

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION -DISCIPLINE-TRAVAIL

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE
DE COCODY-ABIDJAN



UFR BIOSCIENCES
LABORATOIRE DE PHARMACODYNAMIE-
BIOCHIMIQUE
B.P. 582 ABIDJAN 22 (RCI)
Tél/Fax : (225) 22 44 03 07 ; (225) 22 44 37 24



N° d'ordre.....

THESE

Présentée pour l'obtention du
DOCTORAT TROISIEME CYCLE
SPECIALITE PHARMACOLOGIE-BIOCHIMIQUE

Par

YAPO ADOU

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE BIOCHIMIE

Thème

PROSPECTION DANS LE MECANISME
BIOCHIMIQUE DE L'ACTION
CARDIOVASCULAIRE DE MAÏ-BAO
(CHAMPIGNON THE-TRESOR) PAR
SEQUENÇAGE CHROMATOGRAPHIQUE

Soutenue à Abidjan le 16 Décembre 2003

COMPOSITION DU JURY

Président du jury : OFFOUMOU ATTE MICHEL

Directeur de thèse : GUEDE-GUINA FREDERIC

Examineurs :

***KONE PENAHOURE**

***OTOKORE DAMA ALBERT**

Professeur Titulaire

Professeur Titulaire

Maître de Conférence

Maître-Assistant

AVANT PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique et au Laboratoire de Physiologie Animale de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody sous la direction du Professeur GUÉDÉ-GUINA FREDERIC

REMERCIEMENTS

◆ Le Professeur **GUÉDÉ-GUINA FRÉDÉRIC**

Professeur Titulaire de Biochimie.

Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody.

Non seulement Vous m'avez accepté dans votre Laboratoire, mais vous avez aménagé le thème de ce travail et l'avez orienté afin qu'il puisse être soutenu. Vous n'avez ménagé aucun effort malgré vos multiples occupations pour suivre et contribuer étroitement à l'élaboration définitive de cette présente thèse. Trouvez ici Monsieur le Professeur, l'expression de ma profonde reconnaissance.

◆ Docteur **OTOKORÉ DAMA ALBERT**

Docteur, Maître Assistant, Directeur Adjoint du Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody.

Vous avez été celui qui a cru en moi. Vous avez été celui qui a guidé mes premiers pas dans la recherche. Seul vous, saurez me raconter aux autres.

C'est vous qui aviez accepté de m'encadrer depuis le DEA. Et m'aviez présenté au Professeur **GUÉDÉ-GUINA FRÉDÉRIC** afin que je pusse être membre de son Laboratoire. C'est encore vous qui m'aviez proposé le thème de ce travail qui a été par la suite aménagé par le Professeur **GUÉDÉ-GUINA FRÉDÉRIC**. Vous avez par la même occasion suivi de cette thèse. Je ne sais comment vous remercier, si ce n'est que de trouver ici ma déférente reconnaissance et ma profonde gratitude.

◆ Professeur **OFFOUMOU ATTÉ MICHEL**

Professeur Titulaire de Physiologie Animale.

Directeur du Laboratoire de Nutrition et pharmacologie de l'UFR BIOSCIENCES de l'Université de Cocody.

Votre disponibilité et vos conseils ont été d'un apport très appréciable à l'élaboration de ce présent travail. Je tiens à vous remercier sincèrement du fond du cœur.

◆ Professeur **BAKAYOKO LY RAMATA**

Professeur titulaire d'Odonto Stomatologie.

Vice-Présidente de l'Université de Cocody.

C'est un honneur que vous me faites en acceptant de participer au jury de cette thèse.
Votre Jugement éclairé me permettra d'apprendre d'avantage
Soyez assurée de l'expression de mon sincère et profond respect.

◆ Feu Professeur **KONE PENAHOURE PASCAL**

Maître de Conférences de Physiologie Animale.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos qualités d'enseignant au cours de notre cursus universitaire. Je suis très heureux de vous compter dans le jury de cette thèse afin que sur elle, rejaillissent vos qualités.

Je vous témoigne mon infinie reconnaissance

◆ Professeur **AKA KADJO JUSTIN**

Maître de Conférences de Physiologie Animale.

Directeur du Laboratoire de Physiologie Animale de l'UFR BIOSCIENCES de l'Université de Cocody.

Vous qui avez accepté qu'une partie de ce travail se déroule dans votre Laboratoire, et vous dont les enseignements nous ont permis de mieux comprendre les techniques physiologiques afin de mieux réaliser ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

◆ Professeur **DIPOH KORÉ JACQUES**

Professeur Titulaire de Biochimie.

Doyen Honoraire de l'Université de Cocody.

Directeur du Laboratoire de Biotechnologies de l'UFR BIOSCIENCES de l'Université de Cocody.

Vous avez contribué à notre formation de biochimiste. Bon enseignant, bon chercheur et bon administrateur, vous êtes resté un modèle pour nous. Trouver ici ma déférente admiration.

◆ Professeur **KOUASSI BOHOUSSOU**

Maître de Conférences de Biochimie.

Votre disponibilité et votre soutien moral ont été d'un très grand apport dans la réalisation de ce travail. Soyez en remercié.

◆ Professeur **AGBO N'ZI GEORGES**

Professeur Titulaire de Biochimie.

Directeur du Laboratoire de Biotechnologie et Sciences de Aliments de l'UFR BIOSCIENCES de l'Université de Cocody.

Votre sincère collaboration et votre soutien moral m'ont été bénéfiques. Trouvez ici mon infinie reconnaissance.

◆ Docteur **AKA YEBOUA FRANÇOIS,**

Maître Assistant à l'UFR BIOSCIENCES de l'université de Cocody pour ses encouragements.

◆ Docteur **ABO KOUAKOU JEAN CLAUDE**

Maître Assistant de Physiologie Animale.

Vous m'aviez initié aux techniques d'isolement du cœur de rat et d'enregistrement de la pression artérielle de lapin. Vous avez constamment suivi avec rigueur ce travail et apportez des conseils pertinents. Veuillez trouver ici ma profonde reconnaissance.

◆ **Docteur N'GUESSAN JEAN DAVID**

Maître Assistant de Biochimie.

Pour toi, j'ai été profondément satisfait des remarques justes que tu as apportées à ce travail. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

◆ Le Professeur **DJAMAN Allico Joseph** et les Docteurs **DIOMANDÉ Mahama, BAH Calixte, GUÉDÉ Zihiri, EZOUA Pierre, SORO Yadé René, KOUAMÉ Désiré, CHATIGRE Kouamé, M'BAÏASBÉ Yotilmaye Justine, KRA Adou Mathieu, TRÉBISSOU David Noël, NIAMKÉ Lamine Sébastien, BIÉGO, KAROU Tago Germain**, enseignants à la filière Biochimie-Microbiologie de l'UFR BIOSCIENCES de l'Université de Cocody.

Vous avez été des modèles pour moi de par vos conseils et votre sociabilité. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

◆ Les Professeurs **KATI Coulibaly Séraphin., DATTÉ Yao J et TRAORÉ Flavien**, et les Docteurs **KOUAMÉ Koffi G., AMOIKON Kouakou E., . et ADOU Kobéna Fiéni**, enseignants à l'UFR BIOSCIENCES de l'Université de Cocody.

Vous m'avez accueilli chaleureusement dans votre Laboratoire et m'aviez aidé à comprendre certains mécanismes physiologiques, je ne saurais trouver les mots justes pour vous remercier. Trouvez ici ma profonde gratitude.

◆ Messieurs **OULAÏ Bah Jean, N'DOUMÉ Clément, YAPI Daniel, AKA Théodule, AGBO Théodore, KOUAKOU Édouard, CAMARA** et Feu **GNÉNÉGBÉ G. Guitembert**, pour vos collaborations techniques, je vous remercie sincèrement.

◆ Mes camarades **BLÉ Méléconi Célestin, BOKA Raoul Marius, BIDIÉ Alain, NIAMKÉ Arthur, KONAN Amino Georgette, YÉO Dodéché, AHUA Kouassi Maximin, DIBY Sylvie, TA bi djo, SOUZA Alain, Mme ATTA, KOUADIO Ahou Irène...**, je suis très touché par votre amitié qui ne m'a fait défaut à aucun moment.

◆ **L'ONG Ruban Rouge Côte d'Ivoire**, tous ses membres et en particulier son président **BOKA Raoul Marius** et sa Directrice Exécutive **ASSOUAN Isabelle** qui m'ont permis la saisie et la mise en forme de ce document, je n'oublierai jamais leur collaboration technique et leur amitié sans faille.



Je dédie
Cette thèse à...

◆ **Feu Mon Père AHOUA Yapo Benjamin**

Lui qui a consenti d'énormes sacrifices pour ma réussite. Père, tous tes efforts ne sont pas restés vains. Car, voici aujourd'hui l'un des fruits de tes nombreux sacrifices consentis à l'éducation de tes enfants.

◆ **Ma Mère ABONOU Moussan Hélène**

Toi qui a supporté tous mes caprices. Toi qui a consenti d'énormes efforts pour la réussite de ton fils et toi dont les prières ont été exhaussées, cette thèse représente pour toi toute mon affection.

◆ **Feu ma Belle Mère ADOU Kouso Pierrette**

Je ne pourrai jamais oublier toute l'affection que tu avais pour moi , "ton père". Ta présence m'aurais été bénéfique, mais hélas Dieu notre seigneur en a décidé autrement.

◆ **Mes frères et sœurs BÉDA Ohouo Sylvain, BÉDA Zapé, YAPO Ahoua Adrienne, YAPO Moya Micheline et YAPO Yapi André,**

Vous avez été un second père et une seconde mère pour moi. Vos conseils m'ont été d'un apport très appréciable. A vous les trois derniers, cette thèse est la récompense de vos efforts matériels et financiers consentis à ma réussite.

◆ **Mon fils ADOU Yapo Francis Varauld Délaigle et sa mère SÉRY Marie Chantal,** votre présence et votre soutien moral m'ont permis de mieux me concentrer.

◆ **Mes neveux et nièces, MAYET Béba Félicien, ATSAIN Adja Fulgence, ATSAIN Apo Denise, feu AHONDJO Marius, AKOUN Pierre Pascal, GUTEY Lydie marie Vianney, OBIN Obin, OBIN Assi, YAPO Narcisse, YAPO Agbé Alfred, YAPO Moya Micheline.....,** ce présent travail est le vôtre et devrait servir de modèle à certains.

◆ Mes amis **ADOMON Cyriaque, WAKA Félix, N'CHO léger, AKÈ Yapo Benjamin, Traoré Sibiri, Pélagie, Boka Raoul Marius, Assouan Isabelle, Christine, Lezou, Lambert...**, ce document est le fruit de votre assistance morale.

◆ La communauté chrétienne d'Attiékoi et en particulier la communauté Harriste.

◆ la classe d'âge "**BONTO**" et toutes les autres de la génération "Gnando" d'Attiékoi.

◆ Tous ceux qui ont de près ou de loin concouru à la réalisation de ce travail.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACh	= acétylcholine
AChE	= acétylcholinestérase
ASCh	= acétylthiocholine
ATP	= adénosine triphosphate
ATPaseNa⁺-k⁺	= adénosine triphosphatase sodium-potassium dépendant
Atr	= atropine
batt/min	= battements par minute
BuChE	= butyrylcholinestérase
°C	= degré Celsius
CI₅₀	= Concentration Inhibitrice 50%
cm	= centimètre
DL₅₀	= Dose Létale 50%
DMT	= Dose Minimale Toxique
DTNB	= [5-5' Dithio bis – (2 – nitrobenzoic acid)]
Dx	= digoxine
Dz	= diltiazem
F₁	= fraction 1
F₂	= fraction 2
F₃	= fraction 3
F₄	= fraction 4
Fig	= figure
hyperCa⁺⁺	= milieu hypercalcique
hyperNa⁺	= milieu hypersodique
hypoCa⁺⁺	= milieu hypocalcique
Kb	= kombucha
Km	= constante d'affinité
M	= molaire
M-B	= MAÏ-BAO

ME	= Mac Ewen (solution physiologique de référence)
MEq.g/l	= milliéquivalent gramme par litre
mg/kg PC	= milligramme par kilogramme de poids corporel
ml	= millilitre
mM	= millimolaire
mmHg	= millimètre de mercure
N	= normalité
nM	= nanomolaire
pa	= pression artérielle
pH	= Potentiel Hydrogène
RME	= retour au Mac Ewen
S	= seconde
µg	= microgramme
µg/ml	= microgramme par millilitre
µM	= micromolaire
Vm	= vitesse maximale

LISTE DES FIGURES	pages
Fig 1 : Mécanisme d'action de l'Acétylcholine	15
Fig 2 : Mécanisme d'action des digitaliques (effet inotrope digitalique)	17
Fig 3 : Photo présentant le champignon flottant sur le MAÏ-BAO	20
Fig 4 : Dispositif expérimental permettant l'enregistrement de la pression artérielle de lapin	26
Fig 5 : Dispositif expérimental permettant l'enregistrement de l'activité mécanique de cœur isolé de rat	29
Fig 6 : Méthode d'extraction de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$	35
Fig 7 : Détermination graphique Les Dose Létale 50% et des Dose Minimale Toxique	58
Fig 8 : Effets dose réponses de MAÏ- BAO sur la pression artérielle de lapin	68
Fig 9 : Diminution de la pression artérielle de lapin en fonction des doses de MAÏ-BAO	69
Fig 10 : Effets dose-réponses de l'Acétylcholine sur la pression artérielle	71
Fig 11 : Effets dose-réponse de Diltiazem sur la pression artérielle de lapin	72
Fig 12 : Diminution de la pression artérielle en fonction des doses de l'Acétylcholine	73
Fig 13 : Diminution de la pression artérielle en fonction des concentrations de Diltiazem	73
Fig 14: Interaction MAÏ-BAO - Atropine sur la pression artérielle de lapin	75
Fig 15: Interaction l'Acétylcholine -Atropine sur la pression artérielle de lapin	76

Fig 16: Réduction de l'hypotension induite par MAÏ-BAO (2000 mg/kg) et l'Acétylcholine (10^{-4} mg/kg) par l'Atropine	77
Fig 17: Diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions du cœur isolé de rat en fonction des doses de MAÏ-BAO	79
Fig 18: Effets de MAÏ-BAO à 15 mg/ml l'activité mécanique du cœur isolé rat	80
Fig 19: Effets dose-réponses de l'Acétylcholine sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	82
Fig 20: Diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions du cœur isolé de rat en fonction des doses de l'Acétylcholine	83
Fig 21: Effets dose-réponses de Diltiazem sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	85
Fig 22: Diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions du cœur isolé de rat en fonction des doses de Diltiazem	86
Fig 23: Effets de l'interaction MAÏ-BAO-Atropine sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	88
Fig 24: Effets de l'interaction l'Acétylcholine +Atropine sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	90
Fig 25: Effets du milieu hypercalcique sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	93
Fig 26: Effets de MAÏ-BAO et de MAÏ-BAO en milieu hypercalcique sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	94
Fig 27: Effets du milieu hypersodique et de MAÏ-BAO en milieu hypersodique sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	96
Fig 28: Effets du milieu hypercalcique et de Diltiazem en milieu Hypercalcique sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	98
Fig 29: Effets dose-réponses de la fraction 2 sur la pression artérielle de lapin	106
Fig 30: Effets dose-réponses de la fraction 3 sur la pression artérielle de lapin	107

Fig 31: Comparaison des effets hypotensifs de MAÏ-BAO et de la fraction 2 sur la pression artérielle carotidienne de lapin	109
Fig 32: Interaction de la fraction 2 et de l'Atropine sur la pression artérielle de lapin	111
Fig 33: Effets de la fraction 1 sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	113
Fig 34: Effets de la fraction 2 sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	114
Fig 35: Effets de la fraction 3 sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	116
Fig 36: Effets de la fraction 4 sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	118
Fig 37: Comparaison des effets de 2 et MAÏ-BAO sur l'amplitude des contractions de cœur isolé de rat	121
Fig 38 : Comparaison de la fraction 2 et MAÏ-BAO sur la fréquence des contractions de cœur isolé de rat	121
Fig 39: Effets dose-réponses Digoxine sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	123
Fig 40: Comparaison des effets de Digoxine et de la fraction 3 sur l'amplitude des contractions du cœur isolé de rat	125
Fig 41 : Comparaison des effets de Digoxine et de la fraction 3 sur l'amplitude des contractions de cœur isolé de rat	125
Fig 42 : Interaction de la fraction 2 et de l'Atropine sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	127
Fig 43: Effets de la fraction 2 et de la fraction 2 en milieu hypercalcique (150%) sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	129
Fig 44: Effets du milieu hypersodique (150%) et de la fraction 2 en milieu hypersodique sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	130
Fig 45: Effets du milieu hypocalcique (150%) et de la fraction 3 en milieu hypocalcique sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	132
Fig 46: Effets du milieu hypersodique (150%) et de la fraction 3 en milieu hypersodique sur les contractions du cœur isolé de rat	134

Fig 47 : Détermination du temps de linéarité de l'Acétyle cholinestérase	144
Fig 48 : Détermination du pH optimum d'activité de l'Acétyle cholinestérase	145
Fig 49 : Détermination de la température optimale d'activité de l'Acétyle cholinestérase	145
Fig 50 : Courbe étalon des protéines selon la méthode de Lowry	147
Fig 51 : Pourcentage d'inhibition de l'Acétyle cholinestérase en fonction des concentrations de MAÏ-BAO et de la fraction 2	147
Fig 52 : Influence du substrat sur l'activité de l'Acétyle cholinestérase	148
Fig 53 : Détermination de Vm et Km de l'Acétyle cholinestérase	148
Fig 54 : Influence de MAÏ-BAO (15 mg/ml) sur l'activité de l'Acétyle cholinestérase	150
Fig 55 : Détermination de Vm et Km de l'Acétyle cholinestérase en présence de MAÏ-BAO (15 mg/ml)	150
Fig 56 : Influence de la fraction 2 (5 mg/ml) sur l'activité de l'Acétyle cholinestérase	151
Fig 57 : Détermination de Vm et Km de l'Acétyle cholinestérase en présence de La fraction 2 (5 mg/ml)	151
Fig 58 : Influence de Atropine (10^{-2} mg/ml) sur l'activité de l'Acétyle cholinestérase	153
Fig 59 : Détermination de Vm et Km de l'Acétyle cholinestérase en présence d'Atropine (10^{-2} mg/ml)	153
Fig 60 : Influence du mélange Atropine - MAÏ-BAO sur l'activité l'Acétyle cholinestérase	154
Fig 61 : Détermination de Vm et Km de l'Acétyle cholinestérase en présence du mélange Atropine et MAÏ-BAO	154
Fig 62 : Influence du mélange Atropine et la fraction 2 sur l'activité de l'Acétyle cholinestérase	156
Fig 63 : Détermination de Vm et Km de l'Acétyle cholinestérase	

en présence du mélange Atropine et de la fraction 2	156
Fig 64 : Temps de linéarité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	163
Fig 65 : Courbe d'étalonnage de H ₂ KPO ₄ par la méthode de Sumner	163
Fig 66 : Détermination de la température d'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	165
Fig 67 : Détermination du pH d'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	165
Fig 68 : Influence de la concentration en substrat sur l'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	166
Fig 69 : Détermination de V _m et K _m de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	166
Fig 70 : Influence de MAÏ-BAO (15 mg/ml) sur l'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	168
Fig 71 : Détermination de V _m et K _m de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ en présence de MAÏ-BAO (15 mg/ml)	168
Fig 72 : Influence de la fraction 3 (1 mg/ml) sur l'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	169
Fig 73 : Détermination de V _m et K _m de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ en présence de la fraction 3 (1 mg/ml)	169
Fig 74 : Comparaison de l'action de M-B et de Dx à 15 mg/ml sur l'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	171
Fig 75 : Détermination de V _m et K _m de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ en présence de MAÏ-BAO et de la Digoxine à 15 mg/ml	171
Fig 76 : Comparaison de l'action de la fraction 3 et de la Digoxine à 1 mg/ml sur l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	172
Fig 77 : Comparaison de V _m et K _m de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ en présence de la fraction 3 et de la Digoxine à 1 mg/ml	172
Fig 78 : Activité résiduelle de l'inhibition de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ du cœur de rat par MAÏ-BAO et de la fraction 3	174
Fig 79 : Activité résiduelle de l'inhibition de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ du cœur de rat par la Digoxine	174

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tabl I : Composition de la solution physiologique de référence : Mac Ewen	23
Tabl II : Produits et leur provenance	52
Tabl III : Valeurs des DMT des différents produits	57
Tabl IV : Calcul des DL ₅₀ de MAI-BAO et ses fractions selon la méthode de calcul de Berhens et coll (1935)	60
Tabl V : Les DL ₅₀ des différentes méthodes	61
Tabl VI : Hypotension et hypertension induites par F ₁ ; F ₂ ; F ₃ et F ₄ sur la pression artérielle de lapin	105
Tabl VII : Pourcentage de Variation de l'amplitude et de la fréquence des contractions cardiaques en fonction des doses des substances pharmacologiques	119
Tabl VIII : Récapitulation des V _m et K _m de l'AChE en présence des différents produits pharmacologiques utilisés	157
Tabl IX : Récapitulation des V _m et K _m de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ en présence des différents produits pharmacologiques utilisés	175

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
A- Généralités sur MAÏ-BAO	5
B- Généralités sur le système cardiovasculaire	6
1- Le cœur	7
2- Les vaisseaux	7
3- La pression artérielle (p.a)	7
4- Les canaux calciques	8
C- Maladies cardiovasculaires	11
D- Médicaments des maladies cardiovasculaires	12
1- Inhibiteurs calciques	12
2- Cardiotoniques	13
II- MATERIEL ET METHODES	18
A- Matériel biologique	19
1- Matériel animal	19
2- Matériel végétal	19
B- Méthodes de préparation de MAÏ-BAO	
et méthodes d'étude physiologiques et pharmacologiques	21
1- Préparation et fractionnement du MAÏ-BAO	21
a- Préparation du matériel biologique	21
a.1- Préparation	21
a.2- Détermination de l'acidité	21
a.3- Lyophilisation et fractionnement de M-B	22
a.3.1- Lyophilisation de l'extrait	22
a.3.2- Fractionnement de l'extrait	22

b- techniques expérimentales physiologiques	23
b.1- Méthode d'études toxicologiques	23
b.2- Méthode d'études physiologiques	24
b.2.1- Enregistrement de la pression artérielle carotidienne de lapin	24
b.2.1.1 - Dispositif expérimental	24
b.2.1.2- Réalisation de la surpression	24
b.2.1.3- Canulation de la veine saphène et de la carotide	26
b.2.2- Enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé de rat	27
b.2.2.1- Le dispositif expérimental	27
b.2.2.2- Prélèvement du cœur isolé de rat	27
2- Méthodes générales de la mise en évidence des effets des substances pharmacologiques sur la pression artérielle et le cœur isolé	29
a- Effets des substances sur la pression artérielle	29
b- Effets des substances sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	30
b.1- Effets dose-réponses	30
b.2- Interaction solutions pharmacologiques – Atr	31
b.3- Effets des solutions physiologiques de composition ionique modifiée dans l'action des substances pharmacologiques	30
C- Méthode d'études biochimiques	33
1- Technique d'extraction de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et de l'AChE du cœur de rat	33
a- Technique d'extraction de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$	33
b- Technique d'extraction de l'AChE	36

2- Méthodes de préparation des substrats	
et des réactifs de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et de l'AChE	36
a- Préparation du substrat et du réactif	
de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$	36
a.1- Préparation de l'ATP-tris	36
a.2- préparation du substrat standard	37
b- Préparation du substrat et du réactif de l'AChE	38
b.1- Préparation des solutions d'ASCh et de DTNB	38
b.2- Préparation du réactif d'Ellman	38
3- Méthode d'étude de l'activité de	
l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et de l'AChE	39
a.- Étude de l'activité de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$	39
a.1- Dosage des protéines par la méthode de Lowry	39
a.2- Dosage du phosphate inorganique	40
b- Étude de l'activité de l'AChE	40
b.1- Technique de dosage de l'activité	
des cholinestérases totales	40
b.2- Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase	41
c- Détermination des paramètres cinétiques de	
l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et de l'AChE	42
c.1- Étude de l'activité de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et de	
l'AChE en fonction du temps de la réaction	42
c.1.1- Étude de l'activité de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en	
fonction du temps de la réaction	42
c.1.2- Étude de l'activité de l'AChE en	
fonction du temps de la réaction	43
c.2- Détermination du pH optimum d'activité	
de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et de l'AChE	43

c.2.1- Détermination du pH optimum d'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	44
c.2.2- Détermination du pH optimum d'activité de l'AChE	44
c.3- Détermination de la température optimale l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ et de l'AChE	44
c.3.1- Détermination de la température optimale d'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	43
c.3.2- Détermination de la température optimale d'activité de l'AChE	45
4- Méthodes d'étude des différents effecteurs	45
a- Étude de l'influence du substrat sur l'activité catalytique l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ et de l'AChE	45
a.1- Étude de l'influence du substrat sur l'activité catalytique l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	45
a.2- Étude de l'influence du substrat sur l'activité catalytique l'AChE	46
b- Étude de l'influence des effecteurs sur l'activité catalytique l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ et de l'AChE	46
b.1- Influence de MAÏ-BAO, F ₃ et Dx sur l'activité catalytique l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	46
b.2- Influence des effecteurs sur l'activité catalytique de l'AChE	47
b.2.1- Influence de M-B, F ₂ et Atr sur l'activité catalytique	47
b.2.2- Influence de l'association M-B-Atr et F ₂ - Atr sur l'activité catalytique	48
c- Détermination de l'activité résiduelle	

de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	48
5- Méthodes statistiques de comparaison	48
a- Comparaison de deux échantillons indépendants	48
b- Comparaison de deux échantillons appariés	50
6- Limites des techniques d'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé de rat	51
E- Les produits utilisés et leur provenance	52
III- RÉSULTATS	54
PREMIERE PARTIE : ETUDES TOXICOLOGIQUES	55
A-Toxicité aiguë	56
1- Comportement des animaux	56
2- Détermination des Doses Minimales Toxiques (DMT)	56
3- Détermination de la dose létale 50%	57
a- La méthode directe	57
b- La détermination graphique	58
c- Détermination par calcul	59
4- Comparaison des DL ₅₀ des différentes méthodes	61
B- Toxicité chronique	62
C- Discussion et conclusion	63
DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDES PHARMACODYNAMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES	66
A- Actions de MAÏ-BAO, de l'acétylcholine et du diltiazem sur l'activité cardiovasculaire	67
1- Effets comparés de M-B, de l'ACh et de Dz sur la pression artérielle de lapin	67
a- Effets dose-réponses de MAÏ-BAO	

sur la pression artérielle	67
b- effets dose- réponses de l'ACh sur la p.a de lapin	70
c- Effets dose-réponses du diltiazem sur la p.a de lapin	70
d- Études comparatives de l'interaction M-B-Atr ; ACh-Atr et Dz-Atr sur la pression artérielle de lapin	74
2- Effets dose-réponse de M-B, de l'ACh et de Dz sur les contractions de l'activité mécanique du cœur isolé de rat	78
a- Effets dose-réponses de MAÏ-BAO sur les Contractions de l'activité mécanique du cœur isolé de rat	78
b- Effet dose-réponse de l'ACh sur les contractions de l'activité mécanique du cœur isolé de rat	81
c- Actions dose-réponses de Dz sur les contractions de l'activité mécanique du cœur isolé de rat	84
3- Interaction M-B-Atr et ACh-Atr sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	87
a- Interaction MAÏ-BAO-Atr sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	87
b- Interaction ACh-Atr sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	89
4- Effet des solutions physiologiques de composition ionique modifiée dans l'action de MAÏ-BAO et du diltiazem sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	91
a- Effet du milieu hyperCa ²⁺ dans l'action de MAÏ-BAO sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat	91
a.1- Effets du milieu hyperCa ²⁺ sur les contractions du cœur isolé de rat	91
a.2- Effet du milieu hyperCa ²⁺ dans l'action de M-B sur les contractions du cœur de rat	91

b- Effet du milieu hyperNa ⁺ dans l'action de M-B sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	95
c- Effets du milieu hypercalcique dans l'action de Dz sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	96
5- Discussion et conclusion	99
B- Action des fractions de MAÏ-BAO (F₁; F₂; F₃; F₄) sur la pression artérielle et sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	103
1- Actions des fractions F ₁ , F ₂ , F ₃ et F ₄ sur la pression artérielle de lapin	103
a- Effets dose-réponses des fractions sur la pression artérielle de lapin	103
b - Étude comparative de l'action de F ₂ et M-B sur la pression artérielle de lapin	108
c- Étude de l'interaction F ₂ - Atr sur la pression artérielle de lapin	112
2- Actions des fractions F ₁ , F ₂ , F ₃ et F ₄ sur l'activité mécanique de cœur de rat	112
a- Effets dose-réponses des différentes fractions de MAÏ-BAO sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	112
b- Études comparatives de M-B et de la fraction F ₂ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	120
b.1- Effets sur l'amplitude des contractions cardiaques	120
b.2- Effets sur la fréquence des contractions cardiaques	120
c- Études comparatives de la fraction F ₃ et de la digoxine sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	122
c.1- Effets dose-réponses de Dx sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	122
c.2- Étude comparative des effets de F ₃ et Dx sur	

l'amplitude des contractions cardiaques	124
c.3- Études comparatives des effets de F ₃ et Dx sur la fréquence des contractions cardiaques	124
3- Étude de l'interaction F ₂ - Atr sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	126
4- Effets des solutions physiologiques de composition ionique modifiée dans l'action de F ₂ et F ₃ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat	128
a- Effets sur la fraction F ₂	128
a.1- Effets de F ₂ en milieu hypercalcique	128
a.2 – Effets de F ₂ en milieu hypersodique	128
b- Effets sur la fraction F ₃	131
b.1- Effets de la fraction F ₃ en milieu hypocalcique	131
b.2- Effets de la fraction F ₃ en milieu hypersodique	133
5- Discussion et conclusion	135
TROISIÈME PARTIE : ÉTUDES BIOCHIMIQUES	142
A- Action de MAÏ-BAO et de sur l'AChE de cœur de rat	143
1- Détermination du taux de AChE du cœur de rat	143
2- Détermination du temps de linéarité de l'AChE	143
3- Détermination du pH et de la température d'activité	143
4- Détermination de la concentration en protéine de l'extrait enzymatique	146
5- Influence de M-B et de F ₂ sur l'activité de l'AChE	146
6- Influence de la concentration en substrat sur l'activité de l'AChE	146
7- Influence de MAÏ-BAO (15 mg/ml), de F ₂ (5 mg/ml) et de l'atropine (10 ⁻² mg/ml) sur l'activité de l'AChE	149

a- Action de M-B (15 mg/ml) sur l'activité de l'AChE	149
b- Action de F ₂ (5 mg/ml) sur l'activité de l'AChE	149
c- Action de l'Atropine 10 ⁻² mg/ml sur l'activité de l'AChE	152
8- Influence de l'interaction M-B - Atr et F ₂ - Atr sur l'activité de l'AChE	152
a- Action de M-B (15 mg/ml) + Atr (10 ⁻² mg/ml)	152
b- Action de F ₂ (5 mg/ml) + Atr (10 ⁻² mg/ml)	155
9- Discussion et conclusion	158
B- Action de MAÏ-BAO et de la fraction F₃ sur l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur de rat	161
1- Détermination du taux de protéine dans le cœur de rat	161
2- Étude de l'activité de l'ATPase en fonction du temps	162
3- Détermination de l'activité spécifique de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ du cœur de rat	162
4- Détermination de la température maximale d'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	164
5- Détermination du pH optimum d'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	164
6- Influence de la concentration en substrat sur l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	164
7- Influence de M-B (15 mg/ml) et de F ₃ (1 mg/ml) sur l'activité catalytique de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	167
a- Action de M-B (15 mg/ml) sur l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	167
b- Action de F ₃ (1 mg/ml) sur l'activité catalytique l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	167
8- Comparaison de l'influence de M-B et Dx à 15 mg/ml et de F ₃ et Dx à 1 mg/ml sur l'activité de l'ATPase	170
a- Comparaison de l'action de M-B (15 mg/ml) et	

