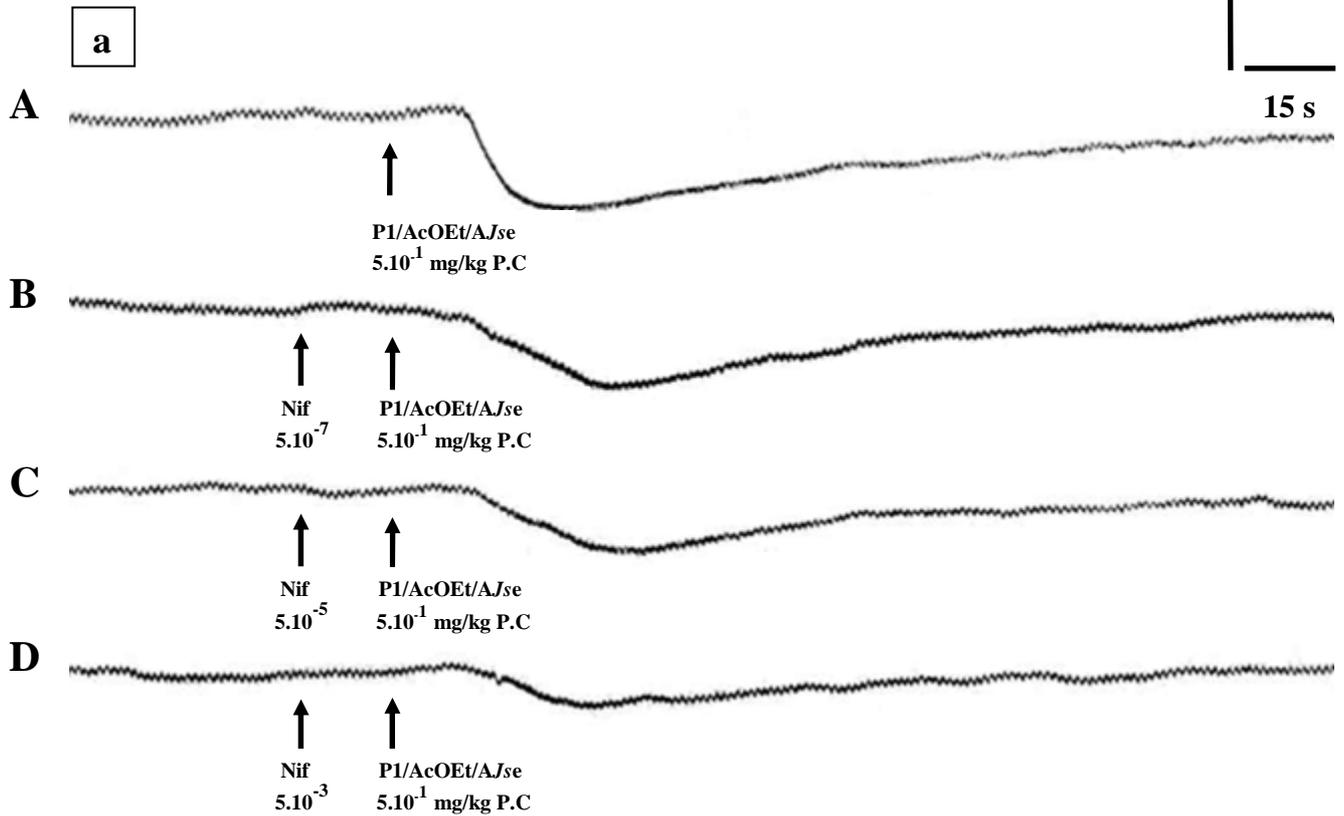
Les colonnes de la **figure 99-b**, tracée à partir des résultats de 3 expériences, présentent les effets de la nifédipine sur l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse.

### **IV<sub>2</sub> – 4 – 1 – 4. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – losartan sur la pression artérielle de lapin**

Pour voir les effets du losartan (Cozaar®) sur l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse, le lapin est prétraité avec cet antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, aux doses de  $5.10^{-8}$  et  $5.10^{-7}$  mg/kg P.C., avant de recevoir la substance purifiée (1 min après) à la dose de  $5.10^{-1}$  mg/kg P.C. Le but de cette étude est de savoir si P1/AcOEt/AJse agit par l'intermédiaire des récepteurs de l'angiotensine II pour induire ses effets ou si, tout comme pour l'extrait brut, ses effets sont potentialisés par cette substance.

Il apparaît, comme le montre la **figure 100-a** qui est un enregistrement type des résultats de cette série d'expériences, que le losartan, aux doses de  $5.10^{-8}$  et  $5.10^{-7}$  mg/kg P.C., est sans effet notable sur l'hypotension artérielle induite par P1/AcOEt/AJse.

La **figure 100-b** présente les colonnes montrant les effets de P1/AcOEt/AJse sur la pression artérielle, en absence ou en présence du losartan, dans cette série d'expériences (n = 3).



**Figure 99 : interaction P1/AcOEt/AJse-nifédipine sur la pression artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel (après la flèche)

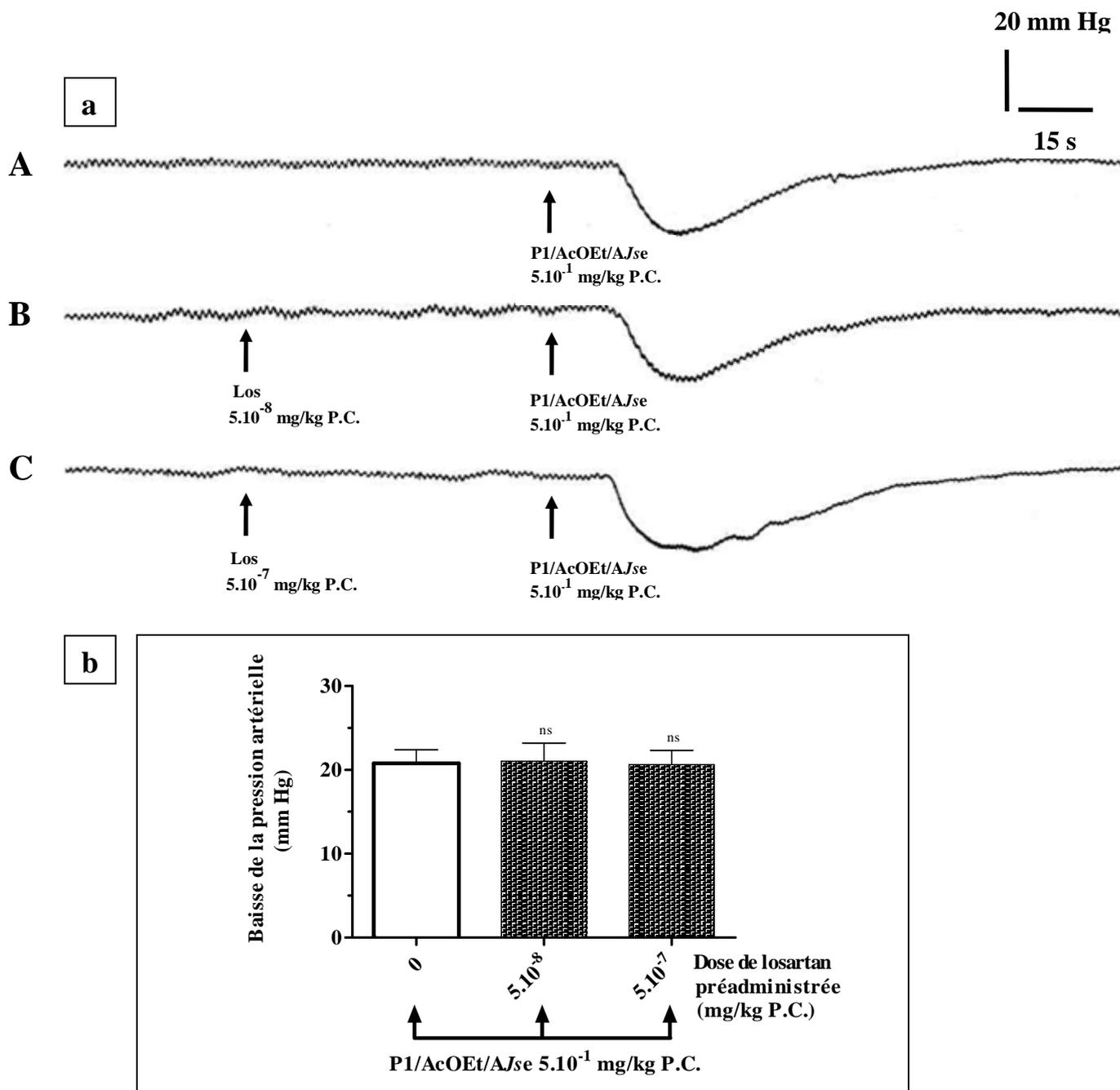
**B à D** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel

(après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration de la nifédipine (Nif)

à  $5.10^{-7}$  (B),  $5.10^{-5}$  (C) et  $5.10^{-3}$  (D) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de P1/AcOEt/AJse sur la pression artérielle en présence de la nifédipine**

**n = 3 ; ns P > 0,05 ; \*\* P < 0,01.**



**Figure 100 : interaction P1/AcOEt/AJse-losartan sur la pression artérielle de lapin**

**a – Enregistrement type**

**A** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel (après la flèche)

**B à D** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5.10^{-1}$  mg/kg de poids corporel (après les 2<sup>èmes</sup> flèches), précédés de l'administration du losartan (Los) à  $5.10^{-8}$  (B) et  $5.10^{-7}$  (C) mg/kg de poids corporel (P.C.)

**b – Effets de P1/AcOEt/AJse sur la pression artérielle en présence du losartan**

**n = 3 ; ns P > 0,05.**

## IV<sub>2</sub> – 4 – 1 – 5. Discussion

Les effets hypotenseurs de P1/AcOEt/AJse sont semblables à ceux de substances cholinergiques. Mais, l'étude du mécanisme d'action de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) dont est issue cette substance purifiée a révélé que les effets des substances contenues dans AJse ne sont pas médiés par l'activation de récepteurs cholinergiques. De même, AJse n'agit pas par l'intermédiaire de récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques. Ainsi, l'action de la substance P1/AcOEt/AJse se ferait indépendamment des récepteurs cholinergiques et des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, mais par l'intermédiaire d'autres sites récepteurs.

Pour connaître le mécanisme d'action de la substance P1/AcOEt/AJse, issue de la purification d'un extrait aqueux brut de *Justicia secunda* qui s'est révélé contenir des substances  $\beta$ -bloquants et anticalciques, et dont les effets sont potentialisés en présence d'un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, il a été mené l'étude de l'interaction entre cette substance et des antagonistes qui occupent les sites d'action des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (propranolol), des canaux calciques (vérapamil et nifédipine) et des récepteurs de l'angiotensine II (losartan).

Le propranolol, un  $\beta$ -bloqueur qui inhibe à la fois les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques (Witchitz, 1994 ; Brown, 1995 ; Moulin et Coquerel, 2002), n'a pas d'effets sur l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse. De même, le losartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, qui se lie sélectivement aux récepteurs AT<sub>1</sub> (Doig *et al.*, 1993 ; Johnston, 1995 ; Goodfriend *et al.*, 1996 ; Nicholls *et al.*, 1997 ; Roffman, 1998 ; Boutouyrie, 1999) et bloque les effets que l'angiotensine II exerce sur ces récepteurs (Maeso *et al.*, 1997), n'a pas d'effet sur l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse. La substance purifiée P1/AcOEt/AJse n'agit donc pas par le biais de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ou de récepteurs de l'angiotensine II et n'est donc pas un  $\beta$ -bloquant, ni un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II.

Les effets hypotenseurs de cette substance P1/AcOEt/AJse sont partiellement inhibés par le vérapamil et par la nifédipine. Le vérapamil et la nifédipine sont deux classes pharmacologiques d'inhibiteurs calciques. Le premier (vérapamil) a un tropisme mixte, à la fois vasculaire et myocardique, avec une prédominance de l'action cardiaque sur l'action artério-dilatatrice périphérique. C'est l'inhibiteur calcique ayant l'effet inotrope négatif le plus marqué (Motte *et al.*, 1996 ; Legalerey, 2001). La nifédipine, quant à elle, a un effet vasculaire prédominant (Frishman *et al.*, 1984 ; Werner, 1984).

Chacun des deux types d'inhibiteur calcique (vérapamil et nifédipine) réduit, proportionnellement à la dose, l'hypotension induite par P1/AcOEt/AJse. Ceci laisse supposer

que P1/AcOEt/AJse agit sur les canaux calciques localisés aussi bien sur le myocarde que sur le muscle lisse vasculaire. P1/AcOEt/AJse a donc un tropisme mixte, à la fois myocardique et vasculaire.

Ainsi P1/AcOEt/AJse, tout comme les autres anticalciques, a la propriété de bloquer de façon sélective l'entrée du calcium au travers des canaux calciques lents ou voltage dépendants situés dans la membrane plasmique des cellules du myocarde et des cellules musculaires lisses des vaisseaux. Cette diminution de l'influx calcique causée par P1/AcOEt/AJse dans les cellules musculaires cardiaques et les cellules musculaires vasculaires a pour conséquence une cardioinhibition, une vasodilatation et ainsi une baisse de la pression artérielle.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur l'activité cardiaque**

Cette étude vise à voir les effets de P1/AcOEt/AJse sur l'activité électrique globale (ECG) et l'activité mécanique (contraction). Par la suite, une étude des effets de cette substance sur l'hémodynamie cardiaque se fera par la mesure du débit coronaire cardiaque.

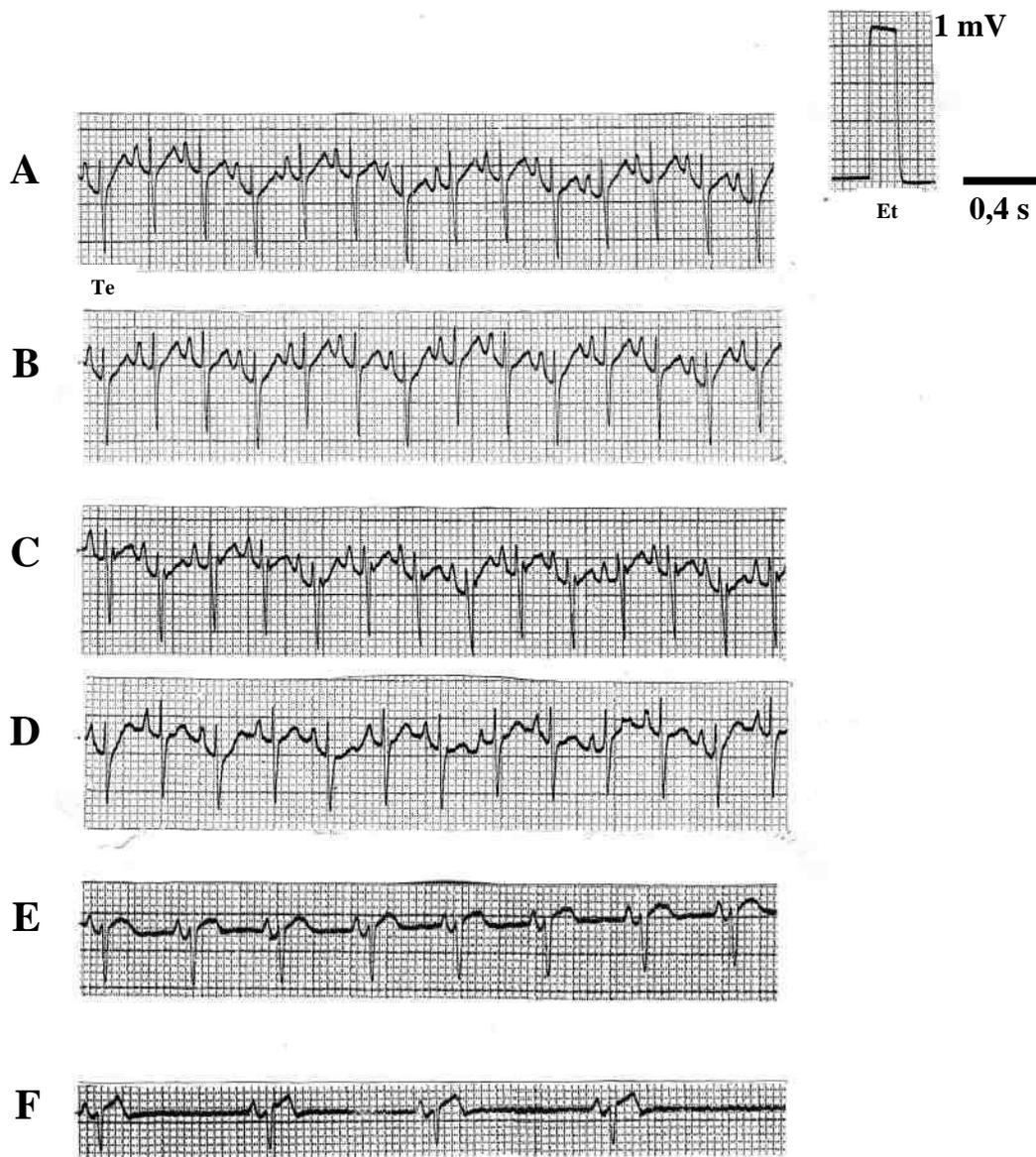
##### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 1. Effets de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur l'activité cardiaque**

##### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 1 – 1. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur l'électrocardiogramme (ECG) de lapin**

Lors de l'enregistrement de l'ECG de lapin, des doses croissantes de P1/AcOEt/AJse, variant de  $10^{-2}$  à 1,25 mg/kg P.C., sont administrées à l'animal. La **figure 101** est un enregistrement type de cette série d'expériences.

L'analyse de l'ECG a porté sur l'amplitude des différentes ondes, sur la durée des intervalles séparant ces ondes et sur la fréquence cardiaque (cf. **figure 44**, résultats IV<sub>1</sub> – 4 – 1 – 1 – 1., page 164).

Il apparaît que P1/AcOEt/AJse est sans effet sur les durées des intervalles séparant les ondes, mais agit essentiellement sur l'amplitude de ces ondes et sur la fréquence cardiaque. Les effets de P1/AcOEt/AJse sur l'ECG apparaissent à partir de la dose de  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/kg P.C., et se traduisent par une diminution de l'amplitude du complexe QRS (**figure 101-B**). Cette dose, P1/AcOEt/AJse est sans effet sur les autres paramètres de l'ECG. Les doses plus faibles n'ont aucun effet sur l'ECG.



**Figure 101 : effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur l'électrocardiogramme de lapin**

**A** - Enregistrement témoin (Te) de l'ECG normal et étalonnage (Et)

**B à F** - Effets de P1/AcOEt/AJse à  $5 \cdot 10^{-2}$  (B) ;  $10^{-1}$  (C) ;  $5 \cdot 10^{-1}$  (D) ; 1 (E) et 1,25 (F)  
mg/kg de poids corporel

A partir de la dose de  $10^{-1}$  mg/kg P.C., et pour les doses supérieures, en plus de la diminution de l'amplitude du complexe QRS, P1/AcOEt/AJse, il apparaît aussi une diminution de l'amplitude de l'onde T et une baisse de la fréquence cardiaque. Les effets sur l'amplitude de l'onde P ne sont apparents qu'à partir de la dose de  $5.10^{-1}$  mg/kg P.C. (**figure 101-D**). Ces effets se traduisent par la diminution de l'amplitude de cette onde P, en plus de la diminution de l'amplitude de l'onde T et du complexe QRS, et la baisse de la fréquence cardiaque. Tous ces effets sur les paramètres de l'ECG sont dose-dépendants.

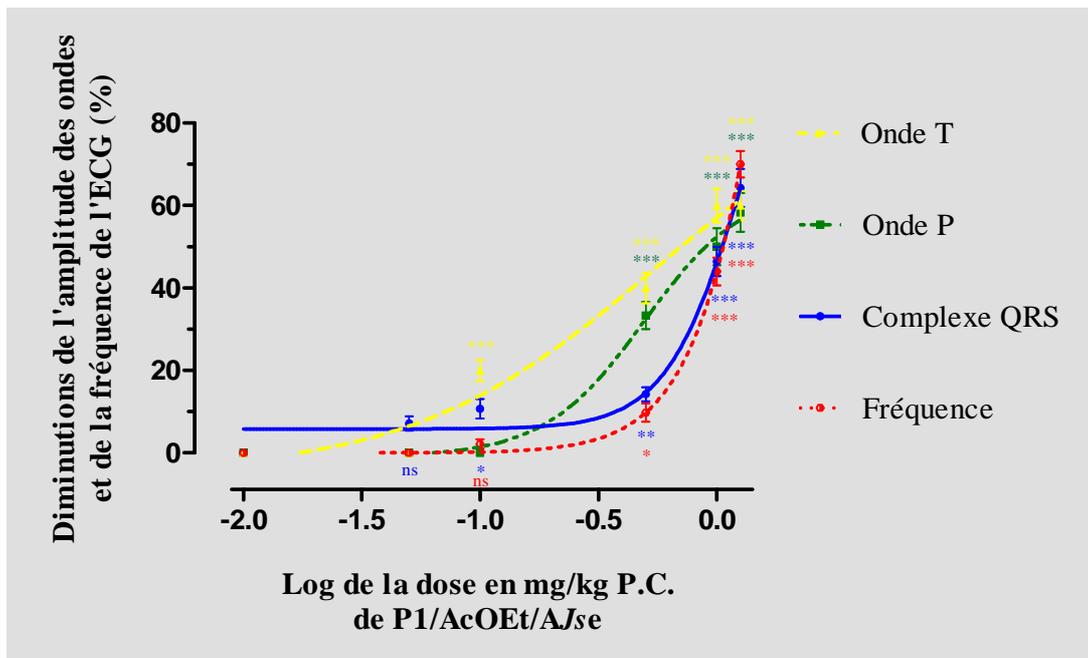
Aux doses inférieures ou égales à  $5.10^{-1}$  mg/kg P.C., les effets de P1/AcOEt/AJse sur l'ECG sont totalement réversibles. A partir de 1 mg/kg P.C. (**figure 101-E**), ces effets deviennent partiellement réversibles, puis irréversibles au delà de cette dose.

La **figure 102** donne les courbes montrant les effets de P1/AcOEt/AJse sur l'amplitude des ondes P et T et du complexe QRS et sur la fréquence cardiaque. Ces courbes permettent de déterminer les doses efficaces 50 % ( $DE_{50}$ ) de P1/AcOEt/AJse sur les différents paramètres de l'ECG, notamment sur les amplitudes de l'onde P (= 0,495 mg/kg P.C.), du complexe QRS (= 1,307 mg/kg P.C.) et de l'onde T (= 0,534 mg/kg P.C.), et sur la fréquence cardiaque (= 2,721 mg/kg P.C.).

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 1 – 2. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur les contractions du cœur isolé de rat**

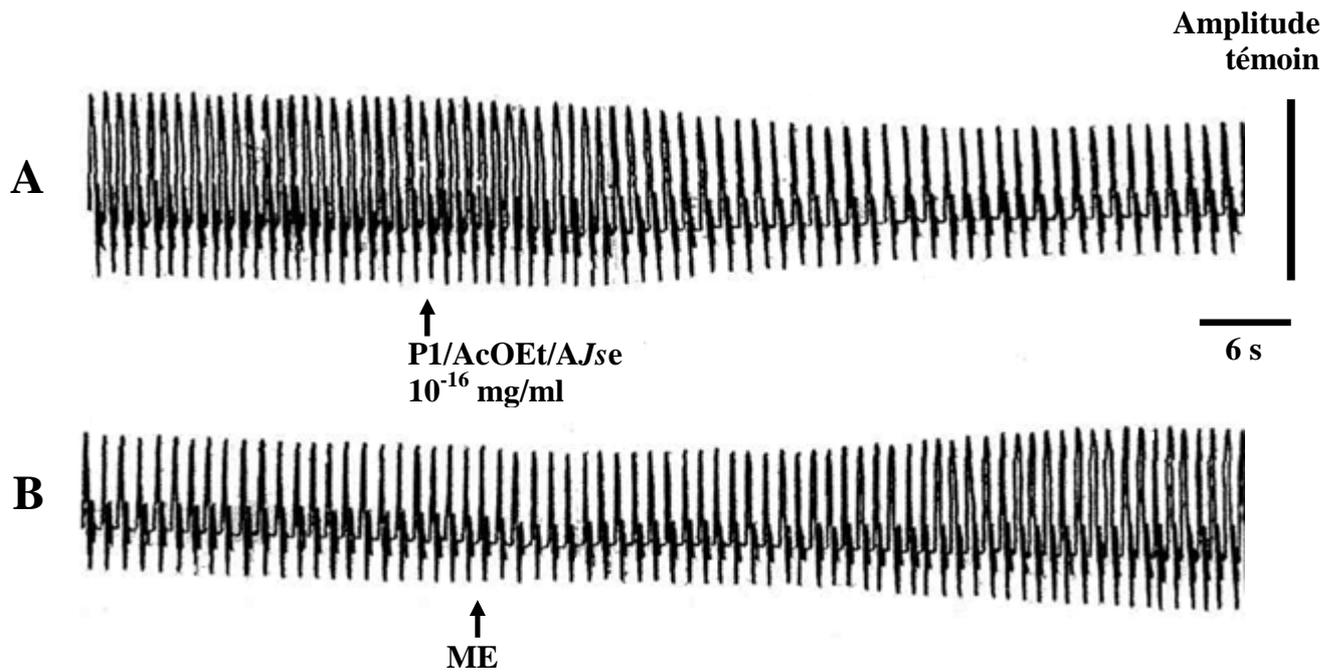
P1/AcOEt/AJse, à des doses variant de  $10^{-20}$  à  $10^{-4}$  mg/ml, entraîne, sur les contractions du cœur isolé et perfusé de rat, des effets inotrope et chronotrope négatifs. Des doses de P1/AcOEt/AJse inférieures à  $10^{-20}$  mg/ml sont sans effet sur les contractions cardiaques. La cardiodépression induite par P1/AcOEt/AJse est dose-dépendante et totalement réversible jusqu'à une dose de  $10^{-10}$  mg/ml. Ces effets restent partiellement réversibles pour les doses variant de  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  mg/ml, puis deviennent irréversibles au delà de  $10^{-6}$  mg/ml.

La **figure 103** est un enregistrement type des effets de P1/AcOEt/AJse sur les contractions du cœur isolé de rat. Elle montre qu'à la dose de  $10^{-10}$  mg/ml, P1/AcOEt/AJse induit une diminution de l'amplitude des contractions de 26,09 % et une réduction de la fréquence cardiaque de 13,97 %.



**Figure 102 : diminutions, en fonction de la dose de P1/AcOEt/AJse, de l'amplitude des ondes P et T, du complexe QRS et de la fréquence de l'ECG de lapin**

(n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)



**Figure 103 : effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-10}$  mg/ml sur les contractions du cœur isolé de rat**

**A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-10}$  mg/ml

**B** - Suite de A et retour au Mac Ewen de référence (ME) (après la flèche)

La **figure 104** représente les courbes montrant les effets inhibiteurs de P1/AcOEt/AJse sur l'amplitude et sur la fréquence des contractions cardiaques. Les concentrations efficaces 50 % de P1/AcOEt/AJse, déterminées à l'aide de ces courbes, sont de  $10^{-16}$  mg/ml pour l'amplitude des contractions et  $10^{-17}$  mg/ml pour la fréquence cardiaque.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 1 – 3. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur le débit coronaire du cœur isolé de rat**

Sous imprégnation de doses croissantes de P1/AcOEt/AJse, le débit coronaire du cœur isolé et perfusé est mesuré.

Il apparaît que des doses de P1/AcOEt/AJse variant de  $10^{-20}$  à  $10^{-4}$  mg/ml entraînent une augmentation dose-dépendante du débit coronaire cardiaque. Les doses inférieures à  $10^{-20}$  mg/ml, n'ont pas d'effet notable sur ce débit coronaire cardiaque.

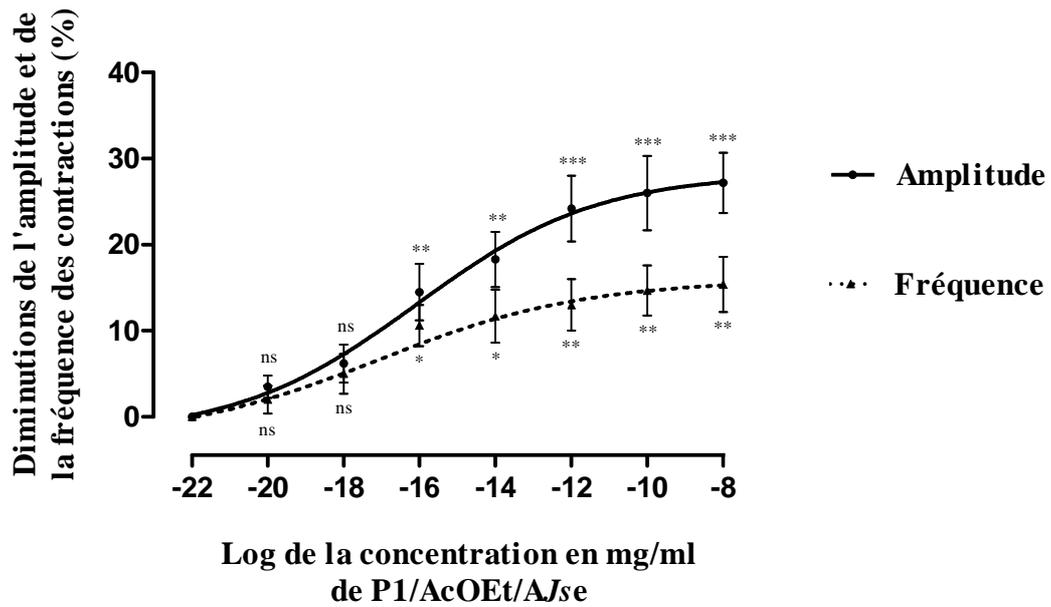
La **figure 105** représente la courbe de la variation du débit coronaire cardiaque en fonction du logarithme de la concentration de P1/AcOEt/AJse, pour 3 expériences. Elle permet de déterminer une  $CE_{50}$  de  $1,44 \cdot 10^{-13}$  mg/ml.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur les contractions cardiaques**

Pour connaître le mécanisme d'action de la substance P1/AcOEt/AJse, le vérapamil, un anticalcique qui inhibe partiellement les effets de cette substance sur la pression artérielle, a été utilisé. Le but est de voir l'effet de cet anticalcique sur l'action de P1/AcOEt/AJse, directement sur l'une de ses cibles potentielles qu'est le cœur sur lequel la substance purifiée agit.

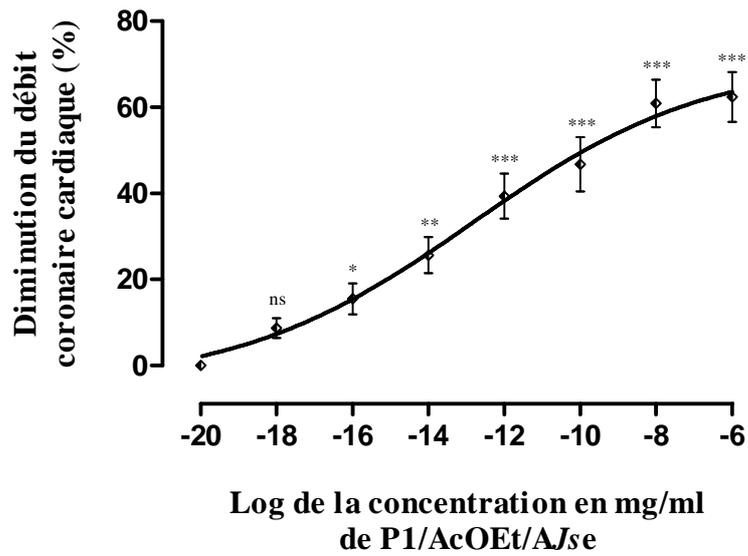
L'activité cardiaque étant sous-tendue par les flux ioniques, une étude des effets de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique de compositions ioniques modifiées sera menée afin d'apprécier le rôle éventuel des ions qui participent à son mécanisme d'action.

Dans ces expériences, P1/AcOEt/AJse est utilisée à la dose de  $10^{-16}$  mg/ml ( $CE_{50}$ ). A cette dose, il induit des effets inotrope et chronotrope négatifs de  $14,53 \pm 3,33$  % et  $10,64 \pm 4,32$  % ( $n = 3$ ) respectivement (**figure 106**). Ces effets sont significatifs ( $P < 0,01$ ), totalement et rapidement réversibles (en moins de 60 s).



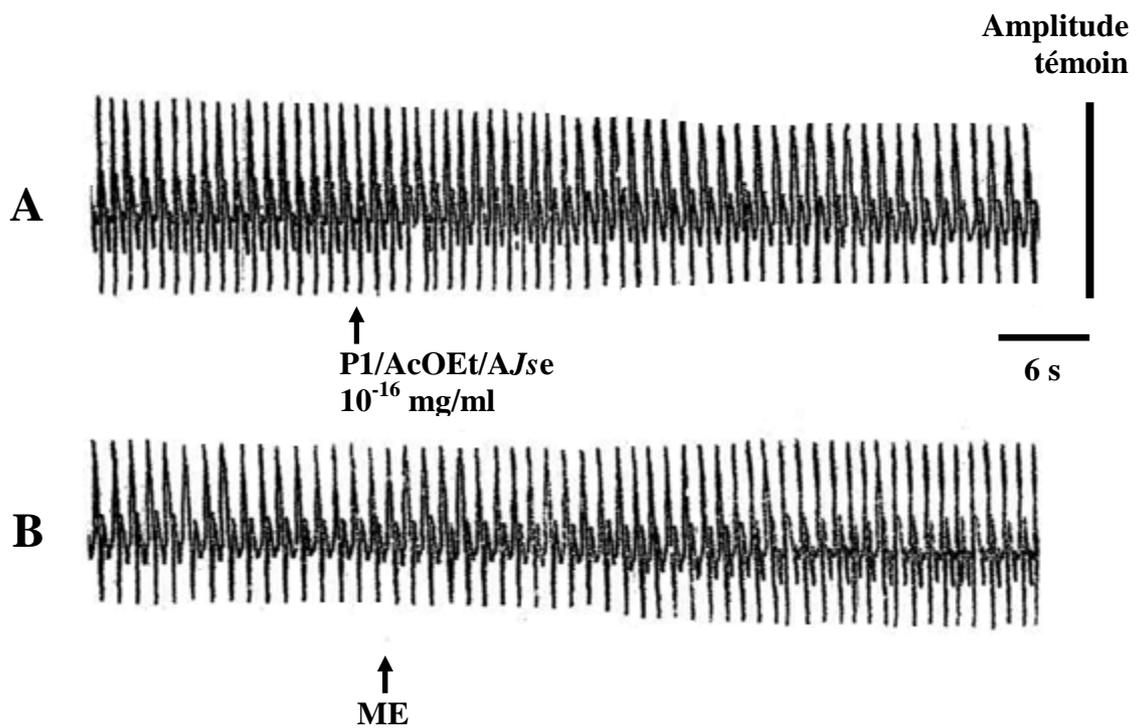
**Figure 104 : diminutions de l'amplitude et de la fréquence des contractions du cœur isolé de rat en fonction de la concentration de P1/AcOEt/AJse**

(n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)



**Figure 105 : diminution du débit coronaire du cœur isolé de rat en fonction de la concentration de P1/AcOEt/AJse**

(n = 3 ; ns P > 0,05 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001)



**Figure 106 : effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml sur les contractions du cœur isolé de rat**

**A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml

**B** - Suite de A et retour au Mac Ewen de référence (ME) (après la flèche)

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 1. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – vérapamil sur les contractions du cœur isolé de rat**

La **figure 107-A** montre les effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml sur les contractions cardiaques. A cette dose, P1/AcOEt/AJse seul induit une réduction de l'amplitude et la fréquence des contractions de 16,07 % et 6,52 % respectivement.

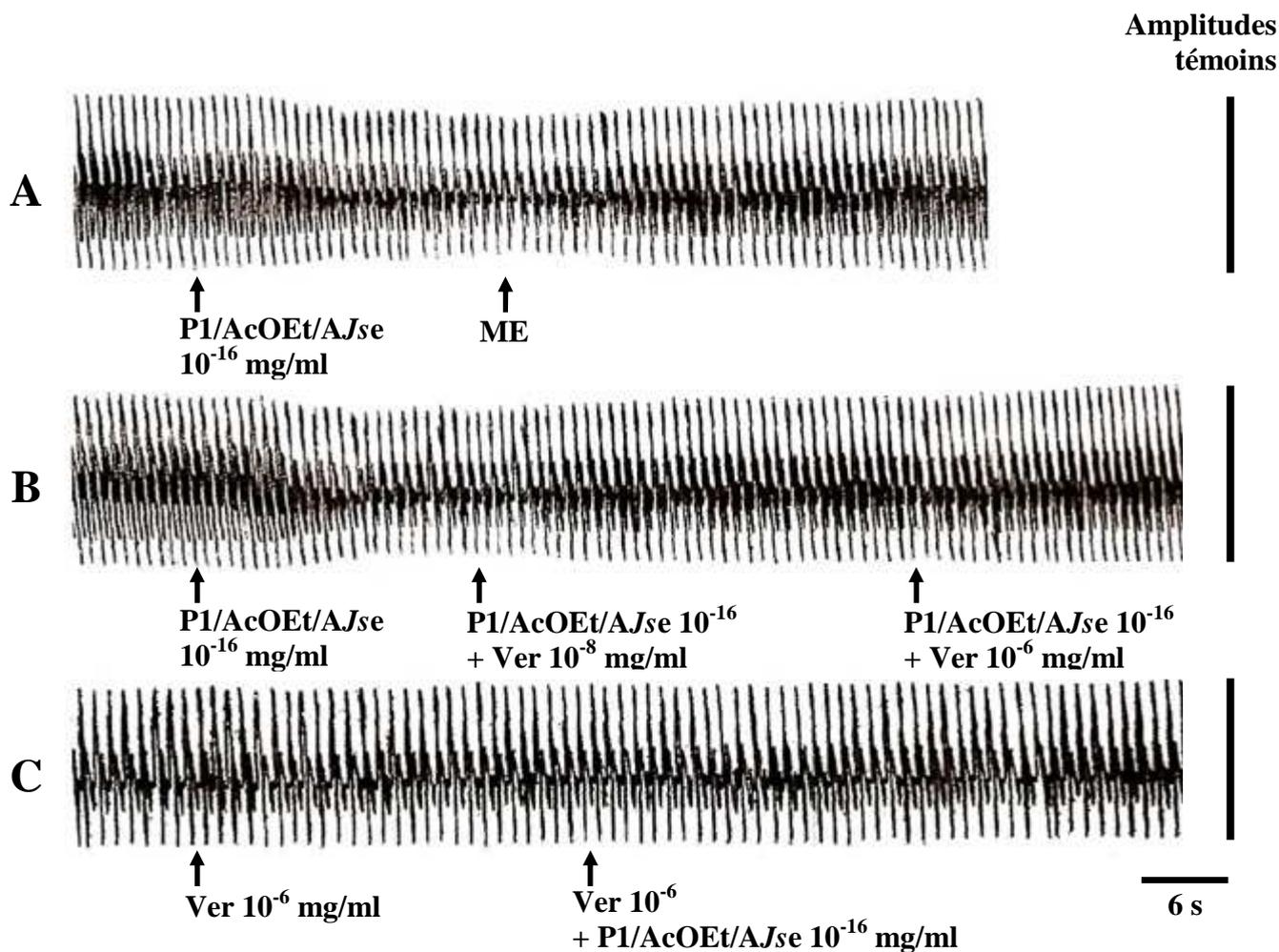
Lorsque la perfusion du cœur est reprise avec la même dose de P1/AcOEt/AJse, il apparaît des effets inotrope et chronotrope négatifs de 16,86 % et 8,70 % (**figure 107-B**). A la suite de cet effet de la substance, le vérapamil, en solution physiologique contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml est administré à la dose de  $10^{-8}$  mg/ml, puis à  $10^{-6}$  mg/ml. Avec la dose de vérapamil de  $10^{-8}$  mg/ml, les effets inotrope et chronotrope négatifs deviennent respectivement 3,57 % et 6,52 % ; soient des réductions respectives des effets inhibiteurs de P1/AcOEt/AJse sur les contractions cardiaques de 17,33 % et 25,07 %. Lorsque la dose de vérapamil passe à  $10^{-6}$  mg/ml, ces effets inotrope et chronotrope négatifs induits par P1/AcOEt/AJse sont annulés et les paramètres cardiaques reviennent à la normale.

Dans une autre expérience, la perfusion du vérapamil précède celle de P1/AcOEt/AJse (**figure 107-C**). Il apparaît que le vérapamil seul, à  $10^{-6}$  mg/ml, n'a pas d'effet propre sur les contractions cardiaques. L'administration de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml, en solution physiologique contenant le vérapamil à  $10^{-6}$  mg/ml, n'entraîne pas non plus de modification de l'activité cardiaque.

Ainsi, l'effet cardioinhibiteur induit par P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml est inhibé en présence du vérapamil à  $10^{-6}$  mg/ml.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2. Effets de P1/AcOEt/AJse sur les contractions du cœur isolé de rat en solutions physiologiques de compositions ioniques modifiées**

Le but de cette étude est d'apprécier le rôle spécifique des ions dans l'action de P1/AcOEt/AJse, vu que, dans les conditions normales, l'activité cardiaque est régulée par un certain nombre de flux ioniques et aussi par l'environnement ionique extracellulaire. Ainsi, cette étude des effets de P1/AcOEt/AJse dans des milieux physiologiques de compositions ioniques modifiées est réalisée en apportant en excès ou en réduisant les taux des principaux cations qui interviennent dans l'activité cardiaque.



**Figure 107 : interaction P1/AcOEt/AJse-vérapamil sur les contractions  
du cœur isolé de rat**

- A** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et retour au Mac Ewen de référence (ME) (après la 2<sup>ème</sup> flèche)
- B** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et effets du vérapamil (Ver) à  $10^{-8}$  mg/ml (après la 2<sup>ème</sup> flèche) et à  $10^{-6}$  mg/ml (après la 3<sup>ème</sup> flèche) en solution contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml
- C** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets du vérapamil (Ver) à  $10^{-8}$  mg/ml et de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml en solution physiologique contenant du vérapamil à  $10^{-6}$  mg/ml (après la 2<sup>ème</sup> flèche)

Dans cette étude, P1/AcOEt/AJse est utilisée à une dose de  $10^{-16}$  mg/ml dans des solutions physiologiques dont la composition en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  a été modifiée. A cette dose, l'action de P1/AcOEt/AJse seul sur les contractions cardiaques se traduit par des effets inotrope et chronotrope négatifs de  $14,53 \pm 3,33$  % et  $10,64 \pm 4,32$  % ( $n = 3$ ) respectivement (cf. **figure 106**, page 287).

#### **IV<sub>2</sub> – 11 – 2 – 2 – 2 – 1. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypocalcique sur les contractions cardiaques**

La solution hypocalcique (75 %  $\text{CaCl}_2$ ) induit, sur les contractions du cœur isolé de rat, des effets inotrope et chronotrope négatifs de  $23,97 \pm 4,22$  % et  $18,83 \pm 2,62$  % ( $n = 3$ ) respectivement.

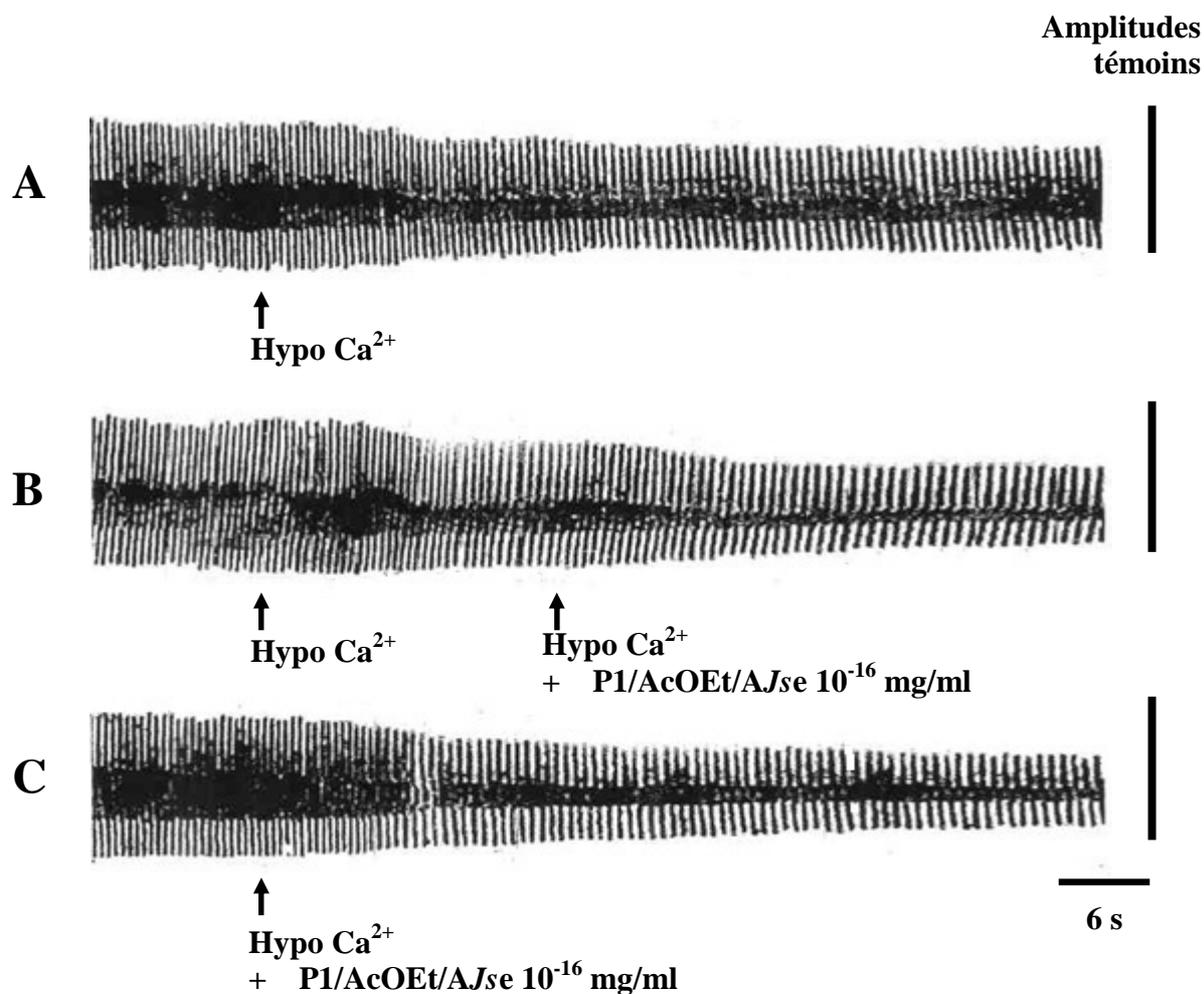
La **figure 108** présente, pour une série d'expériences, des enregistrements types des effets du milieu hypocalcique (75 %  $\text{CaCl}_2$ ) seul, puis en présence de P1/AcOEt/AJse. Il apparaît que la solution hypocalcique (75 %  $\text{CaCl}_2$ ) entraîne une diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions cardiaques de 27,78 % et 19,5 % (**figure 108-A**). Cette expérience est reprise en B et, lorsqu'il apparaît des effets inotrope et chronotrope négatifs constants de 20 % et 18,39 %, la solution physiologique hypocalcique est remplacée par une autre solution hypocalcique (75 %  $\text{CaCl}_2$ ) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml. Dans ce cas, les effets inotrope et chronotrope négatifs s'accroissent et les diminutions d'amplitude et de fréquence des contractions cardiaques sont respectivement de 50 % et 36,36 % (**figure 108-B**).

La **figure 108-C** montre les effets de la solution hypocalcique (75 %  $\text{CaCl}_2$ ) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml, perfusée directement. Ce milieu entraîne des diminutions d'amplitude et de fréquence des contractions cardiaques de 50 % et 39,93 %.

Les effets inotrope et chronotrope négatifs du milieu hypocalcique sont donc accentués en présence de P1/AcOEt/AJse.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 2. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypercalcique sur les contractions cardiaques**

Suite à la perfusion du cœur avec une solution hypercalcique (125 %  $\text{CaCl}_2$ ), l'amplitude et la fréquence des contractions augmentent de  $18,48 \pm 4,09$  % et  $33,71 \pm 3,18$  % ( $n = 3$ ).