Dx (15 mg/ml ou 1,92 mM) sur l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	170
b- Comparaison de l'influence F ₃ et Dx à 1 mg/ml sur l'activité de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺	170
9- Détermination de l'activité résiduelle de l'ATPase Na ⁺ -K ⁺ et des CI ₅₀ des inhibiteurs (M-B, F ₃ et Dx)	173
10- Discussion et conclusion	176
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	180
BIBLIOGRAPHIE	184

INTRODUCTION

Les plantes jouent un rôle important dans la vie de l'être humain. Elles interviennent aussi bien au niveau médical comme support important pour la médecine moderne, qu'au niveau alimentaire. Les différentes molécules de synthèse sont souvent sorties des principes actifs de nombreux végétaux (DANIEL,1983)⁽⁴¹⁾ tels la morphine, la strychnine, la quinine, la digitaline etc... (FOUCHÉ et al, 2001)⁽⁶¹⁾.

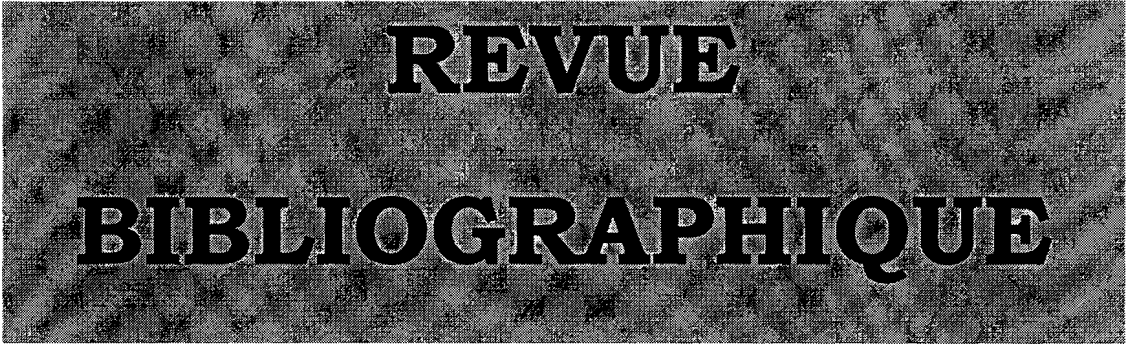
Dans le Tiers monde en général et en Afrique en particulier, les plantes médicinales connaissent un regain d'intérêt. Toutes les couches de la population quel que soit leur niveau de vie, se tournent vers la médecine traditionnelle ou associent les deux médecines afin d'avoir une solution à leur maux. Face à l'impuissance de la médecine moderne, les hommes ont recours à la tradithérapie dont les recettes ont permis de les soulager de certaines maladies. De nombreuses espèces de plantes dont 50 000 en Afrique (ADJANOHOUN, 1990)⁽⁴⁾ et 1 421 en Côte d'Ivoire (AKÉ-ASSI, 1991)⁽⁷⁾ sont prescrites en recettes médicamenteuses pour le traitement de plusieurs affections. Les nombreux problèmes socio-économiques que connaissent les populations africaines et les coût élevés des médicaments pharmaceutiques ont amené certains gouvernements africains à mettre en place des programmes nationaux de recherche tendant à valoriser la pharmacopée africaine afin de mettre en place des médicaments semi-finis dont le coût sera à la portée des bourses des populations. C'est ainsi qu'en Côte d'Ivoire, a été mis en place le programme « Substances Naturelles à usages thérapeutiques et cosmétiques de Côte d'Ivoire » en 1973. A cet effet, des études pharmacologiques et pharmacodynamiques ont permis d'isoler et de séparer les principes actifs de certaines plantes à pouvoir thérapeutique du patrimoine forestier ivoirien, mais aussi des plantes d'origines diverses. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à l'étude d'un champignon d'origine asiatique (MAÏ-BAO ou Kombucha) dans notre laboratoire. Malgré les nombreuses vertus attribuées au MAÏ-BAO ou Kombucha dont la

régulation de la flore intestinale, la fortification des cellules, le traitement du cancer (**GÜNTHER, 1996**)⁽⁸⁰⁾, de l'hypertension artérielle, du diabète, de l'artériosclérose, de la tuberculose et de l'arthrite (**KRAFT, 1959**)⁽¹⁰⁴⁾, peu de recherches ont été menées (**GREEWALT et al, 1998**)⁽⁷⁵⁾. Cependant, l'activité antimicrobienne du champignon a été étudiée par plusieurs auteurs dont **STEINKRAUS et al (1996)**⁽¹⁶⁷⁾ et **GUTTAPADU et al (2000)**⁽⁸¹⁾ ainsi que sa constitution microbiologique et sa composition chimique (**GREEWALT et al, 2000 ; DUFRESNE et FARNWORTH, 2000**)^(74,50). Par ailleurs, les recherches sur la pharmacodynamie cardiovasculaire de MAÏ-BAO ou Kombucha restent encore mal connues malgré le pouvoir thérapeutique sur les maladies cardiovasculaires que lui accorde la médecine traditionnelle. La plus fréquente des maladies cardiovasculaires est l'hypertension artérielle qui touche 15 à 20% de la population sous les Tropiques (**COLLARD, 1998**)⁽³⁸⁾ en général et 14% en Côte d'Ivoire selon **BERTRAND (1981)**⁽²⁰⁾. La consommation de la boisson (MAÏ-BAO) en thérapie par de nombreuses personnes hypertendues nous a amené à étudier les effets de MAÏ-BAO sur le système cardiovasculaire, afin d'établir les bases scientifiques des vertus cardiovasculaires de MAÏ-BAO et ses fractions et de déterminer leurs mécanismes d'action biochimique. A cet effet, Notre travail consistera

- 1- à étudier la toxicité de ces produits afin de déterminer les DMT et les DL₅₀,
- 2- à étudier l'action de MAÏ-BAO sur le système cardiovasculaire en comparaison avec quelques substances pharmacologiques de référence,
- 3- à fractionner M-B selon ses effets cardiovasculaires et à voir l'action cardiovasculaire de chacune des fractions. Cela nous permettra de sélectionner les fractions à effets significatifs sur le cœur afin de réaliser des études de comparaison avec quelques substances

pharmacologiques de référence sur le système cardiovasculaire. Cette méthode a pour but de mieux appréhender les mécanismes d'action des substances contenues dans MAÏ-BAO et ses fractions cardioactives,

- 4- à déterminer de façon effective, les mécanismes biochimiques de l'action cardiovasculaire de M-B et celle de ses fractions.

I

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

A- Généralités sur MAÏ-BAO

Les différentes vertus thérapeutiques attribuées au MAÏ-BAO (M-B) encore appelé Komboucha (Kb) sont très nombreuses. Nous pouvons citer la réduction de la pression artérielle sanguine, la guérison du rhumatisme, l'amélioration de la vue, la réduction de l'obésité, la régulation de l'appétit, la protection contre le diabète, la stimulation du système glandulaire et l'amplification du métabolisme général (ALLEN, 1998)⁽¹⁰⁾. En plus, AHUA (1996)⁽⁵⁾ a montré que MAÏ-BAO inhibe certains germes responsables de la diarrhée dont E. coli.

En effet, après la seconde guerre mondiale, de nombreuses recherches ont été menées en Russie. Ces recherches ont permis de constater que les populations qui consommaient la Kb étaient exemptes de cancer et avaient leur système immunitaire renforcé (ALLEN, 1998)⁽¹⁰⁾. C'est ainsi que la boisson Kb a été propagée en Europe et partout dans le monde après la deuxième guerre mondiale (GREENWALT et al, 2000)⁽⁷⁴⁾. Il convient de rappeler que le Kb ou M-B a été découvert au Japon et en Chine puis propagé partout en Europe via l'Allemagne et le Portugal depuis des siècles (HOLLMAN et al, 1996)⁽⁹²⁾. Cependant, certains auteurs tels que KRAFT (1959)⁽¹⁰⁴⁾ parlent de l'origine mal connue du Champignon qui pourrait provenir de la Chine, du Pérou, du Brésil ou de l'Espagne. A cette boisson, sont attribués plusieurs noms dont «Champignon-miracle», Champignon de la Charité » ou « Champignon de longue vie » (KRAFT, 1959)⁽¹⁰⁴⁾ ou « Divine Che » ou «Tea Krass» (DUFRESNE et FARNWORTH, 1999)⁽⁵⁰⁾.

Tous ces différents noms attribués au MAÏ-BAO, sont dus aux différents effets thérapeutiques que les auteurs lui accordent. Ces différentes vertus thérapeutiques feraient de M-B ou Komboucha, la boisson la plus

consommée dans le monde après l'eau (YANG et WANG, 1993)⁽¹⁸⁵⁾ Cette boisson est préparée par fermentation du thé dont le sucrage se fait à 100 g/l à 25°C (GREENWALT et al, 1998; CHEN et LIU, 2000)^(75, 36) à 50 g/l (DUFRESNE et FARNWORTH, 2000)⁽⁵⁰⁾ ou à 0,7% à 23-24°C (BILJANA et al, 2000)⁽²³⁾ ou à 50-150 g/l à température ambiante (GREENWALT et al, 2000)⁽⁷⁴⁾.

Le champignon encore appelé Champignon Thé-trésor est un assemblage de levures et de bactéries acétiques (KRAFT, 1959; REISS, 1994; MAYSER et al, 1995 ; LIU et al, 1996; BALENTINE, 1997; DUFRESNE et FARNWORTH, 1999)^(104, 150, 122, 111, 15, 50) dans un amas de film gélatineux (ABADIE, 1962)⁽¹⁾. Selon certains auteurs dont ROUSSIN (1996)⁽¹⁵⁵⁾ ; BLANC (1996)⁽²⁴⁾ et YUKERVICH et KUTYSHENKO, (1998)⁽¹⁸⁶⁾, de la fermentation du substrat qu'est le sucrose, découlent plusieurs produits finals parmi lesquels on peut citer l'éthanol, l'acide lactique, l'acide acétique, la vitamine B etc....Chacun de ces produits ayant une action thérapeutique bien définie dans l'organisme. Cependant, tout produit médicamenteux étant susceptible d'effet secondaire, l'on pourrait penser que M-B ou Kb, après consommation entraînerait des effets secondaires nocifs, voire toxiques. Car, à des concentrations très élevées, les médicaments peuvent être toxiques sur les fonctions de l'organisme. Il convient de souligner que M-B est issu de la fermentation du thé. De la famille des Theaceae, le thé provient de deux variétés dont *Camellia sinensis* var. *sinensis*. et *Camellia sinensis* var *assamica* (HARA et al, 1995a)⁽⁸⁵⁾. Ces différentes variétés contiennent des éléments chimiques tels que la théamine, la caféine, la théophylline, la théaflavine (HARA et al, 1995c)⁽⁸⁶⁾ et les flavonoïdes qui contribuent au goût amer et donne un arrière goût sucré à la boisson du thé (HARA et al, 1995e)⁽⁸⁸⁾. En plus des macro

éléments, le thé contient des vitamines E, K, A et un peu de vitamines B et C ainsi que du magnésium, du potassium et du fluor (HARA et al, 1995d)⁽⁸⁷⁾.

B- Généralités sur le système cardiovasculaire

Constitué du cœur et des différents vaisseaux, le système cardiovasculaire serait l'élément moteur de l'organisme. Il distribue dans le sang, les différents éléments dont les autres organes ont besoin.

1- Le cœur

contractions régulières du muscle cardiaque assurent la circulation du sang dans l'organisme. Les différentes contractions sont engendrées et se propagent grâce au tissu nodal. Ce tissu comprend le nœud sinusal qui commande la fréquence cardiaque et qui est situé dans l'oreillette droite. Le nœud auriculo-ventriculaire est placé dans la jonction de l'oreillette et du ventricule. Ce nœud est prolongé dans le ventricule par le faisceau de His et ses ramifications permettant le passage de l'influx vers le ventricule.

Le cœur en se contractant, propulse le sang dans les vaisseaux en vue d'irriguer les différents organes.

2- Les vaisseaux sanguins

Ils sont chargés de conduire l'oxygène et les nutriments aux organes par l'intermédiaire du sang. Ils bénéficient d'un degré d'élasticité qui leur permet de diminuer ou d'augmenter de calibre en fonction du flux sanguin propagé par le cœur. La pression artérielle (PA) étant tributaire du travail du cœur et des vaisseaux (GUYTON, 1976)⁽⁸²⁾ il en résulte que la variation de la pression artérielle entraîne une hypotension ou hypertension.

3- La pression artérielle (p.a)

La PA est la pression que le sang exerce sur la paroi des artères qui, en retour oppose une résistance à l'écoulement du sang. En effet, selon la relation de **GREEN**,

$$\text{PA} = \text{débit du sang} \times \text{résistance vasculaire}$$

La résistance vasculaire est l'ensemble des forces qui s'opposent au débit sanguin dans les vaisseaux. Quant au débit, il correspond au rapport entre la chute de la pression (ΔP) dans le système et la résistance opposée à l'avancement du sang (**Loi de POISSEUILLE**).

$$Q = \frac{\pi \cdot \Delta P \cdot r^4}{8 \cdot L \cdot \eta}$$

Q = débit du sang

ΔP = différence de pression

r = rayon de l'artère

L = longueur du vaisseau

η = viscosité du sang

Une défaillance du cœur et des vaisseaux, conduit inéluctablement à des pathologies cardiovasculaires. Ces maladies sont susceptibles d'être soignées soit par des cardiotoniques dans le cas d'une insuffisance cardiaque et de certains troubles du rythme; soit par des inhibiteurs calciques dans le cas de certaines arythmies, de l'insuffisance coronarienne et de l'hypertension artérielle.

Le niveau de la p.a est lié au maintien de deux fonctions importantes du système cardiovasculaire, le débit cardiaque et la pression capillaire qui, tous deux, fixent les échanges avec les tissus (**SAFAR et al, 1983**)⁽¹⁵⁷⁾. En

somme, le cœur et les vaisseaux participent à la variation de la pression artérielle à travers les mouvements du calcium. Le calcium étant en partie responsable de la variation de l'activité cardiovasculaire à travers les canaux calciques.

4- Les canaux calciques

Les canaux calciques régulent l'entrée du calcium dans de nombreux types cellulaires. Ils contribuent à la transmission des messages biologiques tels que le couplage excitation-contraction ou contraction-sécrétion.

La diversité fonctionnelle des canaux calciques est apparue à la suite de nombreuses études. Ainsi, la classification des canaux est basée sur:

- les études électrophysiologiques permettant de voir les propriétés fonctionnelles des canaux calciques;
- les études pharmacologiques permettant de distinguer la sensibilité des canaux aux différents composés;
- la localisation tissulaire.

Il résulte de toutes ces études, l'existence de quatre (4) types de canaux calciques (L, N, P et T) dont le plus abondant sur le muscle squelettique est le type L (**KAPLAN et LIEBERMAN, 1978; MERSSON et al, 1983; CHOBANIAN, 1984**)^(99,126,37). Le type L est un canal calcique voltage dépendant de haute activité. Il est sensible à la dihydropyridine et est localisé dans les tissus excitables et non excitables (**MEYER et al, 1983; PEDERSON, 1983; MERSSON et al, 1983**)^(124, 144, 126).

La purification de ce type de canal a conduit à déterminer sa nature glycoprotéique constituée de cinq (5) sous unités selon **SAFAR et ROLAND, (1981)**⁽¹⁵⁶⁾ que sont :

- α_1 : transmembranaire et portant un site de phosphorylation;

- α_2 : transmembranaire et portant un site de glycosylation;
- β : cytosolique et portant un site de phosphorylation;
- γ : transmembranaire et portant un site de glycosylation;
- δ : extracellulaire et portant un site de glycosylation;

Il a été montré par des radio-ligands spécifiques, que trois types d'antagonistes des canaux calciques à savoir les Benzothiazépines (BZT), les Dihydropyridines (DHP) et les phénylalkylamines (PAA), ont leur sites de fixation situés sur la sous unités α_1 du canal de type L. Cependant, l'affinité des DHP est supérieure à celle des PAA et des BZT. Par conséquent, le calcium induit une augmentation de la liaison des DHP, alors qu'il diminue celle des BZT et des PAA avec le site. Car, la partie de la séquence qui correspond à la liaison des DHP contient un domaine de liaison du calcium (SPEDDING, 1985)⁽¹⁶⁴⁾.

En définitive, quel que soit l'état conformationnel auquel un antagoniste calcique est lié, la conséquence sera toujours le blocage du canal. Cependant, le fait que la liaison s'effectue de façon préférentielle, c'est-à-dire avec une meilleure affinité sur un état conformationnel particulier, a des implications thérapeutiques. Ainsi, les DHP se lient avec une meilleure affinité à l'état inactivé des canaux calciques. Ce qui leur confère une sélectivité vasculaire. Les DHP sont pour cela des vasodilatateurs efficaces contre certaines pathologies comme l'hypertension artérielle. Par contre les antagonistes de type PAA ont une plus grande affinité pour l'état ouvert du canal calcique. Par conséquent, ils se lient d'autant plus efficacement que les canaux fonctionnent. Ce qui les rend particulièrement efficaces au niveau des structures ayant une activité rythmique. C'est pourquoi les PAA sont plus efficaces dans la réduction de la contractilité et le rythme des structures à activité spontanée. (SINGH et VAUGHAN-WILLIAMS, 1972)⁽¹⁶²⁾.

Les trois grands groupes d'antagonistes du calcium représentent des médicaments très importants dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

C- Maladies cardiovasculaires

les maladies cardiovasculaires telle que l'hypertension artérielle représentent un problème de santé publique majeur. Car, elles touchent près de 15% des populations adultes des pays industrialisés (**WAEBER et al, 1989**)⁽¹⁷⁵⁾. Au cours de ces dernières années, des efforts considérables ont été menés pour la mise en place de nouvelles molécules susceptibles de remédier à ces maux. Les médicaments découverts à cet effet sont des cardiotoniques (les glycosides cardiaques et les parasymphomimétiques) et des cardioinhibiteurs (les sympathomimétiques et les inhibiteurs des canaux calciques).

D- Médicaments des maladies cardiovasculaires

1- Inhibiteurs calciques

Les inhibiteurs calciques sont des substances susceptibles de bloquer le passage du calcium au travers des canaux situés dans la membrane plasmique d'une variété de cellules excitables telles que les cellules du myocarde et du muscle vasculaire.

Les inhibiteurs des canaux calciques ont des actions différentes sur le système cardiovasculaire dans la durée et dans les tissus (**DEFEUDIS, 1985; SPEDDING, 1985**)^(46, 164). Les antagonistes du calcium, en inhibant l'influx

calcique, entraînent une inotropie négative du myocarde et une dilatation périphérique des vaisseaux sanguins (SCHWINGER et al, 1990)⁽¹⁶⁰⁾. Selon SINGH et VAUGHAN-WILLIAMS, (1972)⁽¹⁶²⁾; GLOSSMANN et al, (1982)⁽⁷⁰⁾; FLECKENSTEIN, (1983)⁽⁶⁰⁾; MURPHY et al, (1983)⁽¹³³⁾; SPEDDING (1985)⁽¹⁶⁴⁾, ces substances sont classées en trois groupes:

- les dihydropyridines conduits l'Isradipine,
- les Benzothiazépine conduits par le Diltiazem,
- les Phénylalkylamines conduits le Vérapamil.

Aussi, chaque inhibiteur calcique a sa structure chimique qui lui est propre (MEYER et al, 1983)⁽¹²⁴⁾.

Des études récentes ont montré sur l'artère humorale que la dihydralazine diminue le diamètre de l'artère, alors que le diltiazem l'augmente (SAFAR et al, 1983)⁽¹⁵⁷⁾. C'est ainsi que la nifédipine est utilisée dans le traitement des hypertensions sévères qui résistent aux traitements habituels (KAPLAN et LIEBERMAN, 1978; FRISHMAN et al, 1984; WERNER, 1984)^(99, 64, 181). Quant aux autres anticalciques, tels que le diltiazem, la nicardipine et la nitrendipine, ils permettent la normalisation de la pression artérielle (GOULD et al, 1982)⁽⁷³⁾. L'utilisation des antagonistes calciques comme médicaments est plus efficace quand les sujets sont âgés. Cela serait dû au fait que la réponse baro-réflexe est atténuée au delà de 50 ans (BUHLER et al, 1982; CHOBANIAN, 1984)^(29, 37). Cependant, il faut noter que les antagonistes des canaux calciques conduisent à un effet inotrope négatif. Mais cet effet inotrope négatif en principe nuisible peut produire une modération dans le fonctionnement du cœur défaillant (BODO et al, 1997)⁽²⁶⁾. A ces antagonistes calciques, il faut ajouter l'acétylcholine qui exerce les mêmes effets cardiaques basés sur deux mécanismes d'action

biochimiques comme l'indique la figure 1 (**NIEDERGERKE et PAGE, 1977; REUTER et SCHOLZ, 1977; ROSS et al, 1977; BIEGON et PAPPANO, 1980**)^(139, 152, 154, 22). De cette figure, il ressort que l'ACh se fixe sur les récepteurs muscariniques et inhibe l'adénylcyclase

- de façon indirecte via l'interaction entre les récepteurs β -adrénergiques et l'adénylcyclase. Cette interaction est régulée par une protéine G,

- de façon directe de l'adénylcyclase régulée par une protéine G.

Ces deux mécanismes concourent à la fermeture des canaux calciques entraînant ainsi une cardioinhibition.

2- Cardiotoniques

Les hétérosides cardiotoniques encore appelés digitaliques, sont ainsi dénommés parce qu'ils augmentent l'efficacité des contractions cardiaques (inotropie positive). Ils sont exclusivement d'origine végétale et sont extraits de la digitale pourpre.

Les hétérosides cardiotoniques sont constitués d'une partie osidique (non indispensable à l'activité cardiaque) et d'une partie aglycone stéroïdique ou génine. C'est cette partie stéroïdique qui est le support de l'activité cardiotonique par action sur l'insuffisance cardiaque et de certains types

d'arythmies. Les glycosides cardiotoniques ont tous les mêmes propriétés pharmacologiques. Ils augmentent le débit cardiaque chez l'insuffisant cardiaque, mais ne le diminuent pas ou le diminuent légèrement chez le sujet normal malgré l'existence de l'effet inotrope positif (**MASON et al, 1969; GOODMAN et al, 1975**)^(120, 72). En effet, **HOUPE et al, (1983)**⁽⁹³⁾ ont confirmé ces résultats avec la ouabaïne chez l'insuffisant cardiaque. Alors que **REIFFEL et al, (1979)**⁽¹⁴⁹⁾ montrèrent une diminution chez les patients aux cœurs sains. Les effets cardiovasculaires de ces glycosides cardiaques sont tributaires d'un

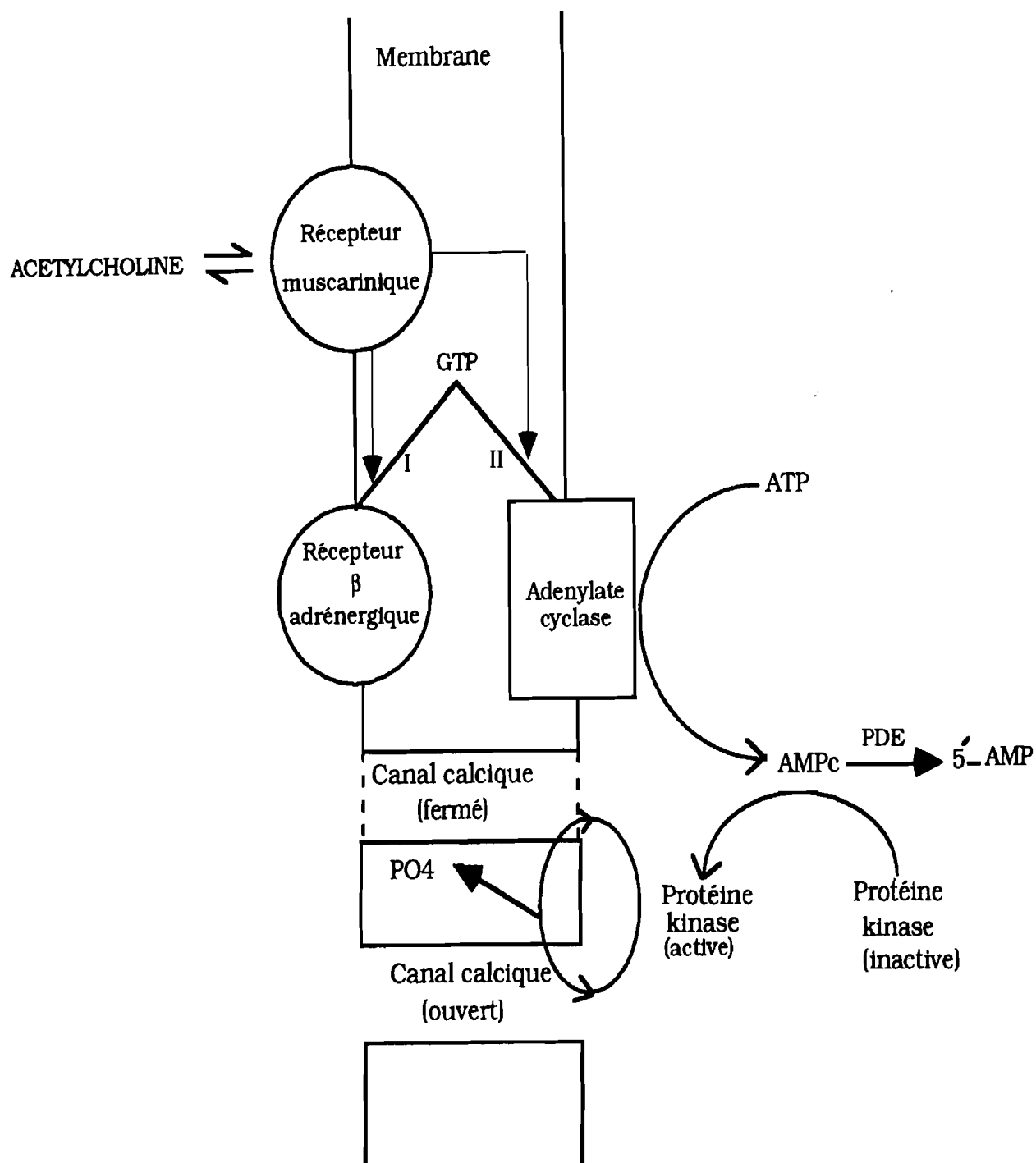


Figure 1: Mécanisme d'action de l'acétylcholine
 (NIEDERGERKE et coll., 1977; ROSS et coll., 1977;
 REUTER et coll., 1977; WATANABE et coll., 1978)^(131, 146, 144, 170)

mécanisme d'action biochimique qui passe par l'inhibition de l'ATPase Na^+ - K^+ . Cette inhibition réduit le flux entrant potassique et le flux sortant sodique tout en augmentant le calcium cytosolique par des voies d'échange Na^+ - Ca^{++} (Fig 2). De cette figure, il ressort que l'inhibition de l'ATPase Na^+ - K^+ par les digitaliques, induit une augmentation de la concentration sodique intracellulaire. Il s'en suit un déclenchement du système d'échange Na^+ - Ca^{++} . Ce qui entraîne une augmentation de la quantité cytosolique du Ca^{++} dont une partie est captée par le réticulum sarcoplasmique dont la fonction est de maintenir constante la concentration calcique cytosolique. La surcharge calcique du réticulum sarcoplasmique entraîne une libération importante du calcium lors du potentiel d'action. Ce qui participe d'une augmentation de la contractilité des myofibrilles (HAÏAT et al, 1995)⁽⁸³⁾.