**Figure 108 : effets d'une solution physiologique hypocalcique (75 % CaCl<sub>2</sub>) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypocalcique (75 % CaCl<sub>2</sub>) sur les contractions du cœur isolé de rat**

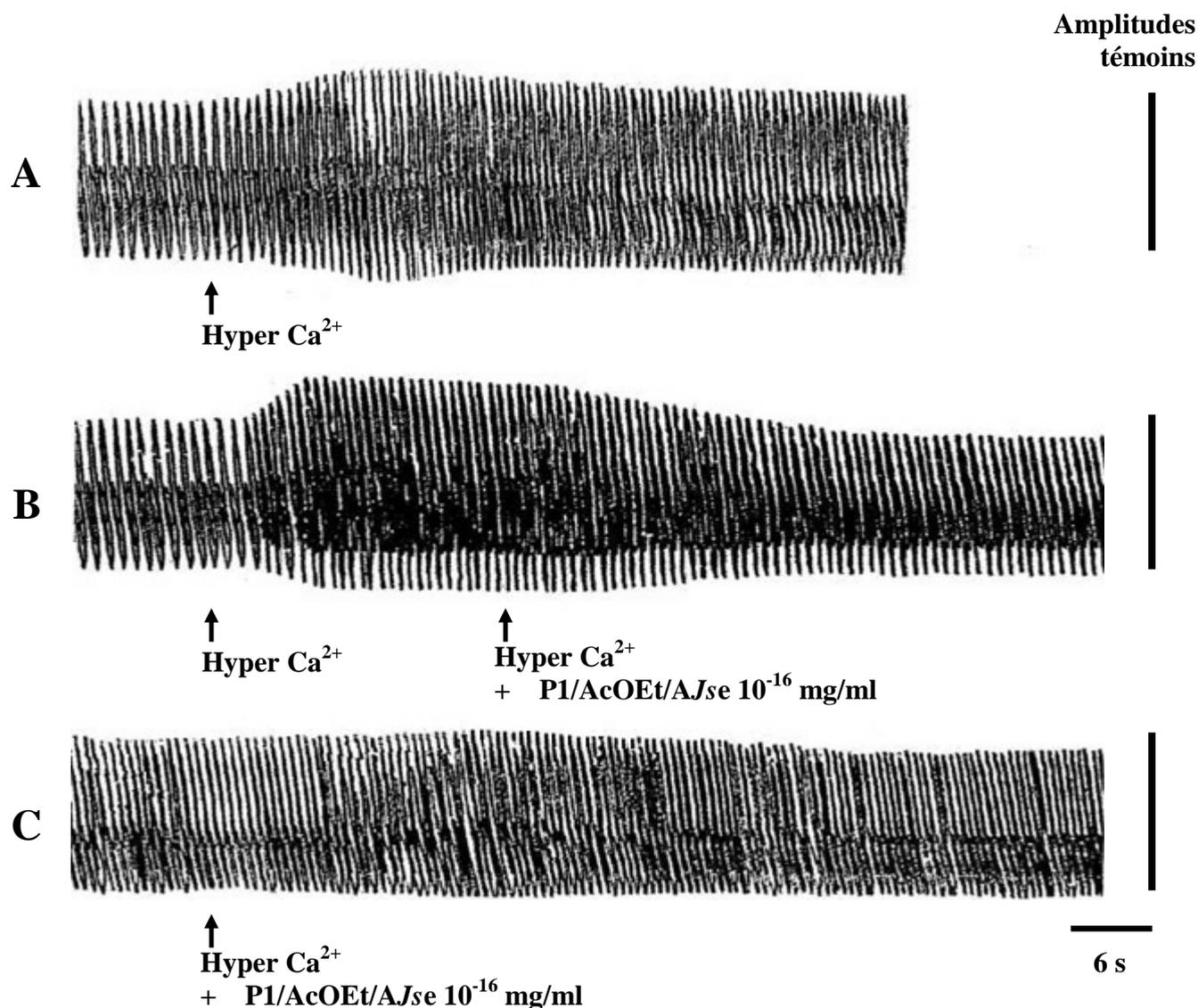
- A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de la solution hypocalcique (hypo Ca<sup>2+</sup>)
- B** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de la solution hypocalcique (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hypocalcique (après la 2<sup>ème</sup> flèche)
- C** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hypocalcique

Dans une série d'expériences (**figure 109**), la solution hypercalciqique (125 %) induit, au début de sa perfusion, des effets inotrope et chronotrope positifs de 37,23 % et 35,63 %. Par la suite, ces effets cardiotoniques sont réduits et les contractions cardiaques se stabilisent avec des augmentations d'amplitude et de fréquence de 17,39 % et 34,68 %. Cette expérience reprise fait apparaître des effets inotrope et chronotrope positifs constants de 37,78 % et 35,63 % respectivement (**figure 109-B**). La perfusion, à la suite, d'une solution hypercalciqique (125 %  $\text{CaCl}_2$ ) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml entraîne un effet inotrope négatif se traduisant par une diminution de l'amplitude des contractions de 6,67 % par rapport à l'enregistrement témoins. Dans ce même temps, il y a réduction de l'effet chronotrope positif, qui passe de 34,68 % à 21,74 % d'augmentation de la fréquence cardiaque. Dans la 3<sup>ème</sup> expérience (**figure 109-C**), le cœur est directement perfusé avec une solution hypercalciqique (125 %  $\text{CaCl}_2$ ) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml. Il apparaît, dans ce cas, d'abord de faibles augmentations de la fréquence et de l'amplitude des contractions cardiaques respectivement de 8,70 % et 1,49 % ; par la suite, la fréquence cardiaque passe à 13,43 % d'augmentation tandis que l'amplitude des contractions baisse, faisant apparaître un effet inotrope négatif de 4,35 %.

De cette série d'expériences, il ressort qu'en présence de P1/AcOEt/AJse, l'augmentation de l'activité cardiaque induite par la solution hypercalciqique est atténuée, et même, la force des contractions cardiaques diminue par rapport au témoin.

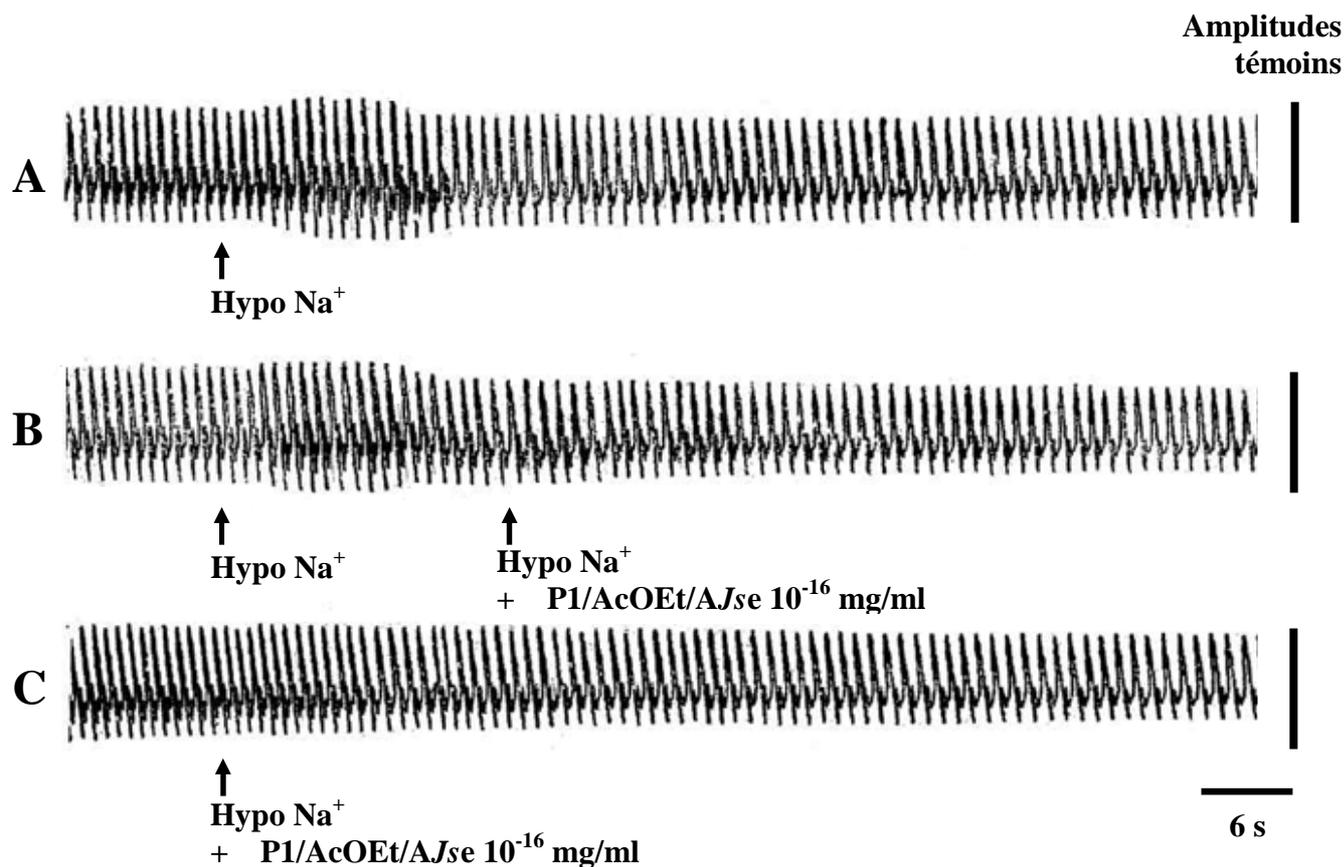
#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 3. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hyposodique sur les contractions cardiaques**

Une solution hyposodique (90 % NaCl) perfusée induit, transitoirement, une augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques de  $19,75 \pm 3,43$  % et une réduction de la fréquence de  $6,19 \pm 2,23$  % ( $n = 3$ ). Par la suite, l'amplitude et la fréquence des contractions baissent donnant des effets inotrope et chronotrope négatifs de  $10,64 \pm 2,39$  % et  $12,36 \pm 4,25$  %. En effet, la **figure 110** qui présente en A les effets d'une solution hyposodique (90 % NaCl) montre qu'une telle solution entraîne, 10 s après le début de la perfusion, un effet inotrope positif de 21,88 % et un effet chronotrope négatif de 4,17 %. Par la suite, l'amplitude des contractions diminue tandis que la diminution de la fréquence s'accroît pour se stabiliser tous les deux avec des valeurs de réduction de 12,5 % et 14,58 % respectivement par rapport à l'enregistrement témoin. En B, l'effet de la solution hyposodique (90 % NaCl) seule qui se traduit par des effets inotrope positif et chronotrope négatif de 12,5 % et 16,67 % précède celui de ce même milieu,



**Figure 109 : effets d'une solution physiologique hypercalcique (125 %  $\text{CaCl}_2$ ) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypercalcique (125 %  $\text{CaCl}_2$ ) sur les contractions du cœur isolé de rat**

- A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de la solution hypercalcique ( $\text{hyper Ca}^{2+}$ )
- B** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de la solution hypercalcique (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml en solution hypercalcique (après la 2<sup>ème</sup> flèche)
- C** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml en solution hypercalcique



**Figure 110 : effets d'une solution physiologique hyposodique (90 % NaCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hyposodique (90 % NaCl) sur les contractions du cœur isolé de rat**

- A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de la solution hyposodique (hypo Na<sup>+</sup>)
- B** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de la solution hyposodique (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hyposodique (après la 2<sup>ème</sup> flèche)
- C** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hyposodique

mais contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml. Ce deuxième milieu fait chuter l'amplitude des contractions de 22,58 % et la fréquence baisse de 16,63 % (**figure 110-B**). Lorsque le cœur est perfusé avec la solution hyposodique (90 % NaCl) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml, il apparaît uniquement une diminution de l'amplitude des contractions de 25 % et une baisse de la fréquence cardiaque de 23,08 % (**figure 110-C**).

Il apparaît donc que P1/AcOEt/AJse annule l'effet inotrope positif transitoire observé en présence d'une solution hyposodique, et accentue les effets inotrope et chronotropes négatifs induits par une telle solution.

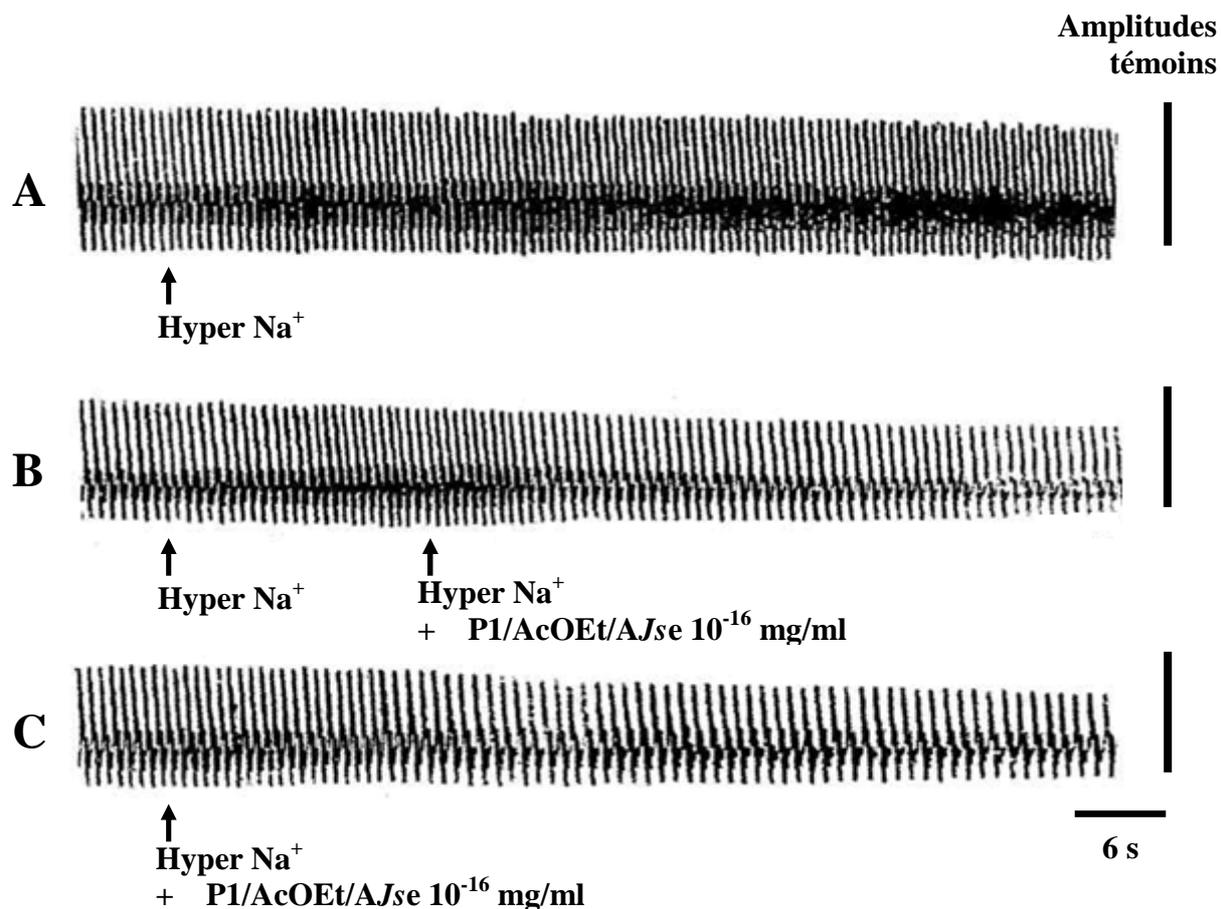
#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 4. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypersodique sur les contractions cardiaques**

La perfusion du cœur avec une solution de Mac Ewen hypersodique (125 % KCl) induit une diminution de l'amplitude des contractions de  $5,23 \pm 3,03$  % et une augmentation de la fréquence cardiaque de  $12,03 \pm 2,97$  % ( $n = 3$ ). En effet, un tel milieu, dans l'expérience de la **figure 111-A**, entraîne des effets inotrope négatif de 7,89 % et chronotrope positif de 10,77 %. Dans l'expérience qui suit (**figure 111-B**), la solution hypersodique (125 % KCl) fait apparaître des effets inotrope négatif et chronotrope positif de 3,23 % et 13,33 %. La perfusion, à la suite, d'une solution hypersodique (125 % KCl) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml entraîne uniquement une diminution de ces deux paramètres de 25,81 % et 3,33 % respectivement. En présence d'une solution hypersodique (125 % KCl) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml, l'amplitude et la fréquence des contractions cardiaques diminuent et atteignent des valeurs de réductions respectives de 31,25 % et 23,33 % par rapport à l'enregistrement témoin (**figure 111-C**).

La substance P1/AcOEt/AJse annule ainsi l'effet chronotrope positif causé par la solution hypersodique, faisant apparaître un effet contraire, c'est-à-dire chronotrope négatif, et accentue l'effet inotrope négatif induit par cette solution.

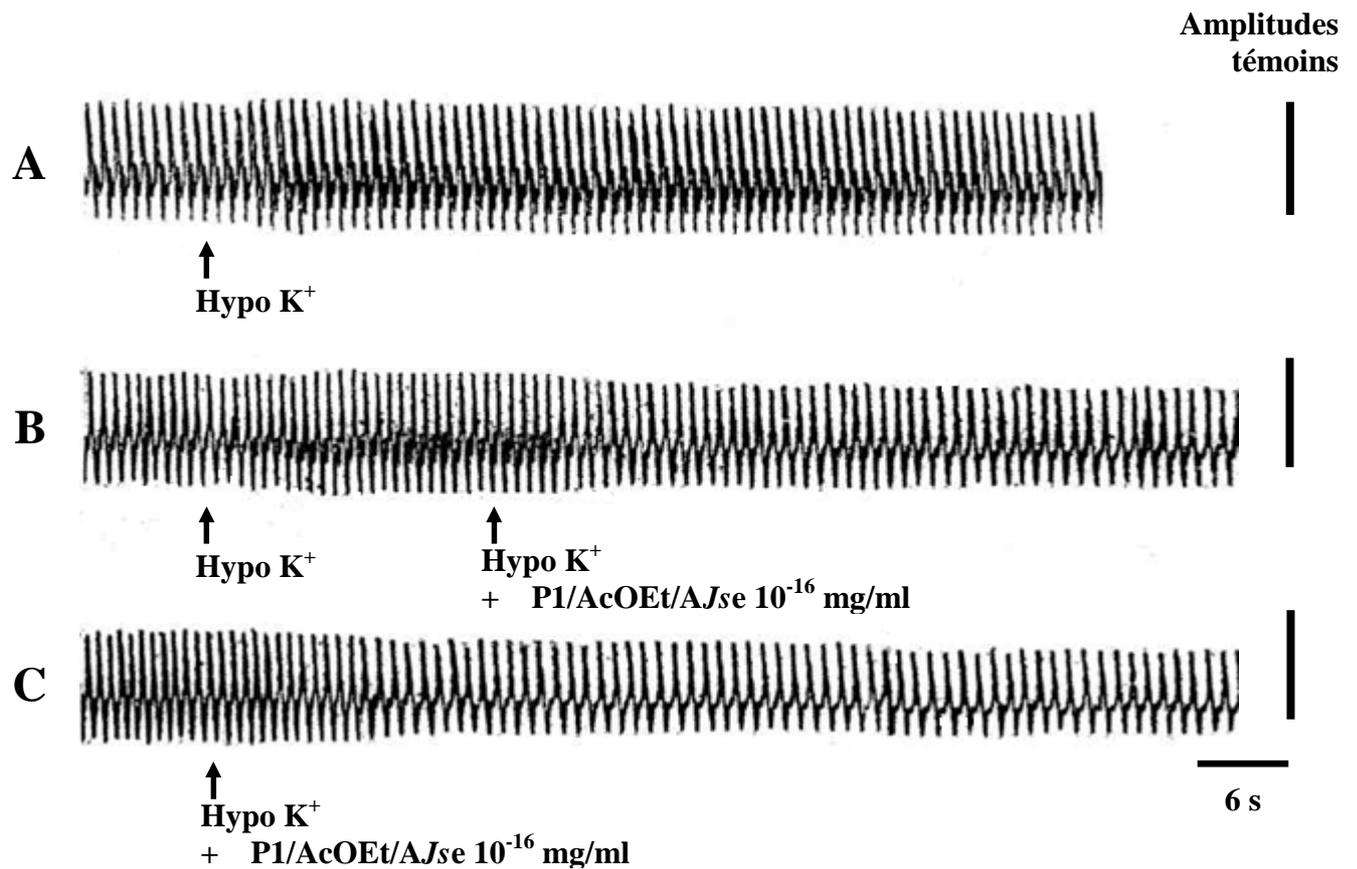
#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 2 – 5. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hypopotassique sur les contractions cardiaques**

Dans cette série d'expériences, le cœur est dans un premier temps perfusé avec une solution physiologique hypopotassique (75 % KCl). Une telle solution n'a pas d'effet notable sur la fréquence cardiaque, mais il apparaît essentiellement une augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques de  $12,76 \pm 4,37$  % ( $n = 3$ ). Dans la série d'expériences présentée par la **figure 112-A**, le résultat de la perfusion du cœur avec la solution hypopotassique (75 % KCl) est une augmentation de l'amplitude des contractions de 8,82 %,



**Figure 111 : effets d'une solution physiologique hypersodique (125 % NaCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypersodique (125 % NaCl) sur les contractions du cœur isolé de rat**

- A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de la solution hypersodique (hyper Na<sup>+</sup>)
- B** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de la solution hypersodique (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hypersodique (après la 2<sup>ème</sup> flèche)
- C** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hypersodique



**Figure 112 : effets d'une solution physiologique hypotassique (75 % KCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hypotassique (75 % KCl) sur les contractions du cœur isolé de rat**

- A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de la solution hypotassique (hypo K<sup>+</sup>)
- B** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de la solution hypotassique (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hypotassique (après la 2<sup>ème</sup> flèche)
- C** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hypotassique

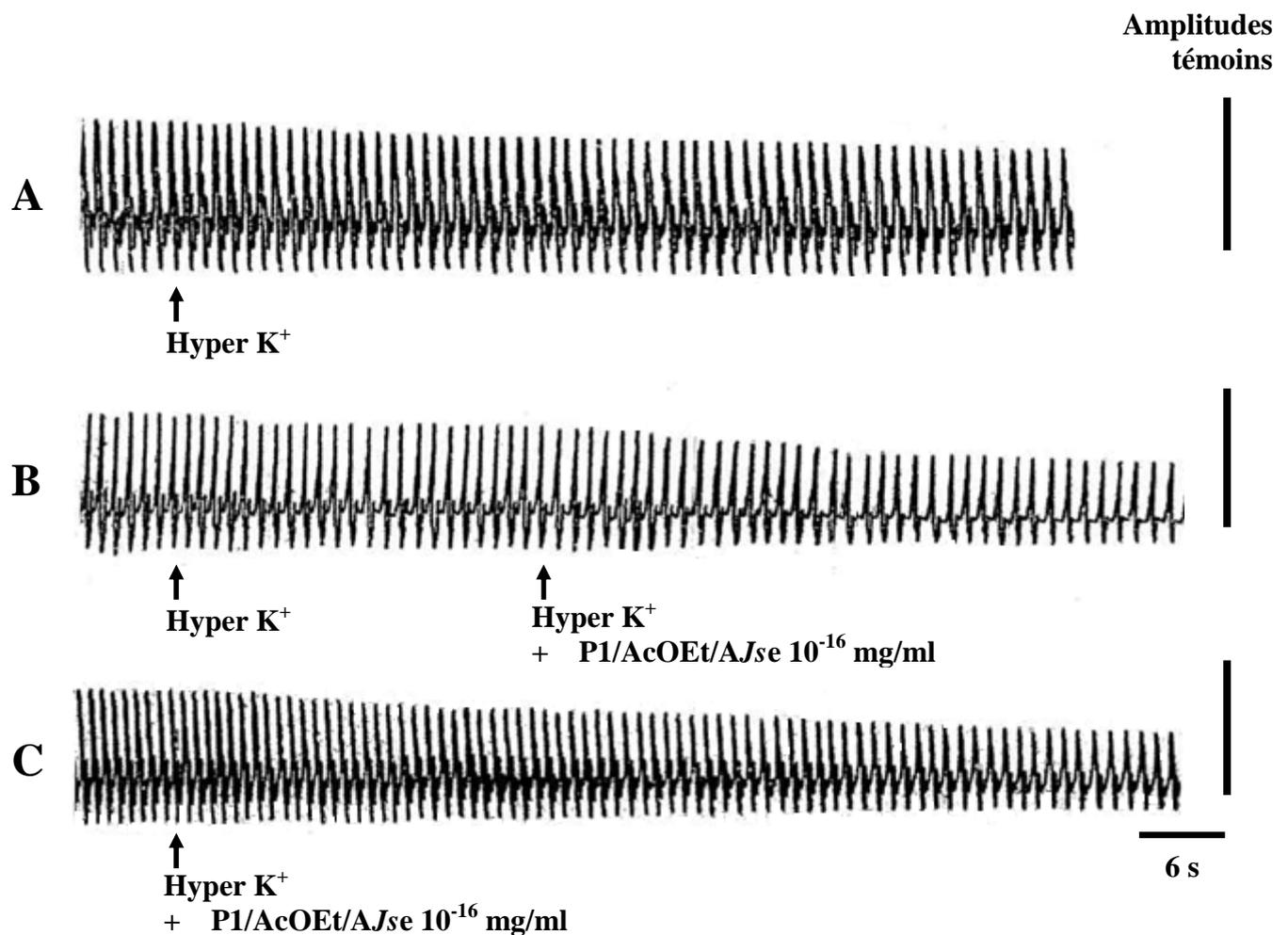
alors que la fréquence cardiaque ne varie pas. La perfusion de cette solution, reprise dans l'expérience qui suit (**figure 112-B**), entraîne un effet inotrope positif de 13,33 %, avec une fréquence constante de 40 battements/min. A la suite de cet effet, une solution hypopotassique (75 % KCl) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml fait apparaître uniquement une réduction de l'amplitude et de la fréquence des contractions cardiaques de 13,33 % et 18,52 %. Il en est de même lorsque, dans l'expérience de la **figure 112-C**, le cœur reçoit directement la solution hypopotassique (75 % KCl) contenant P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml. Dans ce cas, les effets inotrope et chronotrope négatifs observés sont plus importants. Ils sont de 26,67 % et 27,59 % respectivement.

Il est donc à retenir que l'effet inotrope positif induit par la solution hypopotassique est annulé par P1/AcOEt/AJse qui, en plus, entraîne un effet inotrope négatif et accentue l'effet chronotrope négatif.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 2 – 6. Effets de P1/AcOEt/AJse en solution hyperpotassique sur les contractions cardiaques**

La **figure 113-A** montre qu'une solution hyperpotassique (125 % KCl) induit une cardiodépression qui se traduit par une diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions de 19,05 % et 8,06 %. La solution hyperpotassique (125 % KCl) entraîne normalement des effets inotrope et chronotrope négatifs de  $15,19 \pm 4,03$  % et  $9,71 \pm 2,65$  % (n = 3). Les effets inotrope et chronotrope négatifs respectifs de 12,26 % et 11,76 % (**figure 113-B**) qui sont obtenus suite à la perfusion du cœur avec une solution hyperpotassique (125 % KCl) sont renforcés lorsque cette solution contient P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml. En effet, dans ce cas, les diminutions d'amplitude et de fréquence atteignent respectivement 41,03 % et 15,91 %. La **figure 113-C** montre que lorsque le cœur reçoit directement P1/AcOEt/AJse à  $10^{-16}$  mg/ml en solution hyperpotassique, des effets inotrope et chronotrope négatifs de 42,11 % et 22,22 % sont observés.

P1/AcOEt/AJse accentue donc la cardioinhibition induite par la solution hyperpotassique.



**Figure 113 : effets d'une solution physiologique hyperpotassique (125 % KCl) et de P1/AcOEt/AJse en solution physiologique hyperpotassique (125 % KCl) sur les contractions du cœur isolé de rat**

- A** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de la solution hyperpotassique (hyper K<sup>+</sup>)
- B** - Enregistrement témoin (avant la 1<sup>ère</sup> flèche), effets de la solution hyperpotassique (après la 1<sup>ère</sup> flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hyperpotassique (après la 2<sup>ème</sup> flèche)
- C** - Enregistrement témoin (avant la flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à 10<sup>-16</sup> mg/ml en solution hyperpotassique

### IV<sub>2</sub> – 4 – 2 – 3. Discussion

L'étude des variations de potentiels qui accompagnent l'activité cardiaque sous l'imprégnation de P1/AcOEt/AJse a été réalisée par l'enregistrement de l'électrocardiogramme de lapin.

Des modifications des différents paramètres de l'ECG ont été enregistrées. En effet, la substance P1/AcOEt/AJse agit sur l'activité électrique globale du cœur en entraînant une diminution de la fréquence cardiaque et une diminution de l'amplitude des ondes P et T et de celle du complexe QRS.

Ces effets cardioinhibiteurs induits par P1/AcOEt/AJse sur l'ECG apparaissent à des doses plus faibles que celles de l'extrait brut (AJse). En effet, à la dose de  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/kg P.C., P1/AcOEt/AJse agit sur l'ECG en occasionnant une diminution de l'amplitude du complexe QRS et les effets inhibiteurs de cette substance sur la fréquence cardiaque et sur l'amplitude de l'onde T et de celle du complexe QRS sont apparents à partir de la dose de  $10^{-1}$  mg/kg P.C. Par contre, l'extrait brut n'est actif sur l'ECG qu'à partir d'une dose de 5 mg/kg P.C. entraînant une augmentation de l'amplitude du complexe QRS et une diminution de la fréquence des battements cardiaques. Les effets de cet extrait sur les ondes T et P, qui se traduisent par la diminution de leurs amplitudes n'est perceptible qu'à partir de la dose de 10 mg/kg P.C. pour l'onde T et 20 mg/kg P.C. pour l'onde P. Ainsi, P1/AcOEt/AJse est 100 fois plus active sur l'activité électrique globale du cœur que l'extrait brut initial.

Cette substance n'a pas d'effets notables sur les intervalles séparant les ondes de l'ECG. P1/AcOEt/AJse n'a donc pas d'effets sur le temps nécessaire à la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules (intervalle PR), sur le temps de systole ventriculaire (intervalle QT), et sur le temps de stimulation complète des ventricules (segment ST). Le fait que P1/AcOEt/AJse n'agisse pas sur la conduction de l'influx au niveau cardiaque laisse suggérer que la bradycardie induite par cette substance serait d'origine sinusale, car l'électrocardiogramme montre un tracé d'aspect normal avec un rythme ralenti (Pipberger *et al.*, 1990 ; Keating et Sanguinet, 2001).

L'observation d'une diminution significative du rythme cardiaque peut être attribuée à une action inhibitrice directe de P1/AcOEt/AJse au niveau de l'excitabilité des structures cellulaires à l'origine de l'automatisme cardiaque (nœud de Keith et Flack) et responsables de la commande excito-motrice et de la conductibilité du myocarde. En effet, Di Matteo et Vacheron (1987) ont montré que le mécanisme électrophysiologique intime de l'action chronotrope négatif est la dépression de l'automatisme sinusale par ralentissement de la pente de dépolarisation lente.

La réduction de l'amplitude des ondes P et T et du complexe QRS de l'ECG par P1/AcOEt/AJse indique que l'action de cette substance est consécutive à une diminution de la dépolarisation (et la contraction) des oreillettes, une diminution de la repolarisation (et la relaxation) des ventricules et une diminution de la dépolarisation (et la contraction) des ventricules (Durrer, 1968 ; Fisch, 1980 ; Brutsaert et Sys, 1989 ; Pipberger *et al.* 1990 ; Cain *et al.*, 1996 ; Bers, 2002 ; Yan *et al.*, 2003 ; Hlaing *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2009 ; Xue *et al.*, 2010). Ces réductions de dépolarisations et repolarisation induites par P1/AcOEt/AJse seraient à l'origine de l'inhibition de l'activité cardiaque.

La cardioinhibition induite par P1/AcOEt/AJse est également observées sur l'activité mécanique du cœur isolé. En effet, sur les contractions cardiaques, P1/AcOEt/AJse induit des effets inotrope et chronotrope négatifs. Ceci prouve une action directe de P1/AcOEt/AJse sur le myocarde. Ainsi, l'inhibition de l'activité électrique induite par P1/AcOEt/AJse et mise en évidence par les réductions de la fréquence cardiaque ainsi que l'amplitude des ondes P, T et du complexe QRS, aurait pour conséquence les effets inotropes et chronotropes négatifs induits par cette substance sur l'activité mécanique du cœur isolé. Waller (1887) indique que l'activité électrique du cœur, due à une dépolarisation de la membrane des cellules cardiaques, est à l'origine de la contraction cardiaque. La diminution de cette activité électrique engendre une diminution de l'activité mécanique du cœur. L'allure sigmoïde des courbes de l'évolution de l'amplitude et de la fréquence des contractions cardiaques en fonction du logarithme de la concentration de P1/AcOEt/AJse permet d'émettre l'idée, selon Miller et Tainter (1944), qu'il s'agit bien d'une substance à effet pharmacologique dont l'action, au niveau cardiaque, passe par l'activation de récepteurs.

Les effets cardioinhibiteurs de cette substance purifiée (P1/AcOEt/AJse) sont plus marqués que ceux de l'extrait brut (AJse). En effet, P1/AcOEt/AJse agit sur le cœur, entraînant une cardioinhibition à partir de la dose  $10^{-20}$  mg/ml, alors que AJse induit un effet chronotrope négatif seulement à partir de la dose de  $10^{-18}$  mg/ml. P1/AcOEt/AJse est donc 100 fois plus actif que l'extrait brut sur les contractions cardiaques.

P1/AcOEt/AJse, à des doses supérieures ou égales à  $10^{-18}$  mg/ml, entraîne une augmentation dose-dépendante du débit coronaire du cœur isolé. A cette dose, l'extrait brut reste sans effet sur le débit coronaire. Cet extrait n'est actif qu'à partir de la dose de  $10^{-16}$  mg/ml, entraînant une diminution du débit coronaire. Ainsi, P1/AcOEt/AJse, tout comme sur les contractions cardiaques, est 100 fois plus actif que l'extrait brut sur le débit coronaire cardiaque.

L'allure sigmoïde de la courbe de la diminution de débit coronaire en fonction du logarithme de la concentration de P1/AcOEt/AJse atteste que l'action de cette substance sur les artères coronaires passerait par des récepteurs. Cette diminution du débit coronaire cardiaque serait relative à une dilatation des vaisseaux coronaires, et donc un écoulement plus aisé du liquide nourricier dans ces vaisseaux (L'Abbate *et al.*, 2002 ; Wei et Kaul, 2004 ; Segal, 2005). La substance P1/AcOEt/AJse serait donc vasodilatatrice, en plus d'être cardioinhibitrice.

Les effets de P1/AcOEt/AJse sur les contractions cardiaques seraient dus à l'action de cette substance sur les canaux ioniques. En effet, le vérapamil, un anticalcique à effets sinusal et coronaire prédominants (Motte *et al.*, 1996 ; Legalerey, 2001), inhibe la cardioinhibition induite par P1/AcOEt/AJse. L'action du vérapamil passe par le blocage des canaux calciques. En inhibant l'entrée du calcium, le vérapamil provoque, au niveau des cellules musculaires cardiaques, un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire et une diminution de la force contractile (Godfraind *et al.*, 1986 ; Cosma, 1989 ; Schwinger *et al.*, 1990 ; Cohen, 1997). Il induit également une diminution de la fréquence de décharges, entraînant un effet chronotrope négatif ou bradycardisant (Kawai *et al.*, 1981 ; Caron *et al.*, 1993 ; Laurent *et al.*, 1994). Le fait que le vérapamil inhibe les effets de P1/AcOEt/AJse laisse suggérer que cette dernière substance agirait sur les canaux calciques en les bloquant.

P1/AcOEt/AJse serait donc un anticalcique à effet cardiaque. Ainsi P1/AcOEt/AJse, tout comme les autres anticalciques à prédominance cardiaque, aurait la propriété de bloquer de façon sélective l'entrée du calcium au travers des canaux calciques lents ou voltage-dépendants situés dans la membrane plasmique des cellules du myocarde. Cette diminution de l'influx calcique causée par P1/AcOEt/AJse dans les cellules musculaires cardiaques aurait pour conséquence une cardioinhibition.

Dans les conditions normales, l'activité cardiaque est régulée par un certain nombre de flux ioniques (Abe et Goto, 1964 ; Langer, 1965 ; Leoty, 1971), dont les plus importants sont  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , et aussi par l'environnement ionique extracellulaire (Niedergerke et Lüttgau, 1957 ; Lüttgau et Niedergerke, 1958 ; Aka, 1980). Les modifications des concentrations extracellulaires de ces ions, qui entraînent des modifications de leur transit transmembranaire, ont permis de mettre en évidence l'influence de P1/AcOEt/AJse sur les flux ioniques qui sous-tendent l'activité mécanique des structures contractiles.

Il apparaît que l'inhibition par P1/AcOEt/AJse de la libération du calcium serait à l'origine des effets cardioinhibiteurs plus prononcés de cette substance en solutions physiologiques hypocalcique, hyposodique, hypersodique et hyperpotassique.

En effet, la cardioinhibition engendrée par la diminution du taux de calcium dans un milieu hypocalcique est renforcée par P1/AcOEt/AJse qui inhiberait en plus la libération du calcium intracellulaire ; le milieu hypocalcique réduisant l'influx calcique et donc la force contractile du myocarde (Coraboeuf et Garnier, 1961 ; Fleckenstein, 1977 ; Kyosuke *et al.*, 1991). Godfraind *et al.*, (1986) ont rapporté que les inhibiteurs de l'influx calcique peuvent diminuer le courant calcique entrant dans les cellules et exercer un effet inotrope négatif sur l'activité cardiaque. Ces auteurs ont en outre montré que les effets des substances qui inhibent l'influx calcique cardiaque et vasculaire étaient comparables à ceux observés lors d'une diminution du  $Ca^{2+}$  dans les milieux de survie des préparations.

En milieu hyposodique, une augmentation transitoire de l'amplitude des contractions cardiaques apparaît initialement, ensuite il y a diminution de l'amplitude et de la fréquence de ces contractions. Cette décroissance ultérieure de l'amplitude des contractions serait liée au déséquilibre ionique engendré par la baisse de la concentration de  $Na^+$  extracellulaire (Bronner et Freslon, 1992). Le sodium favorisant la dépolarisation membranaire, la présence d'un faible taux de  $Na^+$  entraîne la diminution de l'excitabilité du myocarde et ainsi la baisse de l'activité cardiaque. Ces effets inotrope et chronotrope négatifs en milieu hyposodique sont plus importants en présence de P1/AcOEt/AJse. Ceci indique que cette substance agirait en réduisant l'excitabilité du myocarde.

Le milieu hypersodique diminue quelque peu l'amplitude des contractions et augmente la fréquence cardiaque. La baisse de la force contractile du myocarde observée dans un tel milieu est accentuée par l'addition de P1/AcOEt/AJse. Cet effet pourrait s'expliquer par le fait que la baisse de l'influx calcique engendrée par l'excès de sodium (Godfraind *et al.*, 1986) est renforcée par la présence de P1/AcOEt/AJse qui inhiberait également cet influx calcique. Cette substance réduirait également l'augmentation de l'excitabilité qu'engendre une augmentation modérée du taux de  $Na^+$  extracellulaire. Ainsi, en présence de P1/AcOEt/AJse, il ya diminution de la fréquence cardiaque et renforcement de la diminution de l'amplitude des contractions cardiaques.

Il a été observé que le milieu hyperpotassique diminue l'activité cardiaque. Selon Skou (1988), toute augmentation du potassium extracellulaire stimule l'activité de la pompe  $Na^+/K^+$  par accroissement de la déphosphorylation. Ceci provoque une hyperpolarisation de la membrane cellulaire pouvant désactiver les canaux calciques voltage-dépendants avec,

conséquent, une réduction de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Bronner et freslon, 1992). Ce mécanisme serait à l'origine de la baisse de l'activité cardiaque lorsque le potassium est modérément augmenté dans la solution physiologique de survie. La présence de P1/AcOEt/AJse dans la solution hyperpotassique accentue la réduction de l'activité cardiaque induite par l'excès de  $\text{K}^+$  extracellulaire. Ceci est en faveur d'un renforcement par P1/AcOEt/AJse de la réduction de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le milieu hyperpotassique.

Aussi, les effets cardioinhibiteurs des milieux hypocalcique, hyposodique, hypersodique et hyperpotassique sont renforcés par la présence de P1/AcOEt/AJse qui, en bloquant les canaux calciques, diminue la libération du calcium intracellulaire.

Une solution hypercalcique, par la mise à disposition des cellules cardiaques d'un taux élevé de  $\text{Ca}^{2+}$ , entraîne une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des battements cardiaques (Fleckenstein, 1971 ; Hess et Gabel, 1979 ; Hess *et al.*, 1984 ; Overgaard *et al.*, 2005 ; Galli *et al.*, 2006). Ces effets inotrope et chronotrope positifs observés en milieu hypercalcique sont atténués en présence de P1/AcOEt/AJse.

L'augmentation transitoire de l'amplitude des contractions en solution hyposodique résulte de l'augmentation de l'influx calcique (Niedergerke et Orkand, 1966 ; Reuter et Seitz, 1968 ; Glitsh *et al.*, 1970 ; Leblanc et Hume, 1990 ; Bronner et Freslon, 1992 ; Sham *et al.*, 1992 ; Levi *et al.*, 1994). En effet, la baisse du  $\text{Na}^+$  extracellulaire entraîne, d'une part, l'activation de la sortie de  $\text{K}^+$  par le biais du canal d'échange  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$  suite à l'inhibition du canal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ; ceci favorisant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  et donc une augmentation de la force contractile du myocarde. D'autre part, la réduction du  $\text{Na}^+$  du milieu extérieur crée un gradient favorable à une sortie de  $\text{Na}^+$  de la cellule. Ce mouvement provoque secondairement une pénétration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule par le biais de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , ce qui est également responsable de l'augmentation de l'amplitude des contractions apparaissant dans un premier temps, sur les préparations cardiaques placées dans une solution de survie appauvrie en  $\text{Na}^+$  (Bronner et freslon, 1992 ; Nuss et houser, 1992 ; Sham *et al.*, 1992). Reuter et Seitz (1968) et Glitsh *et al.*, (1970), examinant les effets des ions intra et extracellulaires sur le flux calcique dans le muscle cardiaque de Mammifère, ont également montré que la baisse de la concentration de  $\text{Na}^+$  extracellulaire accroît l'influx calcique. En présence de P1/AcOEt/AJse, l'augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques en milieu hyposodique n'apparaît pas et laisse place à des effets inotrope et chronotrope négatifs.

En milieu hypopotassique, on observe une augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques (Lepeschkin *et al.*, 1957; Funk-Brentano, 1992). Eisner et Lederer (1979-a et 1979-b) ont montré, sur la fibre ventriculaire de Mammifère, que le milieu hypopotassique bloquerait la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , induisant ainsi un appauvrissement intracellulaire en ions  $\text{K}^+$ . Il en résulterait une baisse de la conductance potassique et donc une dépolarisation de la membrane (Aka, 1980). Il est également admis que l'effet inotrope positif des solutions pauvres en  $\text{K}^+$  est dû à l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Hodgkin et Horowic, 1960 ; Glynn, 1962 ; Reuter et Seitz, 1968). Cela conduit secondairement à une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire suite à l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  par l'accroissement du  $\text{Na}^+$  intracellulaire (Lüttgau et Niedergerke, 1958; Carmeliet et Vereecke, 1969 ; Reiter *et al.*, 1971 ; Beuckelmann et Wier, 1988 ; Levi *et al.*, 1994). Il s'en suivrait alors une accumulation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  (Levi *et al.*, 1994) responsable de l'effet inotrope positif observé en milieu hypopotassique. En effet, depuis les travaux de Thomas (1961), il est admis que la réduction de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  entraîne une augmentation de la prise de calcium par le muscle cardiaque. Coraboeuf *et al.* (1961) ont rapporté que cet effet pourrait être dû à un échange direct entre les ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , par le canal d'échange  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ , en milieu hypopotassique. Dans un tel milieu hypopotassique, la réduction de la fréquence des contractions cardiaques proviendrait, selon les travaux de Coraboeuf *et al.* (1961), puis ceux de Vassale (1965), de la réduction de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$ . Ce processus accélère l'efflux potassique responsable d'une hyperpolarisation dont la conséquence est l'effet chronotrope négatif (Aka, 1980). Morad et Goldman (1973) indiquent que l'augmentation du gradient de  $\text{K}^+$  accélère l'efflux potassique et que le mouvement entrant de  $\text{Ca}^{2+}$  est couplé avec le mouvement sortant de  $\text{K}^+$  par le système d'échange  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Dans nos conditions expérimentales, la présence de P1/AcOEt/AJse fait qu'en milieu hypopotassique il n'y a plus d'augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques, laissant ainsi cours à des effets inotrope et chronotrope négatifs.

En présence de la substance P1/AcOEt/AJse, la suppression des effets inotropes positifs des milieux hyposodique et hypopotassique et l'atténuation des effets inotrope et chronotrope positifs en solution hypercalcique, laisse suggérer que cette substance inhibe l'influx calcique.

En définitive, l'action de P1/AcOEt/AJse se traduirait par la diminution de l'excitabilité du myocarde, le blocage des canaux calciques conduisant à une inhibition du

flux entrant calcique et de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et, conséquemment, une baisse des contractions cardiaques. Ainsi, P1/AcOEt/AJse serait un anticalcique avéré.

La diminution de l'influx calcique causée par P1/AcOEt/AJse dans les cellules musculaires cardiaques, et la baisse de l'activité contractile du cœur, pourraient également rendre compte de la baisse de la pression sanguine artérielle induite par cette substance.

### **IV<sub>2</sub> – 4 – 3. Mécanisme d'action de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse sur l'activité vasculaire**

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 3 – 1. Effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye**

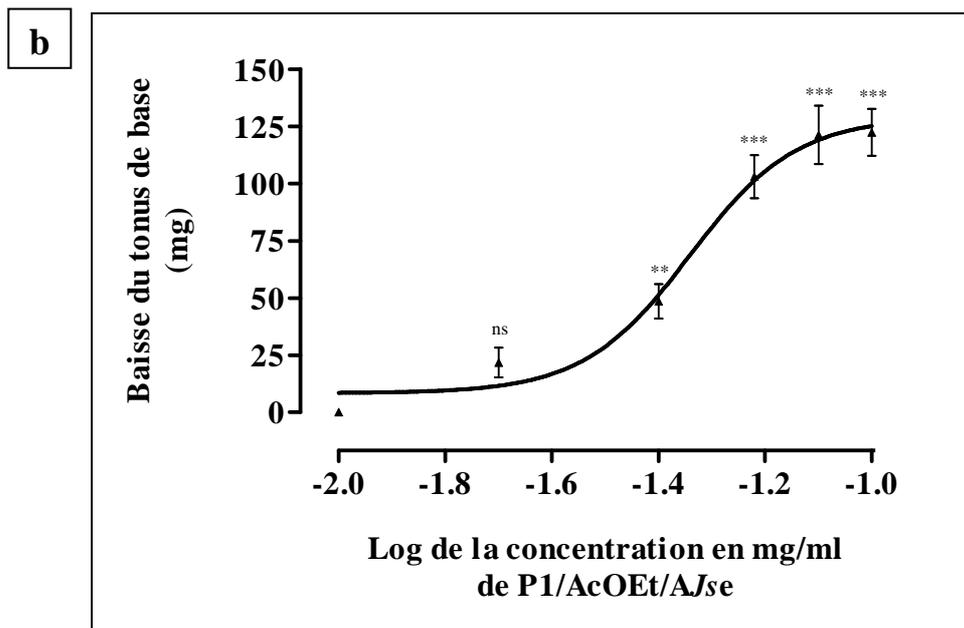
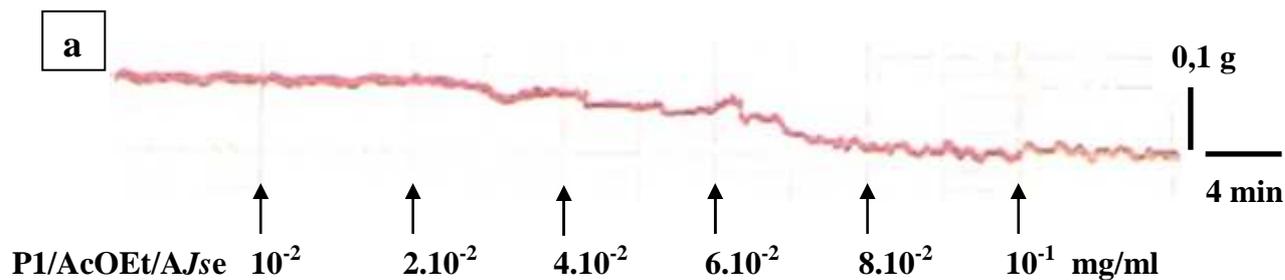
Cette série d'expériences a consisté à administrer des doses croissantes et cumulées de P1/AcOEt/AJse variant de  $10^{-2}$  mg/ml à  $10^{-1}$  mg/ml à des bandelettes d'artère aorte isolée de cobaye.

Dans nos conditions expérimentales, des doses inférieures à  $2 \cdot 10^{-2}$  mg/ml sont sans effet sur le tonus musculaire aortique. Par contre, les doses variant de  $2 \cdot 10^{-2}$  à  $8 \cdot 10^{-2}$  mg/ml induisent une diminution dose-dépendante du tonus musculaire de l'artère aorte isolée, allant de  $21,8 \pm 6,5 \cdot 10^{-3}$  g à  $121,2 \pm 12,7 \cdot 10^{-3}$  g. Les doses de P1/AcOEt/AJse supérieures à  $8 \cdot 10^{-2}$  mg/ml, administrées postérieurement, ne modifient plus le tonus musculaire aortique.

La **figure 114-a** est un enregistrement type des effets de P1/AcOEt/AJse, à des doses variant de  $10^{-2}$  mg/ml à  $10^{-1}$  mg/ml, sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye. La courbe de la **figure 114-b** donne les effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur le tonus musculaire aortique de cobaye, pour 3 expériences types. La valeur de la concentration efficace 50 % de P1/AcOEt/AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte est de  $4,56 \cdot 10^{-2}$  mg/ml.

#### **IV<sub>2</sub> – 4 – 3 – 2. Antagonisme P1/AcOEt/AJse – nifédipine sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye**

En vue d'apprécier l'action de la nifédipine sur les effets vasorelaxants de P1/AcOEt/AJse, cet anticalcique est testé sur l'artère aorte isolé de cobaye en présence ou avant l'administration de la substance purifiée. Dans une première série d'expériences, P1/AcOEt/AJse est d'abord administrée à la dose de  $6 \cdot 10^{-2}$  mg/ml, ensuite des doses croissantes de nifédipine sont ajoutées à la solution de survie contenant l'organe. Cette dose de P1/AcOEt/AJse entraîne une baisse de tonus aortique de  $60,9 \cdot 10^{-3} \pm 8,2 \cdot 10^{-3}$  g (effet significatif,  $P < 0,001$ ).



**Figure 114 : effets dose-réponse de P1/AcOEt/AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye**

**a – Enregistrement type**

Enregistrement témoin (avant la première flèche) et effets cumulés de P1/AcOEt/AJse successivement à  $10^{-2}$ ,  $2.10^{-2}$ ,  $4.10^{-2}$ ,  $6.10^{-2}$ ,  $8.10^{-2}$  et  $10^{-1}$  mg/ml sur les contractions toniques aortiques.