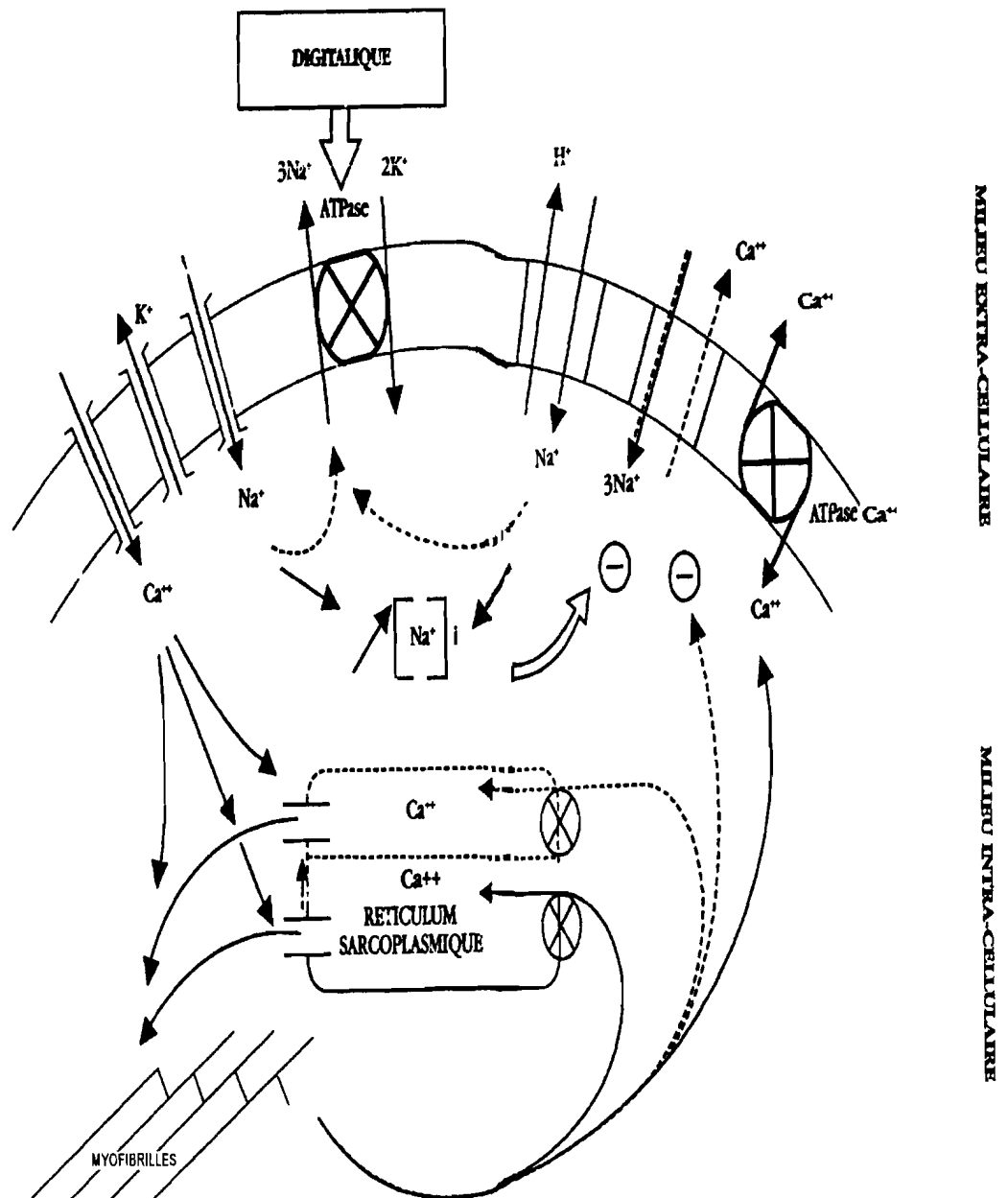


Fig 2 : Mécanisme d'action des Digitaliques

(effet inotrope digitalique) HAÏAT et coll (1995)⁽⁸³⁾

II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A- MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1- Matériel animal

Les animaux utilisés pour la réalisation de nos travaux sont des lapins et des rats. Ces animaux proviennent du Laboratoire de l'animalerie de Physiologie Animale de l'UFR Biosciences de l'Université de Cocody. Ce sont des lapins de l'espèce *Oryctolagus cuniculus* pesant en moyenne deux (2) kg et des rats de souche Wistar pesant en moyenne 250g. Lorsque les lapins sont achetés dans des fermes en ville, ils sont acclimatés pendant plus de cinq (5) jours à l'animalerie avant toute utilisation éventuelle.

2- Matériel végétal

Le matériel utilisé est le Champignon Thé-trésor. C'est une plante d'origine asiatique se présentant sous la forme d'un amas gélatineux abritant levures et bactéries acétiques. Ce champignon fermente le thé sucré pour donner le MAÏ-BAO ou Komboucha (Fig 3) que nous allons utiliser dans nos différentes expérimentations.



Fig 3: Photo présentant le Champignon Thé-Trésor flottant sur le MAÏ-BAO.

(Le ferment appelé mycélium, a été généré à partir d'une suspension cellulaire pour recouvrir la totalité de l'interface air liquide. L'épaisseur observée a été obtenue au bout de 15 jours d'incubation à 28°C.)

B- MÉTHODE DE PRÉPARATION DE MAÏ-BAO ET MÉTHODES PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES

1- Préparation et fractionnement de MAÏ-BAO

a- Préparation de MAÏ-BAO

a.1- Préparation

MAÏ-BAO ou Kb est la boisson issue de la fermentation du thé vert sucré par le Champignon Thé-trésor. La méthode de préparation de M-B selon **FEINSO et WONG, (1980)⁽⁵⁸⁾** ; **SAI-RAM et al, (2000)⁽¹⁵⁸⁾** et **CHEN et LIU, 2000⁽³⁶⁾** se fait par introduction du champignon dans un récipient contenant une solution du thé jaune (thé Lipton). Cette solution est sucrée avec du saccharose à 90 g/l soit 9%, car selon **GÜNTHER, 1996⁽⁸⁰⁾**, le taux de sucre recommandé varie de 70 à 100g/l de thé. Le taux de sucre est mesuré avec un réfractomètre à main de type RAM et de marque Sopelem (0-50%). Le récipient contenant le thé et le champignon est recouvert d'un tissu propre permettant la circulation de l'air. L'ensemble est ensuite placé à la température de 28°C. Après deux (2) à quatre (4) jours, le thé commence à fermenter. Son goût devient semblable à celui de la citronnelle. Deux (2) semaines après incubation, le thé devient aromatisé, acidulé et rafraîchissant : c'est le MAÏ-BAO (Fig 3).

a.2- Détermination de l'acidité.

Dans le cadre de nos études, le thé devient consommable au bout de deux (2) semaines. Ainsi donc, le thé est prélevé et son acidité est mesurée par dosage acido-basique. En effet, nous neutralisons les acides monovalents présents dans MAÏ-BAO avec une base monovalente qui est la soude (NaOH 0,1 N). Ce qui nous permet de déterminer l'acidité de M-B. Généralement, après deux (2) semaines la boisson est consommable et l'acidité est comprise entre 110 mEq.g/l et 140 mEq.g/l . C'est à cette acidité que M-B est filtré, stocké, lyophilisé puis fractionné.

a.3- Lyophilisation et fractionnement de MAÏ-BAO

a.3.1- Lyophilisation de MAÏ-BAO

La boisson prélevée est répartie par volume de 250 ml et congelée dans des ballons de 500 ml préalablement pesés. Ces ballons sont ensuite portés au lyophilisateur. Au bout de 24 heures, on obtient un produit condensé sous forme de poudre jaune hydrophile dans les ballons. Nous grattons et pesons très rapidement cette poudre que nous conservons sous forme de solution en y ajoutant un volume connu d'eau distillée.

a.3.2- Fractionnement de l'extrait

Les dépôts sont réalisés avec des solutions de MAÏ-BAO à 1000 mg/ml. On dépose sur gel sephadex G-50, un volume de MAÏ-BAO égal à $1/5^{\text{e}}$ du volume du gel dans la colonne. Ces solutions de M-B sont éluées à travers une colonne de Gel sephadex G-50 de 3,5 cm de diamètre sur 30 cm de longueur. Le débit moyen de la chromatographie est une goutte toutes les trois secondes (1 goutte/3s); soit 0,05 ml toutes les trois secondes. Cette

chromatographie sur gel à basse pression nous a permis de recueillir quatre (4) fractions (F₁; F₂; F₃ et F₄) de 150 ml de volume chacune.

Ces différentes fractions sont congelées puis lyophilisées dans les mêmes conditions que le produit brut. Ainsi, nous obtenons des poudres de chaque fraction que nous conservons sous forme de solutions concentrées. Ces solutions vont donc nous permettre de faire tous nos tests aussi bien toxicologiques, physiologiques que biochimiques .

b- Composition chimique des solutions physiologiques de références

Pour les tests physiologiques sur le cœur isolé de rat, nous avons utilisé la solution physiologique de type **MAC EWEN (1956)**⁽¹¹⁵⁾. Pour la pression artérielle de lapin, la solution physiologique utilisée est le NaCl 9‰.

Tableau I : composition du Mac Ewen

Caractéristiques des solutions mères	P.M (g)	Volume (ml) ou quantité (g)	Concentration (mM)
NaCl (80g/l)	58,44	95ml (7,6g)	130,04
KCl (20g/l)	74,56	21ml (0,42g)	5,63
CaCl ₂ (20g/l)	111	12ml (0,24g)	2,16
PO ₄ H ₂ Na (15g/l)	119,96	9,5ml (0,14g)	1,18
CO ₃ HNa (40g/l)	84,01	25ml (1,00g)	11,90
MgCl ₂ ,6H ₂ O (10g/l)	203,30	5ml (0,05g)	0,24
Glucose	180,16	2g	11,10
Q.S.P.		1l	

On ajoute de l'eau distillée après le CaCl_2 et $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ afin d'éviter les précipitations.

c- Techniques expérimentales

c.1- Méthode d'études toxicologiques

Les rats utilisés pour l'expérimentation, sont placés dans des cages contenant de la litière de copeaux de bois. Cette litière est renouvelée périodiquement, c'est-à-dire tous les deux (2) jours. Chaque cage utilisée contient cinq (5) rats de poids sensiblement égaux. La salle de l'animalerie est aérée permettant donc un renouvellement de l'air. Les différentes solutions pharmacologiques utilisées (M-B ; MB-F₁; MB-F₂; MB-F₃; MB-F₄) sont injectées par voie intrapéritonéale à l'aide d'une seringue à insuline de 1 ml. Ainsi, on fait cinq (5) lots de cinq (5) rats pour chacun des produits:

- 0 à 40 000 mg/kg de PC de M-B brut;
- 0 à 40 000 mg/kg de PC de MB-F₁;
- 0 à 40 000 mg/kg de PC de MB-F₂;
- 0 à 40 000 mg/kg de PC de MB-F₃;
- 0 à 43 000 mg/kg de PC de MB-F₄.

c.2- Méthode d'étude physiologique

c.2.1– Enregistrement de la pression artérielle de lapin

c.2.1.1 - Dispositif expérimental

L'enregistrement de la pression artérielle carotidienne se fait avec le manomètre de Ludwig (fig 4). Ce dispositif comprend un tube en U constitué de deux branches. L'une des branches contient du mercure surmonté de la solution de Mac Ewen et possède deux extrémités. L'extrémité la plus haute se termine par une seringue (5) qui permet de faire la surpression. Quant à l'extrémité la plus basse, elle se termine par un cathéter (7) qui plonge dans un bécher (6) contenant le Mac Ewen hépariné et qui permet la canulation de la carotide. La deuxième branche contient également du mercure surmonté d'un flotteur auquel est relié le stylet inscripteur (2) qui transmet ses mouvements au cylindre enregistreur (1). Ce cylindre enveloppé de papier enregistreur tourne à la vitesse de 1 mm/s grâce à un moteur (6).

c.2.1.2- Réalisation de la surpression

La sensibilité du système manométrique de Ludwig est réalisée à l'aide d'une seringue qui assure le remplissage du tube en U adapté à un cathéter. Le cathéter contenant du Mac Ewen, sert à la canulation de la carotide. L'extrémité supérieure du tube en U fixe le niveau de base à partir duquel l'on mesure la pression artérielle.

c.2.1.3- Canulation de la veine saphène et de la carotide

Les lapins utilisés sont anesthésiés par injection intra péritonéale avec d'éthyle uréthane 40% à raison de 1 g/kg de poids corporel.

La canulation de la veine saphène se fait en plaçant le lapin en décubitus dorsal. Puis, on pose un garrot à la racine du membre inférieur rendant saillant la veine saphène. Une tonte et une dissection sont ensuite

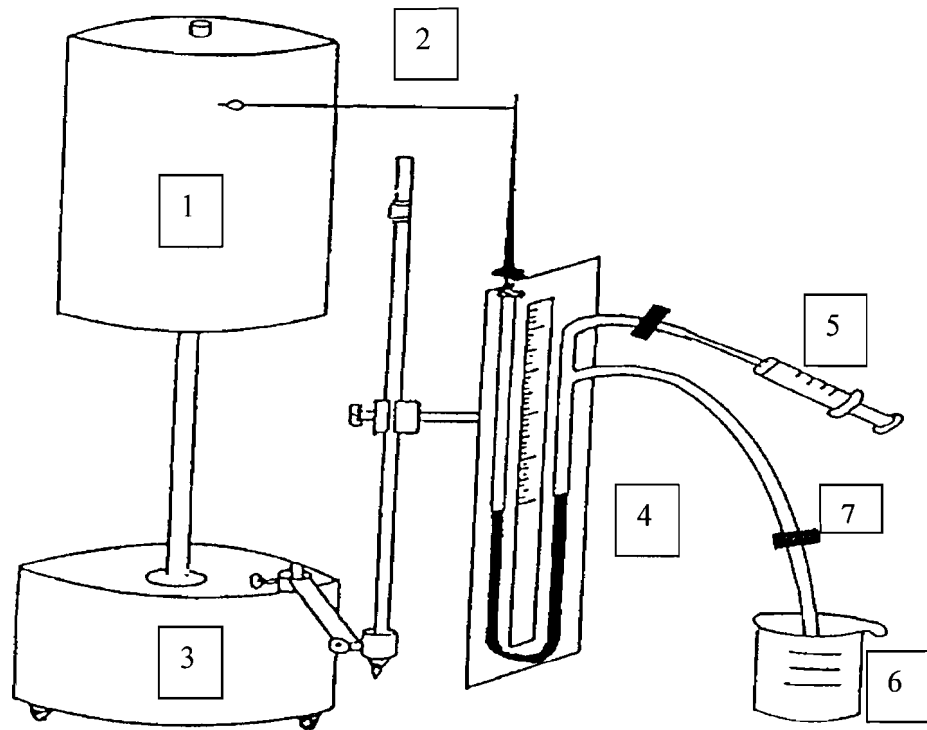


Figure 4: Dispositif expérimental permettant l'enregistrement de la pression artérielle de lapin.
(Laboratoire de Physiologie Animale, UFR Biosciences, 1996)

- 1 : Cylindre enregistreur
- 2 : Stylet inscripteur
- 3 : Moteur
- 4 : Manomètre
- 5 : Seringue
- 6 : Becher
- 7 : Cathéter

réalisées afin de mettre à nu la veine saphène qui est enveloppée dans un amas de tissus conjonctifs. Cet amas est débarrassé sur environ 4 cm afin de ligaturer la veine saphène en amont avec du fil. Enfin une hémisection est faite permettant ainsi de canuler la veine à l'aide d'un cathéter.

Quant à la carotide, sa canulation se fait après une tonte et une incision longitudinale au niveau du cou. On coupe ensuite différents plans musculaires pour mettre à nu la carotide en évitant de léser la veine jugulaire et les nerfs. La carotide est ligaturée en amont et du côté du cœur pour éviter la perte de sang. Une hémisection est enfin réalisée sur la carotide dans laquelle le cathéter de la sonde carotidienne est introduit et fixé avec une ligature. Le cathéter est placé en direction du cœur afin que la pression exercée par le sang soit communiquée au stylet inscripteur via le mercure.

c.2.2- Enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé de rat

c.2.2.1- Le dispositif expérimental

Le dispositif utilisé dans l'expérience est celui de **LANGENDHORFF (1895)**⁽¹⁰⁶⁾. Il est constitué d'un bain-Marie réglé à 37°C par un thermostat. A ce bain sont reliés différents godets suspendus à 50 cm de hauteur et contenant des solutions pharmacologiques constamment oxygénées par un bulleur d'aquarium ou de piscine. A l'intérieur du bain, se trouvent plusieurs voies sous forme de serpentins et qui sont reliées à un robinet à canule externe qui permet de perfuser le cœur isolé suspendu au dispositif. Le cœur est ensuite accroché par son apex à l'hameçon relié par un fil au stylet inscripteur qui transmet ses mouvements au cylindre enregistreur. Ce cylindre est enveloppé de papier enregistreur et tourne à une

vitesse constante de 1 mm/s pour l'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé de rat (Fig 5).

c.2.2.2- Prélèvement du cœur de rat

Les rats utilisés sont anesthésiés par injection intra péritonéale d'éthyle uréthane 20% à raison de 1 g/kg de PC. Les animaux sont placés rapidement sous respiration artificielle à l'aide d'un générateur d'air afin d'oxygéner leurs organes. Une thoracotomie médiane est ensuite effectuée et la cage thoracique est maintenue ouverte avec un écarteur. Cela permet de mettre à nu la crosse aortique et les vaisseaux sanguins en dilacérant le thymus qui les enrobe. Des nœuds sont préparés sur les trois artères collatérales. Par ailleurs, une hémisection est réalisée au niveau de la crosse

aortique afin d'y introduire une canule surmontée d'une seringue préalablement remplie de Mac Ewen hépariné. La canule est ligaturée dans la crosse aortique après les artères collatérales. La solution physiologique héparinée est injectée dans le cœur pour éviter la coagulation du sang. On isole le cœur en sectionnant les vaisseaux en deçà des ligatures. Le cœur isolé est rapidement fixé au robinet du dispositif expérimental et perfusé avec le liquide physiologique (Mac Ewen). L'apex du cœur est accroché au stylet inscripteur qui transmet les mouvements du cœur au cylindre enregistreur. Le stylet trace ainsi les mouvements cardiaques sur le papier enregistreur au fur et à mesure que tourne le cylindre à une vitesse constante de 1 mm/s.

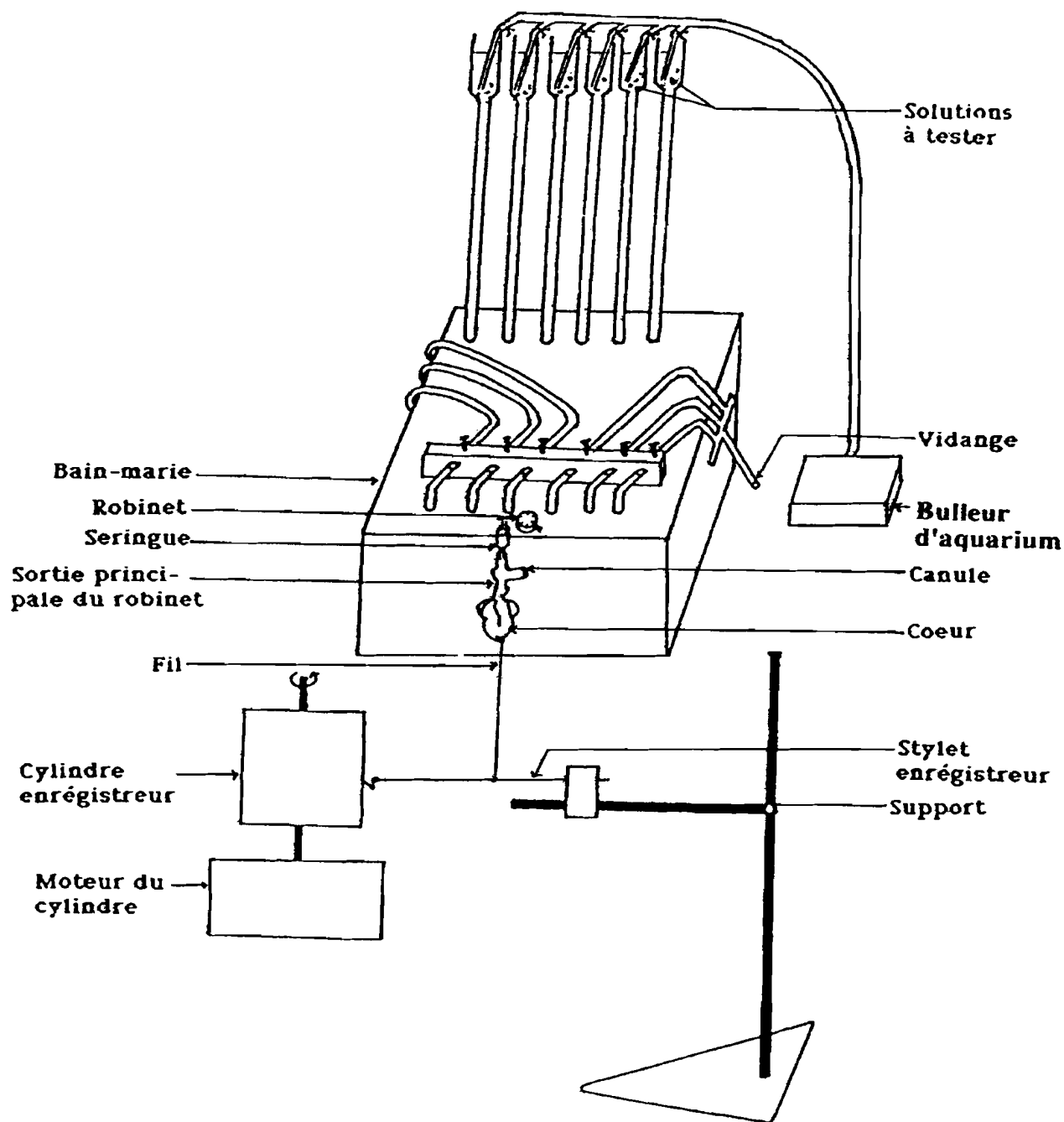
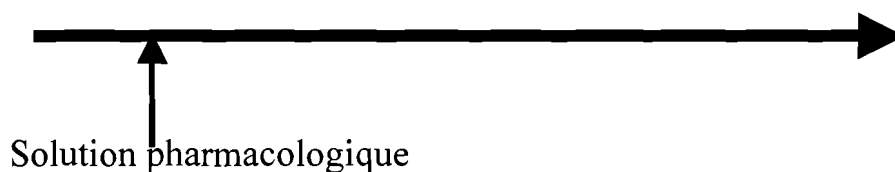


Figure 5 : Dispositif expérimental permettant l'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé de rat.
(Laboratoire de Physiologie Animale, UFR Biosciences, 1996)

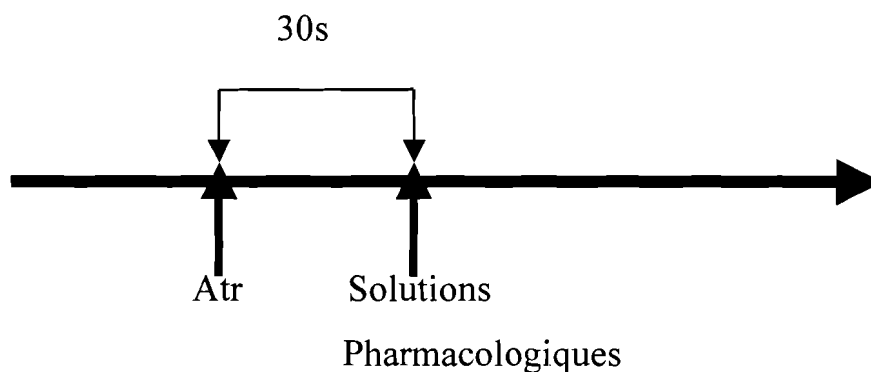
2- Méthodes d'études pharmacologiques sur la pression artérielle de lapin et sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat.

a- Effets des substances pharmacologiques sur la pression artérielle

Nous avons effectué des effets dose-réponses par injection des solutions pharmacologiques par la veine saphène. Ces différentes solutions sont le diltiazem (Dz), acétylcholine (ACh), M-B et ses fractions (F₁, F₂, F₃ et F₄) à des concentrations croissantes. La pression artérielle obtenue est inscrite sur le papier enregistreur du cylindre que nous fixons à l'aide de vernis.