**b – Diminution du tonus musculaire aortique en fonction de la concentration de P1/AcOEt/AJse**

**n = 3 ; ns P > 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001.**

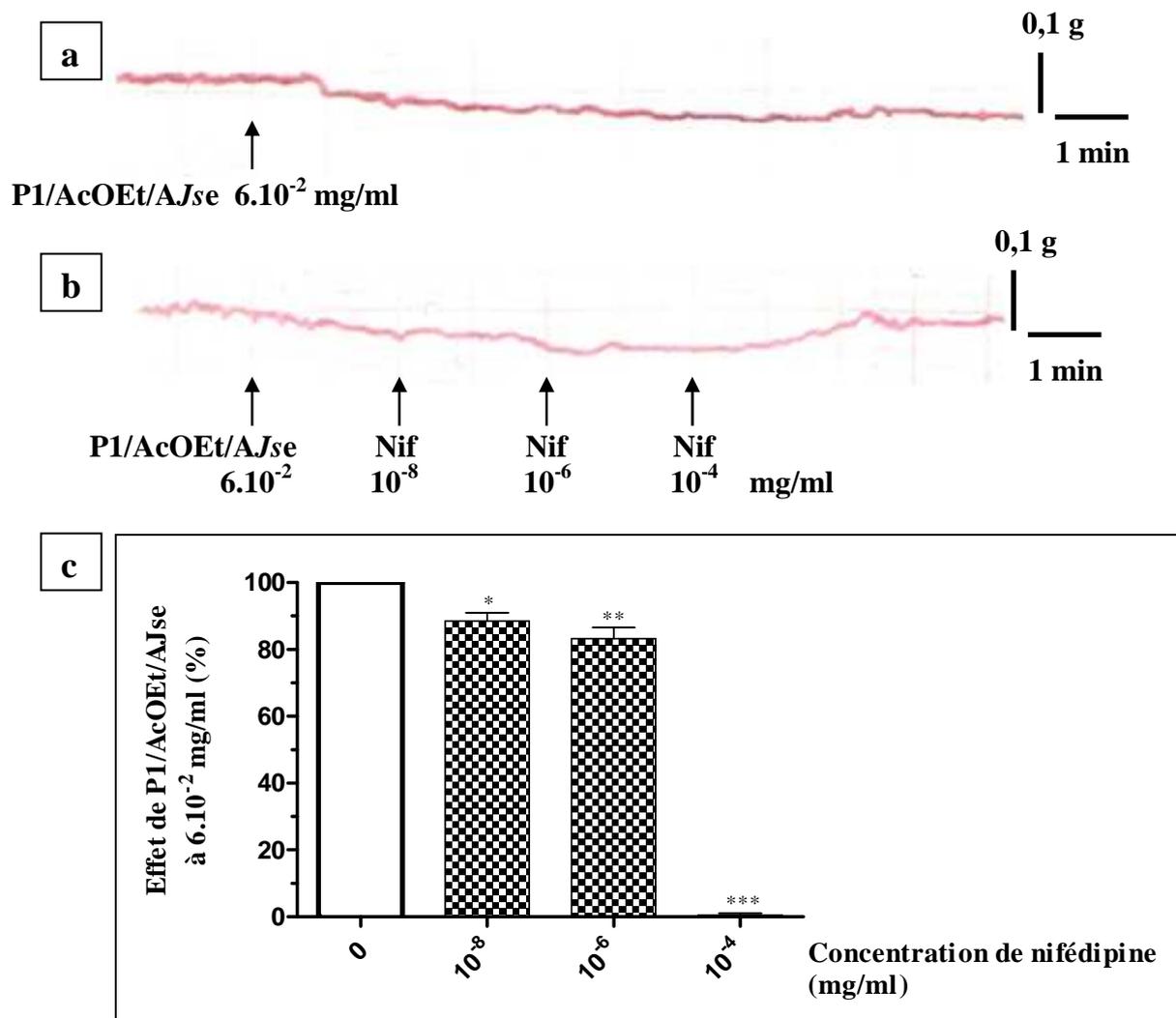
La **figure 115-a** est un enregistrement type de l'effet de la dose unique de P1/AcOEt/AJse de  $6.10^{-2}$  mg/ml. A cette dose, le tonus de base diminue progressivement pour atteindre une baisse maximale de  $63,6.10^{-3}$  g après environ 6 min.

L'administration de P1/AcOEt/AJse à la même dose de  $6.10^{-2}$  mg/ml entraîne une baisse du tonus de base de l'artère aorte isolée jusqu'à une valeur de  $37,5.10^{-3}$  g après 2 min (**figure 115-b**). Lorsqu'à la suite une dose de nifédipine de  $10^{-8}$  mg/ml est administrée, il apparaît, 2 min après, une baisse supplémentaire du tonus de base de  $14.10^{-3}$  g. Le tonus de base baisse ainsi de  $51,5.10^{-3}$  g ; soit une réduction de 11,5 % de la vasorelaxation normalement induite par la dose de P1/AcOEt/AJse de  $6.10^{-2}$  mg/ml, dans le même temps de contact de l'aorte isolée avec cette substance. Lorsqu'une dose de nifédipine de  $10^{-6}$  mg/ml est ensuite administrée, le tonus de base ne diminue plus et reste constant. La nifédipine à  $10^{-6}$  mg/ml réduit donc de 16,67 % la baisse de tonus normalement induite par P1/AcOEt/AJse à  $6.10^{-2}$  mg/ml. En administrant une dose de nifédipine de  $10^{-4}$  mg/ml, le tonus de base augmente et revient à sa valeur normale.

Les colonnes de la **figure 115-c** présentent les effets de la nifédipine sur la baisse du tonus de base de l'artère aorte isolée de cobaye normalement induite par P1/AcOEt/AJse à  $6.10^{-2}$  mg/ml.

Dans une deuxième série d'expériences (**figure 116-a**), l'organe reçoit d'abord la nifédipine, puis P1/AcOEt/AJse lui est administrée à des doses croissantes ( $\geq CE_{50}$ ). On note qu'en présence de la nifédipine à  $10^{-4}$  mg/ml, P1/AcOEt/AJse, à des doses variant de  $4.10^{-2}$  à  $8.10^{-2}$  mg/ml, agit peu sur le tonus de base. En effet, dans cette série d'expériences, la baisse du tonus de base de l'aorte prétraitée avec de la nifédipine est de 24,2 ; 26,8 et 36,4 mg en présence de P1/AcOEt/AJse à  $4.10^{-2}$ ,  $6.10^{-2}$  et  $8.10^{-2}$  mg/ml respectivement ; soient 49,9 %, 30 % et 26 % des effets normalement induits par cette substance à ces doses.

Les colonnes de la **figure 116-b** présentent la baisse du tonus de base des contractions de l'artère aorte induite par P1/AcOEt/AJse en absence et en présence de la nifédipine à  $10^{-4}$  mg/ml.



**Figure 115 : effets de la nifédipine sur la baisse du tonus de base des contractions de l'artère aorte isolée de cobaye induite par P1/AcOEt/AJse**

**a – Enregistrement type de l'effet d'une dose unique de P1/AcOEt/AJse sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée de cobaye**

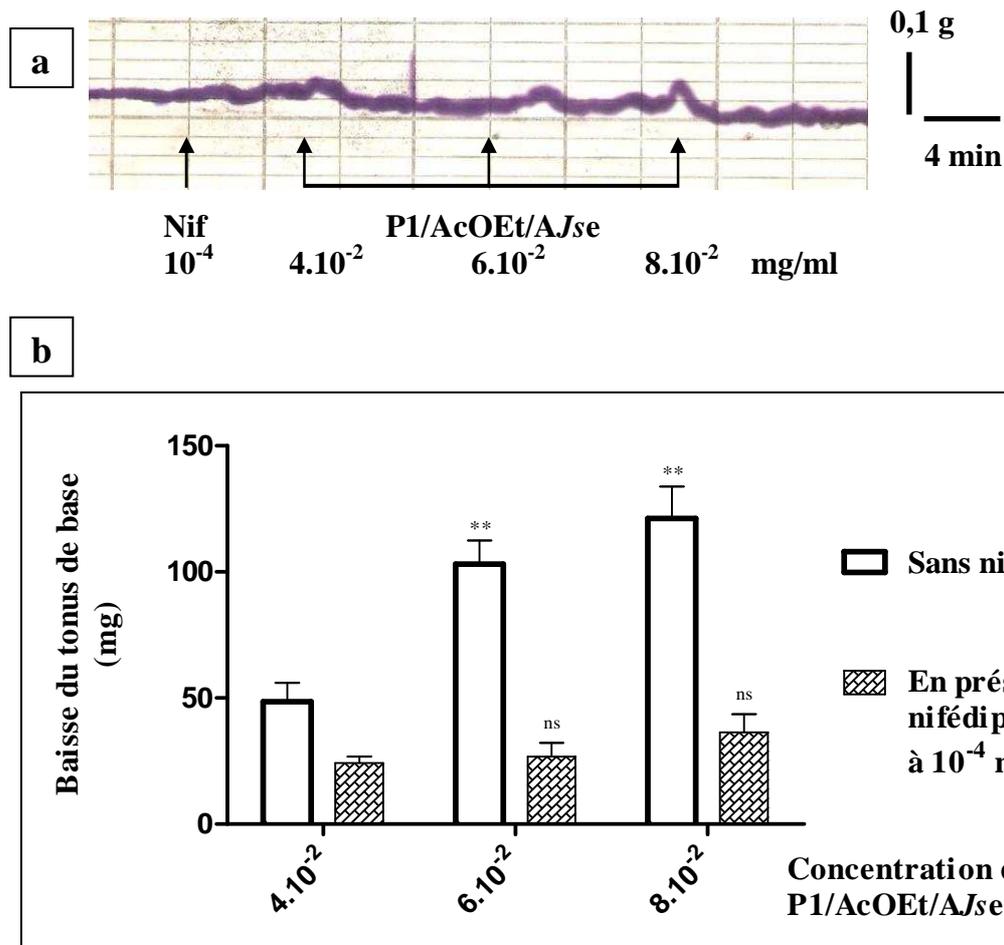
Enregistrement témoin (avant la flèche) et effet de P1/AcOEt/AJse à  $6.10^{-2}$  mg/ml sur les contractions toniques aortiques.

**b – Enregistrement type des effets de la nifédipine sur la baisse du tonus de base induite par P1/AcOEt/AJse**

Enregistrement témoin (avant la première flèche) et effets de P1/AcOEt/AJse à  $6.10^{-2}$  sur les contractions toniques aortiques, puis de la nifédipine (Nif) successivement à  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  mg/ml.

**c – Baisse du tonus de base induite par P1/AcOEt/AJse à  $6.10^{-2}$  mg/ml en fonction de la concentration de nifédipine**

**n = 3 ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01.**



**Figure 116 : baisse du tonus de base des contractions de l'artère aorte isolée de cobaye induite par P1/AcOEt/AJse en présence de nifédipine**

**a – Enregistrement type**

Enregistrement témoin (avant la première flèche), administration de la nifédipine (Nif) à  $10^{-4}$  mg/ml et effets de P1/AcOEt/AJse successivement à  $4.10^{-2}$ ,  $6.10^{-2}$  et  $8.10^{-2}$  mg/ml sur les contractions toniques aortiques.

**b – Baisse du tonus de base induite par P1/AcOEt/AJse en absence et en présence de nifédipine à  $10^{-4}$  mg/ml**

**n = 3 ; ns P > 0,05 ; \*\* P < 0,01.**

### IV<sub>2</sub> – 4 – 3 – 3. Discussion

La substance P1/AcOEt/AJse induit, sur les contractions toniques de l'artère aorte isolée, une vasorelaxation. P1/AcOEt/AJse est donc une substance vasodilatatrice. Cette substance agit sur le tonus aortique à des doses beaucoup plus faibles que l'extrait brut. En effet, les effets vasorelaxants de P1/AcOEt/AJse apparaissent à partir de la dose de  $2.10^{-2}$  mg/ml, alors que AJse n'est active qu'à partir de la dose de 2 mg/ml. P1/AcOEt/AJse est donc 50 fois plus active sur la force contractile de l'artère aorte que l'extrait brut (AJse).

La vasorelaxation induite par P1/AcOEt/AJse est dose-dépendante et présente un plateau de saturation pour les fortes doses, comme le montre la courbe de la baisse du tonus de base de l'aorte en fonction du logarithme de la concentration de P1/AcOEt/AJse. Cela indique que les effets de P1/AcOEt/AJse passeraient par l'activation de récepteurs.

La nifédipine, un anticalcique à effet vasculaire prédominant (Frishman *et al.*, 1984 ; Werner, 1984), réduit considérablement, annule, et même reverse les effets vasodilatateurs de P1/AcOEt/AJse. Il est connu que la nifédipine, en agissant sur les canaux calciques de type L, entraîne une diminution de l'influx calcique. Ceci provoque, au niveau vasculaire, une relaxation musculaire, une diminution des résistances périphériques, entraînant une vasodilatation et une chute de la pression artérielle (Ishii *et al.*, 1980 ; Karaki et Weiss, 1988 ; Stoll et Spector, 1989 ; Michiru et Quentin, 2003).

L'inhibition des effets vasorelaxants de P1/AcOEt/AJse par la nifédipine indique que cette substance purifiée agirait, comme la nifédipine, sur les canaux calciques en les inhibant, d'où la vasodilatation conduisant à la baisse de la pression artérielle observée.

La substance purifiée P1/AcOEt/AJse serait donc également un anticalcique à effet vasculaire.

### IV<sub>2</sub> – 5. Conclusion

L'extraction solide-liquide de feuilles fraîches de *Justicia secunda* (Acanthaceae) a permis d'obtenir un composé solide sous forme de poudre, nommé AJse. Le rendement de cette extraction est de 30 %.

La séparation liquide-liquide (LLE) de l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (AJse) a donné trois fractions chromatographiques : les phases chloroformique, acétatique et aqueuse. Cette technique (LLE) permet d'obtenir une bonne séparation des composés de l'extrait brut avec peu de perte de produits (1 %). En effet la LLE donne des rendements de 2 %, 20 % et 77 %, respectivement pour les phases CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et H<sub>2</sub>O.

Les multiples constituants contenus dans l'extrait brut ont été repartis différemment dans les trois phases issues de la séparation liquide-liquide de *AJse*, ce qui est confirmé par la chromatographie sur couche mince (CCM) et par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique de l'extrait brut et des phases issues de la LLE de *AJse*.

L'étude pharmacologique des trois phases issues de la LLE sur la pression sanguine artérielle de lapin montre que ces substances sont toutes hypotensives, avec un effet plus important pour la phase acétatique ; la phase chloroformique étant la moins active. Cependant, les effets de ces trois phases sont inférieurs à ceux de l'extrait brut. Toutefois, ces phases issues de la LLE ont des effets synergiques sur la pression sanguine artérielle, et l'effet des trois phases cumulées est sensiblement égal à celui de l'extrait brut. Ainsi, la séparation liquide-liquide a séparé les constituants et les principes actifs contenus dans l'extrait brut et a permis leur répartition, dans des proportions variées, dans chacune des phases, tout en préservant leur bio-activité.

Trois composés différents, contenus dans la phase acétatique (la plus active sur la pression artérielle), ont été isolés et purifiés. Pour cela, diverses techniques chromatographiques ont été utilisées. Il s'agit de la chromatographie sur couche mince (CCM), de la chromatographie liquide à moyenne performance (MPLC), de la chromatographie sur colonne ouverte (CC), de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique et de la HPLC semi-préparative. L'un de ces trois composés (P3/AcOEt/*AJse*) n'a aucune activité pharmacologique sur la pression sanguine artérielle. Le produit pur P1/AcOEt/*AJse* est le plus actif des produits purifiés et s'avère être également 25 fois plus actif que l'extrait brut (*AJse*).

Grâce à la spectrométrie de masse (MS) et à la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN), la masse moléculaire et la structure de la substance P1/AcOEt/*AJse* ont été déterminées. Il s'agit de l'Acide 4-(octadécyloxy)-, 4-[[4-[[[1-méthylheptyl]oxy]carbonyl]phényl]éthynyl]phényl ester benzoïque (C<sub>48</sub>H<sub>66</sub>O<sub>5</sub>). Sa masse moléculaire est de 723,4993 Da.

Ce composé n'a jamais été décrit ou cité dans la littérature. En effet, nos recherches bibliographiques n'ont montré aucune description ou citation de cette substance.

La substance P1/AcOEt/AJse est également antihypertensive. On en veut pour preuve que P1/AcOEt/AJse réduit considérablement l'hypertension artérielle induite chez le lapin par l'administration d'adrénaline ou la stimulation du nerf sympathique.

Comparativement à d'autres substances, le produit P1/AcOEt/AJse est peu toxique au niveau cellulaire. Sa cytotoxicité, déterminée grâce au test au MTT sur trois lignées cellulaires, est plus faible que celle d'un extrait hydro-alcoolique de cette plante, déterminée par d'autres auteurs qui, en la comparant à la toxicité au niveau cellulaire de d'autres plantes, sont arrivés à la conclusion que cet extrait est peu toxique. Ainsi, la substance P1/AcOEt/AJse est recommandée pour son utilisation en pharmacologie.

Cette substance P1/AcOEt/AJse, en plus de son effet hypotenseur, induit une inhibition de l'activité cardiaque et une vasorelaxation. En effet, P1/AcOEt/AJse est cardioinhibitrice aussi bien sur l'activité électrique globale que sur l'activité mécanique du cœur. Elle induit également une vasorelaxation au niveau des coronaires et de l'artère aorte. Le parallélisme des effets cardiodépresseurs et vasodilatateurs de P1/AcOEt/AJse laisse penser que l'action de cette substance sur la pression artérielle résulte de son effet simultané sur ces deux paramètres.

Cette substance est beaucoup plus active que l'extrait brut. En effet, la substance P1/AcOEt/AJse apparaît 25 à 100 fois plus active que l'extrait brut sur les différents paramètres du système cardio-vasculaire de Mammifères.

L'étude du mécanisme d'action de P1/AcOEt/AJse a montré que cette substance agit sur les paramètres cardio-vasculaires essentiellement en inhibant l'influx calcique et la libération du calcium intracellulaire. En effet, P1/AcOEt/AJse atténue les effets cardiotoniques des milieux hypercalcique, hyposodique et hypopotassique qui relèvent le taux de  $Ca^{2+}$  et accentue les effets cardioinhibiteurs des milieux hypocalcique, hyposodique, hypersodique et hyperpotassique. Ces milieux agissent en diminuant le  $Ca^{2+}$  disponible pour les contractions cardiaques. En conséquence, la substance P1/AcOEt/AJse est un anticalcique qui inhibe non seulement l'influx calcique, mais aussi la libération du calcium intracellulaire.

Cet anticalcique a un tropisme mixte, à la fois myocardique et vasculaire car ses effets sur les contractions cardiaques et le tonus vasculaires sont inhibés respectivement par le vérapamil et la nifédipine.

L'inhibition du flux calcique, la cardioinhibition et la vasodilatation seraient ainsi à l'origine de l'effet antihypertenseur de P1/AcOEt/AJse. Ces propriétés de P1/AcOEt/AJse

justifient en effet la réduction de l'hypertension artérielle induite par l'adrénaline administrée au lapin ou libérée suite à la stimulation du nerf sympathique de cet animal, étant donné que l'adrénaline, substance cardioactivatrice et vasoconstrictrice, agit en activant le flux calcique.



**V – CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

## V – CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le but de valoriser les plantes médicinales dans le cadre de la recherche de nouveaux composés pharmacologiquement actifs, principalement dans le traitement de l'hypertension artérielle, notre étude a porté sur *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae). Cette plante de la pharmacopée africaine est utilisée en médecine traditionnelle pour ses nombreuses vertus thérapeutiques dont le traitement de l'hypertension artérielle.

Dans ce contexte, la toxicité et l'action d'un extrait aqueux brut de feuilles fraîches de *Justicia secunda*, dénommée *AJse*, a été évalué, à l'aide de méthodes de criblages biologiques et pharmacologiques, sur l'activité cardio-vasculaire de Mammifères.

Nos résultats indiquent que cet extrait est peu toxique. Il entraîne essentiellement des effets hypotenseurs, antihypertenseurs, cardioinhibiteurs, vasodilatateurs, antioxydants et une augmentation de la viscosité du sang et du débit coronaire cardiaque. Pour certaines doses de cet extrait brut, il a également été mis en évidence des effets cardiotoniques et une diminution du débit coronaire cardiaque. Ces effets de *AJse* sur la pression artérielle sont dû à la présence dans sa composition de substances  $\beta$ -bloquants, anticalciques et, probablement, d'autres substances non identifiées.

Cet extrait est riche en métabolites secondaires, notamment des stérols et polyterpènes, des alcaloïdes, des saponosides et des anthocyanes, couramment utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés pharmacologiques.

Cette étude s'est poursuivie par l'isolement et la purification de composés responsables de ces divers effets de l'extrait aqueux de *Justicia secunda*. La méthodologie de purification, fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques et d'études pharmacologiques bioguidées sur la pression artérielle, a permis de séparer les composés de l'extrait brut en trois phases (chloroformique, acétatique et aqueuse).

La phase acétatique, qui présente l'activité pharmacologique la plus marquée parmi les trois phases issues de la séparation liquide-liquide de *AJse*, a été retenue. Dans cette fraction acétatique, notre choix d'isolement s'est porté sur trois composés largement majoritaires sur les chromatogrammes HPLC/DAD-UV. Parmi ces trois composés qui ont été purifiés, il a été retenu P1/AcOEt/*AJse*, le plus pharmacologiquement actif sur la pression sanguine artérielle. Par l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie de masse et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, ce composé a été identifié comme étant l'Acide 4-(octadécyloxy)-, 4-[[4-[(1-méthylheptyl)oxy]carbonyl]phényl]éthynyl]phényl ester benzoïque (C<sub>48</sub>H<sub>66</sub>O<sub>5</sub>).

Sa masse moléculaire est de 723,4993 Da. Il s'agit d'une nouvelle molécule qui n'a jamais été décrite ou citée dans la littérature.

Des études pharmacologiques ont permis de déterminer sa toxicité, ses effets et son mécanisme d'action sur l'activité cardio-vasculaire de Mammifères. Ainsi, cette substance s'avère être peu toxique et 25 à 100 fois plus active que l'extrait brut sur le système cardio-vasculaire de Mammifères. P1/AcOEt/AJse est un anticalcique qui, par ses propriétés d'inhibiteur calcique, induit une hypotension artérielle, une cardioinhibition et une vasodilatation. Ce composé est par ailleurs un antihypertenseur.

Dans cette étude, l'extrait de feuilles fraîches de *Justicia secunda* (Acanthaceae) ainsi que le produit naturel purifié P1/AcOEt/AJse isolé ont montré des potentialités pharmacologiques intéressantes dans le traitement de l'hypertension artérielle.

Par ailleurs, l'extrait brut présente un intérêt réel et prometteur par son activité antioxydante qui a été établie. En effet, en raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, le recours à des substances naturelles douées d'activités antioxydantes s'avère très avantageux et d'actualité.

Ainsi, nos résultats confirment et valident l'indication thérapeutique traditionnelle de *Justicia secunda* M. Vahl (Acanthaceae) dans le traitement de l'hypertension artérielle. Etant donné que l'extrait aqueux brut de feuilles de *Justicia secunda* est peu toxique, l'utilisation de cette forme traditionnelle peut être envisagée dans le traitement de l'hypertension artérielle afin de soulager les patients. Une préparation aqueuse traditionnelle peut donc être proposée en thérapeutique pour lutter contre l'hypertension artérielle. De même, la substance purifiée P1/AcOEt/AJse, beaucoup plus active que l'extrait brut sur le système cardio-vasculaire de Mammifères, pourrait être indiquée dans le traitement de cette affection.

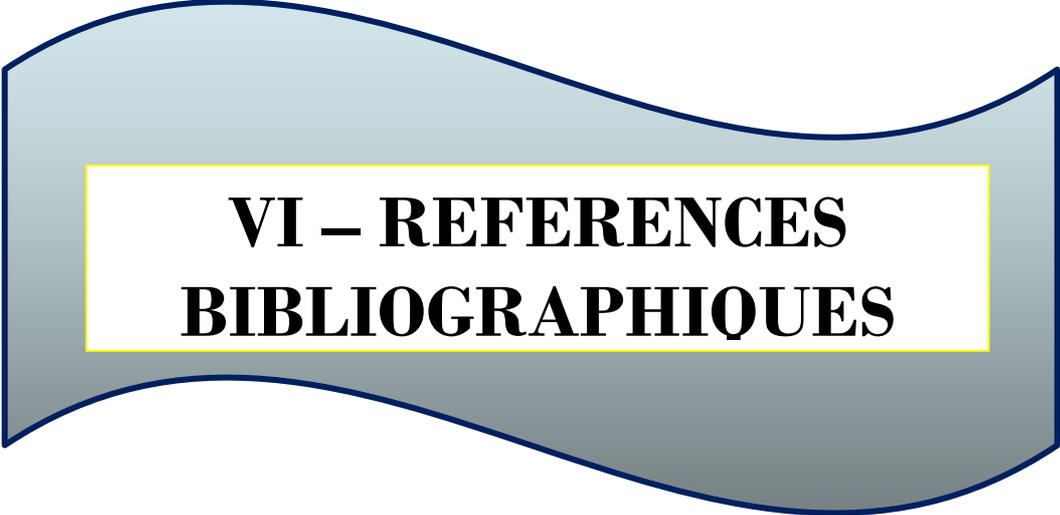
Nous envisageons ultérieurement mettre en valeur les résultats obtenus par une formulation galénique de l'extrait aqueux brut de feuilles fraîches de *Justicia secunda* (Acanthaceae) et de la substance purifiée P1/AcOEt/AJse, issue de cet extrait. Nous pourrions ainsi mettre à la disposition des patients, souffrant d'hypertension artérielle, de médicaments traditionnels améliorés ou de phytomédicaments standardisés à coût modéré et donc accessibles aux populations. Une telle initiative doit être accompagnée d'une production végétale de cette plante afin d'assurer sa disponibilité.

Le travail réalisé dans le contexte actuel présente des limites. En effet, la nécessité de réaliser des tests non cliniques, c'est-à-dire "*in vitro*", de toxicité (cytotoxicité) présente un intérêt pour tous les produits bioactifs. Ces études "*in vitro*" représentent un prérequis important, mais elles ne prétendent en aucun cas se substituer aux études cliniques ultérieures. C'est pourquoi nous envisageons également réaliser, avec l'extrait aqueux brut de *Justicia secunda* (Acanthaceae) et le composé purifié P1/AcOEt/AJse issu de cette plante, des études de biotolérance.

Ces études seront complétées par des études expérimentales des effets de ces substances sur certaines pathologies cardio-vasculaires induites, puis par des tests cliniques pour le traitement de l'hypertension artérielle, eu égard aux propriétés antihypertensives avérées des ces produits.

De même, des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces principes actifs seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

Un tel travail que nous envisageons mener s'insère dans une longue chaîne. Il implique une collaboration étroite avec des Universités et Instituts disposant du savoir faire et de Laboratoires performants. Il exige également des moyens matériels et financiers et une coopération avec des industries qui, seules, sont en mesure de produire en quantité suffisante et commercialiser les produits obtenus à partir des plantes.