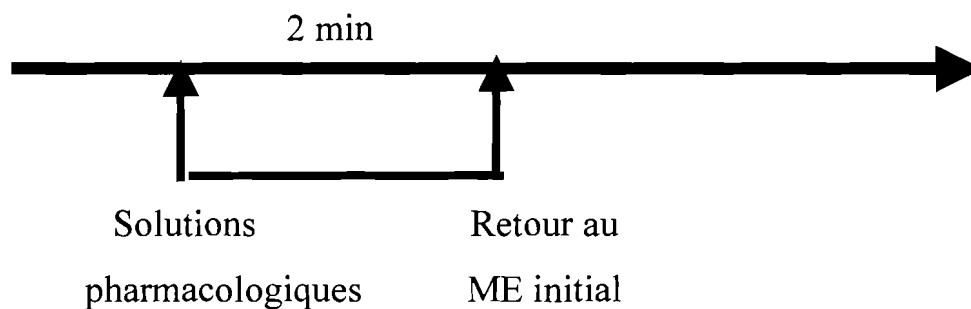
Nous avons effectué des interactions entre M-B et l'atropine à des concentrations croissantes; l'ACh et l'atropine (Atr) afin de voir l'effet antagoniste ou non de l'atropine sur chacun de ces produits. Ainsi, 30 s après injection de l'Atr à une concentration bien donnée, on injecte le produit testé.



b- Effets des substances pharmacologiques sur le cœur isolé de rat

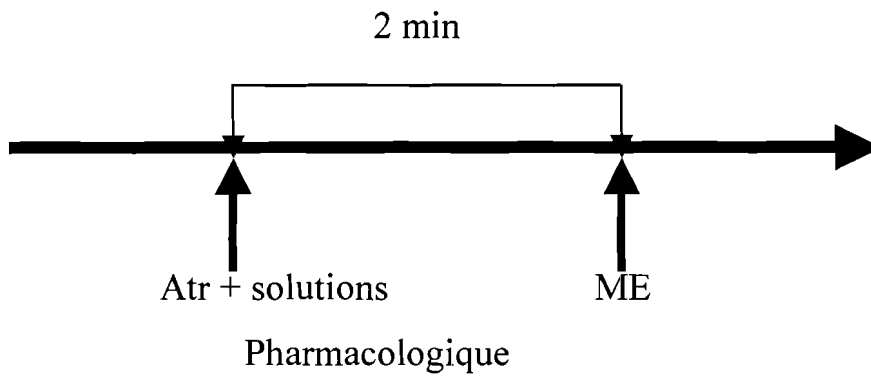
b.1- Effets dose-réponses

Pour l'étude les effets dose-réponses de chacun des produits pharmacologiques que sont M-B; MB-F₁; MB-F₂; MB-F₃; MB-F₄; ACh et Dz, nous avons procédé par la perfusion du cœur isolé avec des concentrations croissantes de chacun de ces produits pharmacologiques. Après deux (2) minutes de perfusion, on retourne au Mac Ewen (ME) afin de voir si l'effet du produit est réversible ou non et d'en déterminer les concentrations thérapeutiques et toxiques.



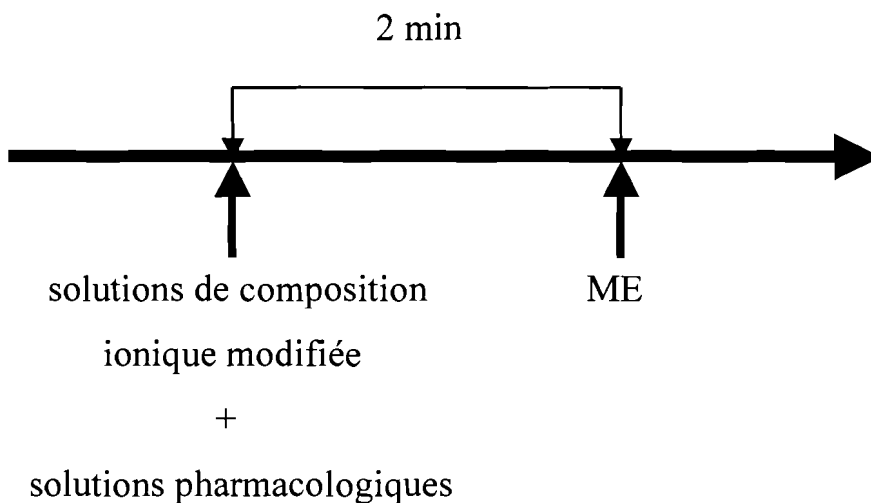
b.2- Interaction solutions pharmacologiques - Atr

On a observé l'action du mélange MB (15 mg/ml) + Atr (10^{-2} mg/ml); Dz (10^{-2}) + Atr (10^{-2} mg/ml); F₂ (5 mg/ml) + Atr (10^{-2} mg/ml) et ACh (10^{-2} mg/ml) + Atr (10^{-2} mg/ml). Après environ deux (2) minutes d'action, on retourne au Mac Ewen de référence. Ces expériences nous permettront de voir l'action cholinomimétique ou non de chacun des produits pharmacologiques.



b.3- Effets des solutions physiologiques de composition ionique modifiée dans l'action des substances pharmacologiques

Le cœur est perfusé avec des solutions pharmacologiques préparées dans du Mac Ewen contenant des ions Na^+ et Ca^{++} de concentrations modifiées (solutions hyper et hyposodique, et solutions hyper et hypocalcique).



C- MÉTHODES D'ÉTUDES BIOCHIMIQUES

1- Techniques d'extraction de l'ATPase Na⁺-K⁺ et de l'AChE du cœur de rat

a- Techniques d'extraction de l'ATPase Na⁺-K⁺

Nous avons utilisé le cœur de rat pour l'extraction de l'ATPase Na⁺-K⁺. La méthode d'extraction utilisée est celle de **SCHWARTZ et al, (1962)⁽¹⁵⁹⁾**; **GUÉDE-GUINA (1975)⁽⁷⁶⁾**. Le rat est assommé par la nuque et une thoracotomie est réalisée afin de prélever rapidement le cœur. Le cœur est ensuite placé dans une solution de saccharose 0,32 M à 0°C et à pH 7,4. On broie six (6) grammes de cœur dans neuf (9) volumes de solution de sucrose 0,32 M avec un homogénéiseur (Ultra-turax T25 basic) à 8 500 trs/min. Le broyage se fait pendant 15 s dans un bain de glace fondant à 0°C. Le broyât est ensuite centrifugé à différentes vitesses dans une centrifugeuse réfrigérée (MEDIFRIGER-BL de marque SELECTA et de Rotor 7001081) à température constante de 4°C (Fig 6).

Pour adapter les différentes vitesses de centrifugation à notre centrifugeuse dont la vitesse maximale est 15 000 trs/min ou 19 282g, nous avons utilisé la relation suivante

$$g = 1118.10^{-8} \cdot r \cdot v^2 \quad v = \text{vitesse (trs/min)}$$

$$r = \text{rayon du rotor (cm)} = 7,6 \text{ cm}$$

Les différentes centrifugations débutent avec 2 658 trs/min pendant 10min. Le surnageant est conservé à 0°C et le culot est repris une fois dans un volume de sucrose 0,32 M. Une deuxième centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions. Le culot est jeté et le surnageant obtenu est mélangé au premier surnageant conservé. Ce mélange est centrifugé à 10 849 trs/min

pendant 15 min et le surnageant est conservé à 0°C. Le culot est lavé deux fois avec un demi volume de sucrose et subit à nouveau une centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot est jeté et le mélange des surnageants est centrifugé à 15 000 trs/min pendant 60 min. Le surnageant issu de cette centrifugation est jeté et le culot est repris une fois dans un volume de sucrose, puis, de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Seul le culot issu de cette centrifugation est repris dans le sucrose et centrifugé à 13 287 trs/min pendant 10 min. Le surnageant est recueilli et le culot contenant les mitochondries est jeté. C'est ce surnageant qui va subir enfin une nouvelle centrifugation à 15 000 trs/min pendant 60 min. Le culot issu de cette centrifugation et qui contient l'ATPase Na⁺-K⁺ des microsomes est conservée à -20°C.

l'ATPase Na⁺-K⁺ microsomale obtenue est mise en suspension dans de l'eau bidistillée à la concentration de 5 mg de microsome par ml. Ces suspensions sont conservées par volume de 5 ml à -20°C afin que l'enzyme puisse garder toute son activité (NAKAO et al, 1965)⁽¹³⁵⁾..

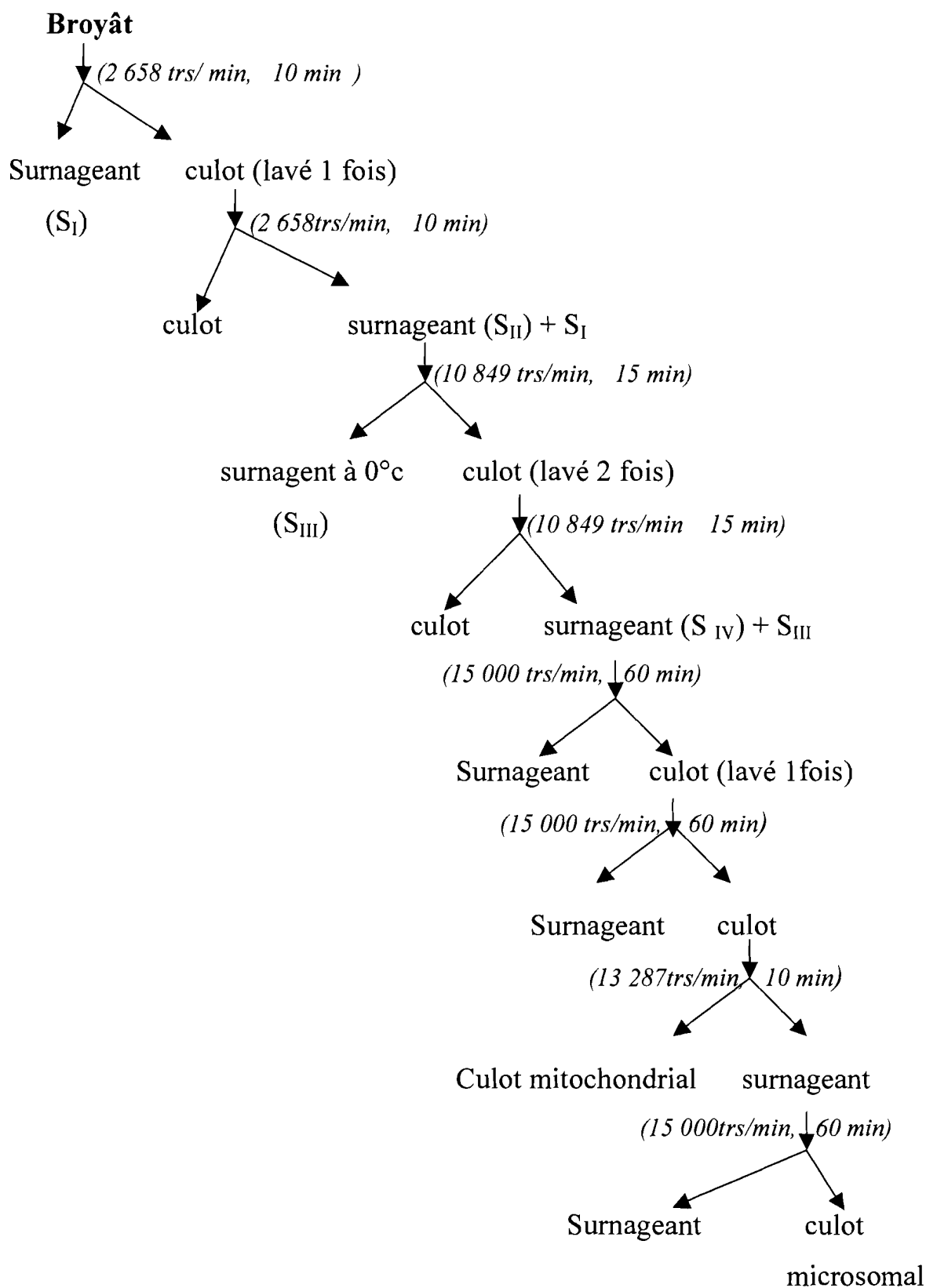


Fig 6: Méthode d'extraction de l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur de rat (GUÉDÉ, 1975)⁽⁷⁶⁾

b- Technique d'extraction de l'AChE

L'extraction de l'AChE a été faite selon la méthode de **KHOA-BUT et OCHILLO (1987)⁽¹⁰³⁾**; **BAHI (1998)⁽¹⁴⁾** et **N'GUESSAN (2001)⁽¹³⁸⁾** en utilisant le cœur de rat. Le rat est assommé avec un coup de massue à la nuque. Le cœur du rat est isolé rapidement dans le tampon phosphate mono et disodique 0,5 M à pH 7,8 grâce à une thoracotomie médiane. Le cœur est pesé et broyé avec un homogénéiseur (extra-turax T25) à 2 500 trs/min pendant 2 min dans le tampon phosphate à raison de 1 g pour 50 ml de tampon. Le broyât est ensuite centrifugé à 2 500 trs/min pendant une heure dans une centrifugeuse de marque Alresa. Le surnageant obtenu constitue la préparation enzymatique.

2- Méthodes de préparation des substrats et des réactifs de l'ATPase Na⁺-K⁺ et de l'AChE

a- Préparation du substrat et du réactif de l'ATPase Na⁺-K⁺

a.1- Préparation de l'ATP-tris

La préparation de l'ATP-tris utilise un substrat qui est le Tris-hydroxyméthylaminométhane de l'adénosine triphosphate. Selon **SCHWARTZ et al, (1962)⁽¹⁵⁹⁾** et **NAKAO et al, (1965)⁽¹³⁵⁾**, la préparation de l'ATP-tris nécessite deux (2) lots de résine échangeuse de cation de 2,5 g chacun. Chacun des lots est successivement traité avec 50 ml d'HCl (N), de l'eau bidistillée, une solution de NH₃ (N), de l'eau bidistillée, HCl (N), de l'eau bidistillée jusqu'à l'obtention d'une solution à pH neutre (6-7). Les deux lots de résine sont alors conservés dans une chambre froide (0-4°C).

Parallèlement, 0,5 g d'ATP- Na_2 est pesé et dissout dans 2ml d'eau désionisée puis ajouté à l'un des lots de résine. Le mélange est agité pendant 15 min et filtré sous vide avec un büchler. La résine est ensuite lavée deux fois avec 1 ml d'eau bidistillée. Le filtrat est ajouté à l'autre lot de résine et traité de la même manière. Le filtrat final est amené à pH 7,4 avec le Tris-HCl (1M), pH 7,4. La concentration de l'ATP-tris est ramenée à 15 mM en mesurant l'absorbance à 260 nm avec un spectrophotomètre (Spectronic Genesis). A cette longueur d'onde, l'ATP 15 mM donne une absorbance de 0,23.

a.2- Préparation du substrat standard

Le substrat standard s'obtient par le mélange de l'ATP-tris aux sels. Ainsi, pour 100 ml de substrat standard, il faut mélanger

- 25 ml de tris-HCl (0,4 M) à pH 7,4
- 10 ml de NaCl (1 M)
- 10 ml de KCl (0,3 M)
- 1 ml de MgCl_2 (0,3 M)
- 20 ml d'ATP-tris (15 mM)
- qsp 100 ml d'eau distillée

Le substrat standard ainsi obtenu, donne des concentrations finales de 3mM en ATP; 100mM en Tris-HCl; 100mM en NaCl; 3mM en MgCl_2 et 30mM en KCl.

Ce substrat standard ainsi préparé, va servir de substrat pour l'ATPase Na^+ - K^+ extraite.

b- Préparation du substrat et du réactif de l'AChE

b.1- Préparation des solutions d'ASCh et de DTNB

La solution d'iodure d'acétylthiocholine (ASCh) de concentration 0,014 M, nécessaire à la préparation du substrat de l'AChE est obtenue en dissolvant 0,4g de ASCh dans 100ml d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C pendant une semaine au plus. Quant à la solution de DTNB 0,01 M nécessaire à la préparation du réactif d'Ellman, elle est obtenue par dissolution de 0,4 g de ce produit dans 100 ml de tampon phosphate 0,5 M à pH 7,8 dilué au 1/5^e. La solution de DTNB est aussi conservée à 4°C.

b.2- Préparation du réactif d'Ellman

Le réactif d'Ellman est préparé à partir de la solution de DTNB (0,01,M) et de la solution d'iodure d'acétylthiocholine (0,014 M).

L'ASCh est le substrat de l'AChE.

Ainsi, le réactif d'Ellman est préparé extemporanément à partir de

- 100 µl (ASCh) 0,014 M
- 100 µl de DTNB (0,01 M)
- 20 µl de tampon phosphate (0,5 M) à pH 7,8
- 780 µl d'eau distillée

Ce mélange conduit à un volume final de 1000 µl contenant 0,0014M d'acétylthiocholine.

3- Méthodes d'étude de l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ et de l'AChE

a- Étude de l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺

a.1- Dosage des protéines par la méthode de Lowry

La méthode de **LOWRY et al, (1951)⁽¹¹²⁾** est la résultante de l'association de deux réactions:

- la réaction de biuret qui permet de caractériser les liaisons peptidiques,
- la réaction de Folin qui permet de mettre en évidence les acides aminés aromatiques.

La méthode de Lowry permet de doser la quantité de protéines présentes dans une solution donnée. Pour ce faire, nous avons établi une courbe étalon avec une protéine de référence: le Sérum Albumine Bovine (SAB) à des concentrations de 0 à 200 µg/ml. Au delà de cette concentration, la loi de Beer-Lambert n'est plus respectée. Il n'existe donc plus de corrélation entre l'absorbance et la concentration.

La réalisation de la méthode de Lowry utilise les solutions suivantes:

- solution A: réactif de Folin dilué deux fois,
- solution B: Na₂CO₃ 2% dans NaOH 0,1N
- solution C: CuSO₄ 1%
- solution D: tartrate de sodium et de potassium à 2%
- solution E: préparée extemporanément en mélangeant 1 ml de C, 1 ml de D et 98 ml de B.

Dans différents tubes à essai, sont mis 1 ml de la solution SAB à concentrations différentes allant de 0 à 200 µg/ml. Puis, dans chacun de ces

tubes, on ajoute 0,5 ml de réactif de Folin. On agite énergiquement et on lit après 30 min, l'absorbance à 700 nm.

a.2- Dosage du phosphate inorganique

La méthode de **SUMNER (1944)⁽¹⁶⁸⁾**: elle permet de mettre en évidence le complexe phosphomolybdique par la coloration bleue. La lecture se fait à 540 nm. Cette méthode utilise comme réactif, le sulfate ferreux (FeSO_4) qui est préparé extemporanément pour le dosage du phosphore avec :

- * 5 g de FeSO_4
- * 50 ml d'eau distillée
- * 1 ml de H_2SO_4 (7,5 N)

Pour le dosage du phosphore, on ajoute successivement

- * 0,5 ml de molybdate d'ammonium 6,6%
- * 0,5 ml de H_2SO_4 (7,5 N)
- * 0,4 ml de FeSO_4

On laisse la coloration se développer pendant 30 min avant de faire la lecture de l'absorbance à 540 nm sur un spectrophotomètre.

Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions avec une solution de KH_2PO_4 (5 mM).

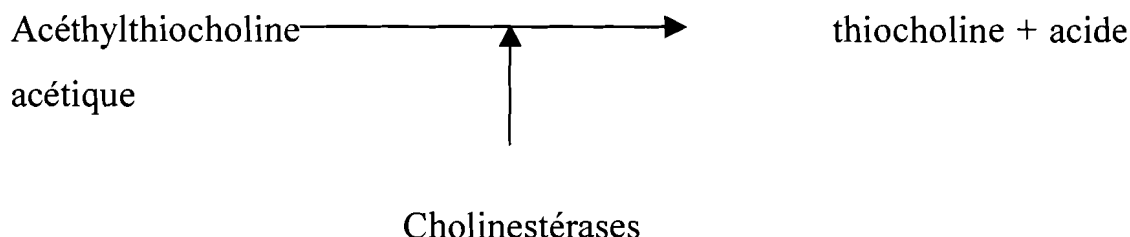
b- Étude de l'activité de l'AChE

b.1- Technique de dosage de l'activité des cholinestérases totales

La solution enzymatique obtenue à l'issue de l'extraction selon la méthode de **KHOA-BUT et OCHILLO (1987)⁽¹⁰³⁾** est constituée de deux

cholinestérases : l'acétylcholinestérase (AChE) ou vraie cholinestérase et la Butyrylcholinestérase (BuChE) ou pseudocholinestérase.

Selon **ELLMAN et al (1961)⁽⁵⁴⁾**, le dosage de l'activité des deux cholinestérases est basé sur la réaction suivante :



La thiocholine libérée à l'issue de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par les cholinestérases, s'associe au DTNB pour donner une coloration jaune. Et c'est cette coloration qui est mesurée au spectrophotomètre à 412nm.

Le milieu réactionnel est constitué par

- 1 ml de tampon phosphate (0,5 M) à pH 7,8
- 100 µl de solution enzymatique.

Après agitation au vortex et préincubation au bain Marie à 38°C pendant 15 min, on ajoute 50 µl de réactif d'Ellman. Ensuite, le mélange est incubé à 38°C pendant 15 min puis la lecture est faite à 412 nm.

b.2- Dosage de l'activité de l'AChE.

Le dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase seule se fait en utilisant un inhibiteur de l'activité de la BuChE qu'est l'éthopropazine. L'expérience est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Mais avant d'ajouter le réactif d'Ellman, l'enzyme est préincubée à 38°C pendant 15 min en présence de l'éthopropazine à 10^{-4} M. Après l'ajout du

réactif d'Ellman, le mélange est incubé dans les mêmes conditions que précédemment, puis la lecture à 412 nm.

Le tube témoin contient tous les éléments sauf l'enzyme. Pour toutes les autres études, le tampon phosphate (0,5 M) à pH 7,8 est préparé avec l'éthopropazine 10^{-4} M.

c- détermination des paramètres cinétiques de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ et de l'AChE

c.1- Étude de l'activité de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ et de l'AChE en fonction du temps de réaction

Cette étude permet de déterminer le temps de réaction. Ce temps est la période au cours de laquelle la vitesse de catalyse de l'enzyme est proportionnelle au temps. Cela permet de déterminer le temps d'incubation du milieu réactionnel pour les études ultérieures et de calculer la vitesse initiale.

c.1.1- Etude de l'activité de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en fonction du temps de réaction

L'étude de l'activité catalytique de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ du cœur de rat a été réalisée par la méthode de Sumner selon le protocole suivant:

Après introduction de 0,2 ml de substrat standard dans les tubes à essai, on ajoute 0,2 ml de la solution microsomale (solution enzymatique). Ensuite, 0,5 ml de molybdate d'ammonium (6,6%) est introduit dans chacun des tubes. Puis, on y ajoute successivement 0,5 ml de H_2SO_4 (7,5 N) et 0,4 ml de FeSO_4 . Le volume final est ramené à 5 ml avec de l'eau distillée et est placé à 37°C au bain Marie. A intervalle de temps régulier, la réaction est

arrêtée dans chacun des tubes en précipitant les protéines en excès avec 1 ml d'acide trichloroacétique à 0°C (ATTILIO, 1975)⁽¹²⁾. Le contenu des tubes est prélevé à intervalle régulier de 5 min et la DO est lue à 540nm.

c.1.2- Etude de l'activité de l'AChE en fonction du temps de réaction

La détermination de l'activité de l'AChE se fait par la préparation du milieu réactionnel qui comprend :

- 50 ml de tampon phosphate (0,5 M) à pH 7,8
- 750 µl de solution enzymatique.

Après agitation, l'erenmeyer contenant le milieu réactionnel est porté au bain marie à 37°C. Après 15 min de préincubation, on ajoute 250 µl de réactif d'Ellman. Le milieu réactionnel est immédiatement prélevé pour déterminer l'absorbance à zéro minute. Puis à intervalle de temps régulier de 5 min, 1ml du milieu est immédiatement prélevé et lu à 412 nm contre le tube témoin.

Le tube témoin est réalisé avec

- 1,015 ml de solution tampon (0,5 M) à pH 7,8
- 5 µl de réactif d'Ellman.

c.2- Détermination du pH optimum d'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ et de l'AChE

Toutes les enzymes sont des protéines. Elles possèdent donc des groupements ionisables qui sont sensibles aux variations du pH.

c.2.1- Détermination du pH optimum d'activité de l'ATPase Na⁺K⁺

Pour la détermination du pH, nous avons utilisé les mêmes conditions de dosage selon la méthode de Sumner. Le tampon utilisé est le sucrose 0,32M qui est préparé à pH compris entre 2 et 12.

c.2.2- Détermination du pH optimum d'activité de l'AChE

Pour la détermination du pH, nous avons utilisé le tampon phosphate qui est préparé à pH compris entre 5 et 9. Puis l'étude est faite selon la méthode de KHOA-BUT et OCHILLO, (1987)⁽⁹⁰³⁾.

c.3- Détermination de la température optimale d'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ et de l'AChE

Les enzymes exercent leur activité à une températures qui leur est spécifique afin d'éviter leur dénaturation: c'est la température optimale. Au delà de cette température, l'enzyme se dénature et son activité baisse.

c.3.1- Détermination de la température optimale d'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺

Pour déterminer cette température optimale, nous avons réalisé les mêmes conditions d'expérimentation que celles décrites par Sumner. Les tubes à essai sont portés au bain Marie et incubés à une gamme de températures comprises entre 0 et 60°C pendant 30 min.

c.3.2- Détermination de la température optimale d'activité de l'AChE

La température optimale est déterminée en préincubant à 38°C pendant 15 min dans des tubes à essai,

- 1 ml de tampon phosphate (0,5 M) à pH 7,8
- 75 µl de solution enzymatique.

On agite les tubes et on ajoute 75 µl de réactif d'Ellman. Le mélange de chaque tube est homogénéisé et incubé pendant 15 min à différentes températures variant de 24 à 44°C. L'absorbance est lue à 412 nm contre le témoin.

Pour chaque expérience aussi bien de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que de l'AChE, on réalise toujours un témoin pour chaque paramètre donné et dans les mêmes conditions.

4- Méthode d'étude des différents effecteurs

a- Étude de l'influence du substrat sur l'activité catalytique de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ et de l'AChE

a.1- Étude de l'influence du substrat sur l'activité catalytique de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$

Dans cette étude, le milieu réactionnel est composé de :

- substrat (ATP) de concentration variant de 0 à 8 mM;
- 0,2 ml de solution enzymatique;
- 0,5 ml de molybdate d'ammonium (6,6 %);
- 0,5 ml de H_2SO_4 (7,5 N);
- 0,4 ml de FeSO_4 ;

- qsp 5 ml.

On incube les tubes à 37°C pendant 15 min et on ajoute 1 ml d'acide trichloroacétique juste après pour arrêter les réactions et on fait la lecture à 540 nm.

a.2- Étude de l'influence du substrat sur l'activité catalytique de l'AChE

Dans cette étude, nous avons préparé le substrat (le réactif d'Ellman) à différentes concentrations allant de 0 nM à 15 nM.

Le milieu réactionnel est composé de :

- 1000 µl de tampon phosphate 0,5 M à pH = 7,8
- 75 µl de solution enzymatique.

Après 15 min de préincubation, 50µl de réactif d'Ellman sont ajoutés dans les différents tubes à essai à des concentrations variant de 0 M à $15 \cdot 10^{-6}$ M. Le mélange est homogénéisé et incubé à 38°C pendant 15 min contre le tube témoin qui ne contient pas d'enzyme. On fait la lecture à 412 nm.

b- Influence des effecteurs sur l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ et l'AChE

b.1- Influence de MAÏ-BAO, MB-F₃ et Dx sur l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺

Cette étude nous a permis de voir l'action des concentrations croissantes de chacun des trois produits sur l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur de rat. A savoir pour M-B et MB-F₃ (10^{-2} à 50 mg/ml) et pour Dx ($1,28 \cdot 10^{-2}$ µM à 64 µM). Dans des tubes à essai, on met 0,2 ml de substrat

standard. Puis on ajoute un volume X de l'effecteur afin qu'avec le volume total de 5 ml, l'effecteur soit à la concentration voulue. Après l'effecteur, on ajoute 0,5 ml de molybdate d'ammonium (6,6 %) dans chacun des tubes. On ajoute successivement 0,5 ml de H₂SO₄ (7,5 N) et 0,4 ml de Fe₂SO₄. Les différents tubes sont incubés à 37°C pendant 15 min au bout desquelles on ajoute de l'acide trichloroacétique à 0°C pour précipiter la protéine en excès. On fait la lecture à 540 nm.

On prépare pour chaque concentration de l'effecteur, des tubes témoins ne contenant pas l'enzyme.

b.2- Influence des effecteurs sur l'activité catalytique de l'AChE

b.2.1- Influence de MAÏ-BAO, MB-F₂ et Atr sur l'activité de l'AChE

Nous avons étudié l'action de MAÏ-MAO à 15 mg/ml, de MB-F₂ à 5 mg/ml et de l'atropine à 10⁻² mg /ml sur l'activité catalytique de l'AChE de cœur de rat. Le milieu réactionnel est constitué de :

- 900 µl de tampon phosphate 0.5 M à pH=7.8
- 100 µl de M-B ou MB-F₂ ou Atr préparé dans du tampon.
- 75 µl de la solution enzymatique.

Après préincubation incubation , on ajoute 50 µl de réactif d'Ellman et le mélange homogénéisé est incubé à 38°C pendant 15 min. On fait ensuite la lecture à 412 nm.

b.2.2- Influence de l'association M-B – Atr et MB-F₂ – Atr l'activité de l'AChE

Ces différentes expérimentations ont été réalisées avec l'association MB-F₂ (5 mg/ml) + Atr (10⁻² mg/ml) et M-B (15 mg/ml) et Atr (10⁻² mg/ml). Le milieu réactionnel est composé de :

- 800 µl de tampon phosphate 0,5 M à pH = 7,8
- 100 µl de M-B ou de MB-F₂,
- 100 µl de Atr
- 75 µl de solution enzymatique.