**VI – REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## VI – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott T. P., Kleiman R., 1991.** Solvent selection guide for counter-current chromatography. *J Chromatogr* ; **538** : 109-118.
- Abe Y., Goto M., 1964.** Effects of external ions on the excitation-contraction coupling of cardiac muscle of the Rabbit. *Japnese J Physiol* ; **14** : 123-134.
- Abo K. J. C., 1996.** Effets pharmacologiques d'un extrait aqueux de *Mareya micrantha* (Euphorbiacée) sur l'activité cardio-vasculaire de Mammifères. *Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire* ; n° **242**, 145 p.
- Abo K. J. C., Ehile E. E., Guede-Guina F., Traore F., 2000.** Effets cholinergiques d'un extrait aqueux de *Mareya micrantha* (Euphorbiaceae) sur la pression artérielle et l'activité cardiaque. *Afr bioméd* ; **5** (3) : 11-20.
- Abole S., 2006.** Traitement de l'HTA chez la femme enceinte en milieu Hospitalier. A propos de 106 cas au CHU d'Abidjan-Treichville. *Thèse de Doctorat de Pharmacie, Université d'Abidjan* ; n° **1075**, pp 12-14.
- Adams M. A., Nakanishi K., 1979.** Selected uses of high pressure liquid chromatography for the separation of natural products. *J Liq Chromatogr* ; **2** (8) : p 1097.
- Adoubi K. A., Diby K. F., Nguetta R., Yangni-Angaté K. H., Adoh A. M., 2006.** Facteurs de la mauvaise observance thérapeutique de l'hypertendu en Côte d'Ivoire. *Rev Int Sci Med* ; **8**(3) : 18-22.
- Ajay M., Chai H. J., Mustafa A. M., Gilani A. H., Mustafa M. R., 2007.** Mechanisms of antihypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *J Ethnopharmacol* ; **109** : 388-393.
- Aka K. J., 1980.** Analyse de la repolarisation du myocarde ventriculaire du singe en relation avec la fibrillation cardiaque. Influence d'une substance cardioactive africaine (extrait de *Mansonia altissima*). *Thèse de Doctorat d'Etat es-Sciences, Université d'Abidjan* ; n° **55**, 233 p.
- Allam M., Saunier C., Sautegau A., Harteman D., 1990.** The inotropic effect of digoxin on an isolated rat heart in hypercapnia and (or) hypoxia. *Can J Physiol Pharmacol* ; **68** : 455-461.
- Almange C., 1998.** Introduction à la thérapeutique cardiologique. *Département de cardiologie et maladies vasculaires. CHU de Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex. 10 p.* <http://www.med.univ.rennes1.fr/therapeutique.htm>. 05/09/2001.

- Amos S., Akah P. A., Binda L., Enwerem N. M., Ogundaini A., Wambebe C., Hussaini M. I., Gamaniel K. S., 2003.** Hypotensive activity of the ethanol extract of *Pavetta crassipes* leaves. *Biol Pharm Bull* ; **26** : 1674-1680.
- Anga T. J., 2007.** Antihypertensive effect of an aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa*. *Fitoterapia* ; **78** : 292-297.
- Anonyme, 1989.** Perindopril (coversyl®) : un antihypertenseur hautement performant. *Laboratoire Sevrier* ; 5 p.
- Anonyme, 1999.** Angiotensin II receptor antagonists. *Drug Facts and Comparisons* ; p 165R-165Z.
- Anonyme, 2003.** Hypertension artérielle et ses complications. Abidjan (Côte d'Ivoire). *Institut de Cardiologie d'Abidjan* ; 183 p.
- Anonyme, 2007-a.** Suivi et orientation des femmes enceintes en fonction des situations à risque identifiées. *Argumentaire, HAS* ; pp : 23-25.
- Anonyme, 2007-b.** Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle essentielle. Recommandations pour la pratique clinique. *Synthèse des recommandations professionnelles, HAS* ; 6 p.
- Antonius-Gunawan M. D., Ali Massumi M. D., Robert Hall J. M. D., 1981.** Calcium antagonists : A new class of therapeutic agents. *Cardiovascular Diseases, Bulletin of the Texas Heart Institute* ; **8(3)** : 413-420.
- Appel L. J., Moore T. J., Obarzanek E., 1997.** A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *DASH Collaborative Research Group, N Engl J Med* ; **336** : 1117-1124.
- Arakawa K., 1996.** Effect of exercise on hypertension and associated complications. *Hypertension Res* ; **19(1)** : S87-S91.
- Arguedas J. A., Perez M. I., Wright J. M., 2010.** Valeurs cibles pour un traitement antihypertenseur. *Minerva* ; **9(3)** : 38-38.
- Arora A., Nair M. G., Strasburg G. M., 1998.** Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology & Medicine*; **24(9)** : 1355-1363.
- Artigou J. Y., Monsuez J. J., 2007.** Résistance hémodynamique et loi de Poiseuille. In : «cardiologie et maladies vasculaires». *Editeur : Issy-les-Moulineaux (Elsevier Masson), France* ; p 62.

- Azizi M., Guyene T. T., Chatellier G., Wargon M., Menard J., 1997-a.** Additive effects of losartan and enalapril on blood pressure and plasma active renin. *Hypertension* ; **29** : 634-640.
- Azizi M., Guyene T. T., Chatellier G., Menard J., 1997-b.** Pharmacological demonstration of the additive effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II antagonism in sodium depleted healthy subjects. *Clin Exp Hypertens* ; **19** : 937-951.
- Ba S. H., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Zizyphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisée dans le traitement traditionnel du diabète et de l'hypertension artérielle en Mauritanie. *Bamako, Thèse de Doctorat de Pharmacie, FMPOS* ; 120 p.
- Baisch A. L. M., Urban H., Ruiz A. N., 2004.** Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of lyophilized seeds of *Casimiroa edulis* (AECe) on rat mesenteric arterial bed. *J Ethnopharmacol* ; **95** : 163-167.
- Balde M. D., Balde N. M., Kaba M. L., Diallo I., Diallo M. M., Kake A., Bah D., Camara A., Balde M., 2006-a.** HTA : Epidémiologie et anomalies métabolites au Foutah-Djallon en Guinée. *Mali Médical* ; **21**(3) : 19-22.
- Balde A. M., Traore S., Toure M., Diallo D., Keita A., Magassouba F. B., Donzo M., Balde D., Balde N., Barry R., Kaba M. L., Bah A. O., Diallo T. S., Barry A. B., Sylla C., Bah M. S., 2006-b.** Hypertension artérielle en Guinée : épidémiologie et place de la phytothérapie dans la prise en charge dans les zones urbaines et rurales de Fria, Boke, Forecariah (basse Guinée). *Pharm Med Trad Afr* ; **7** : 19-43.
- Belila J. N., 2002.** Facteurs de risque cardio-vasculaire, maladies cardio-vasculaires et gradient social en milieu professionnel (cas de la Société Nationale d'Electricité). *Thèse de Doctorat d'Etat de Médecine, Université de Kinshasa, RD Congo* ; 85 p.
- Berdeaux A., Edouard A., 1997.** Pharmacologie des récepteurs adrénergiques et dopaminergiques. Implications thérapeutiques actuelles. *Services de Pharmacologie et d'Anesthésie-Réanimation, Centre Hospitalier de Bicêtre, 94275 Le Kremlin Bicêtre Cedex, France, MAPAR* ; pp 397-413.
- Bers D. M., 2002.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* ; **415** : 198-205.
- Berthod A., Maryutina T., Spivakov B., Shpigun O., Sutherland A. A., 2009.** Counter-current chromatography in analytical chemistry. *Pure Appl Chem* ; **81**(2) : 355–387.
- Bertrand E., 2005.** Prise en charge de l'hypertension en Afrique subsaharienne. *Cardiol Trop* ; **31** : 11-14.

- Bertrand E., Ravinet L., Odi A., 1974.** Epidémiologie de l'HTA en Côte d'Ivoire. *Afrique médecine*, **13** : 999-1050.
- Beuckelmann D. J., Wier W. G., 1988.** Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol London* ; **405** : 233-255.
- Bliss C. I., 1938.** The determination of the dosage-mortality curve from small numbers. *Quart J Pharm* ; **11** : 192-216.
- Boccalon H., 1995.** Physiologie et exploration de la circulation artérielle. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Cardiologie-Angéiologie* ; 11-600-A-10, 17 p.
- Boffeta P., Garfinkel L., 1990.** Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American cancer society prospective study. *Epidem* ; **1** : 342-348.
- Bouchard V., 1999.** Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II. *Pharm'as-tu lu ?* ; **4(3)** : 1-4.
- Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T., 1999.** Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques. *Spectra Analyse* ; **207** : 11-25.
- Bouchonnet S., 2001.** Comparaison des performances des analyseurs quadripolaires en spectrométrie de masse : trappes ioniques versus quadripôles. *Spectra Analyse* ; **222** : 11-18.
- Boutouyrie P., 1999.** Inhibiteurs des récepteurs AT1 à l'angiotensine II. *Sang Thrombose Vaisseaux* ; **11(6)** : 479-484.
- Bouvenot G., Pevulder B., Guillevin L., Queneau P., Schaeffer A., 1995.** Abrégés de pathologie médicale. *Tome 3, Masson, Barcelone, Paris* ; pp 56-76.
- Bradley H. A., Wiysonge C. S., Volmink J. A., Mayosi B. M., Opie L. H., 2006.** How strong is the evidence for use of beta-blockers as first-line therapy for hypertension ? Systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* ; **24(11)** : 2131-2141.
- Brady C., Spiro A., Gaziano J.M., 2005.** Effects of age and hypertension status on cognition: the Veterans Affairs Normative Aging Study. *Neuropsychology* ; **19** : 770-777.
- Brasch H., Sierolawsky L., Dominiak P., 1993.** Angiotensin II increases norepinephrin release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. *Hypertension* ; **22** : 699-704.
- Breckenridge A., 1982.** Problèmes rencontrés dans le traitement de l'HTA en Afrique. In : «l'hypertension artérielle en Afrique aujourd'hui ». *SIDEM Editeur, Paris, France* ; pp 253-254.

- Bria M., Watkin P., 1997.** La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ou l'aide à la détermination structurale des petites molécules organiques. *L'Actualité Chimique* ; **2** : 24-35.
- Bronner C., Freslon J. L., 1992.** Les canaux ioniques et l'équilibre ionique transmembranaire. In : Pharmacologie moléculaire : mécanisme d'action des médiateurs et des médicaments. *Edité par Landry Y. et Gies J. P., Mc Graw-Hill Publishing Compagny, Toronto, Canada* ; pp. 193-217.
- Brown O. M., 1995.** Adrenergic Drugs and Adrenergic Antagonists. In : Essentials of pharmacology. *Edité par Smith C. M. Reynard A. M. W-B Saunders Compagny, Philadelphia, USA* ; pp 75-91.
- Brunner H., Gavras H. C., 2002.** Angiotensin blockade for hypertension : a promise fulfilled. *Lancet* ; **359** : 990-991.
- Brutsaert D. L., Sys S. U., 1989.** Relaxation and diastole of the heart. *Physiol Rev* ; **69** : 1228-1315.
- Cai H., Harrison D. G., 2000.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research* ; **87**(10) : 840-844.
- Cain M. E., Anderson J. L., Arnsdorf M. F., Mason J. W., Scheinman M. M., Waldo A. L., 1996.** Signal-averaged electrocardiography. *JACC* ; **27** : 238-249.
- Calderon A., 2002.** Etude phytochimique des plantes du Panama : *Henriettella fascicularis*, (SW.) C. Wright et *Miconia serrulata* (DC.) Naud (Melastomaceae) et comparaison chimiotaxonomique des espèces de *Justicia* (Acanthaceae). *Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Université de Lausanne, Suisse* ; 306 p.
- Calhoun D. A., Jones D., Textor S., 2008.** Resistant hypertension : diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American heart association professional education committee of the council for high blood pressure research. *Circ* ; **117** : e510-e526.
- Canet D., 1991.** La RMN : concepts et méthodes. *Inter édition, Paris, France, ISBN 978-2-7296-0375-5* ; pp 31-46.
- Cantillo J., Güette J., Baldiris R., Jaramillo B., Olivero J., 2007.** Evaluacion de la toxicidad aguda (CL50) frente a *Artemia franciscana* y la actividad hemolitica de los extractos acuosos, en diclorometano y metanolico parcial de *Justicia secunda* (Vahl). *Scientia & Technica* ; vol. XIII, **33** : 257-258.
- Cao G., Sofic E., Prior R. L., 1997.** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids : structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*. **22**(5) : 749-760.

- Carmeliet E., Vereecke J., 1969.** Adrenaline and plateau phase of cardiac action potential : importance of  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  and  $K^{+}$  conductance. *Pfluegers Arch* ; **313** : 300-315.
- Caron J., Guedon-Moreau L., Libersa C., 1993.** Antagonistes des mouvements du calcium et troubles du rythme. *Thérapie* ; **48** : 685-695.
- Cassidy A., O'Reilly E. J., Kay C., Sampson L., Franz M., Forman J., Curhan G., Rimm E. B., (2011).** Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am J Clin Nutr* ; **93**(2) : 338-347.
- Castaigne A., 1988.** Bêta-stimulants et Bêta-bloquants. Pour la pratique. *Rev Prat* ; **38** : 569-572.
- Castaigne A., 2000.** Quel antihypertenseur en première intention ? *La Revue du Praticien, Médecine Générale* ; **14**(507) : 1451-1452.
- Chan E. C., Pannangpetch P., Woodman O. L., 2000.** Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta : mechanism of action and structure-activity relationships. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* ; **35**(2) : 326-333.
- Chemla D., Lecarpentier Y., 2001.** La pression artérielle systémique. *Médecine thérapeutique* ; **7**(6) : 477-80.
- Chevalley I., 2000.** Contribution à l'étude phytochimique des Saxifragacées : isolement d'antioxydant à partir de *Saxifraga stellaris* L. et *Saxifraga cuneifolia* L. et d'un composé antifongique de *Ribes rubrum* L. *Thèse de Doctorat, Université de Lausanne, Suisse* ; 175 P.
- Chifundera K., 2001.** Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. *Fitoterapia* ; **72**(4) : 351-368.
- Chobanian A. V., Bakris G. L., Black H. R., 2003.** Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension* ; **42** : 1206-1252.
- Cleon P., D'Angeli D., 2005.** Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. *Spectra Analyse* ; **242** : 13-18.
- Cleon P., Sevrain S., 2002.** Le point sur le couplage chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse. *Spectra Analyse* ; **229**(31) : 22-30.
- Cohen Y., 1997.** Abrégés de Pharmacologie. 4<sup>ème</sup> Ed. Révisée. Masson, Paris, France ; pp : 54-55, 268-276.
- Colhoun H. M., Dong W., Pulta N. R., 1998.** Blood pressure screening, management and control in England : results from the health survey for England 1994. *J Hum Hypertens* ; **16** : 747-752.

- Comoe K. C., Sess D., Guelain J., 1993.** Etude de l'hypertension artérielle en milieu urbain de Côte d'Ivoire. *Med Trop* ; **53**(2) : 173-179.
- Conway W. D., Petroski R. J., 1995.** Modern counter-current chromatography. *American chemical Society, Washington, DC, USA* ; pp 1-14.
- Conway W. D., 1990.** "Solvent systems". In : Countercurrent Chromatography Apparatus Theory & Applications. *VCH Publishers Inc., NY, USA* ; pp 29-35.
- Cooney M. T., Dudina A., De Bacquer D., Wilhelmsen L., Sans S., Menotti A., 2009.** HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis* ; **206**(2) : 611-616.
- Coraboeuf E., Garnier D., 1961.** Action des milieux privés de calcium et de magnésium sur l'activité électrique et mécanique du cœur isolé de rat et de cobaye. *J Physiol Paris* ; **53** : 304-306.
- Coraboeuf E. Guilbault P., Breton D., Dumont M., 1961.** Action des milieux hypopotassiques sur l'activité électronique et mécanique du cœur isolé de rat et de cobaye. *J Physiol Paris* ; **53** : 306-307.
- Coraboeuf E., 1960.** Aspect cellulaires de l'électrogenèse cardiaque chez les vertébrés. *J Physiol, Paris* ; **52**: 323-417.
- Cosentino F., Luscher T. F., 1999.** Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* ; **43** : 274-278.
- Cosma C., 1989.** Pourquoi agir sur les canaux calciques dans l'hypertension artérielle ? *Tribune médicale* ; pp 7-8.
- Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O., 1997.** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fragaria blumei*. *Helv Chem Acta* ; **80** : 1144-1151.
- Cusham D. W., Ondetti M. A., 1991.** History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* ; **17** : 589-592.
- Dahlof B., Devereux R. B., Kjeldsen S. E., 2002.** Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention for endpoint reduction in hypertension (LIFE) : a randomized trial against atenolol. *Lancet* ; **359** : 995-1003.
- Dar A., Behbahanian S., Malik A., Jahan N., 1999.** Hypotensive effect of the methanolic extract of *Mimusops elengi* in normotensive rats. *Phytomedicine* **6** : 373-378.
- De Graeve J., Berthou F., Frost M., Arpino P., Prome J. C., 1986.** Chromatographic methods combined with mass spectrometry. Technology and applications in the fields of environmental studies. *Pharmacology and Biochemistry, Lavoisier, Paris, France* ; 382 p.

- De Hoffmann E., 1996.** Tandem mass spectrometry : a primer. *J Mass Spectrom* ; **31** : 129-137.
- Demirdöven N., Cheatum C. M., Chung H. S., Khalil M., Knoester J., Tokmakoff A., 2004.** Two-dimensional infrared spectroscopy of antiparallel beta-sheet secondary structure. *Journal of the American Chemical Society* ; **126** : p 7981.
- Denizot F., Lang R., 1986.** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* ; **89** : 271-277.
- Derdemezis C. S., Filippatos T. D., Mikhailidis D. P., Elisaf M. S., 2010.** Effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* ; **15**: 120-134.
- Derome A. E., 1989.** The Use of N.M.R. Spectroscopy in the structure determination of natural products. Two dimensional methods. *The Dyson Perrins Laboratory, South Parks Road, Oxford OX 13 QY* ; pp 111-140.
- Diallo D., Guissou I. P., Tall C., Kasilo O. M. J., 2010.** Recherche sur la médecine traditionnelle africaine : hypertension. *The African Health Monitor* ; Special issue **14** : 6 p.
- Dickerson R. E. C., Brown M. J., 1995.** Influence of age on general practitioners definition and treatment of hypertension. *Br Med J* ; **30** : p 574.
- Dievart F., Everaere S., 1998.** Le sixième rapport de la JNC pour la prise en charge de l'HTA. *STV* ; **10**(8) : 469-479.
- Diezi J., 1989.** Toxicologie : principes de bases et répercussions cliniques. In «Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques». *Ed. Slatkline-Genève* ; pp 33-44.
- Di Matteo J., Vacheron A., 1987.** Cardiologie. 2<sup>e</sup> édition, *expansion scientifique française, Paris* ; p 701.
- Dionkounda R., 2005.** Evaluation du coût de prise en charge de l'hypertension artérielle à l'Institut de Cardiologie d'Abidjan. *Thèse de Doctorat d'Etat de Médecine, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire* ; 115 p.
- Doig J. K., Macfayden R. J., Sweet C. S., Lees K. R., Reid J. L., 1993.** Dose-ranging study of the angiotensin type I receptor antagonist losartan (Dup753/MK954) in salt-depleted normal man. *J Cardiovasc Pharmacol* ; **21** : 732-738.
- Doods H. N., Dammgen J., Mayer N., Rinner I., Trach V., 1989.** Muscarinic receptors in the heart and vascular system. *Prog Clin Pharmacol* ; **7** : 47-72.

- Douglas J. G., Bakris G. L., Epstein M., 2003.** Management of high blood pressure in African Americans. Consensus statement on hypertension in African Americans working groups on the International Society of Hypertension in Blacks. *Arch Intern Méd* ; **163** : 5245-5541.
- Dragsted A., Lang B., 1957.** Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. *Ann Pharmacol Fr* ; p 11.
- Duarte J., Jimenez R., Villar I. C., Perez-Vizcaino F., Jimenez J. and Tamargo J., 2001-a.** Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta Medica* ; **67**(6) : 567-569.
- Duarte J., Perez-Palencia R., Vargas F., Ocete M. A., Perez-Vizcaino F., Zarzuelo A., Tamargo J., 2001-b.** Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* ; **133**(1) : 117-124.
- Duchene-Marulhaz P., 1973.** Effets de l'innervation cholinergique sur le cœur de mammifère. *J Physiol (Paris)* ; **66** : 373-397.
- Durrer D., 1968.** Electrical aspects of human cardiac activity : a clinical-physiological approach to excitation and stimulation. *Cardiovasc Res* ; **2** : 1-18.
- Ehile E. E., 1983.** Inhibitions de longues durées induites par le venin de *Naja nigricolis* sur les neurones à ondes salves "Br" d'*Hélix pomatia*. *Ann Univ Abidjan, série C (Sciences) Tome XIX* : 161-181.
- Ehile E. E., Ouedraogo L., Aka K. J., 1990.** Effet inotrope positif d'un extrait aqueux de *Mansonia altissima* sur le duodénum isolé de lapin. *Bull Med Pharm* ; **4**(1) : 3-15.
- Einthoven W., 1912.** The different forms of the human electrocardiogram and their signification. *Lancet* ; **1** : 853-861.
- Eisner D. A., Lederer W. J., 1979-a.** Inotropic and arrhythmogenic effects of potassium depleted solutions on mammalian cardiac muscle. *J Physiol London* ; **294** : 255-277.
- Eisner D. A., Lederer W. J., 1979-b.** The role of sodium in the effects of potassium depleted solutions on mammalian cardiac muscle. *J Physiol London* ; **294** : 279-301.
- Etifier-Chalono E., 2005.** Quelques plantes médicinales utilisées par les Amérindiens. *Lobelia* ; **4** : 4 p.
- Ettinger S. L., Sobel R., Whitmore T. G., Akbari M., Bradley D. R., Gleave M. E., Nelson C. C., 2004.** Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer Res* ; **64**(6) : 2212-2221.

- Ettre L. S., Hinshaw J. V., 1993.** Basic relationships of gas chromatography. 2<sup>ème</sup> édition, *Advanstar, Cleveland, Ohio, USA* ; p 36.
- Fattorusso V., Ritter O., 1995.** VADEMECUM CLINIQUE. Du diagnostic au traitement. 14<sup>e</sup> édition, *MASSON, Paris, France* ; pp 92-98.
- Fauconnier J., Bedut S., Le Guen J. Y., Babuty S., 2003.** Ca<sup>2+</sup> current-mediated regulation of action potential by pacing rate in ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* ; **57** : 970-980.
- Favreto W. A. J., Pinto A. M. P., Manfio J. L., Fiametti K. G., Percio M. F., dos Santos M. B., 2012.** Development and validation of a UPLC-ESI-MS/MS method for the determination of N-butylscopolamine in human plasma : Application to a bioequivalence study. *Drug Testing and Analysis* ; **4**(3-4) : 215-221.
- Ferreira S. H., Greene L. H., Alabaster V. A., Bakhle Y. S., Vane J. R., 1970.** Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. In : *Nature. Macmillan Journals, London* ; **225** : 379-380.
- Fields J. Z., Roeske W. R. Morkin E., Yamamura H. I., 1978.** Cardiac muscarinic cholinergic receptors. Biochemical identification and characterization. *J Biol Chem* ; **253** : 3251-3258.
- Fisch C., 1980.** The clinical electrocardiogram : a classic. *Circulation* ; **62** (Suppl. III) : 1-4.
- Fleckenstein A., 1971.** Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention of production myocardial lesions. In : *Calcium and the heart. London and New York Academic Press* ; pp 59-82.
- Fleckenstein A., 1977.** Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* ; **17** : 149-166.
- Fleckenstein A., 1983.** History of calcium antagonists. *Circ Res* ; **52**(suppl I) : 1-16.
- Folkow B., 1982.** Physiological aspects of hypertension. *Physiol Rev* ; **62** : 347-355.
- Foucault A. P., Nakanishi K., 1990.** Gradient elution centrifugal partition chromatography. Comparison with HPLC gradients and use of ternary diagrams to build gradients. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* ; **13**(18) : 3583-3602.
- Foucault A. P., 1995.** Centrifugal partition chromatography. *Chromatographic Science Series, Marcel Dekker Inc., New York, USA* ; **38** : 335-407.
- Fournet J., 1978.** Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique. *Institut National de Recherche Agronomique (INRA), France* ; pp 1365-1366.

- Frishman W. H., Weinberg P., Peled H. B., Charlaps S., Beer N., 1984.** Calcium entry blockers for treatment of severe hypertension and hypertension crisis. *Am J Med* ; special issue on calcium antagonists : 35-41.
- Froment A., 1976.** HTA et corpulence : conséquences pratiques. *Acquis Méd Récentes* ; 1 : 175-188.
- Funk-Brentano C., 1992.** Canaux potassiques et arythmies. *Arch Mol Cœur* ; 85(4) : 9-13.
- Furchgott R. F., Zawadzki J. V., 1980.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* ; 288 : 373-376.
- Gaboriaudr R., 1996.** Physico-chimie des solutions. *Ed. Masson, Chap. 3* ; pp 144-148.
- Galli G. L. J., Gesser H., Taylor E. W., Shiels H. A., Wang T., 2006.** The role of the sarcoplasmic reticulum in the generation of high heart rates and blood pressures in reptiles. *J Exp Biol* ; 209 : 1956-1963.
- Galper J. B., Plein W., Catterall W., 1977.** Muscarinic acetylcholine receptors in developing chick heart. *Journal of Biological Chemistry* ; 252 : 8692-8699.
- Garrett R., 2000.** Biochimie. *Ed. DEBOECK, Chap. 2* ; pp 78-79.
- Geleijnse J. M., Launer L. J., Hofman A., Pols H. A., Witteman J. C., 1999.** Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Archives of Internal Medicine* ; 159(18) : 2170-2174.
- Gerlier D., Thomasset N., 1986.** Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Imm Methods* ; 94 : 57-63.
- Gilbenkrantz J., 1990.** Traitement de l'HTA. *Thérapeutique cardio-vasculaire* ; 45 : 552-564.
- Gill S., Chow R., Brown A. J., 2008.** Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond : the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res* ; 47(6) : 391-404.
- Gired X., Digeos-Hasnier S., LE Heuzey J. Y., 1998.** Guide pratique de l'hypertension artérielle. *Editions Médicales Spécialisées, Paris, France* ; pp : 144-148, 155-158.
- Giudicelli J. F., 1984.** Pharmacologie clinique et pharmacocinétique des bêta-bloquants. *Rev Prat* ; 34 : 902-922.
- Glistsh H. G., Reuter H., Scholtz H., 1970.** Effect of internal sodium concentration on calcium fluxes in isolate guinea pig auricles. *J Physiol London* ; 209 : 25-43.
- Glynn I. M., 1962.** Activation of adenosine triphosphatase in a cell membrane by external potassium and internal sodium. *J Physiol London* ; 160 : 18-19.