Après préincubation incubation , on ajoute 50 µl de réactif d'Ellman et le mélange homogénéisé est incubé à 38°C pendant 15 min. On fait ensuite la lecture à 412 nm contre un tube témoin ne contenant pas de solution enzymatique pour chaque expérience..

c- Détermination de l'activité résiduelle de l'ATPase Na⁺-K⁺

En fonction des expériences ci-dessus réalisées, nous avons déterminer les pourcentages de l'action des effecteurs sur l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur de rat. La représentation graphique de ces pourcentages va nous permettre d'avoir les CI₅₀ de chacun des effecteurs.

5- Méthodes statistiques de comparaison

a- Comparaison de deux échantillons indépendants

Deux échantillons (1 et 2) ou deux séries d'expériences de populations N₁ et N₂ sont dites indépendantes quant elles n'ont aucun lien entre elles.

Soit m_1 et m_2 , les moyennes respectives des deux séries d'expériences. Dans notre cas, N_1 et $N_2 < 30$. Nous comparons les résultats des deux séries d'expériences réalisées sur le cœur isolé de rat avec deux produits différents à des concentrations différentes.

On suppose que:

- la variable étudiée est gaussienne dans les deux populations.
- les variances dans les deux populations sont égales.

On peut alors effectuer le test du t de Student. Ainsi, on définit deux hypothèses:

$H_0: m_1 = m_2$, la concentration des différentes substances utilisées dans nos expérimentations est la même dans les deux populations.

$H_1: m_1 \neq m_2$, alors les moyennes des deux échantillons diffèrent.

Si H_0 est vraie, alors la théorie nous indique que la quantité

$$t = \frac{m_1 - m_2}{s \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

suit la loi du t de Student à $\nu = N_1 + N_2 - 2$ d.d.l (nombre de degré de liberté).

On détermine alors dans le tableau du t de Student la valeur t_{α} en choisissant α dans le tableau.

Si après le calcul, t ne se trouve pas dans la région critique, c'est-à-dire si t se trouve dans l'intervalle $\pm t_{\alpha}$, alors on accepte l'hypothèse H_0 et on conclut

qu'au risque α , les moyennes ne diffèrent pas significativement, donc les deux produits ont sensiblement les mêmes effets. Dans le cas contraire, l'un d'entre les deux produits comparés est plus actif que l'autre.

b- Comparaison de deux échantillons appariés

Deux échantillons de populations N_1 et N_2 sont dits appariés, quant ils ont des liens entre eux.

Dans notre cas, nous avons comparé les résultats d'expériences de deux produits différents mais aux mêmes concentrations.

Dans ce cas, on détermine les différences (d) pour chaque couple de résultats à la même concentration. On calcule la moyenne de d (\bar{d}) et l'écart type (s).

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{N} \quad \text{et} \quad s = \sqrt{\frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{N}}{N-1}}$$

Puis, selon le test t de Student, on peut poser deux hypothèses :

H_0 : $\sum d = 0$, alors les moyennes des deux expériences sont les mêmes,

H_1 : $\sum d \neq 0$, alors les moyennes diffèrent.

Si H_0 est vraie, alors le paramètre t

$$t = \frac{\bar{d}}{s / \sqrt{N}}$$

suit une loi de Student à N-1 ddl en supposant que les différents d suivent une loi normale. On détermine comme précédemment t_{α} dans la table de Student avec α et le ddl. Ainsi, la région critique

Est formée des valeurs extérieures à l'intervalle $\pm t_{\alpha}$.

Si t tombe dans la région critique, on accepte H_1 et on conclut qu'au risque α , l'un des deux produits testés est plus actif que l'autre.

Si t tombe à l'extérieur de la région critique, alors on conclut que les deux produits testés ont sensiblement les mêmes effets.

6- Limites des techniques expérimentales de l'enregistrement de l'activité mécanique du cœur isolé de rat

Le cœur ne produit pas ses contractions rythmiques normales, car les techniques utilisées connaissent des limites qui sont liées à deux facteurs dont

- la température : le cœur est isolé dans un milieu ambiant de 22°C, alors qu'il devrait être à la température de 37°C afin d'être dans les conditions d'activité normale. Aussi, le cathéter de perfusion du cœur étant placé à une certaine distance de celui-ci, les substances pharmacologiques connaissent une déperdition de température allant de 37°C à 35°C avant d'arriver au cœur.
- L'oxygénation : Le cœur ne reçoit pas suffisamment d'oxygène pour produire une activité normale, car au lieu d'utiliser un barbotage de carbogène, l'on a utilisé un bulleur d'aquarium.

E- LES PRODUITS UTILISES ET LEUR PROVENANCE

Tableau II : les produits chimiques utilisés

produits	P.M (g/mol)	Provenance
NaCl	58,44	SIGMA
CaCl ₂	111	LABOSI
KCl	74,56	SIGMA
PO ₄ HNa	119,96	MERCK
CO ₃ HNa	84,01	MERCK
MgCl ₂	95,30	MERCK
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180	MERCK
Diltazem (C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S)	414	SIGMA
Atropine (C ₁₇ H ₂₃ NO ₃)	289,38	PROLABO
Acétylcholine choride (C ₇ H ₁₆ NO ₂ Cl)	181,66	SIGMA
Gel Séphadex G-50		SIGMA
Digoxine (C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄)	780,90	Procter et gamble pharmaceuticales
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	342,30	MERCK
Tris-hydrométhylaminométhane (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	121.14	MERCK
Adénosine triphosphate disodique (C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₃ P ₃ Na ₂)	551,1	SIGMA

Résine		PROLABO
Eau désionisée		Société Ivoirienne de Raffinage (SIR)
NH ₃	17,03	SIGMA
Phosphate monosodique	334,14	MERK
Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	134.12	MERK
Réactif de Folin		MERK
Molybdate d'ammonium	321,92	MERK
Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)	98,07	MERK
Sulfate de fer (FeSO ₄)	152	PROLABO
Acide trichloroacétique (C ₂ HCl ₃ O ₂)	163,39	PROLABO
Sérum Albumine Bovine (SAB)		BioMérieux
Carbonate disodique (Na ₂ CO ₃)	106	MERK
Hydroxyde de sodium (NaOH)	40	MERK
Sulfate de cuivre (CuSO ₄)	159,68	MERK
Tartrate de sodium et de potassium (C ₄ H ₄ NaKO ₆)	210,91	MERK
Éthopropazine (C ₁₉ H ₂₄ N ₂ S .HCl)	348,90	SIGMA
2,2'dinitro-5,5'dithiodibenzoïque acide (C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂)	396,36	MERK
Acéthylthiocholine iodide (C ₇ H ₁₆ ISNO)	289,20	SIGMA

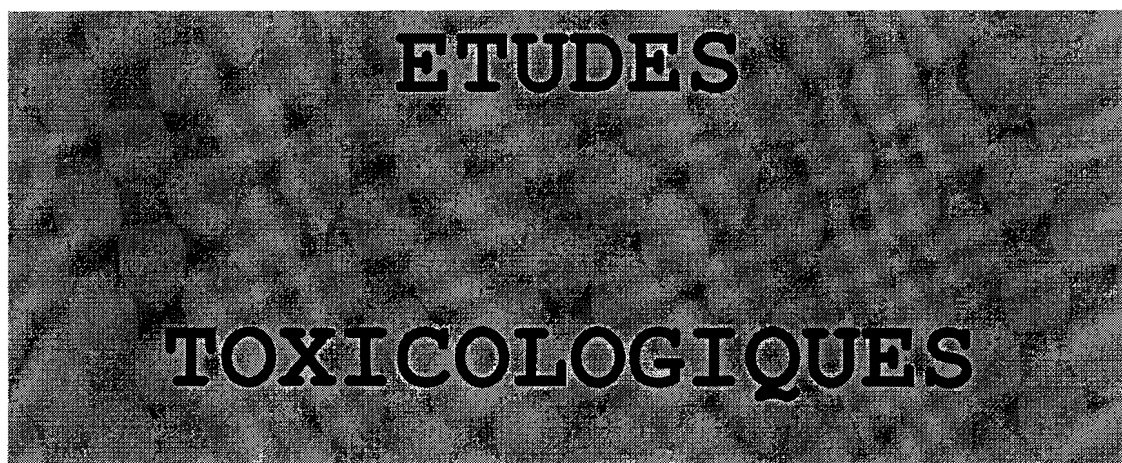
III

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

PREMIERE PARTIE



Cette étude nous a conduit à déterminer la toxicité aiguë et la toxicité chronique.

A-TOXICITE AIGUE

Dans notre cas, nous avons cherché la dose unique pouvant entraîner la mort de 50% d'animaux mis en expérimentation selon leur poids. Dans cette étude, des doses croissantes de M-B; MB-F₁ ; MB-F₂ ; MB-F₃ et MB-F₄ ont été administrées par voie intrapéritonéale à des lots de cinq (5) rats ayant le même poids à l'intérieur de chaque lot.

1- Comportement des animaux.

Après injection par voie intra péritonéale de fortes doses de produits, la respiration des rats s'entrecoupe et devient saccadée. Ils restent alors, immobiles pendant quelques instants. Ensuite, ils se déplacent lentement par des mouvements désordonnés. Puis, environ 10h de temps après injection des produits, survient la mort du premier animal. L' animal meurt couché sur le ventre.

2- détermination des doses minimales toxique (DMT)

La DMT est la plus petite dose qui entraîne la mort du premier animal. Les DMT ont été déterminées graphiquement (Fig 7) et résumées dans le tableau VI. Ces DMT sont très élevées. Cependant, la DMT de MB-F₂, soit 15 000 mg/kg de PC est plus faible par rapport à celles de MAÏ-BAO (17 500 mg/kg de PC) et de MB-F₃ (20 000 mg/kg de PC). Quant aux fractions MB-F₁ et MB-F₄, leur injection n'entraîne pas de mortalité.

Tableau III : valeurs des DMT des différents produits.

Produits	M-B	MB-F ₁	MB-F ₂	MB-F ₃	MB-F ₄
DMT (mg/kg de PC)	17 500	-	15 000	20 000	-

3- Détermination de la dose létale 50% (DL₅₀)

Au cours de cette toxicité, on détermine la Dose Létale 50% (DL₅₀).

La DL₅₀ est la quantité d'un produit exprimée en mg/kg de PC ou parfois en mg/m² et qui provoque la mort de 50% des animaux d'un lot homogène quant à la race, au sexe ou au poids. Selon VEZINET et al, (1981)⁽¹⁷³⁾, la détermination de la DL₅₀ est une étude quantitative et qualitative des phénomènes toxiques qu'on peut rencontrer après administration d'une dose unique du produit. C'est donc un test d'orientation susceptible de fournir des indications sur des effets probables d'un surdosage chez l'Homme.

Trois méthodes nous ont permis de déterminer la DL₅₀ de M-B, MB-F₁, MB-F₂, MB-F₃ et MB-F₄. Ce sont :

- la méthode directe,
- la méthode graphique,
- la méthode par calcul.

a- La méthode directe

Cette méthode consiste à déterminer par dénombrement des animaux, la dose de chacun des produits entraînant la mort de la moitié des animaux mis en expérimentation dans chaque lot 24 h après l'injection. Ainsi, nous avons constaté que pour M-B, la DL₅₀ est 24 000 ± 1 520mg/kg de PC.

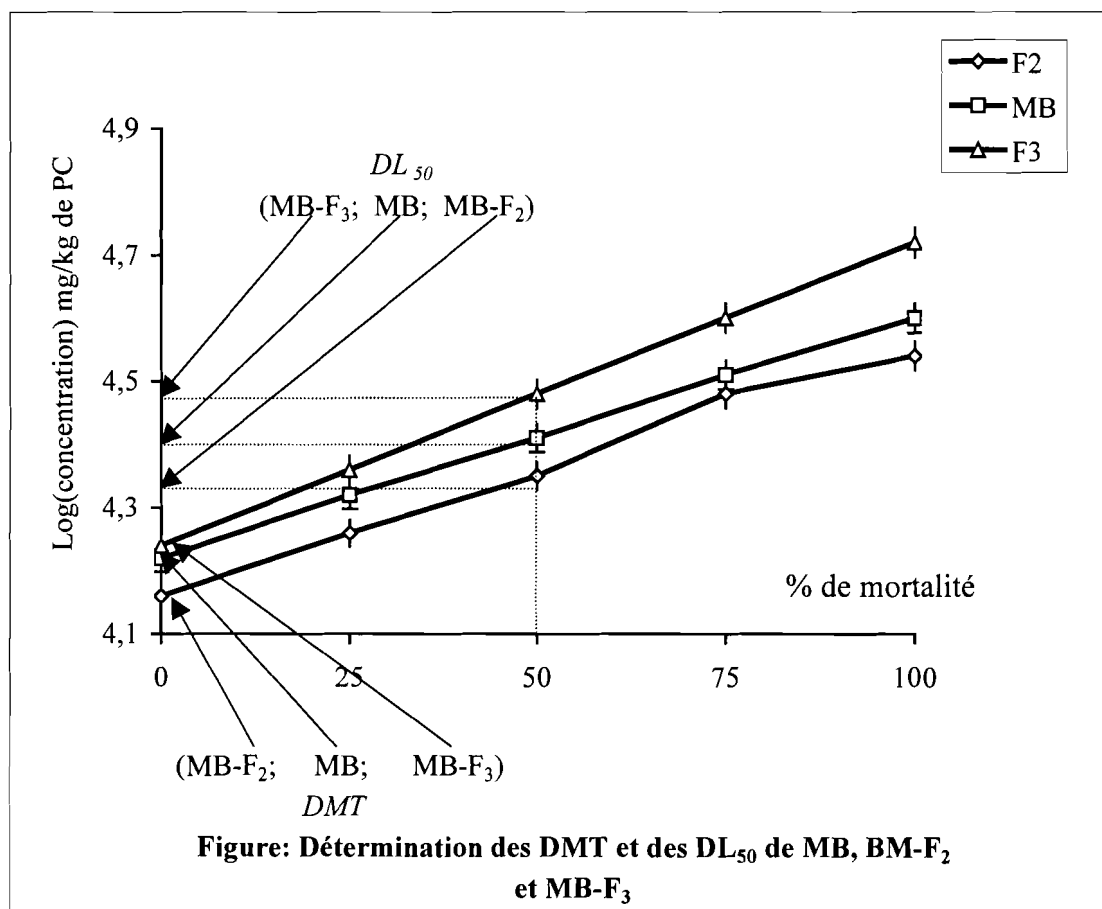
Celles de MB-F₂ et MB-F₃ sont respectivement 20 000 ± 1 350 mg/kg de PC et 25 500 ± 1 250 mg/kg de PC. Quant aux fractions MB-F₁ et MB-F₄, elles

n'ont conduit à aucune mortalité même aux doses élevées de 40 000 mg/kg de PC.

b- La méthode de détermination graphique

La courbe de la mortalité en fonction de Log des doses (Fig 7), permet de faire les observations suivantes :

- Les doses inférieures à 15 000 mg/kg de PC n'induisent aucune mortalité pour tous les produits.
- Les DL_{50} sont respectivement,
 - pour M-B : 23 387 mg/kg de PC,
 - pour MB-F₂ : 20 417 mg/kg de PC,
 - pour MB-F₃ : 24 942 mg/kg de PC.



c- Détermination par calcul

Le tableau VI montre de façon globale le nombre de rats qui sont morts après injection d'une dose donnée de chacun des produits. En effet, à partir de ces tableaux, nous pouvons déterminer par calcul la DL_{50} de chacun des produits selon la méthode de **BERHENS et KARBER, (1935)⁽¹⁹⁾**. Selon ces auteurs,

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{\Sigma(a \times b)}{n}$$

Avec

DL_{50} = dose donnant 50% de mortalité

DL_{100} = dose donnant 100% de mortalité

a = nombre moyen d'animaux morts entre deux doses successives.

b = différence entre deux doses successives.

n = nombre d'animaux utilisés par lot ou moyenne d'animaux utilisés.

Exemple de calcul : MAI-BAO

$DL_{100} = 40\ 000$ mg/kg de PC

$\Sigma(a \times b) = 80\ 000$ mg/kg de PC

n = 5

TABLEAU IV : calcul des DL₅₀ de MAI-BAO et ses fractions selon la méthode de BERHENS ET KARBER (1935)⁽¹⁹⁾

Lot animaux	I					II					III					IV					V				
Nombre de rats	5					5					5					5					5				
Concentration des produits en mg/ml	1 500					1 750					2 000					3 000					4 000				
Quantité de drogue en mg/kg de PC	15 000					17 500					20 000					30 000					40 000				
Produits	M-B	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	M-B	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	M-B	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	M-B	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	M-B	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
Nombre de rats morts	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	2	0	4	2	0	4	0	4	4	0	5	0	5	5	0

$$b_{II-I} = 2\,500$$

$$a_{II-I} = 0,5$$

$$b_{III-II} = 2\,500$$

$$a_{III-II} = 1,5$$

$$b_{IV-III} = 10\,000$$

$$a_{IV-III} = 3$$

$$b_{V-IV} = 10\,000$$

$$a_{V-IV} = 4,5$$

$$DL_{50} = 40\ 000 - \frac{80\ 000}{5} = 24\ 000 \text{ mg/kg de PC}$$

D'après la méthode de calcul, les valeurs des DL_{50} des produits sont résumées dans le tableau VII.

4- Comparaison des DL_{50} des différentes méthodes

Tableau V: Les DL_{50} des produits selon les trois (3) Méthodes

Produits Méthodes	DL_{50} (mg/kg de PC)				
	M-B	MB-F ₁	MB-F ₂	MB-F ₃	MB-F ₄
Méthode Directe	24 000 (± 1 520)	0	20 000 (± 1 350)	25 000 (± 1 250)	0
Méthode graphique	23 387 (± 2 050)	0	20 417 (± 1 650)	24 942 (± 1 067)	0
Méthode par calcul	24 000 (± 1 382)	0	20 750 (± 1 440)	24 500 (± 850)	0

Nous avons fait la comparaison des DL_{50} des trois (3) méthodes pour chaque produit par la méthode de comparaison de deux échantillons indépendants selon le test t de Student. Nous avons alors constaté que les DL_{50} des trois méthodes pour chacun des produits ne diffèrent pas significativement. En effet, les trois (3) méthodes de détermination des DL_{50} des différents produits donnent des valeurs sensiblement égales pour chacun des produits.

Cette même méthode de comparaison par le test t de Student nous a permis de comparer les DL_{50} moyennes des produits. De cette comparaison, nous avons conclu que les DL_{50} moyennes des trois produits ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre.

Nous avons déterminé ensuite, l'intervalle de confiance de la DL_{50} moyenne de chaque produit.

- $22\ 883,48 \leq DL_{50}(M-B) \leq 24\ 707,86$ mg/kg de PC
- $19561,09 \leq DL_{50}(MB-F_2) \leq 21\ 216,91$ mg/kg de PC
- $24\ 223,46 \leq DL_{50}(MB-F_3) \leq 25\ 404,54$ mg/kg de PC

B- TOXICITÉ CHRONIQUE

L'étude de cette toxicité s'est faite sur 150 jours (5mois). Elle nous a permis de voir que pour les doses inférieures à la DL_{50} de chacun des produits, la mortalité est nulle ou se fait après injections de doses répétées de M-B, MB-F₂ et MB-F₃ sur une longue période. C'est ainsi que pour MB-F₂, seule la dose de 12500 ± 3750 mg/kg de PC entraîne la mort d'un seul animal 648h (27 jours) après injection. Puis, de trois animaux après 3096h, soit 127 jours. Quant à M-B et MB-F₃, les doses inférieures à 15000 mg/kg de PC, entraînent la mort d'aucun animal durant toute la période d'expérimentation. Seulement, après quelques signes de faiblesse, les animaux métabolisent les produits.

C- DISCUSSION ET CONCLUSION

Les différentes DL_{50} au cours de nos expériences sont respectivement

- $24\ 000 \pm 1\ 520$ mg/kg de PC pour M-B
- $20\ 000 \pm 1\ 350$ mg/kg de PC pour MB-F₂
- $25\ 000 \pm 1\ 250$ mg/kg de PC pour MB-F₃

Quant à MB-F₁ et MB-F₄, elles n'entraîne la mort d'aucun animal quelle que soit la dose dans l'intervalle de concentrations testées.

Nous observons que toutes les DL_{50} sont supérieures à 20 000 mg/kg de PC. Elles témoignent donc d'une faible toxicité aiguë. Cependant, il convient de noter que quel que soit le produit, la DL_{50} est supérieure à 5 000 mg/kg de PC. Par conséquent, conformément aux intervalles de toxicité établis par **DUPIN et al, (1992)⁽⁵¹⁾**, M-B et ses fractions sont dits pratiquement non toxiques. Ce résultat corrobore celui de **SAI-RAM et al (2000)⁽¹⁵⁸⁾** selon lequel, le Komboucha préparé dans de meilleures conditions ne conduit pas à une toxicité significative au niveau hématologique, histopathologique et biochimique. Aussi, certains auteurs, par des études épidémiologiques, ont confirmé le très faible taux de toxicité. A cet effet, les études de **SRINIVASAN et al, (1997)⁽¹⁶⁵⁾** n'ont pu montrer qu'un très faible taux de personnes (2 à 4%) a eu des désagréments liés à une toxicité gastro-intestinale après consommation du thé fermenté. Ce faible taux pourrait nous amener à penser que le thé fermenté ne serait pas directement impliqué dans cette intoxication. En fait, M-B et ses fractions (MB-F₂ et MB-F₃) pourraient être l'objet de contamination par des microorganismes pathogènes lors de la préparation de la boisson et de sa conservation malgré son pH acide d'environ 2,5. Ces microorganismes pourraient être des moisissures toxicogéniques qui ont des effets carcinogènes et toxiques sur l'organisme.

Par conséquent, **PHAN et al, (1998)⁽¹⁴⁷⁾** préconisent la préparation et le stockage de la boisson dans du matériel en verre afin d'éviter la contamination de celle-ci par des éléments toxiques. Car, si des conditions aseptiques ne sont pas respectées lors de la préparation et de la conservation du breuvage, le pourcentage de contamination toxique devient grand (**MAYSER et al, 1995)⁽¹²²⁾**.

MAÏ-BAO étant acidifié, il pourrait avoir des réactions chimiques entre le breuvage et le récipient qui le contient. C'est la raison pour laquelle il est recommandé de ne pas utiliser les pots céramiques qui sont souvent décorés et dont le contact avec la boisson pourrait être nuisible à l'organisme (**PERRON et al, 1995)⁽¹⁴⁵⁾**. En effet, ce sont des éléments extérieurs au MAÏ-BAO qui participeraient à la toxicité du thé fermenté qui, à l'origine s'avère peu ou non toxique. Aussi, il convient de noter selon la littérature que M-B contiendrait des éléments antitoxiques ou détoxifiants tels que l'acide acétique et l'acide glucuronique (**ROUSSIN, 1996 ; BILJANA et LIDIJA, 2000)^(155, 23)**. En plus, ces auteurs ont montré que le thé fermenté contiendrait de très faibles taux, voire des traces d'ions toxiques (0,001 µg/ml de chromium; 0,005 µg/ml de charges et pas de cadmium). Le cadmium par exemple, selon **DUPIN et al, (1992)⁽⁵¹⁾**, est un métal lourd qui a été à l'origine de la maladie « Itaï-Itaï » dans la population japonaise.

L'on ne peut cependant pas dire que MAÏ-BAO n'a aucun effet toxique, même si la plupart des chercheurs s'accordent sur sa non toxicité au cas où le breuvage est préparé et conservé dans de bonnes conditions. Il convient de noter qu'à très fortes doses, M-B et ses fractions (F₂ et F₃) peuvent causer une intoxication. Comme l'ont montré nos résultats, M-B donne une toxicité à des doses supérieures ou égales à 20 000 mg/kg de PC. Cela confirme les résultats de **IBRAHIM et al, (1993)⁽⁹⁴⁾** selon lesquels, au

bout de douze (12) semaines de consommation, des lésions internes apparaissent au niveau de certains organes des rats. Ces différents résultats obtenus sur M-B et ses fractions font que l'effet toxique de la boisson devient nuancée. Ces résultats nous amènent donc à dire que M-B et ses fractions ne peuvent produire des effets toxiques qu'à très fortes doses. Car, à ces fortes concentrations, il pourrait se produire une acidose (PERRY, 1995)⁽¹⁴⁶⁾.

Les différentes méthodes utilisées pour la détermination des DL₅₀ de M-B et de ses fractions, donnent des résultats concordants. Ces résultats ont montré que les DL₅₀ sont supérieures ou égales à 20 000 mg/kg de PC. Cela confirme donc la faible toxicité de ces différents produits. Cet effet toxique faible pourrait être le fait de certains éléments présents dans le breuvage. Il pourrait cependant être conseillé de consommer M-B à des concentrations inférieures à 20 000 mg/kg de PC à doses faibles.

DEUXIÈME PARTIE

**ÉTUDES
PHARMACODYNAMIQUES**

A- ACTIONS DE MAÏ-BAO (M-B); D'ACETYLCHOLINE (ACh) ET DU DILTIAZEM (Dz) SUR L'ACTIVITE CARDIOVASCULAIRE

1- Effets comparés de M-B, de l'ACh et de Dz sur la pression artérielle de lapin

a- Effets de MAÏ-BAO sur la pression artérielle de lapin

L'expérience consiste à injecter des doses croissantes de MAÏ-BAO au lapin. Ainsi, comme la Figure 8 qui montre un exemple typique de cinq (5) séries d'expériences, il a été injecté au lapin, des concentrations de M-B allant jusqu'à 2 200 mg/kg de PC.

La solution physiologique (NaCl 9‰) ne modifie pas la pression artérielle du lapin ainsi que les doses inférieures à 50 mg/kg de PC. Quant aux doses supérieures à 50 mg/kg de PC, elles induisent une hypotension dose-dépendante. La concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) déterminée est 2000 mg/kg de PC.(Fig 9).

L'hypotension est immédiatement suivie d'une hypertension compensatrice. En effet, l'hypotension induite par MAÏ-BAO varie de $4 \pm 1,00$ mmHg (50 mg/kg de PC) à $38 \pm 09,28$ mmHg (2000 mg/kg de PC) et elle a une durée variant de 18 s à 22 s. Cependant, à partir de 2200 mg/kg de PC, la réversibilité de l'hypotension artérielle induite, se fait lentement après environ 90s.