- Gnakamene B., Safar M., Blacher J., 2009.** Traitement médical de l'hypertension artérielle. *EMC* ; 11-302-B-10.
- Gocayne J., Robinson D. A., Fitzgerald M. G., 1987.** Primary structure of rat cardiac  $\beta$ -adrenergic and cholinergic receptors obtained by automated DNA sequence analysis : further evidence for a multigene family. *Proc Nat Acad Sci* ; **84** : 8296-8300.
- Godet-Thobie H., Vernay M., Noukpoape A., Salanave B., MalonA., Castetbon K., De Peretti C., 2008.** Niveau tensionnel moyen et prévalence de l'hypertension artérielle chez les adultes de 18 à 74 ans, ENNS 2006-2007. *BEH thématique* ; **49-50** : 478-483.
- Godfraind T., Miller R., Wibo M., 1986.** Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev* ; **38** : 321-416.
- Goodfriend T., Elliot M., Catt K., 1996.** Angiotensin receptors antagonists. *N Engl J Med* ; **334** : 1649-1654.
- Gradman A. H., Arcuri K., Goldberg A., 1995.** A randomized placebo-controlled, double blinded, parallel study of various doses of losartan potassium, compared to enalapril maleate in patients with essential hypertension. *Hypertension* ; **25** : 1345-1350.
- Grenand P., Moretti C., Jacquemin H., 1987.** Pharmacopées traditionnelles en Guyane. *ORSTOM, France* ; pp 89-90.
- Griendling K. K., Sorescu D., Ushio-Fukai M., 2000.** NAD(P)H oxidase : role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* ; **86(5)** : 494-501.
- Griendling K. K., Ushio-Fukai M., Lassègue B., Alexander N. W., 1997.** Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* ; **29** : 366-373.
- Gross F., Pisa Z., Strasser T., Zanchetti A., Amery A., Redman C., Wilhelmssen L., 1986.** Prise en charge de l'hypertension artérielle. Guide pratique à l'usage des médecins et du personnel paramédical. *OMS, Genève, Suisse* ; pp : 18-21.
- Guazzi M. D., Fiorentini C., Olivari M. T., Bartorelli A., Necchi G., Polese A., 1980.** Short and long term efficacy of a calcium-antagonist agent (Nifedipine) combined with methyldopa in the treatment of severe hypertension. *Circulation* ; **61** : p 913.
- Guede-Guina F. G., Attias J., 1977.** Inhibition de l'ATPase  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  microsomal du cerveau par des extraits de *Mansonia altissima*. *Acad Sci, Paris* ; **284** : 2159-2162.
- Guede-Guina F., Tsai C. S., Smith M. O., Vangah-Manda M., Washington B., Ochillo R. F., 1995.** The use of isolated functional heart to pharmacologically characterize active ingredients in the aqueous extracts of *Mareya micrantha*. *Journal of Ethnopharmacology* ; **45(1)** : 19-26.

- Guedeon J., 1987.** Prendre en charge et traiter un hypertendu. *Collection Tchobroutsky* ; 27 : 1-47.
- Guenard H., 1996.** Physiologie humaine. 2<sup>e</sup> édition (*Editions Pradel*) ; 570 p, p 175.
- Günther H., 1993.** La Spectroscopie de RMN : principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone<sup>13</sup> en chimie, Science de l'ingénieur. *Edition Masson, Paris, France, ISBN 978-2-225-84029-6* ; 558 p.
- Guidelines Subcommittee, 1999.** World Health Organization International Society of Hypertension. Guidelines for the management of Hypertension. *J Hypertens* ; 17 : 151-183.
- Guimaraes S., Moura D., 2001.** Vascular adrenoceptors ; an update. *Pharmacol Rev* ; 53: 319-356.
- Guindo I., 2005.** Etude du traitement traditionnel de l'hypertension artérielle au Mali. *Bamako, Thèse de Doctorat de Pharmacie, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie* ; 126 p.
- Gylling H., Miettinen T. A., 1996.** The effects of inhibiting cholesterol synthesis and absorption on cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic non-insulin dependent diabetic men. *J Lipid Res* ; 37 : 1776-1785.
- Hamon G., Castillon A., Gagnault J C., Worcel M., 1985.** Peripheral cardiovascular effects of tabernanthine tartrate in anaesthetized rats. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie* ; 276(1) : 60-72.
- Hamon M., Pellerin F., Guernet M., Mahuzier G., 1990.** Abrégé de chimie analytique. Tome 3 : méthodes spectrales et analyse organique. 2<sup>ème</sup> édition, *Masson (éd.), Paris, France* ; pp 88-89.
- Hansson L., Zanchetti A., Carruthers S. G., Dahlof B., Elmfeldt D., Julius S., 1998.** Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension : principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet* ; 351 : 1755-1762.
- Hartzell H. C., 1980.** Distribution of muscarinic acetylcholine receptors and presynaptic nerve terminals in amphibian hearts. *J Cell Biol* ; 86 : 6-20.
- He F. J., Markandu N. D., Mac Gregor G. A., 2005.** Modest salt reduction lowers blood pressure in isolated systolic hypertension and combined hypertension. *Hypertension* ; 46 : 66-70.

- Heinemann T., Axtmann G., von Bergmann K., 1993.** Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* ; **23** : 827-831.
- Hendriks H. F., Brink E. J., Meijer G. W., Princen H. M., Ntanios F. Y., 2003.** Safety of long-term consumption of plant sterol esters-enriched spread. *Eur J Clin Nutr* ; **57(5)** : 681-692.
- Hendriks H. F., Weststrate J. A., Van Vliet T., Meijer G. W., 1999.** Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* ; **53** : 319-327.
- Henson J. R., 1971.** Descartes and the ECG lettering series. *J Hist Med Allied Sci* ; pp 181-186.
- Herrera M. H., Rosas R. A., Crescente O. V., 2002.** Biological activity of “Sanguinaria” (*Justicia secunda*) extracts. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)* ; **40(3)** : 206-212.
- Hertog M. G., Feskens E. J., Hollman P. C., Katan M. B., Kromhout D., 1993.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen Elderly Study. *Lancet* ; **342(8878)** : 1007-1011.
- Hess M. E., Gabel B. E., 1979.** Dissociation between cardiac cycle AMP and myocardial contractility induced by verapamil, calcium and magnesium ions. *Cardiology* ; **64** : 75-86.
- Hess P., Lansmann J. B., Tsien R. W., 1984.** Different modes of a channel gating behavior favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* ; **311** : 538-544.
- Heusser K., Engeli S., Tank J., (2007).** Sympathetic vasomotor tone determines blood pressure response to long-term sibutramine treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* ; **92(4)** : 1560-1563.
- Heywood V. H., Brummitt R. K., Culham A., Seberg O., 2007.** Flowering plant families of the world. Plant people possibilities. *Royal Gardens, Kew, England* ; pp 23-24.
- Hinshaw J. V., Ettre L. S., 1994.** Introduction to open-tubular column gas chromatography. 3<sup>ème</sup> édition, *Advanstar (éd.), Cleveland, Ohio, USA*, ISBN 0-929870-25-5 ; pp 123-126.
- Hlaing T., DiMino T., Kowey P. R., Yan G. X., 2005.** ECG repolarization waves : their genesis and clinical implications. *Ann Noninvasive Electrocardiol* ; **10(2)** : 211-223.
- Ho D. S., Park J. G., Hata K., Day R., Heberman R. B., Whiteside T. L., 1990.** Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Res* ; **30** : 3681-3689.

- Hodgkin A. L., Horowic Z., 1960.** Potassium contractive action in single muscle fibers. *J Physiol London* ; **221** : 105-120.
- Horvath K., Jeitler K., Siering U., 2008.** Long-term effects of weight-reducing interventions in hypertensive patients, systematic review and meta-analysis. *Arch Int Med* ; **168** : 571-580.
- Hostettmann K., Marston M., Hostettmann M., 1998.** Preparative chromatography techniques. Applications in natural product isolation. 2<sup>nd</sup> édition, Springer Verlag, Berlin, Allemagne ; **53** : 10-11.
- Houghton P. J., Raman A., 1998.** Laboratory hand book for fractionation of natural extracts. Chapman et Hall, Londres, GB., 1<sup>ère</sup> éd. ; pp 29-31.
- Hu F. B., 2003.** Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease : an overview. *Am J Clin Nutr* ; **78**(3 Suppl) : 544S-551S.
- Hurst J. W., 1991.** Ventricular Electrocardiography. New York, NY, Gower Medical Publishing ; pp 5-26.
- Isah A. O., Olumese C., Omorogiuwa I., 1997.** Les possibilités d'accès aux médicaments antihypertenseurs : évolution des prix en 7 ans (1998-1994) dans les CHU Nigérian. *Cardiol Trop* ; **23** : 45-49.
- Ishii H., Itoh K., Nose T., 1980.** Different antihypertensive effects of nifedipine in conscious experimental hypertensive and normotensive rats. *Eur J Pharmacol* ; **64** : 21-99.
- Ito Y., 1982.** Counter-current chromatography. *Trend Biomed Sci* ; **7** : 47-50.
- Ito Y., Weinstein M., Aoki I., Harada R., Kimura E., Nunogaki K., 1994.** Preparative chromatography. Including 10<sup>th</sup> international symposium on preparative chromatography. *Journal of Chromatography A* ; **658**(2) : 315-341.
- Itsuo K., Kayazuyasu M., Ryoko S., Haruos H., Jungji T., 1996.** Electropharmacology of Ro22-9194, a new antiarrhythmic agent. *Gen Pharmac* ; **27**(5) : 755-760.
- Izzo J. L. Jr., Case D. B., 1995.** Drug treatment of hypertension. In : "Essentials of pharmacology". Edité par Smith C. M., Reynard A. M. W-B Saunders Compagny, Philadelphia, USA ; pp 278-295.
- Javorkova V., Pechanova O., Andriantsitohaina R., Vrbjar N., 2004.** Effect of polyphenolic compounds on the renal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase during development and persistence of hypertension in rats. *Experimental Physiology* ; **89**(1) : 73-81.
- Jeffery G. H., Bassett J., Mendham J., Denney R. C., 1989.** VOGEL's Textbook of Quantitative Chemical Analysis. 5<sup>ème</sup> édition, Longman Scientific & Technical (éd), UK, ISBN 0-582-44693-7 ; 545 p.

- Jiang H. D., Cai J., Xu J. H., Zhou X. M., Xia Q., 2005.** Endothelium-dependent and direct relaxation induced by ethyl acetate extract from *Flos Chrysanthemi* in rat thoracic aorta. *J Ethnopharmacol* ; **101** : 221-226.
- Johnston C., 1995.** Angiotensin II receptor antagonists : focus on losartan. *Lancet* ; **346** : 1403-1407.
- Jun-hua L., Wang W., Wen-juan F., Guang-nan W., 2006.** Effects of green tea polyphenols on blood pressure and serum lipid in rats with insulin resistance and its mechanism. *Yingyang Xuebao* ; **28**(6) : 494-497.
- Kadambe S., Murray R., Boudreaux-Bartels G. F., 1999.** Wavelet Transform-based QRS Complex Detector. *IEEE Trans Biomed Eng* ; **46**(7) : 838-848.
- Karaki H., Weiss S.A., 1988.** Calcium release in smooth muscle. *Life Sci* ; **42**(2) : 111-122.
- Kassi Y., 2009.** Effets pharmacologiques d'un extrait aqueux d'écorce de *Parkia biglobosa* (Mimosaceae), plante médicinale de la pharmacopée africaine, sur le système cardio-vasculaire de Mammifères. *Thèse de Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire* ; n° **512**, 157 p.
- Katan M. B., Grundy S. M., Jones P., Law M., Miettinen T., Paoletti R., 2003.** Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* ; **78**(8) : 965-978.
- Katzung B. G., 2006.** Pharmacologie fondamentale et Clinique. *Edition Piccin, Padoue, Italie, 7<sup>ème</sup> édition* ; 1150 p.
- Kawai C., Konishi T., Matsuyama E., Okazaki H., 1981.** Comparative effects of three calcium antagonists, Diltiazem, Verapamil and Nifedipine, on the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Circulation* ; **63** : p 1035.
- Kearney P. M., Whelton M., Reynolds K., Muntner P., Whelton P. K., 2005.** Global Burden of hypertension : analysis of worldwide data. *Lancet* ; **365** : 217-223.
- Keating M. T., Sanguinetti M. C., 2001.** Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* ; **104** : 569-580.
- Kent A. F. S., 1914.** A lecture on some problems in cardiac physiology. *Br Med J* ; **2** : 105-106.
- Keys A., Menotti A., Aravoris C., 1987.** The seven countries study 30 years of follow up from Framingham study. *JAMA* ; **257** : 2176-2180.
- Khosla T., Lowe C. R., 1972.** Obesity and smoking habits by social class. *Br J Prev Soc Med* ; **26** : 249-256.

- Klatsky A. L., Armstrong M. A., Friedman G. O., 1990.** Risk of cardiovascular mortality in alcohol drinkers, ex-drinkers and non drinkers. *Am J Cardiol* ; **66** : 1237-1242.
- Klein W. W., 1984.** Treatment of hypertension with calcium channel blockers : European data. *Am J Med* ; **77(4A)** : 143-146.
- Koffi A., 2007.** Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle à l'Institut de Cardiologie d'Abidjan. Abidjan (Côte d'Ivoire). *Rapport ICA* ; 6 p.
- Kone P. P., 1980.** Etude toxicologique, électrophysiologique et pharmacologique du venin de *Naja nigricolis* (Elapidé de Côte d'Ivoire) et d'une substance antivenimeuse de la pharmacopée traditionnelle africaine (extrait de *Securidaca longepedunculata*, Polygalacée). *Thèse de Doctorat d'Etat es-Sciences, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire* ; n° **58**, 172 p.
- Kouakou K. L., 2008.** Effets pharmacologiques d'une fraction active de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) sur le système cardio-vasculaire de Mammifères. *Thèse de Doctorat de l'Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire* ; n° **27**, 162 p.
- Kouakou K., 1994.** Etude de 200 cas d'HTA recensés aux urgences médicales du CHU de Cocody : aspect clinique, thérapeutique et évolutif. *Thèse de Doctorat de Médecine, Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire* ; n° **1579**, 144 p.
- Kramoh E. K., N'goran Y N. K., Aké-Traboulsi E., Anzouan-Kacou J-B., Traoré F., Agbechi Y. M., Guikahue M. K., 2011.** Hypertension management in an outpatient clinic at the Institute of Cardiology of Abidjan (Ivory Coast). *Archives of Cardiovascular Disease* ; **104** : 558-564.
- Krebs K.G., Heusser D., Wimmer H., 1969.** Spray reagents in thin layer chromatography. A Laboratory Handbook. *Stahl E. Eds., Translated by Ashworth, M.R.F. Springer-Verlag, New York, USA* ; pp 855-892.
- Krikler D. M., 1987.** Electrocardiography then and now. Where next ? *Br Heart J* ; **57** : 113-117.
- Kyosuke T., Kondo H., Hirano A., Kitazawa T., Aker T., 1991.** Ca<sup>2+</sup> entry blockers, force staircase and the onset of the positive inotropic action of cardiotonic steroids in isolated cardiac muscle. *Gen Pharmacol* ; **21(1)** : 33-39.
- L'Abbate A., Sambuceti G., Neglia D., 2002.** Myocardial perfusion and coronary microcirculation : from pathophysiology to clinical application. *J Nucl Cardiol* ; **9** : 328-337.
- Lacaille-Dubois M. A., Wagner H., 1996.** « A review of the biological and pharmacological activities of saponins ». *Phytomedicine* ; **2(4)** : 363-386.

- Landry Y., Gies J. P., 2009.** Pharmacologie. Des cibles vers l'indication thérapeutique. 2<sup>ème</sup> édition, Ed., Dunod, Paris, 531 p.
- Lands A. M., Arnold A., M. C. Auliff J. P., Luduena F. P., Brown T. G., 1967.** Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* ; **214** : 597-598.
- Lands A. M., Luduena F. P., Buzzo H. J., 1976.** Differentiation of receptor responsive to isoproterenol. *Life Sci* ; **6** : 2241-2249.
- Langendorff O., 1895.** Untersuchungen am überlebenden säugetierherzen. *Pflügers Arch* ; **61** : 291-339.
- Langer G. A., 1965.** Calcium exchange in dog ventricular muscle : relation to frequency of contraction and maintenance of contractility. *Circulation Res* ; **17** : 78-89.
- Lans C., 2007.** Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *J Ethnobiol Ethnomed* ; **15** : 3-13.
- Laurent S., Billaud E., Kreft-Jais C., 1994.** Antagonistes du calcium. Editions techniques. *Encycl Méd Chir (Paris-France), Cardiologie-Angéiologie* ; 11-906-A-10, 6 p.
- Lawes C., Vander Hoorn S., Rodgers A., 2008.** Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* ; **371** : 1513-1518.
- Leblanc M., Hume J. R., 1990.** Sodium current induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science wash DC* ; **284** : 372-376.
- Lechat P., 2006.** Pharmacologie. In : pharmacologie cardio-vasculaire. *Université Paris-VI* ; pp 115-139.
- Lechat P., Lagier G., Rouvex B., Vincent M., Weber S., 1982.** Abrégés de pharmacologie médicale. 4<sup>e</sup> édition, Masson, Paris ; pp 432-449.
- Legalerey P., 2001.** Inhibiteurs calciques. *Centre Universitaire Hospitalier de Besançon*. [http://www.besancon-cardio-org/cours/66-inhibiteurs-calciques, php](http://www.besancon-cardio-org/cours/66-inhibiteurs-calciques.php). 23/07/08.
- Lenfant J., Mironneau J., Gargouil Y. M., Galand G., 1968.** Analyse de l'activité électrique spontanée du centre de l'automatisme cardiaque de lapin par les inhibiteurs de la perméabilité membranaire. *C.R. Acad Sci, Paris* ; **266** : 901-904.
- Leoty C., 1971.** Relations entre les courants ioniques transmembranaires et la contraction du myocarde. *Thèse de Doctorat es-Sciences Naturelles, Université de Poitiers* ; n° **144**.
- Lepeschkin E., Katz L. N., Schaeffer H., Shanes A. M., Wiedman S., 1957.** Correlation between the electrocardiogram and the transmembrane action potential in potassium and calcium deficiency of mammalian heart. *Ann New York Acad* ; **65**: 942-949.

- Levi A. J., Spitzer K. W., Kohmoto O., Bridge J. H. B., 1994.** Depolarization-induced Ca entry via Na-Ca exchange triggers SR release in guinea-pig cardiac myocytes. *Am J Physiol* ; **226** (*Heart Circ Physiol*, **35**) : H1422-H1433.
- Li C., Zheng C., Tai C., 1995.** Detection of ECG Characteristic Points Using Wavelet Transforms. *IEEE Trans Biomed Eng* ; **42**(1) : 21-28.
- Ling W. H., Jones P. J., 1995.** Phytostérols et stanols complémentaires à une saine alimentation. *Life Sci* ; **57** : 195-206.
- Lompre A. M., De La Bastie D., Schwartz K., 1990.** Réticulum sarcoplasmique, biochimie et biologie moléculaire. *Rech Hypertrophie Insuff Card B Swynghedauw* ; pp 233-246.
- Longo M. B., 1995.** Diabète sucré et maladies cardio-vasculaires. *Cardiol Trop* ; **21**(82) : 37-44.
- Lorenzana-Jiménez M., Guerrero G. A. M., González X. G., Granados E. G., Cassani J., 2006.** Phytochemical and pharmacological preliminary study of the methanolic extract from *Struthanthus venetus* in cardiovascular system of anesthetized rat. *Pharmacologyonline* ; **3** : 359-364.
- Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., 1998.** Atlas de poche de pharmacologie. 2<sup>e</sup> Edition, Flammarion. Paris, France ; pp : 92-93, 122-123, 304-307.
- Lüttgau H. C., Niedergerke R., 1958.** The antagonism between Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> ions on the frog's heart. *J Physiol London* ; **143** : 486-505.
- Luo C. H., Rudy Y., 1994.** A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res* ; **74** : 1071-1096.
- Maeso R., Rodrigo E., Muñoz-García R. Navarro-Cid J., Ruilope L. M., Lahera V., Cachafeiro V., 1997.** Losartan reduces constrictor responses to endothelin-1 and the thromboxane A2 analogue in aortic rings from spontaneously hypertensive rats : role of nitric oxide. *Journal of Hypertension* ; **15**(12) : 1677-1684.
- Mahuzier G., Hamon M., 1997.** Chimie analytique. Tome 2 : Méthodes de séparation. 2<sup>ème</sup> édition, Masson (éd.), Paris, France, ISBN 2-225-83198-X ; 262 p.
- Mancini G. B., 1996.** Emerging concepts: angiotensin-converting enzyme inhibition in coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* ; **10**(2) : 609-12.
- Mandava N. B., Ito Y., Conway W. D., 1982.** Counter-current chromatography : recent instrumentation and application. *Am Lab* ; **14** : 48-57.
- Mann H., 1920.** A method of analyzing the electrocardiogram. *Arch Intern Med* ; **25** : 283-294.

- March R. E., 1997.** An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* ; **32** : 351-369.
- Marques-Vidal P., Ruidavets J. B., Amouyel P., Ducimetière P., Arveiler D., Montaye M., 2004.** Change in cardiovascular risk factors in France, 1985-1997. *Eur J Epidemiol* ; **19** : 25-32.
- Materson B. J., Reda D. J., Cushman W. C., 1993.** Single-drug therapy for hypertension in men. A comparison of six antihypertensive agents with placebo. *N Engl J Méd* ; **328** : 914-21.
- Maïga M., 1989.** Epidémiologie de l'hypertension artérielle en zone sahélienne dans le cercle de Nara (Mali). *Médecine d'Afrique Noire* ; **36(3)** : 234-237.
- Mbolla B. F. E., Gombet T., Kimbally-Kaky G., Dilou-Bassemouka L., Ikama M. S., 2010.** Coût du traitement médicamenteux de l'HTA. Etude portant sur les patients suivis en ambulatoire au Centre Hospitalier et Universitaire de Brazzaville. *Med Afr Noire* ; **55** (1) : 9-14.
- McQuarrie D. A., 1988.** Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Chem Educ* ; **65** : 426-433.
- Mea A., 2009.** Effets pharmacologiques d'un extrait aqueux de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvacée) ou « bissap » sur : les caractéristiques biophysiques du sang, le muscle intestinal et le système cardio-vasculaire chez les Mammifères. *Thèse de Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire* ; 192 p.
- Mensah N. A. G., 1992.** Etude comparative des effets de la mansonine et de la digoxine sur le système cardio-vasculaire du rat et du lapin. *Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle, Université d'Abidjan* ; n° **165**.
- Meyer P., 1978.** HTA : mécanisme, clinique et traitement. *Flammarion médecine-sciences, Paris* ; p 174.
- Meyer P., 1979.** Les facteurs génétiques de l'HTA. *Rev Prat* ; **55** : 4205-4208.
- Meyer R., Denier C., 1996.** Spectroscopie pratique dans le domaine du visible et de l'ultraviolet. *Bull Un Phys* ; **784** : 895-908.
- Michiru H., Quentin J. P., 2003.** Nifedipine facilitates neurotransmitter release independently of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci* ; **100(10)** : 6139-6144.
- Miller L. C., Tainter M. L., 1944.** Estimation of LD<sub>50</sub> and its error by means of logarithmic probit graph paper. *Proc Soc Exp Bio Med* ; **57** : 261-264.

- Moffat A. C., 1986.** Thin layer chromatography. In : CLARKE's isolation and identification of drugs ; Moffat A. C., Jackson J. V., Moss M. S. and Widdop B. *The Pharmaceutical Press, London , GB* ; pp 160-177.
- Moffat A. C., Jackson J. V., Moss M. S., Widdop B., 1986.** CLARKE's Isolation and Identification of Drugs. 2<sup>ème</sup> édition, *The Pharmaceutical Press (éd.), London, GB* ; p 983.
- Monane M., Bohn R. L., Gurwitz J. H., Glynn R. J., Levin R., Avorn J., 1997.** The effects of initial drug choice and comorbidity on antihypertensive therapy compliance : results from a population based study in the elderly. *Am J Hypertens* ; **10** : 697-704.
- Monner D. A., 1988.** An assay for growth of mouse bone marrow cells in microtiter liquid culture using the tetrazolium salt MTT, and its application to studies of myelopoiesis. *Immunology Letters* ; **19** : 261-268.
- Morad M., Goldman Y., 1973.** Excitation-contraction coupling in heart muscle ; membrane control of development of tension. *Prog Biophys Mol Biol* ; **27** : 257-313.
- Mosmann T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* ; **65** : 55-63.
- Moswa J. L., Kapanda N., Mungende D. M., Okitolonda W., Mayangi M., Mihigo S., Mbale K., 2008.** Plants as an important source of iron for the treatment of anaemia : case of *Justicia secunda*. 11<sup>th</sup> NAPRECA Symposium Book of Proceedings, *Antananarivo, Madagascar* ; pp 132-135.
- Motte G., Dinanian S., Sebag C., Slama M., 1996.** Antiarythmiques. *Encycl Méd Chir Paris, France. Cardiologie-Angéiologie* ; 11-904-A-10, 8 p.
- Moulin M. et Coquerel A., 2002.** Pharmacologie. 2<sup>ème</sup> édition, *Edition Masson, Paris, France* ; pp : 371-378, 483-492.
- Mpiana P. T., Ngbolua K. T. N. N., Bokota M. T., Kasonga T. K., Atibu E. K., Tshibangu D. S. T., Mudogo V., 2010.** *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood Transfus* ; **8** : 248-254.
- Mukamel S., 2000.** Multidimensional femtosecond correlation spectroscopies of electronic and vibrational excitations. *Annual review of physics and chemistry* ; **51** : p 691.
- Mulrow P. J., 1998.** Detection and control of hypertension in the population. The United States Experience. *Am J Hypertens* ; **11** : 744-746.
- Munier R. L., 1972.** Principles of chromatographic methods. *Azoulay (éd.), Paris, France* ; 173 p.