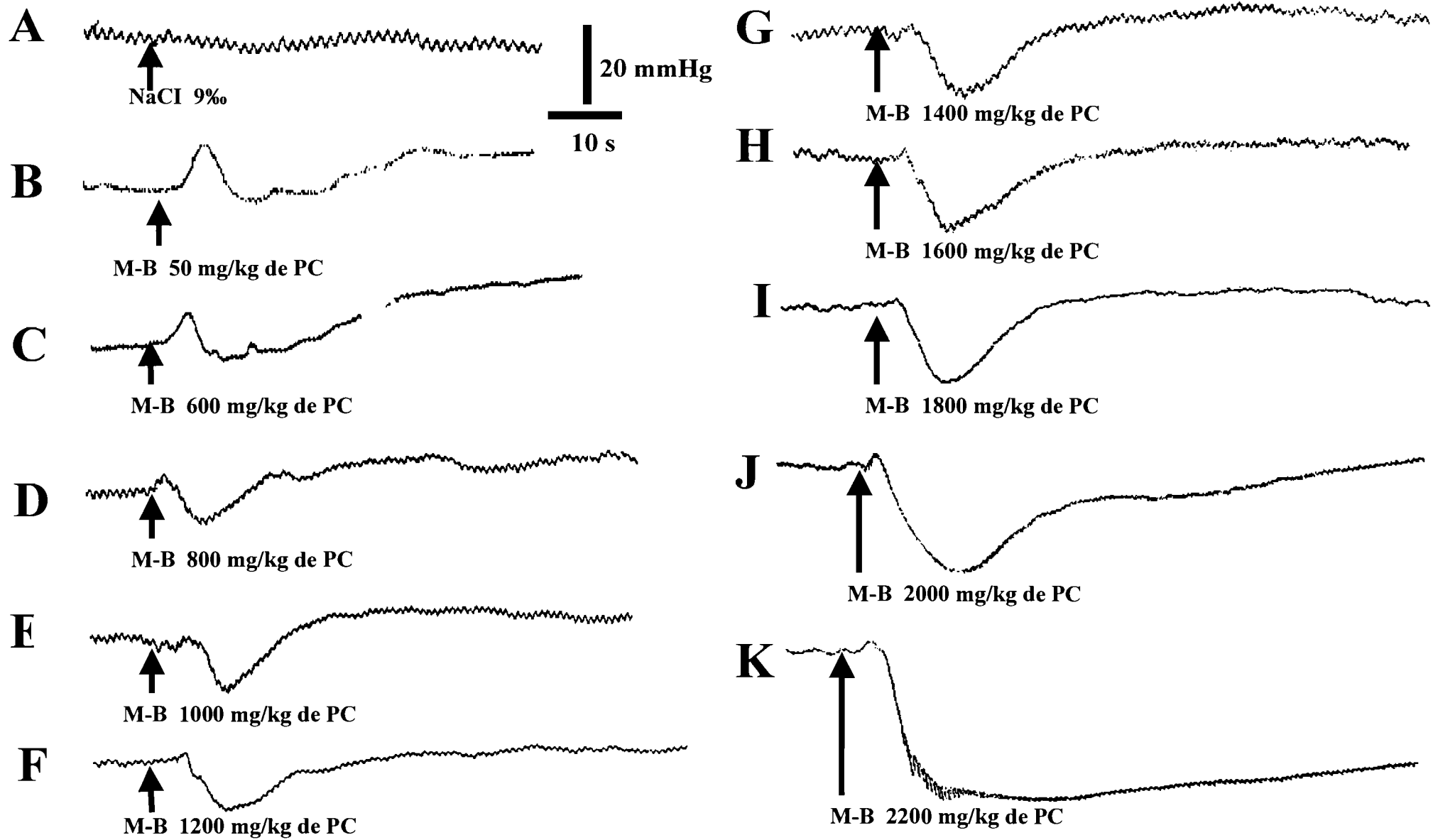


Figure 8 : Effets dose-réponses de MAI-BAO sur la pression artérielle de lapin

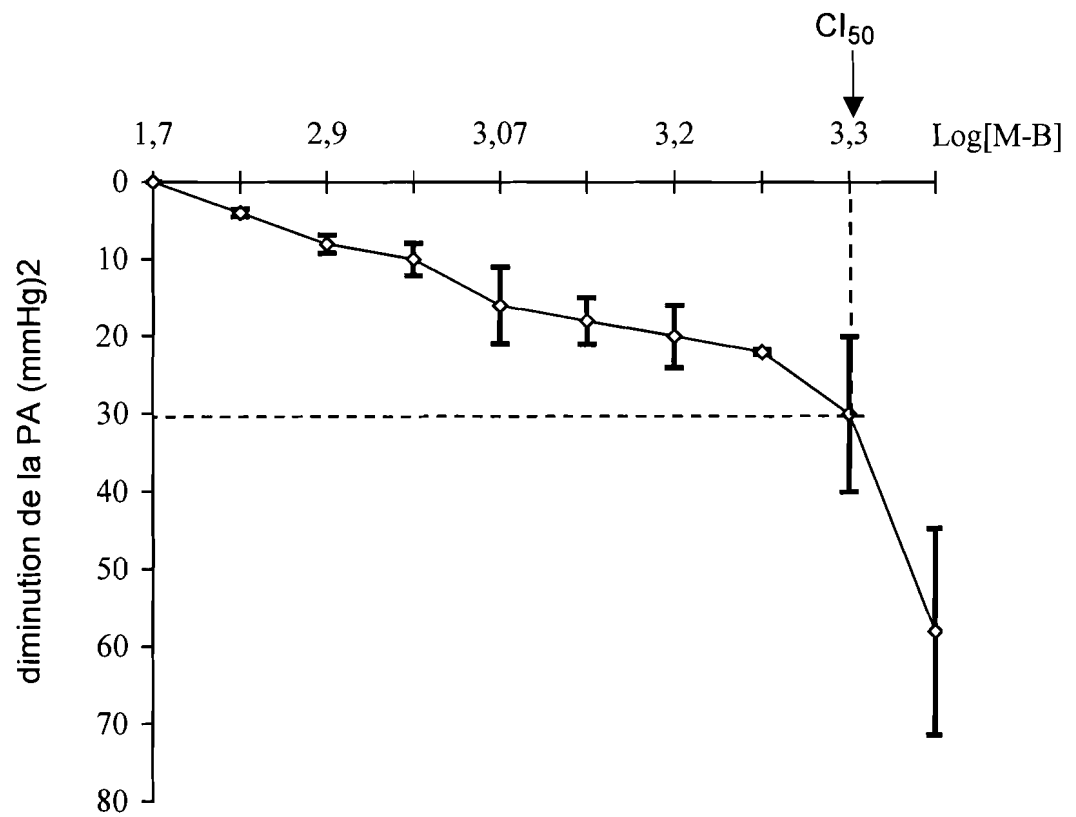


Fig 9: diminution de la pression artérielle de lapin en fonction des doses de MAI-BAO

b- effets de l'ACh sur la pression artérielle de lapin

La figure 10 montre un exemple de cinq (5) séries d'expériences de l'ACh sur la pression artérielle de lapin. Ainsi, de la concentration de 10^{-7} mg/kg de PC à la concentration de 10^{-1} mg/kg de PC, l'hypotension induite par l'ACh passe de $10 \pm 2,13$ mmHg à $52 \pm 10,00$ mmHg avec une CI_{50} égale à 10^{-3} mg/kg de PC (Fig 10). L'ACh induit donc une hypotension dose-dépendante. Cette hypotension a une durée qui augmente avec la dose. Mais à partir de 10^{-1} mg/kg de PC, l'ACh induit une hypotension irréversible.

c- Effets du diltiazem sur la pression artérielle de lapin

A l'instar des deux premiers produits (M-B et ACh) utilisés, les cinq (5) séries d'expériences réalisées avec Dz montrent qu'au fur et à mesure de l'augmentation de la dose de Dz de 10^{-5} mg/kg de PC à 10^{-1} mg/kg de PC, l'hypotension induite augmente en passant de $2 \pm 0,80$ mmHg à $34 \pm 6,00$ mmHg (Fig 11). Dz induit donc une hypotension dose-dépendante. Cette figure montre La valeur de la CI_{50} est égale à 6.10^{-1} mg/kg de PC (Fig 13).

L'hypotension créée par Dz à toutes ces concentrations, est réversible. Mais, cette réversibilité se fait très lentement et est effective après 80s.

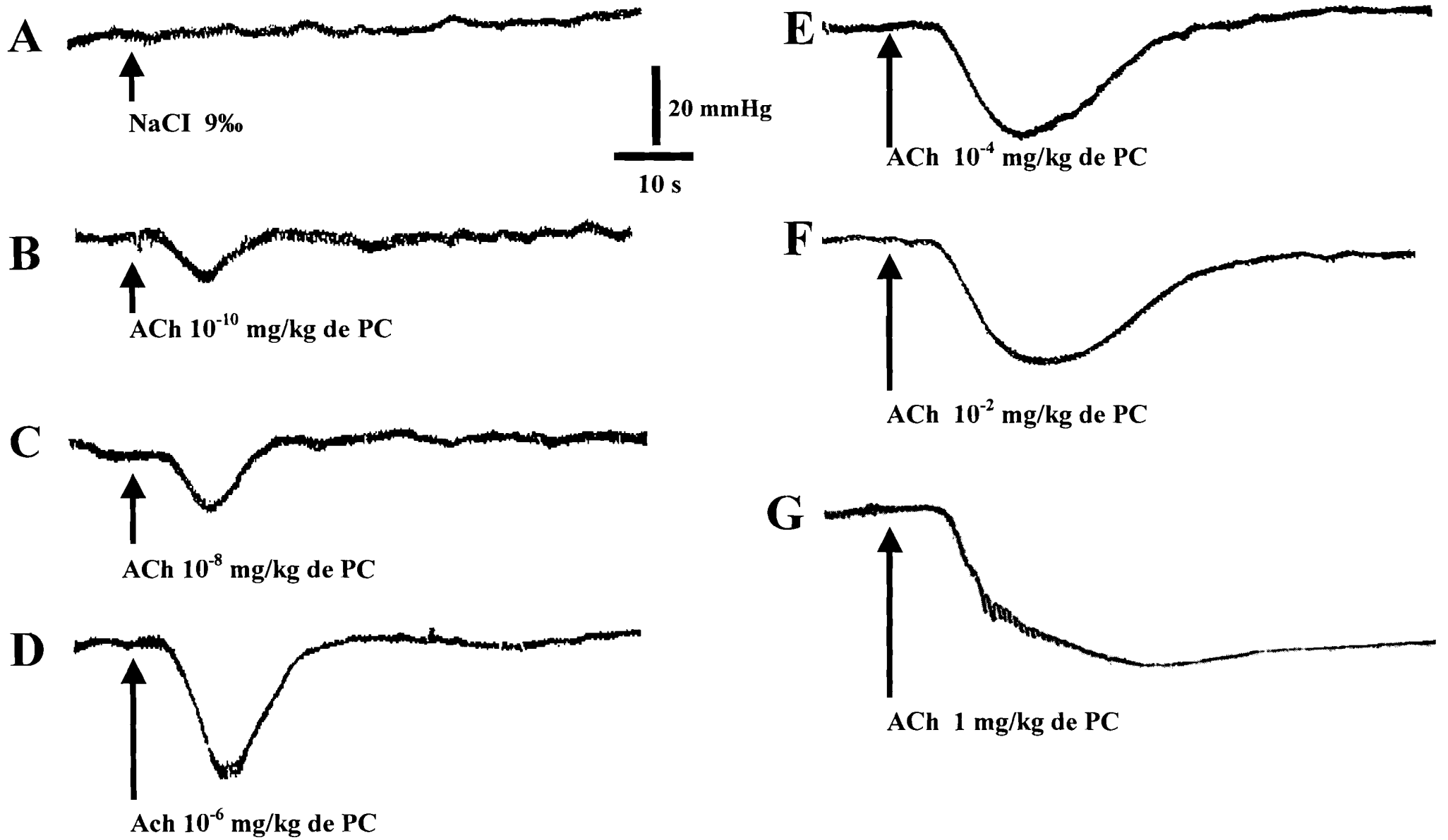


Figure 8 : Effets dose-réponses de l'ACh sur la pression artérielle de lapin

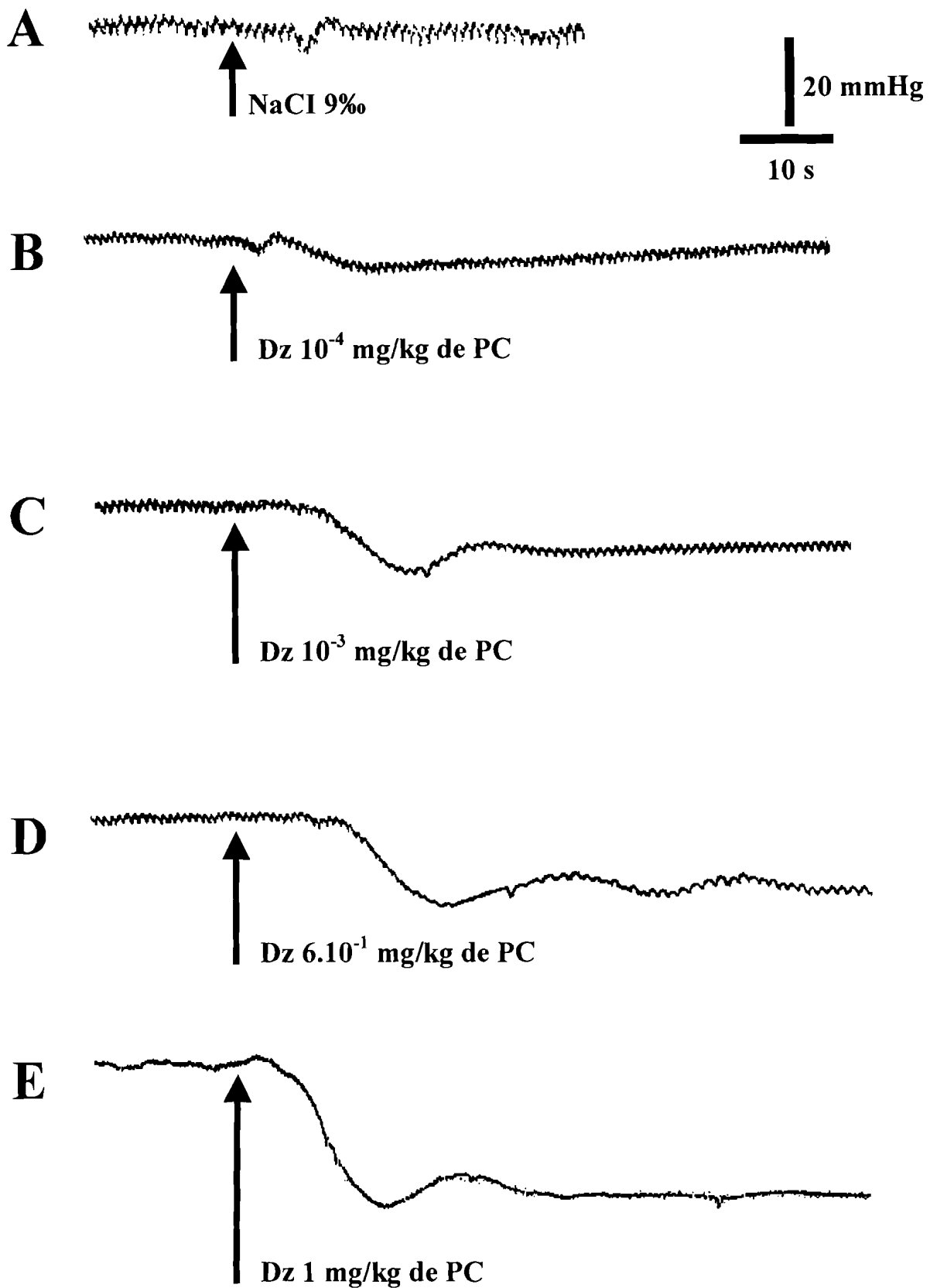


Figure 11 : Effets dose-réponses de Diltiazem (Dz) sur la pression Artérielle de lapin

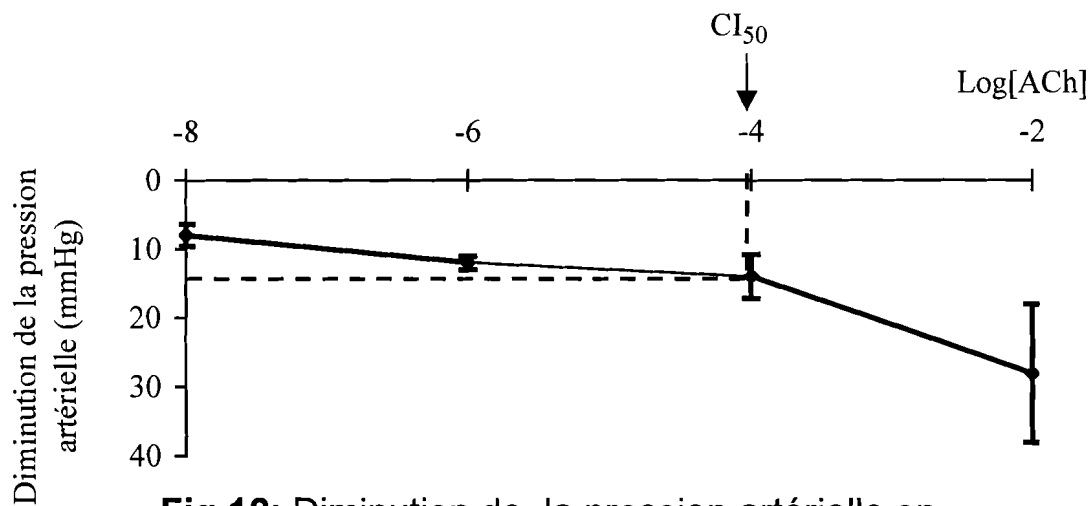


Fig 12: Diminution de la pression artérielle en fonction des doses de l'ACh

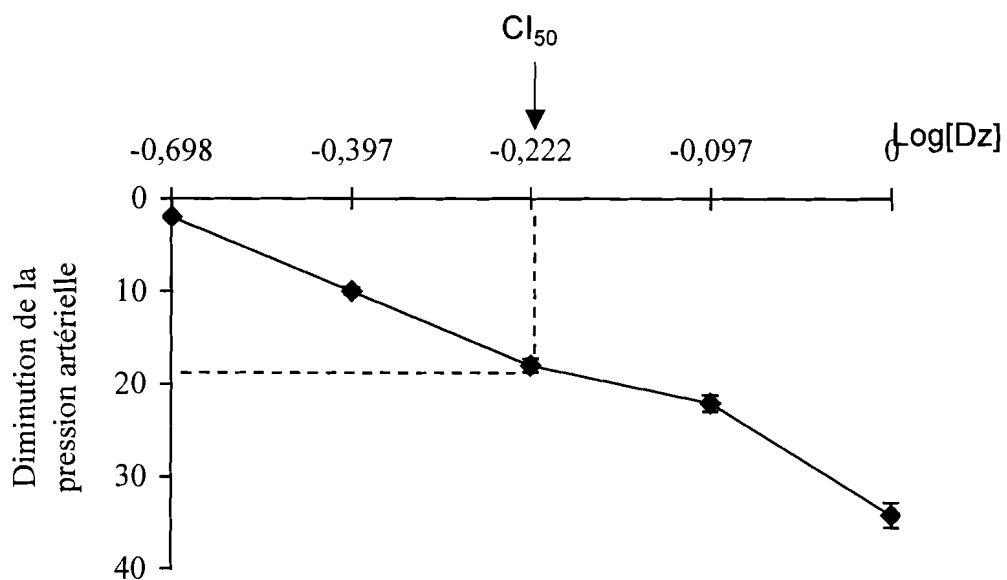


Fig 13: Diminution de la pression artérielle en fonction des concentrations de Dz

**d- Études comparatives des interactions M-B-Atr
et ACh-Atr sur la pression artérielle de lapin**

Après cinq (5) séries d'expériences menées pour chacun des produits dans le cadre de leur interaction avec l'Atropine, comme le montrent les figures 14, 15 et 16, il apparaît que :

- ◆ l'hypotension témoin induite par M-B à 2000 mg/kg de PC et qui a une valeur de $38 \pm 09,28$ mmHg est réduite jusqu'à $24 \pm 05,00$ mmHg par l'Atr à 10^{-1} mg/kg de PC; soit une réduction de 36,84% de sa valeur (Fig 14 F) et qui est sa valeur maximale de réduction quelle que soit l'augmentation de la concentration d'Atr.

L'Atr relève l'hypotension induite par M-B mais ne l'annule pas (Fig 16).

- ◆ l'hypotension témoin induite par l'ACh à 10^{-3} mg/kg de PC, est $40 \pm 10,21$ mmHg et est totalement relevée par l'Atr à 10^{-1} mg/ml (Fig 15 F et 16).

En conclusion, on peut dire que MAÏ-BAO contiendrait aussi bien des substances de type cholinergique que d'autres composés non cholinergiques responsables de l'hypotension induite par M-B.

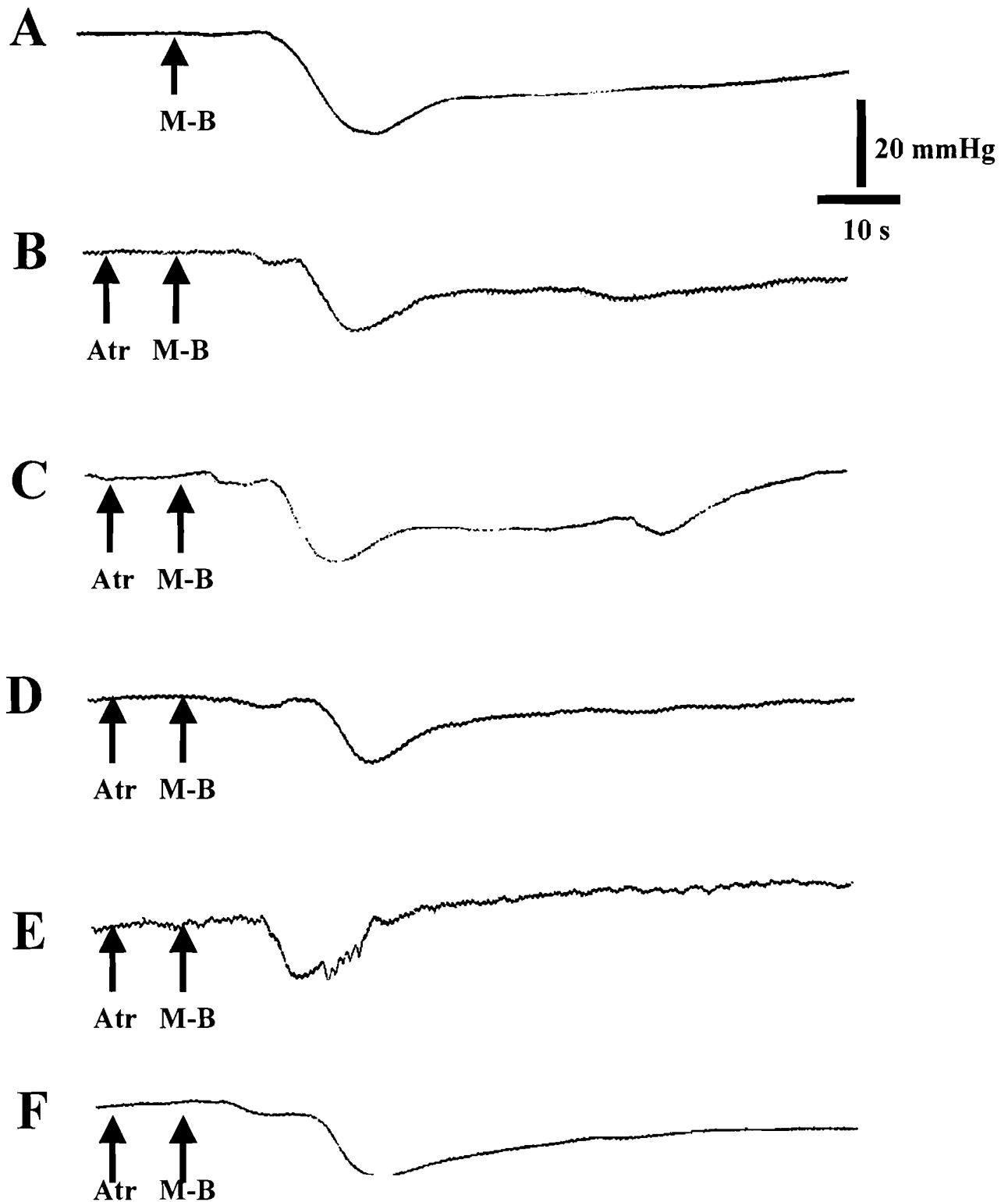


Figure 14 : Effets de l'interaction MAI-BAO - Atr sur la pression artérielle de lapin

A : Effets de M-B à 2000 mg/kg de PC

Les enregistrements suivants montrent les effets de M-B 2000 mg/kg de PC après injection respectivement de doses de :

B : 10^{-5} mg/ml d'Art

C : 10^{-4} mg/ml d'Art

D : 10^{-3} mg/ml d'Art

E : 10^{-2} mg/ml d'Art

F : 1 mg/ml d'Art

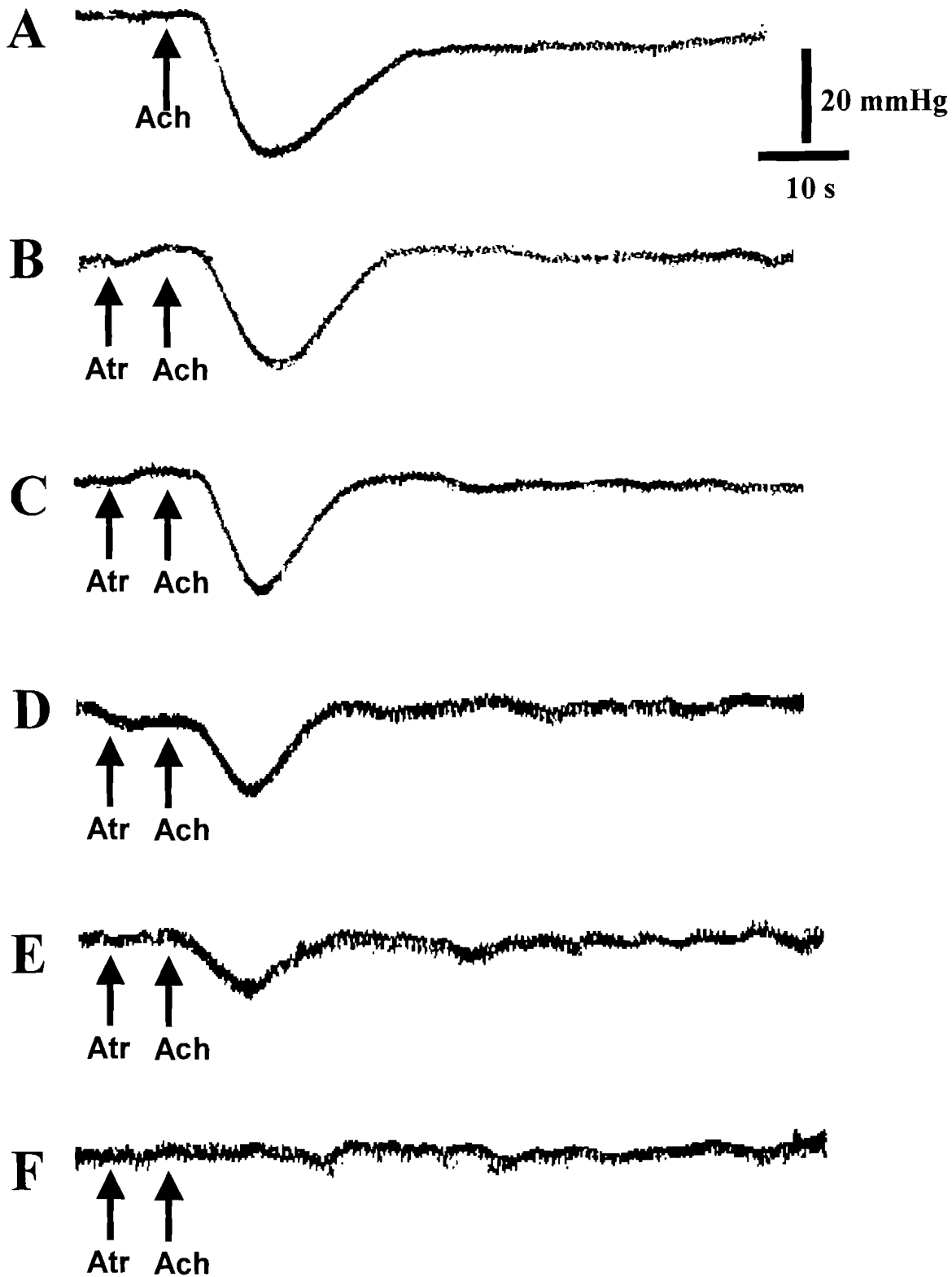


Figure 15 : Effets de l'interaction Ach – Atr sur la pression artérielle de lapin

A : Effets de Ach à 10^{-4} mg/kg de PC

Les enregistrements suivants montrent les effets de Ach à 10^{-4} mg/kg de PC après injection respectivement de doses de :

B : 10^{-5} mg/ml d'Atr

E : 10^{-2} mg/ml d'Atr

C : 10^{-4} mg/ml d'Atr

F : 1 mg/ml d'Atr

D : 10^{-3} mg/ml d'Atr

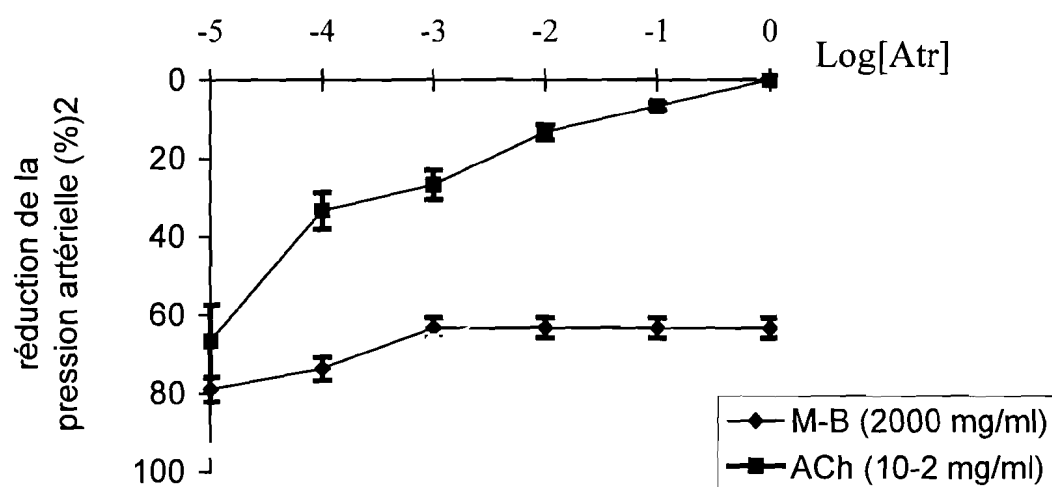


Fig 16: réduction de l'hypotension induite par M-B (2000 mg/ml) et ACh (10^{-4} mg/ml) par l'Atropine.