- Murayama W., Kobayashi T., Kosuge Y., Yano H., Nunogaki Y., Nunogaki K., 1982.** A new centrifugal counter-current chromatography and its application. *J Chromatogr* ; **239** : 643-649.
- Murphy R. C., Johnson K. M., 2008.** Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J Biol Chem* ; **283**(23) : 15521-15525.
- Murray C. J., Lopez A. D., 1997.** Global mortality, disability, and the contribution of risk factors : global burden of disease study. *Lancet* ; **349** : 1436-1442.
- Nakanishi K., Occolowitz J. L., 1979.** Applications of Mass Spectrometry in Structural Studies of Bioactive Compounds. *Phil Tran R Soc Lond* ; **A293** : 3-11.
- Nargeot J., 1978.** Etude électrophysiologique du récepteur cholinergique des fibres myocardiques. *Thèse de Doctorat ès Sciences, spécialité Physiologie Animale, Université François-Rabelais de Tours, France* ; 211 p.
- Naseri M. K. G., Arabian M., Badavi M., Ahangarpour A., 2008.** Vasorelaxant and hypotensive effects of *Allium cepa* peel hydroalcoholic extract in rat. *Pak J Biol Sci* ; **11**(12) : 1569-1575.
- Nathanson N. M., 1987.** The action of muscarinic agonists and antagonists in frog atrial fibers. Electrophysiological studies. *J Pharma* ; **13**: 431-451.
- Nelson E., Arcuri K., Ikeda L., Snavely D., Sweet C., 1992.** Efficacy and safety of losartan in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* ; **5** : A19-20.
- Nguyen H. T., Babeau A., Rouillon J. C., Sigaud G., Isaert N., Bougrioua F., 1996.** Stability of the TGB phases in series of non-fluorinated and fluorinated mesogens. *Ferroelectrics* ; **179** (1-4, Proceedings of the Fifth International Conference on Ferroelectric Liquid Crystals, 1995, Pt. 2) : 33-50.
- Nicholls M. G., Crozier I. G., Ikram H., Richards A. M., 1997.** Angiotensin II type-I receptor antagonists in the treatment of heart failure. *Int J Cardiol* ; **62**(1) : S13-S17.
- Niedergerke R., Lüttgau H. C., 1957.** Calcium and the contraction of the heart. Antagonism between calcium and sodium ions. *Nature* ; **179** : 1066-1067.
- Niedergerke R., Orkand R. K., 1966.** The dependence induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science wash DC*. **284**: 372-376.
- Niessen W. M. A., 1999.** Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Chapter 14 : Natural Products and Endogenous Compounds. *2nd edition, M. Dekker, New York* ; pp 465-500.
- Niessen W. M. A., 2000.** Structure elucidation by LC-MS. *Analysis* ; **28**(10) : 885-887.

- Nisoli E., Tonello C., Landi M., Carruba M. O., 1996.** Functional studies of the first selective  $\beta_3$ -adrenergic receptor antagonist SR 59230A in rat brown adipocytes. *Mol Pharmacol* ; **49**(1) : 7-14.
- Norton D., Crow B., Bishop M., Kovalcik K., George J., Bralley J. A., 2007.** High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) assay for chiral separation of lactic acid enantiomers in urine using a teicoplanin based stationary phase. *J chromatogr B* ; **850**(1-2) : 190-198.
- Novak M., Heinrich J., 1993.** GC/MS Experiments for the Organic Laboratory. Part 2 : Friedel-Crafts Alkylation of p-Xylene. *J Chem Ed* ; **70** : A150-A154.
- Nuss H. B., Houser S. R., 1992.** Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* ; **263** (*Heart Circ Physiol*, **32**) : H1161-H1169.
- Odi A., 1986.** HTA et facteurs de risques cardio-vasculaires en Côte d'Ivoire. *Cardiologie tropicale*, **12** : 47-50.
- Ojewole J. A. O., 2005.** Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. Methods and Findings. *Experimental and Clinical Pharmacology* ; **27**(10) : 689-695.
- Oka F., Oka H., Ito Y., 1991.** Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr* ; **538** : 99-108.
- OMS, 1998.** Communiqué OMS/39. Assemblée Mondiale de la santé : les maladies non transmissibles ont une priorité mondiale.
- OMS, 1999-a.** Le message fort des recommandations. *Cardio-vasculaire, Ed Eval*, **361** : 149-157.
- OMS, 1999-b.** International Society of Hypertension. Guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens* ; **17** : 151-183.
- OMS, 2000.** Résolution du Comité Régional de l'Afrique AFR/RC50/R3 31 Août 2000 : promouvoir le rôle de la médecine traditionnelle dans les systèmes de santé. Stratégie de la région africaine (3).
- OMS, 2002.** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. *OMS, Genève* ; 74 p.
- OMS, 2005.** Enquête STEPS : enquête sur les facteurs de risque des maladies non transmissibles - 2005 Côte d'Ivoire. <http://www.who.int/chp/steps/Cotedivoire 2005.pdf>. p 12.
- OMS, 2010.** Rapport de l'OMS sur la santé dans le monde en 2010. *OMS, Genève* ; 120 p. [www.who.int/whr/2010/fr/index.html](http://www.who.int/whr/2010/fr/index.html).

- Oparil S. M. D., Guthrie R. M. D., 1998.** An elective-titration study of the comparative effectiveness of two angiotensin II-receptor blockers, irbesartan and losartan. *Clinical Therapeutics* ; **20**(3) : 398-409.
- Ouedraogo N., 2003.** L'hypertension artérielle en milieu urbain ouest africain (Ouagadougou/Burkina Faso) : étude transversale communautaire de la prévalence et des facteurs associés. *Ouagadougou, Thèse de Doctorat de Médecine, UFR des Sciences de la Santé*, 2003 ; n° **90**.
- Overgaard J., Wang T., Nielsen. B., Gesser H., 2005.** Extracellular determinants of cardiac contractility in the cold, anoxic turtle. *Physiol Biochem Zool* ; **78** : 976-995.
- Partouche H., 2001.** Les inhibiteurs calciques : des antihypertenseurs de troisième ligne. *La Revue Prescrire*, Tome 21; **217** : 372-375.
- Patel A., MacMahon S., Chalmers J., 2007.** Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus : a randomised controlled trial. *Lancet* ; **370** : 829-840.
- Peralta E. G. Winslow J. W., Ashkenazi A., 1988.** Structural basis of muscarinic acetylcholine receptor subtype diversity. *Trends Pharmacol Sci* ; **suppl. III**, subtypes of muscarinic receptors : 6-11.
- Peralta E. G. Winslow J. W., Peterson G. L., 1987.** Primary structure and biochemical properties of an M<sub>2</sub> muscarinic receptor. *Science* ; **236** : 600-605.
- Perrier E., Perrier R., Richard S., Benitah J. P., 2004.** Ca<sup>2+</sup> control functional expression of the cardiac K<sup>+</sup> spark amplitude but enhance [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient outward current via the calcium pathway. *J Biol Chem Am J Physiol Heart Circ* ; **286**(6) : 2065-2071.
- Pettit G. R., Doubek D. L., Herald D. L., 1991.** « Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the african medicinal plant *Balanites aegyptiaca* ». *Journal of Natural Products* ; **54**(6) : 1491-1502.
- Pieri F., Kirkiacharian S., 1992.** Pharmacologie et thérapeutique. *Ellipses 2<sup>e</sup> éd., Paris* ; pp 195-224.
- Pipberger H. V., McManus C. D., Pipberger H. A., 1990.** Methodology of ECG interpretation in the AVA program. *Meth Inform Med* ; **29** : 337-340.
- Pizzoferrato A., Ciapetti G., Stea S., 1994.** Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* ; **15** : 173-190.
- Potterat O., 1997.** Antioxydants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry* ; **1** : 415-440.

- Pousset J. L., 1989.** Plantes médicinales africaines. Utilisations pratiques. *Ed. Ellipses, ACCT* ; pp 3-12.
- Prieto M., de Abajo F. J., Montero D., Martin-Serrano G., Madurga M., Palop R., 1998.** Use of antihypertensive drugs in Spain, 1985-1995. *Medicina Clinica* ; **110(7)** : 247-253.
- Qing Li G., Blevins D. D., 2004.** Séparez 5 alcaloïdes en moins de 8 minutes. *Med Res Rev* ; **12(1)** : 1-26.
- Quevauviller A., Hamonniere M., 1977.** Activity of the principal alkaloids of *Polyalthia oliveri* Engler (Annonaceae) on the central nervous system and the cardiovascular system. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles* ; **284(1)** : 93-96.
- Quyyumi A. A., 1998.** Endothelial function in health and disease : new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* ; **105** : 32S-39S.
- Randerath K., 1971.** Chromatographie sur couches minces. 2<sup>ème</sup> édition, éditions Gauthier-Villars, Paris, France ; 398 p.
- Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Gardner P., 2001.** Noradrenergic transmission. In : *Pharmacology. Churchill Livingstone, New York, NY, USA, 4<sup>th</sup> edition* ; pp 139-163.
- Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Frappier F., 1996.** Recent results on the pharmacodynamics of *Strychnos malgaches* alkaloids. *Madagascar Sante* ; **6(4)** : 249-253.
- Reiter M., Seebel K., Stickel F. J., 1971.** Sodium dependence of the inotropic effect of a reduction in extracellular potassium concentration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmak* ; **268** : 361-378.
- Renault J. H., Zeches-Hanrot M., 1995.** La chromatographie de contre-courant : une technique d'avenir pour la purification des substances naturelles. *Spectra Analyse* ; **187** : 33-40.
- Renault J. H., Nuzillard J. M., Intes O., Maciuk A., 2002.** Solvent systems. In : Berthod A. (ed.), *Comprehensive analytical chemistry - The support free liquid stationary phase. Wilson & Wilson's, Paris, France* ; **38** : 49-83.
- Reuter H., Seitz N., 1968.** The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol London* ; **195** : 451-470.

- Richard S., Perrier E., Fauconnier S., Pereira L., Gomez A. M., Benitah J. P., 2007.** “Ca<sup>2+</sup> induced Ca<sup>2+</sup> entry” or how the L- type Ca<sup>2+</sup> channel remodels its own signaling pathway in cardiac cells. Progress in biophysics and molecular biology. *Elsevier, Oxford. R.U.* ; **90**(1-3) : 118-135.
- Richer C., Schwebig A., Couidicelli J., Mennard J., 1984.** Les IEC. *Semaine des hôpitaux* ; **21** : 1495-1509.
- Rodriguez-Rodriguez R., Herrera M. D., Perona J. S., Ruiz-Gutiérrez V., 2004.** Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in "orujo" olive oil, on rat aorta. *Br J Nutr* ; **92** : 635-642.
- Roffman D. S., 1998.** Angiotensin II receptor antagonists : improving selectivity in the management of hypertension. *Pharmacy Practice* ; **23**(2) : 131-140.
- Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M., 2009.** Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* ; **1788**(1) : 97-121.
- Rojas J. J., Ochoa V. J., Ocampo S. A., Muñoz J. F., 2006.** Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine : a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Compl Alter Med* ; **17** : 6-12.
- Ross R., 1993.** The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* ; **362** : 801-809.
- Rosset R., Caude M., Jardy A., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. 2<sup>ème</sup> édition, *Masson (éd.), Paris, France*, ISBN 978-2-225-85126-1 ; 374 p.
- Roussignol P., Le Coz S., Plouin P-F., 2004.** Apport des essais thérapeutiques récents pour le traitement de l'hypertension artérielle essentielle. *Rev Prat* ; **54**(6) : 626-632.
- Rouessac F., Rouessac A., 2004.** Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6<sup>ème</sup> édition, *Dunod (éd.), Paris, France* ; 462 p.
- Rougier O., Vassort G., Garnier D., Gargouil Y. M., Coraboeuf E., 1968.** Données nouvelles concernant le rôle des ions Na<sup>+</sup>, et Ca<sup>2+</sup> sur les propriétés électrophysiologiques des membranes cardiaques : Existence d'un canal lent. *C.R. Acad Sci, Paris* ; **266** : 802-805.
- Roupie E., Berdeaux A., 1992.** Biological functions of vascular endothelium. Pathophysiological implications. *Rev. Réanimation Urgences* ; **1**(2) : 263-270.
- Royer R., 1985.** Physiologie et pharmacologie de l'innervation végétative cardiaque et vasculaire. *Encyl Méd Chir (Paris, France), Card* ; **13** : 805-845.

- Safar M., 1985.** Les inhibiteurs calciques dans le traitement de l'hypertension artérielle. *Edité par PIL ; 51 p.*
- Sarafidis P. A., Bakris G. L., 2008.** Resistant hypertension : An overview of evaluation and treatment. *J Am Coll Cardiol ; 52 : 1749-1757.*
- Schaller H., 2003.** The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res ; 42 : 163-175.*
- Schmitz J. M., Graham R. M., Sagalowsky A., Pettinger W. A., 1981.** Renal  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenergic receptors : biochemical and pharmacological correlations. *J Pharmacol Pharmacol Exp Ther ; 219(2) : 400-406.*
- Schwinger R. H. G., Böhm M., Erdmann E., 1990.** Negative inotropic properties of Isradipin, Nifedipin, Diltiazem and Verapamil in diseased human myocardium tissue. *J Cardiovasc Pharmacol ; 15 : 892-899.*
- Segal S. S., 2005.** Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation ; 12 : 33-45.*
- Seyedi N., Xu X., Najletti A., Hintze T., 1995.** Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension ; 26 : 164-170.*
- Sham J. S. K., Cleemann L., Morad M., 1992.** Gating of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  release channel : the role of  $\text{Na}^+$  current and  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Science Wash DC ; 255 : 850-853.*
- Silbernagl S., Despopoulos A., 2000.** Atlas de poche de physiologie. *Editions Flammarion et Cie, Paris, France ; pp 154-181.*
- Silverstein R. M., Basler G. C., Morill T. C., 1998.** Identification spectrométrique de composés organiques. *De Boeck & Larcier S.A., Paris, France ; pp 3-89.*
- Skehan P., Stroeng G., Scuderio G., 1990.** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst ; 82 : 1107-1110.*
- Skou J. C., 1988.** Overview : the Na-K pump. In : *Methods in Enzymology. 156 part P. ATR-driven pumps and related transport ; the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -pump. Eds Colowicks P. and Kaplan N.O., Academic Press INC, San Diego ; pp 1-25.*
- Slacanin I., Marston A., Hostettmann K., 1989.** Modifications to a highspeed counter-current chromatograph for improved separation capability. *J Chromatogr ; 482 : 234-239.*
- Slonick A. E., Frishman W. H., 1989.** Calcium channel blockers myocardial infarction. *Arch Intern Med ; 149 : 1669-1677.*

- Snellen H. A., 1995.** Willem Einthoven (1860-1927) : father of electrocardiography. Dordrecht, Netherlands, *Kluwer Academic Publishers* ; pp 23-27.
- Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L., 1997.** Practical HPLC method development. 2<sup>nd</sup> ed., *John Wiley and Sons*, ISBN 0-471-00703-X ; 542 p.
- Souza A., 2005.** Contribution à la mise en évidence des mécanismes d'action pharmacologiques de ABS, une recette médicinale anti-hémorroïdaire de la pharmacopée africaine, sur le système cardio-vasculaire et le muscle lisse intestinal de Mammifères. *Thèse de Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire* ; n° 417, 155 p.
- Sparg S. G., Light M. E., Van Staden J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* ; **94** : 219-243.
- Spedding M., 1985.** Calcium antagonists subgroups. *Trends Pharmacol Sci* ; **6** : 109-114.
- Spitsmeister M., Adamberg K., Vilu R., 2010.** UPLC/MS based method for quantitative determination of fatty acid composition in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods* ; **82**(3) : 288-295.
- Srinivas N., Rambabu G., Behara S. R. B., Durga S. L., Krishna M. B., 2003.** Possible mechanisms of hypotension produced by 70 % alcoholic extract of *Terminalia arjuna* (L.) in anaesthetized dogs. *BMC Compl Alter Med* ; **3** : 5.
- Srividya N., Periwals S., 1995.** Diuretic, hypotensive and hypoglycaemic effect of *Phyllanthus amarus*. *Indian J Exp Biol* ; **33** (11) : 861-864.
- Steinberg D., 1997.** Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry* ; **272**(34) : 20963-20966.
- Stoll L. L., Spector A. A., 1989.** Interaction of platelet- activating factor with endothelial and vascular smooth muscle cells in coculture. *J. Cell. Physiol* ; **139** : 253-261.
- Strazzullo P., D'Elia L., Kandala N-B., Cappuccio F. P., 2009.** Salt intake, stroke, and cardiovascular disease : meta-analysis of prospective studies. *British Medical Journal* ; **339** : b4567.
- Sudesh V., Vicki G., 2005.** Antioxidants in the treatment of hypertension. *International Journal of Angiology* ; **14** : 60-73.
- Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K., 1994.** A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shell fish. *Brusci Brotech-Brochem* ; **58** : 1780-1783.

- Tangirala R. K., Casanada F., Miller E., Witztum J. L., Steinberg D., Palinski W., 1995.** Effect of the antioxidant N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology* ; **15**(10) : 1625-1630.
- Thomas L. J., 1960.** Increase of labelled calcium uptake in heart muscle during potassium lack contracture. *J Gen Physiol* ; **43** : 1193-1206.
- Tossou R., Gbenou J. D., Dansou P., Fossou M., Moudachirou M., 2008.** Etude des propriétés antianémiques de *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae) chez des rats de souche Wistar. *Rev CAMES, Série A* ; **6** : 26-29.
- Touyz R. M., Schiffrin E. L., 2000.** Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* ; **52** : 639-672.
- Tra BI F. H., Irié G. M., N'gaman K. C. C., Mohou C. H. B., 2008.** Etudes de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sciences et Nature* ; **5**(1) : 39-48.
- Trahms L., Burghoff M., 2010.** NMR at very low fields. *Magn Reson Imaging* ; **28**(8) : 1244-1250.
- Tranchant J., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4<sup>ème</sup> édition, Masson (éd), Paris, France ; 700 p.
- Traore F., Soro T. Y., Nene-Bi S. A., Souza A., 2002.** Etudes toxicologiques de *Swartzia madagascariensis* (Cesalpiniaceae) et d'*Erythrina senegalensis* (Fabaceae). *Rev Iv Sci Tech* ; **3** : 141-151.
- Trautwein E. A., Demonty I., 2007.** Phytosterols : natural compounds with established and emerging health benefits. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* ; **14**(5) : 259-266.
- Trautwein E. A., Duchateau G. S. M. J. E., Lin Y., Mel'nikov S. M., Molhuizen H. O. F., Ntanos F. Y., 2003.** Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol* ; **105** : 171-185.
- Trevañ J. W., 1927.** The error in determination of toxicity. *Proc Roy Soc* ; **101**(b) : 483-514.
- Tsunoda K., Abe K., Hagino T., 1993.** Hypotensive effect of losartan, a non-peptide angiotensin II receptor antagonist in essential hypertension. *Am J Hypertens* ; **6** : 28-32.
- Tufro-McReddie A., Johns D., Geary K., 1994.** Angiotensin II type receptor : role in renal growth and gene expression during normal development. *Am J Physiol* ; **266** : F911-F918.

- Vassale M., 1965.** Cardiac pacemaker potentials at different extra and intra cellular  $K^+$  concentrations. *Am J Physiol* ; **208** : 770-775
- Vassort G., Rougier O., 1972.** Membrane potential and slow inward current dependence of frog cardiac mechanical activity. *Pflügers Arch* ; **331** : 191-203.
- Vaughan-Williams E. M., 1970.** Classification of antiarrhythmic drugs. In «Cardiac Arrhythmias». *Sodertalje, Astra* ; 449-472.
- Vaughan-Williams E. M., 1984.** A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of a new drugs. *J Clin Pharmacol* ; **24** : 129-147.
- Vaya J., Schipper H. M., 2007.** Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem* ; **102**(6) : 1727-1737.
- Vernin G., 1970.** La chromatographie en couche mince. Techniques et applications en chimie organique. *Dunod (éd.), Paris, France* ; 178 p.
- Vollhardt K. P. C., Schore N. E., 1994.** Traité de chimie organique. 2<sup>ème</sup> édition, *De Boeck-Wesmael S. A., Bruxelles, Belgique* ; pp : 324-363, 796-809.
- Waeber B. J., 1998.** Traitement de l'HTA : un aperçu des nouvelles recommandations. *Med Hyg* ; **57** : 1615-1616.
- Waeber B. J., Nussberger H., Brunner, 1990.** Les antihypertenseurs. Pharmacologie médicale. 5<sup>e</sup> édition, *Masson* ; pp 127-200.
- Waeber B., Burnier M., Brunner H. R., 1999.** Le point sur le traitement de l'hypertension artérielle. *Schweiz Med Wochenschr* ; **129** : 14-16
- Wagner H., Bladt S., 2001.** Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. 2<sup>ème</sup> édition, *Springer (éd), Berlin, Heidelberg, Allemagne* ; 384 p.
- Wagner H., Bladt S., Zgainski E. M., 1984.** Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo*, 320 p.
- Walinjorn F.T., Face P., 2000.** L'hypertension : un fléau pour le 21<sup>e</sup> siècle en Afrique subsaharienne. Quelles sont les actions nécessaires ? *Pharmacien d'Afrique* ; **135** : 9-13.
- Waller A. D., 1887.** A demonstration on man of electromotive changes accompanying the heart's beat. *J Physiol* ; **8** : 229-234.
- Wang D. Q., 2007.** Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* ; **69** : 221-248.
- Wei K., Kaul S., 2004.** The coronary microcirculation in health and disease. *Cardiol Clin* ; **22** : 221-231.
- Wellens H. J. J., 1986.** The electrocardiogram 80 years after Einthoven. *J Am Coll Cardiol* ; **7** : 484-491.

- Westfall T. C., Westfall D. P., 2006.** Adrenergic agonists and antagonists. In : L. L. Brunton, J. S. Lazo, and K. L. Parker (eds) Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. *McGraw-Hill, New York, USA, 11<sup>th</sup> edition* ; pp 237-295.
- Wever R. M. F., Luscher T. F., Cosentino F., Rabelink T. J., 1998.** Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* ; **97** : 108-112.
- Whelton S. P., Chin A., Xin X., He J., 2002.** Effect of aerobic exercise on blood pressure : a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Int Med* ; **136** : 493-503.
- Witchitz S., 1994.** Bêta-bloqueurs. Editions Techniques. *Encycl Méd Chir Paris, France. Cardiologie-Angéiologie* ; 11-903-A-10, 7 p.
- Wiysonge C. S., Bradley H., Mayosi B. M., Maroney R., Mbewu A., Opie L. H., Volmink J., 2007.** Beta-blockers for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* ; **24(1)** : CD002003.
- Wong W., 1976.** Some folk medicinal plants from Trinidad. *Economic Botany* ; **30** : 103-142.
- Woodman O. L., Vatner S. F., 1987.** Coronary vasoconstriction mediated by  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in conscious dogs. *Am J Physiol* ; **253(2 Pt 2)** : H388-H393.
- Xavier G., 1999.** Monographie hypertension artérielle essentielle. *La revue du Praticien* ; **49** : 473-535.
- Xavier G., 2005.** Guide pratique de l'hypertension. *Paris, Editions Masson* ; 209 p.
- Xue J., Chen Y., Han X., Gao W., 2010.** Electrocardiographic morphology changes with different type of repolarization dispersions. *J Electrocardiol* ; **43(6)** : 553-559.
- Yan G.-X., Lankipalli R. S., Burke J. F., Musco S., Kowey P. R., 2003.** Ventricular repolarization components on the electrocardiogram : cellular basis and clinical significance. *J Am Coll Cardiol* ; **42(3)** : 401-409.
- Yiannakopoulou E. Ch., Papadopoulos J. S., Cokkinos D. V., Mountokalakis T. D., 2005.** Adherence to antihypertensive treatment : a critical factor for blood pressure control. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* ; **12** : 243-249.
- Young T. M., 1975.** NMR studies of succussed solutions : a preliminary report. *J Amer Inst Hom* ; **68** : 8-16.
- Zalba G., Beaumont F. J., San Jose G., Fortuno A., Fortuno M. A., Etayo J. C., Diez J., 2000.** Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* ; **35(5)** : 1055-1061.
- Zeiher A. M., 1996.** Endothelial vasodilator dysfunction : pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomena ? *Lancet* ; **348** : 510-512.

**Zhu T. G., Patel C., Martin S., Quan X., Wu Y., Burke J. F., Chernick M., Kowey P. R., Yan G.-X., 2009.** Ventricular transmural repolarization sequence : its relationship with ventricular relaxation and role in ventricular diastolic function. *Eur Heart J* ; **30**(3) : 372-380.