2- Effets dose-réponses de M-B, de l'ACh et de Dz sur les contractions rythmiques du cœur isolé de rat.

Les paramètres cardiaques mesurés dans nos expériences, sont l'amplitude et la fréquence exprimées respectivement en centimètre (g) et en battements/ minute (batt/min), puis ramenés en pourcentage (%).

a- Effets de MAÏ-BAO sur les contractions du cœur isolé de rat.

Les différentes expériences réalisées sur les contractions du cœur isolé de rat sont faites en perfusant le cœur avec des doses croissantes de M-B. Il convient de noter que toutes les expériences effectuées sont au nombre de cinq (5) pour chacune des doses ($n = 5$). Il apparaît que, MAÏ-BAO à des doses inférieures à 5 mg/ml n'induit aucun effet. Cependant, les doses égales ou supérieures à 5 mg/ml induisent des effets inotrope et chronotrope négatifs dose-dépendants avec une CI_{50} de 15 mg/ml (Fig 17). Les effets cardioinhibiteurs de M-B sont toujours précédés d'un faible effet inotrope positif fugace. Les effets de M-B pour les concentrations inférieures à 50 mg/ml sont totalement réversibles après le retour au Mac Ewen de référence. Mais ces effets deviennent irréversibles pour les concentrations supérieures ou égales à 50 mg/ml. Ainsi, la figure 18 représente un exemple typique des variations de l'amplitude et de la fréquence des contractions cardiaques après perfusion du cœur isolé de rat avec M-B (15 mg/ml). A cette dose, MAÏ-BAO induit une diminution l'amplitude des contractions de 0,168 à 0,119g équivalant à un effet inotrope négatif de $29,16 \pm 13,52\%$ et une diminution de la fréquence des battements cardiaques de 36 à 24 batt/min ; soit un effet chronotrope négatif de $33,33 \pm 12,04\%$. Cet effet cardioinhibiteur persiste durant 135s avant de se stabiliser. Cependant, après un retour au Mac Ewen

de référence, la réversibilité des paramètres cardiaques se fait progressivement et totalement au bout de 220s.

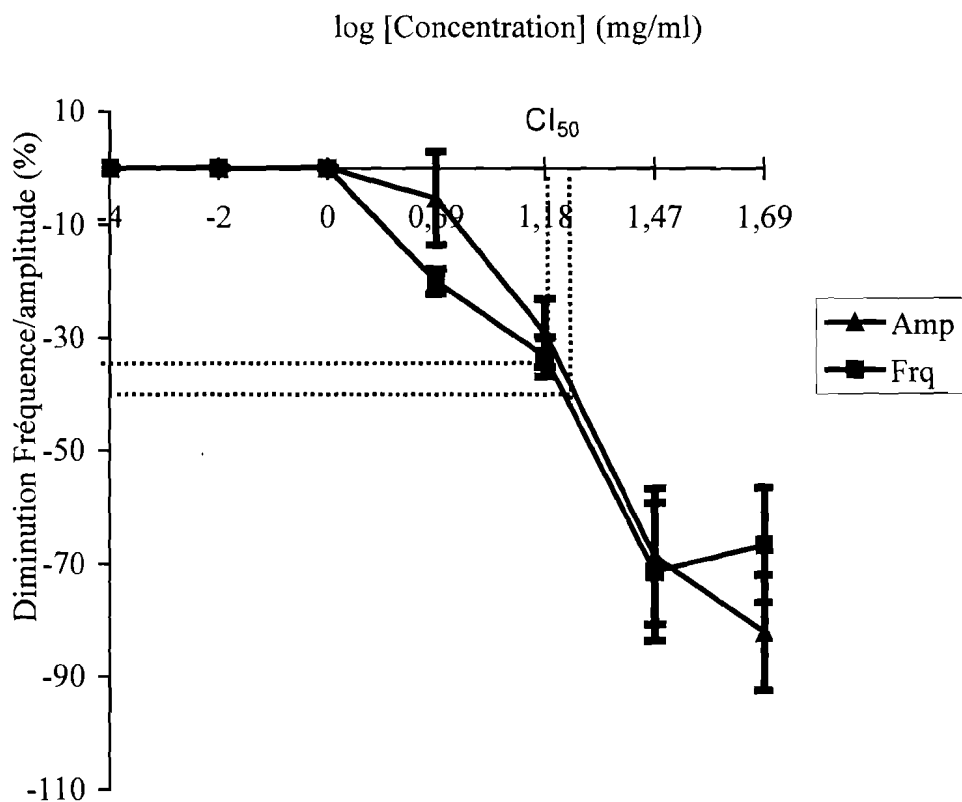


Fig 17: pourcentage de diminution de l'amplitude et de la fréquence cardiaques en fonction des doses de M-B

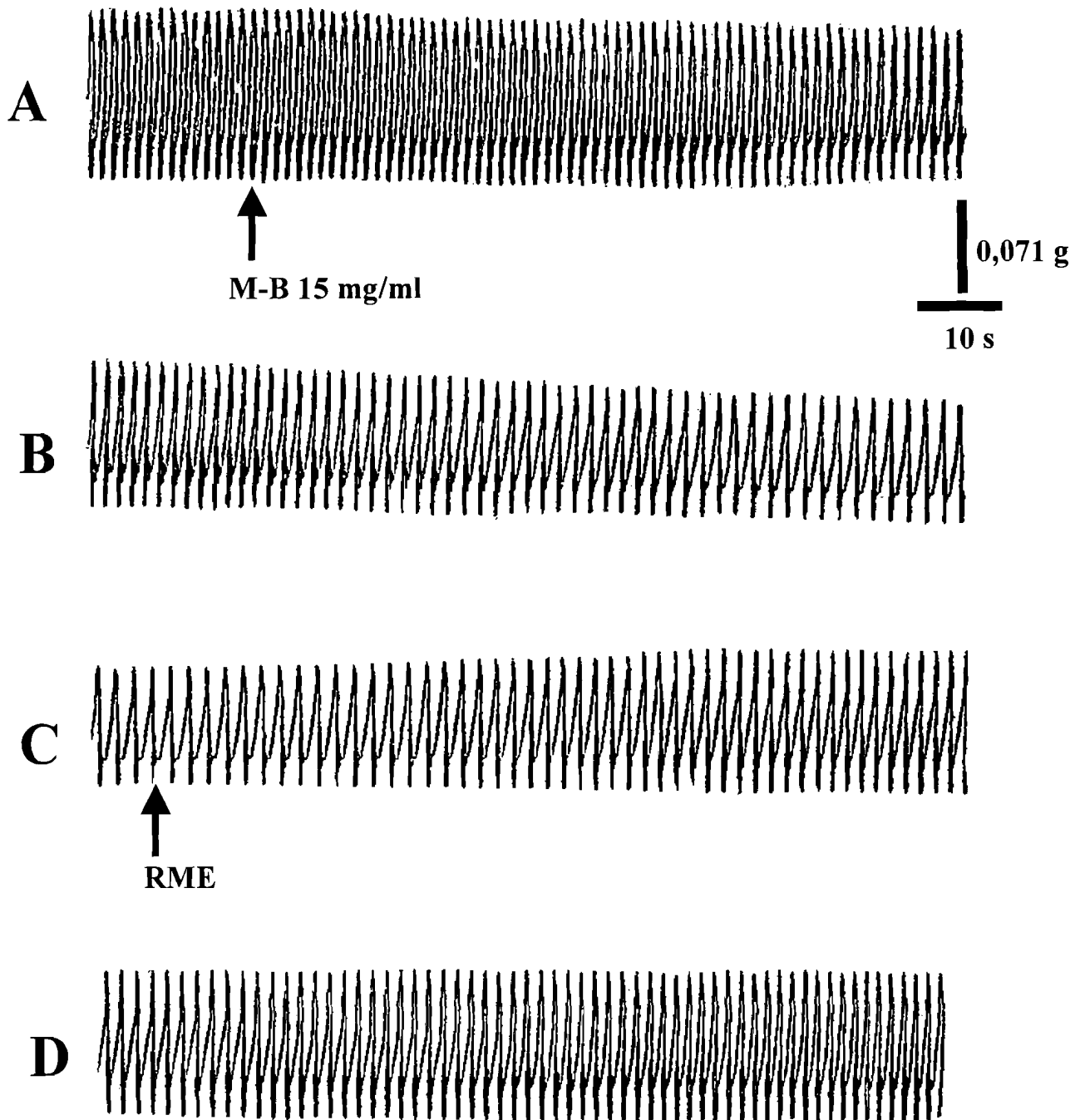


Figure 18 : Effets de M-B à 15 mg/ml sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat

- A : Enregistrement témoin suivi des effets de M-B (15 mg/ml)
- B : suite enregistrement de A
- C : suite de B suivi du retour de Mac Ewen de référence
- D : suite enregistrement de C

b- Effets de l'ACh sur les contractions du cœur isolé de rat.

La figure 19 montre les différents résultats obtenus après perfusion du cœur avec des concentrations croissantes d'ACh dans une gamme de concentration de 10^{-8} mg/ml et 10^{-2} mg/ml. Les concentrations d'ACh inférieures à 10^{-8} mg/ml n'ont aucun effet sur la contraction cardiaque. Cependant, pour les concentrations supérieures à 10^{-8} mg/ml, l'ACh induit une cardioinhibition dose-dépendante avec une CI_{50} égale à 10^{-4} mg/ml (Fig 21). A 10^{-4} mg/ml, l'ACh induit un effet inotrope négatif de $13,10 \pm 1,28\%$ et une diminution de la fréquence de 55 à 36 batt/min, soit un effet chronotrope négatif de $20,00 \pm 05,11\%$.

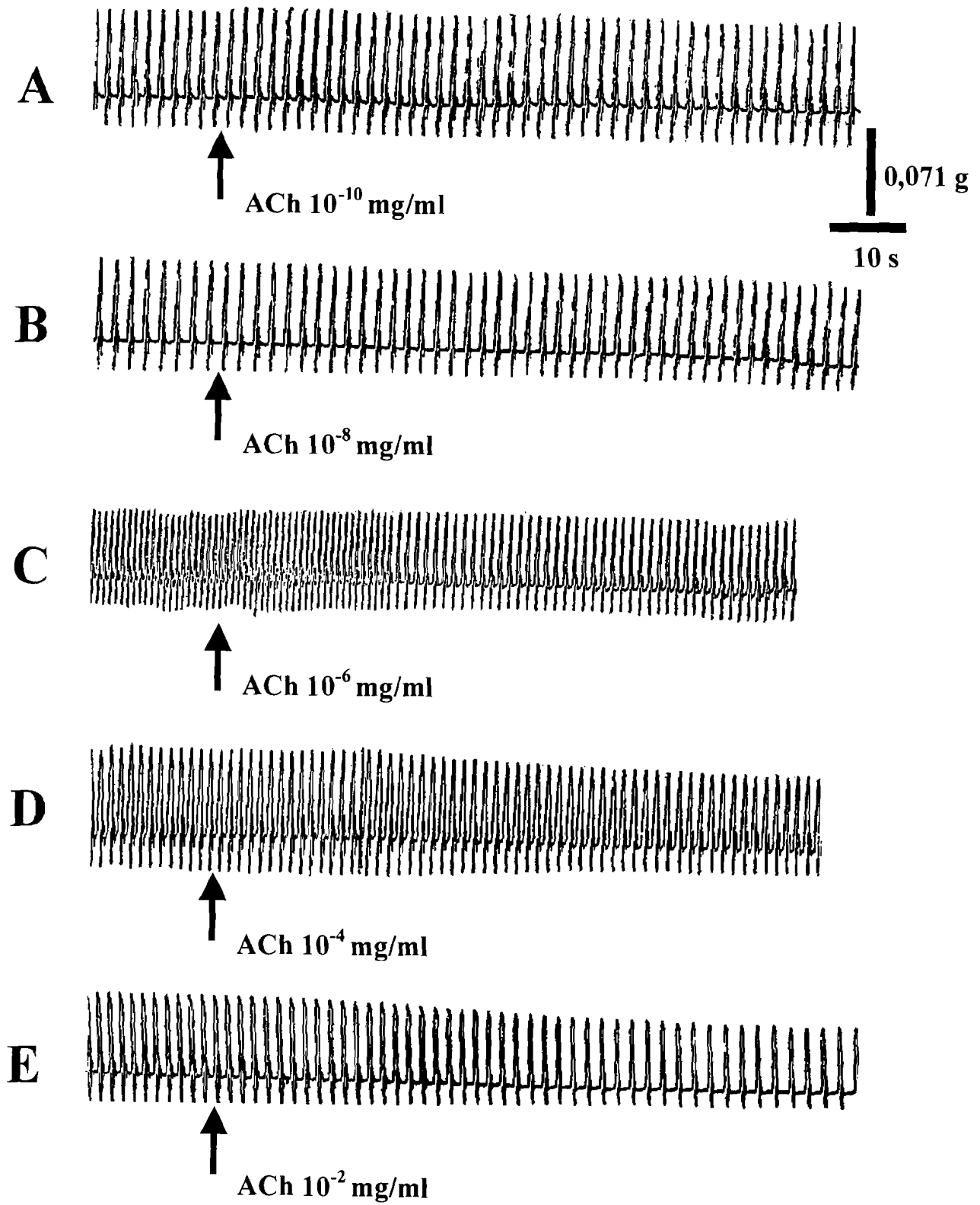


Figure 19 : Effets dose-réponses de ACh sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat

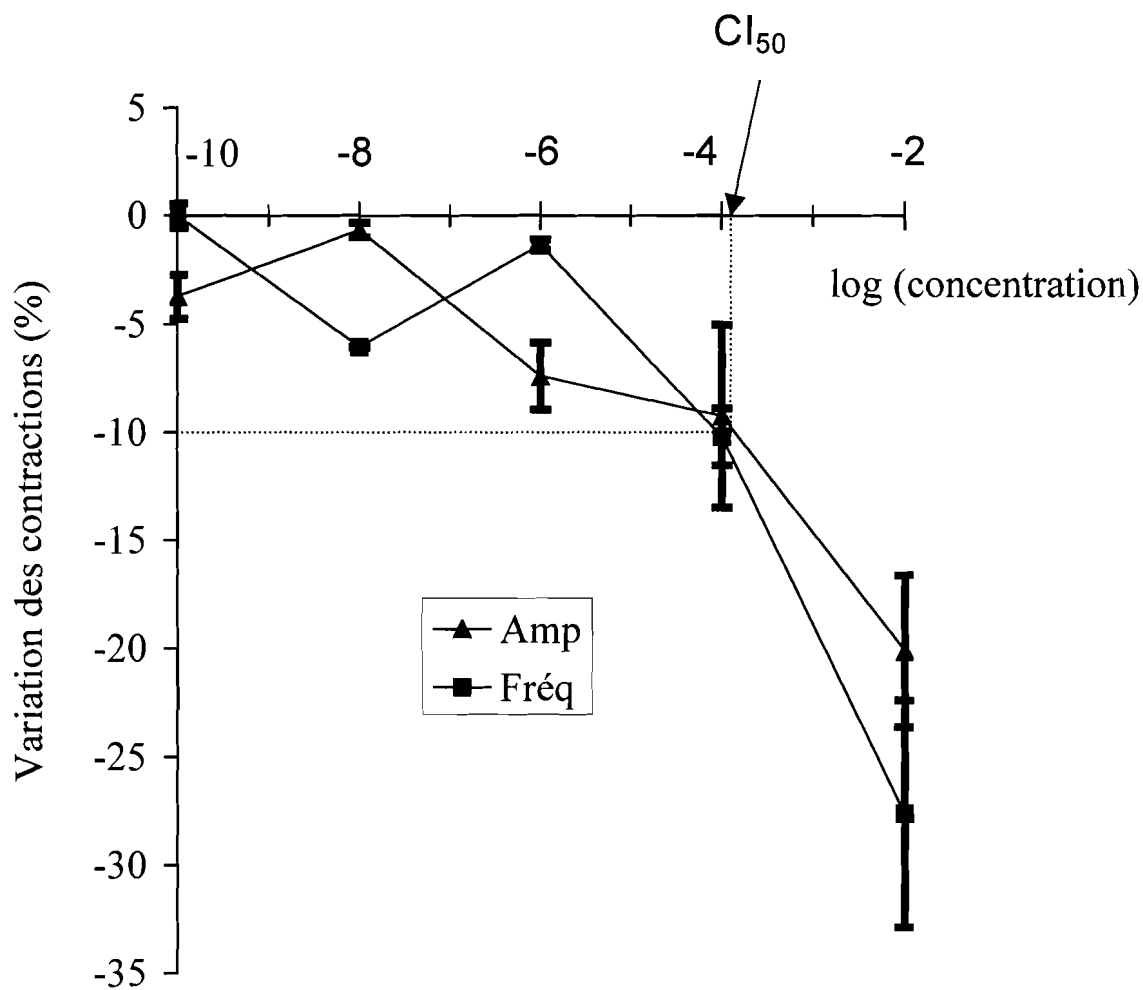


Figure 20: Variation des effets dose-réponses de l'ACh sur les contractions du coeur isolé de rat

c- Effets du diltiazem sur les contractions du cœur isolé de rat.

Le diltiazem (Dz) est un anticalcique de référence. Ainsi, pour comparer l'effet de M-B à celui de Dz, nous avons observé l'effet de Dz sur le cœur isolé de rat. La figure 21 montre que Dz induit un effet cardiodépressif dose-dépendant sur les contractions du cœur isolé de rat. La faible concentration de Dz (10^{-10} mg/ml) entraîne un effet inotrope positif de 0,140 à 0,154g; soit $10,00 \pm 02,72\%$ et aucun effet sur la fréquence cardiaque. Quant à la plus forte concentration (1 mg/ml), elle induit aussi bien une diminution de l'amplitude de 0,154 à 0,021g ($86,36 \pm 10,26\%$) qu'une augmentation de la fréquence des contractions de 48 à 54 batt/min ($12,50 \pm 2,63\%$) (Fig 22). La CI_{50} de Dz est égale à 6.10^{-1} mg/ml (Fig 22).

En conclusion, Dz induit un effet inotrope négatif dose-dépendant net et un effet chronotrope positif peu variable d'environ 14% entre 10^{-10} mg/ml et 1 mg/ml.

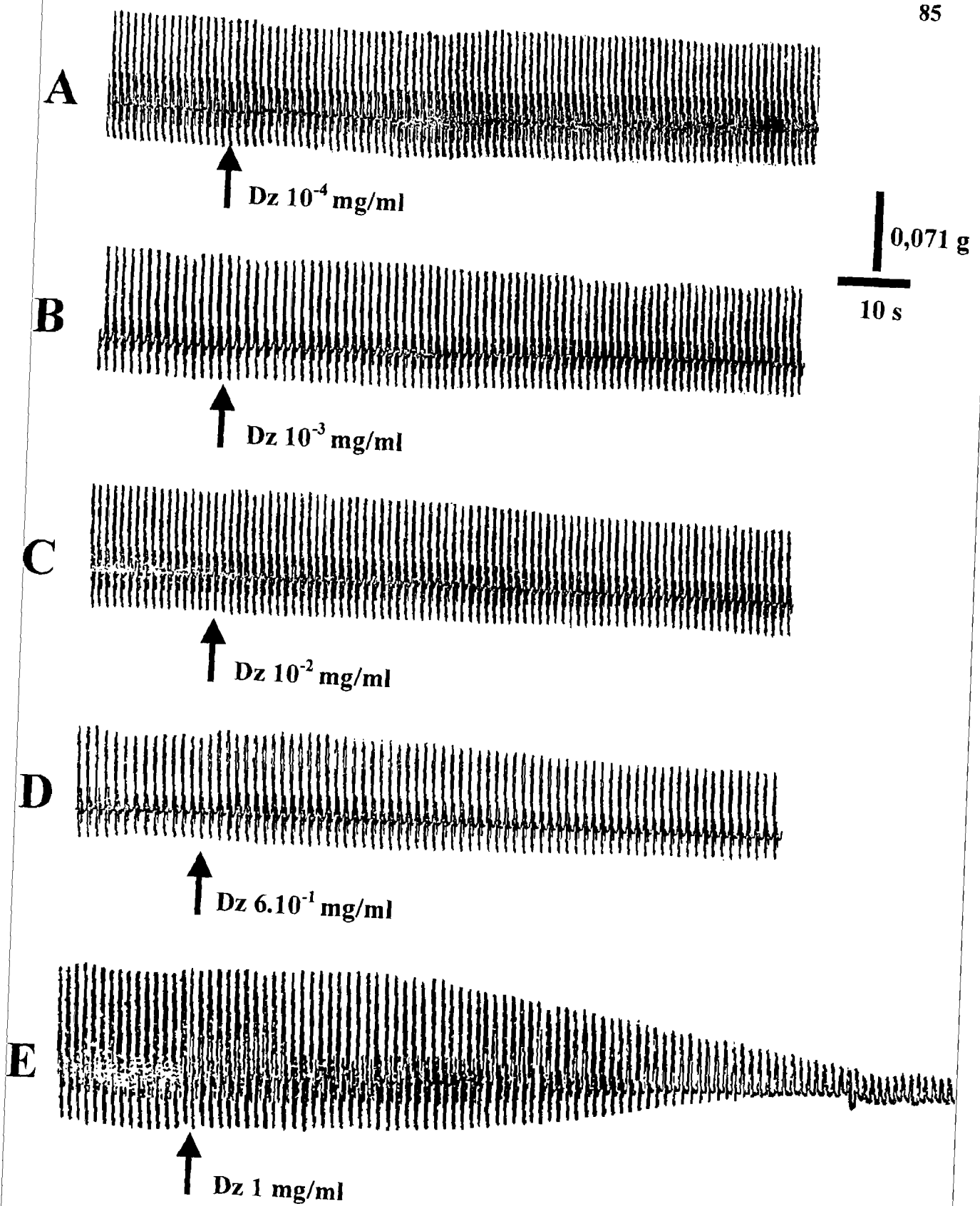


Figure 21 : Effets dose-réponse de Dz sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat

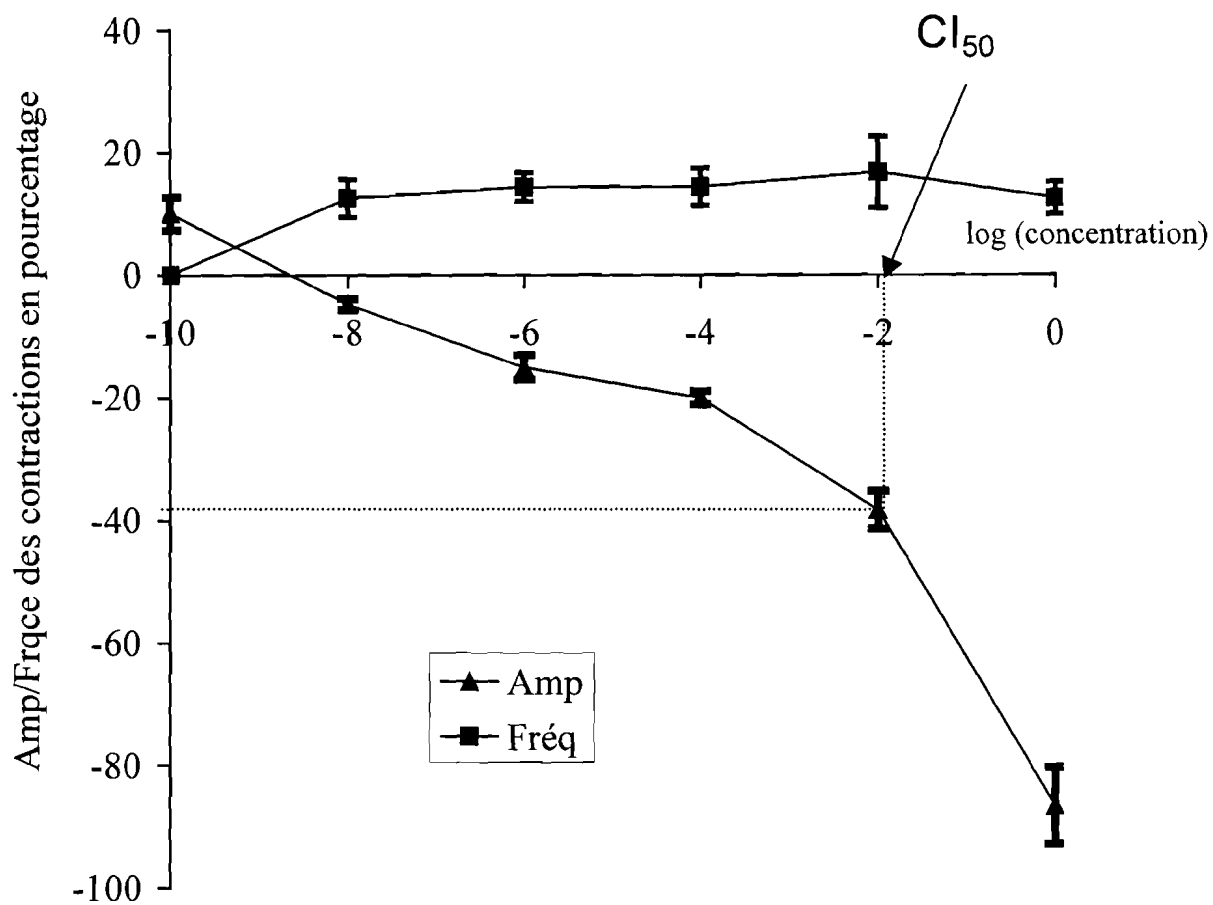


Figure 22: Pourcentage de diminution l'amplitude et pourcentage d'augmentation de la fréquence des contractions cardiaques.

3- Interaction M-B-Atr et ACh-Atr sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat

L'objectif de ces expériences est de savoir si la cardioinhibition induite par chacun des produits (M-B et ACh) peut être levée par l'Atr.

a- Interaction M-B - ATr

La figure 23 représente un exemple de cinq (5) expériences réalisées suite à la perfusion du cœur isolé avec l'association M-B (15 mg/ml) et Atr (10^{-2} mg/ml). Ces enregistrements (23 A) montrent d'une part qu'au niveau de l'amplitude des contractions cardiaques, M-B induit un effet inotrope négatif de 0,105 à 0,071g; soit $33,33 \pm 09,25\%$ après 34 s de perfusion. Par contre, les enregistrements (23 B) montrent qu'après 18 s de perfusion, le mélange M-B (15 mg/ml) et Atr (10^{-2} mg/ml) induit une diminution de l'amplitude de 0,126 à 0,091g; soit $27,00 \pm 11,50\%$. D'autre part, la fréquence cardiaque aussi subit une réduction de 48 à 30 batt/min ($37,50 \pm 08,60\%$), alors que M-B seul réduit la fréquence de $50,00 \pm 16,22\%$.

Selon le test de comparaison de deux échantillons indépendants par le test t de Student, les pourcentages de diminution aussi bien de la fréquence que de l'amplitude des contractions du cœur, induits par M-B (15 mg/ml) et le mélange M-B (15 mg/ml) - Atr (10^{-2} mg/ml), diffèrent significativement. Ce qui nous amène à dire que l'Atr lève partiellement la cardioinhibition induite par MAÏ-BAO.

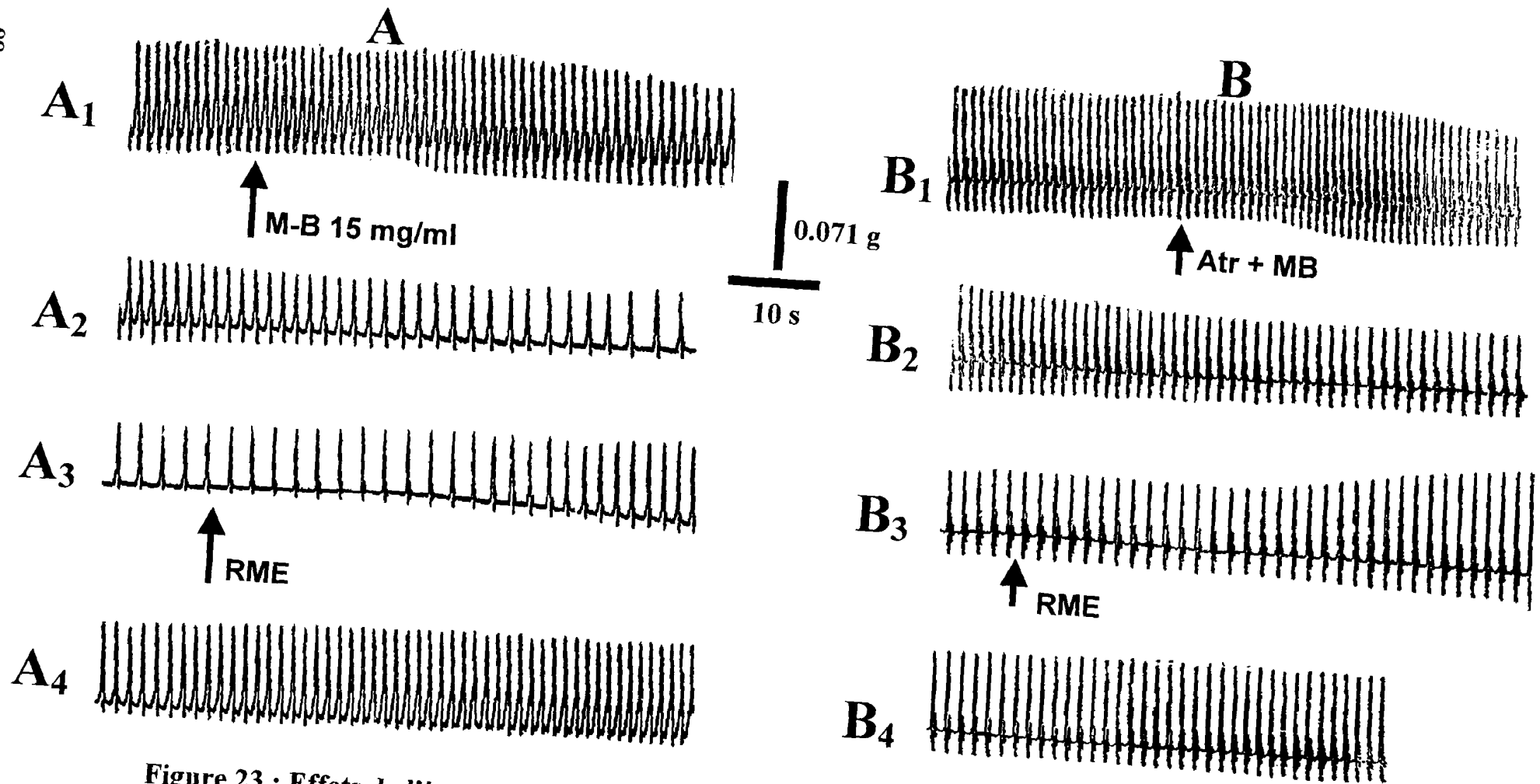


Figure 23 : Effets de l'interaction M-B + Atr sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets de M-B (15 mg/ml)
 A₂ : suite de A₁
 A₃ : suite de A₂ et retour au Mac Ewen de référence
 A₄ : suite de A₃

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de M-B (15 mg/ml) + Atr (10⁻² mg/ml)
 B₂ : suite de B₁
 B₃ : suite de B₂ et retour au Mac Ewen de Référence
 B₄ : suite de B₃

b- Interaction ACh - ATr

La figure 24 est un exemple de cinq (5) expériences réalisées sur l'activité mécanique du coeur isolé de rat avec le mélange Atr (10^{-2} mg/ml) - ACh (10^{-4} mg/ml). Cette figure 24 B montre qu'aussi bien l'effet inotrope négatif ($38,09 \pm 11,05$ %), que l'effet chronotrope négatif ($50,00 \pm 09,80$) induits par l'ACh à 10^{-4} mg/ml (Fig 24 A), s'annulent avec le mélange ACh-At.

Ainsi, la cardioinhibition induite par l'ACh est totalement levée par l'At.

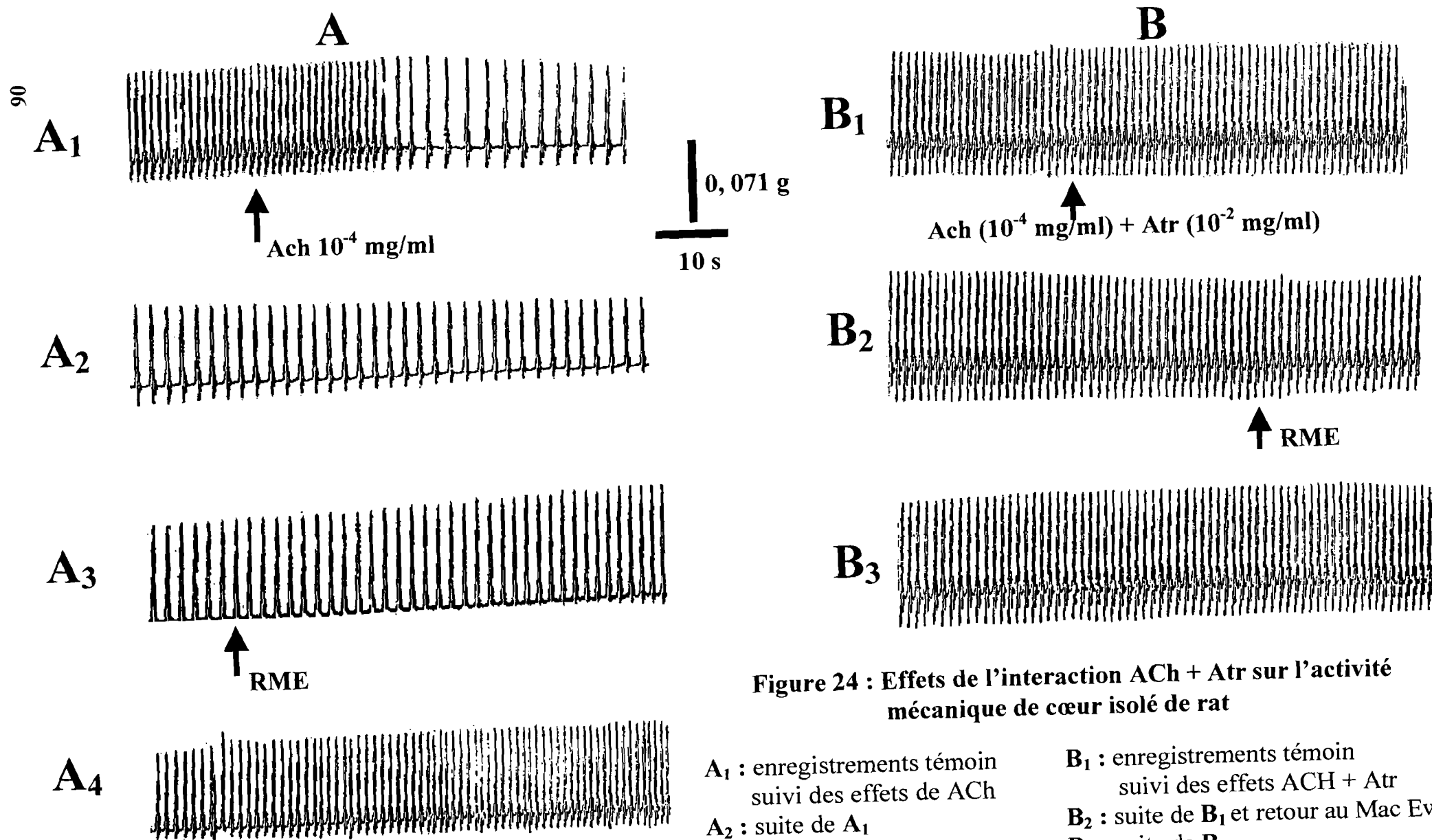


Figure 24 : Effets de l'interaction ACh + Atr sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

- | | |
|---|---|
| <p>A₁ : enregistrements témoin suivi des effets de ACh</p> <p>A₂ : suite de A₁</p> <p>A₃ : suite de A₂ et retour au Mac Ewen</p> <p>A₄ : suite de A₃</p> | <p>B₁ : enregistrements témoin suivi des effets ACh + Atr</p> <p>B₂ : suite de B₁ et retour au Mac Ewen</p> <p>B₃ : suite de B₂</p> |
|---|---|

4- Effets des solutions physiologiques de composition ionique modifiée dans l'action de MAÏ-BAO et du Diltiazem sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat.

a- Effets du milieu hyperCa²⁺ sur l'action de MAÏ-BAO sur les contractions du cœur isolé de rat

a.1- Effets du milieu hyperCa²⁺ sur les contractions du cœur isolé de rat

Selon la figure 25, la perfusion du cœur avec le milieu hypercalcique (150% CaCl₂) conduit à un effet cardiotonique. Cet effet se résume en une augmentation aussi bien de l'amplitude des contractions de 0,126 à 0,168g (22,22 ± 09,20%) que de la fréquence des contractions du cœur de 60 à 66 batt/min (10,00 ± 04,53%). Le milieu hypercalcique induit donc sur le cœur isolé de rat, des effets inotrope et chronotrope positifs. Par ailleurs, le lavage avec la solution physiologique de référence (ME) rétablit les paramètres des contractions initiales.

a.2- Effets du milieu hyperCa²⁺ sur l'action de MAÏ-BAO sur contractions du cœur isolé de rat

- La figure 26 montre un exemple de cinq (5) expériences réalisées avec M-B (15 mg/ml) seul et M-B (15 mg/ml) en milieu hypercalcique (150%). Ces expériences permettent de constater que:

- Les enregistrements (26 A) indiquent un effet inotrope négatif de 0,147 à 0,077g; soit 47,62 ± 26,50% et un effet chronotrope négatif de 54 à 42 batt/min; soit 22,22 ± 08.20% après 30s de perfusion avec M-B.

- L'action de M-B (15 mg/ml) en milieu hypercalcique (150% CaCl_2) représentée par les enregistrements (26 B), donne une augmentation de l'amplitude des contractions cardiaques de 0,126 à 0,133g ($05,26 \pm 01,20\%$) après 21s de perfusion. Et une diminution de la fréquence des contractions cardiaques de 28 à 32 batt/min ($12,50 \pm 04,70\%$) . Le lavage avec la solution de Mac Ewen rétablit les paramètres des contractions cardiaques.

Il apparaît donc que lorsque M-B est mis en milieu hypercalcique, son action inotrope négatif sur le cœur est annulé. Par conséquent, l'excès de calcium inhibe la cardioinhibition induite par M-B.

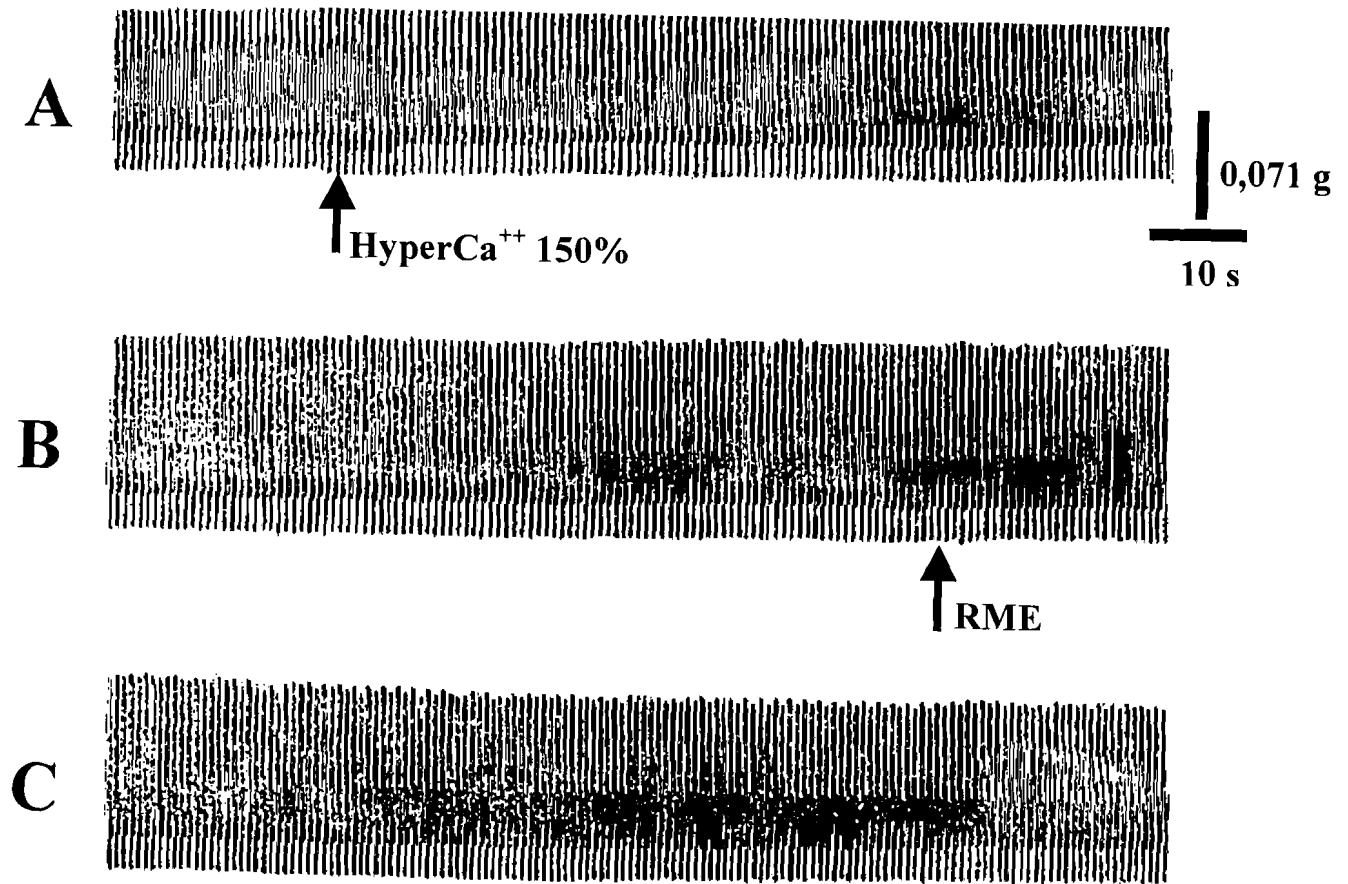


Figure 25 : Effets du milieu hyperCa⁺⁺ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

A : enregistrements témoin suivi des effets du milieu hyperCa⁺⁺ (150%)

B : suite de A suivi du retour au Mac Ewen de référence

C : suite de B

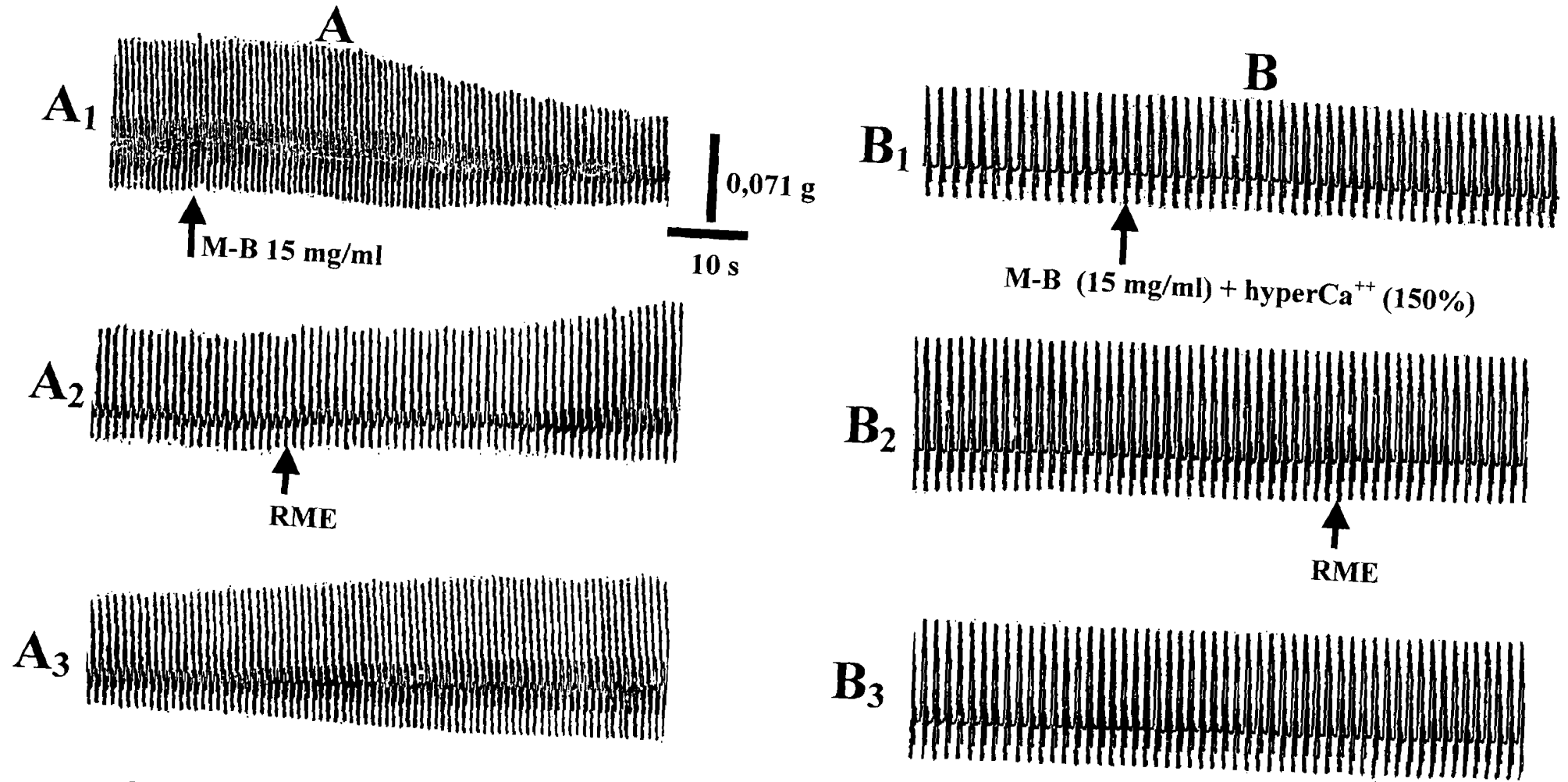


Figure 26 : Effets de M-B et de M-B en milieu hyperCa⁺⁺ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets M-B

A₂ : suite de A₁ et retour au Mac Ewen

A₃ : suite de A₂

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de M-B en milieu hyperCa⁺⁺

B₂ : suite de B₁ et retour au Mac Ewen de référence

B₃ : suite de B₂

b- Effet du milieu hypersodique dans l'action de M-B sur les contractions de l'activité mécanique du cœur isolé de rat.

La figure 27 nous montre d'une part en A, l'effet de la solution hypersodique (150% NaCl) et d'autre part, en B, l'action de M-B (15 mg/ml) en milieu hypersodique (150% NaCl) sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat. On constate que :

- Le milieu hypersodique (150% NaCl) induit un effet inotrope négatif de 0,091 à 0,035g ($61,54 \pm 23,33\%$) et un effet chronotrope positif de 42 à 48 batt/min ($14,28 \pm 02,23\%$). Ces effets apparaissent après 33s de perfusion du cœur. Par ailleurs, ces effets sont réversibles 30s après lavage du cœur avec la solution physiologique de référence (Fig 27 A).

- M-B (15 mg/ml) en milieu hypersodique (150% NaCl) diminue l'amplitude des contractions de 0,077 à 0,007g ($90,90 \pm 07,34\%$). La fréquence cardiaque est également diminuée de 54 à 24 batt/min ; soit un effet chronotrope négatif de $55,55 \pm 08,22\%$. Tous ces effets n'apparaissent qu'après 15s de perfusion du cœur isolé de rat. Ces effets disparaissent après retour au Mac Ewen de référence.

En conclusion, M-B accentue les effets cardioinhibiteurs de la solution hypersodique. En plus, la solution hypersodique raccourcit le temps de latence de l'action de M-B. Ceci nous amène à dire que M-B agit plus rapidement en milieu hypersodique sur les contractions du cœur.

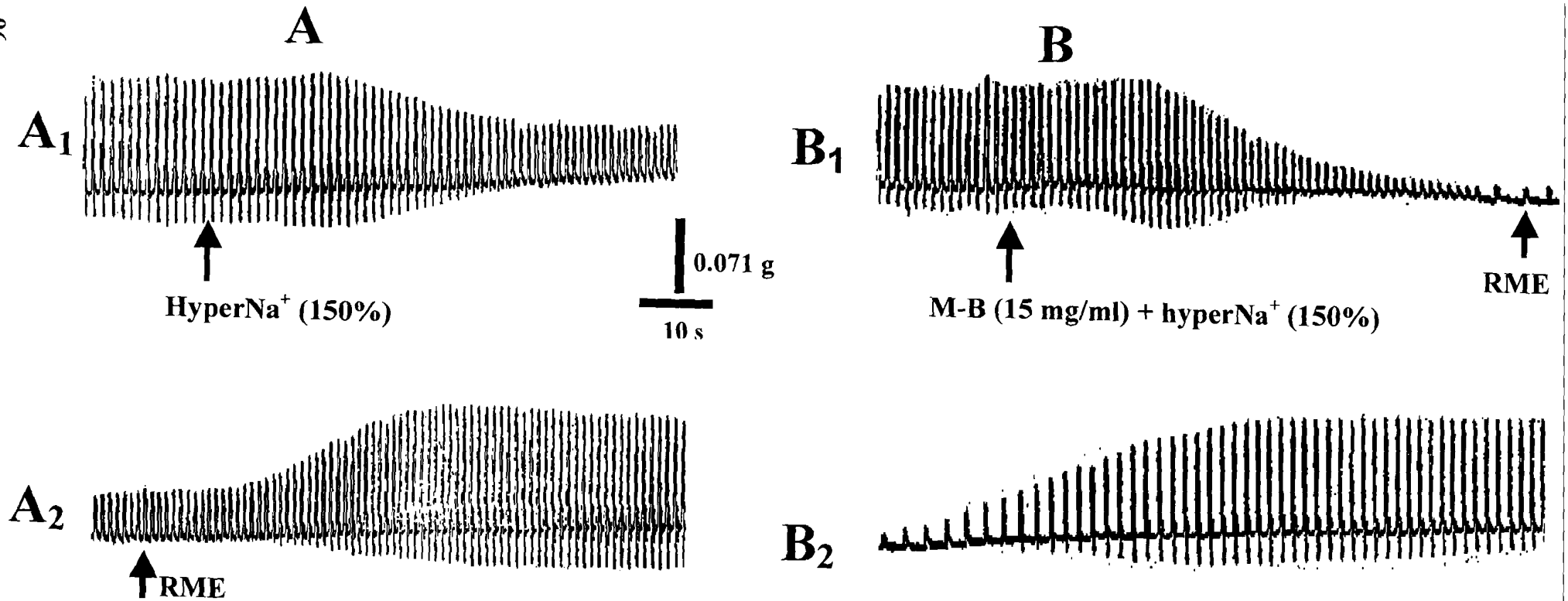


Figure 27 : Effets du milieu hyperNa⁺ et de M-B en milieu hyperNa⁺ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets du milieu hyperNa⁺ (150%)

A₂ : suite de A₁ et retour au Mac Ewen de référence

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de M-B en milieu hyperNa⁺ et retour au Mac Ewen de référence

B₂ : suite de B₁

c- Effets du milieu hypercalcique dans l'action de Dz sur les contractions du cœur isolé de rat

La figure 28 montre un exemple parmi cinq (5) expérimentations réalisées avec Dz (6.10^{-1} mg/ml) en milieu hypercalcique. Ainsi, les enregistrements 28A montrent que la solution hypercalcique (150% CaCl_2) seule augmente l'amplitude des contractions cardiaques de 0,105 à 0,189g ; soit un effet inotrope positif de $44,44 \pm 10,30\%$. Cependant, la fréquence des contractions subit une réduction de 54 à 24 batt/min ; soit $55,55 \pm 08,45\%$. Par ailleurs, sur cette même figure, les enregistrements 28B montrent que Dz (6.10^{-1} mg/ml) en solution hypercalcique (150% CaCl_2), induit un effet inotrope positif de 0,126 à 0,168g ($25,00 \pm 04,58\%$) et un effet chronotrope négatif de 32 à 26 batt/min ($23,07 \pm 07,60\%$).

En conclusion, le diltiazem en milieu hypercalcique, réduit la cardiotonicité du cœur induite par la solution hypercalcique seule. Aussi, il apparaît que l'excès de calcium inhibe la cardiodépression induite par le diltiazem.

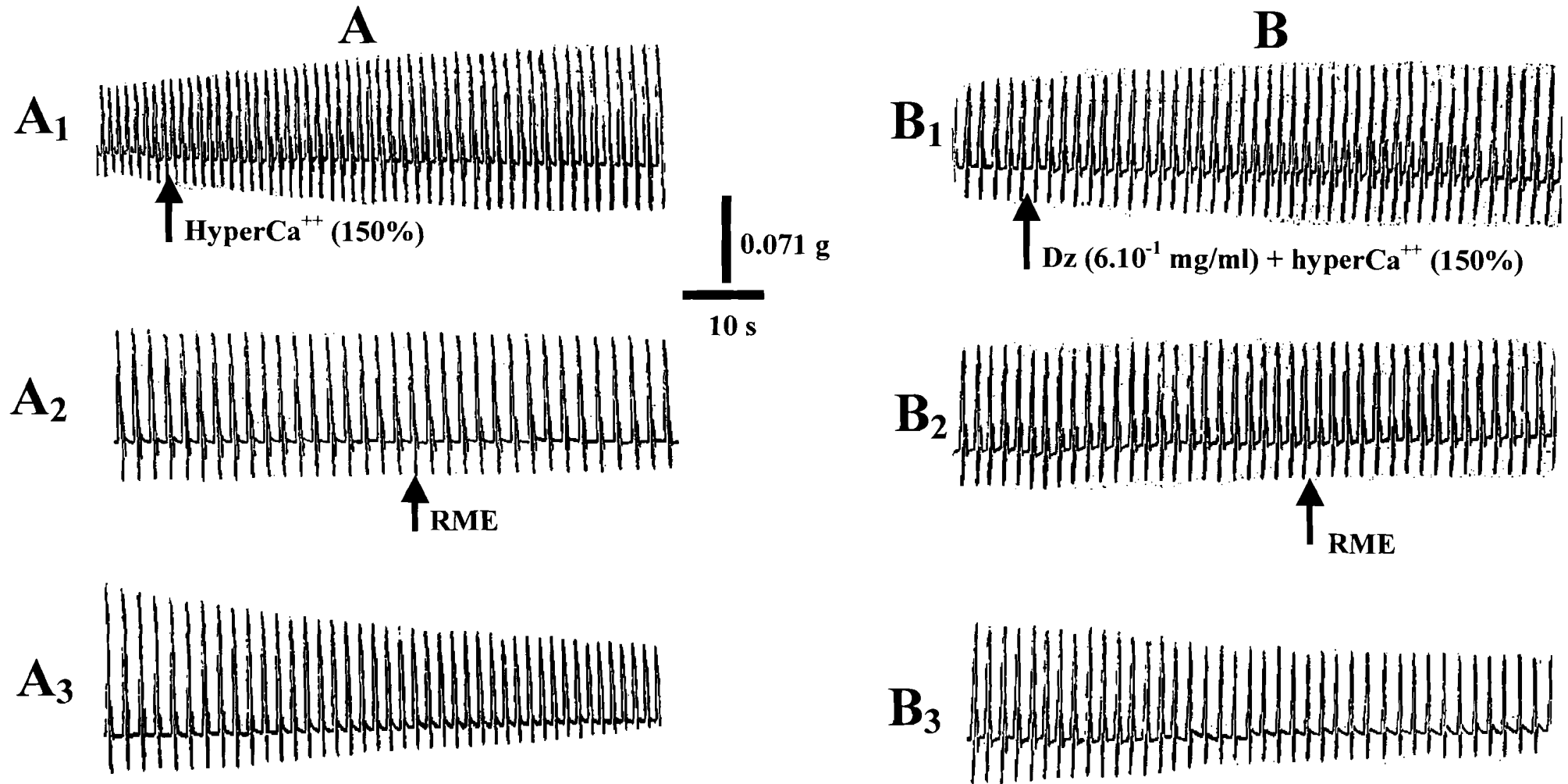


Figure 28: Effets du milieu hyperCa⁺⁺ et de Dz en milieu hyperCa⁺⁺ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets du milieu hyperCa⁺⁺ (150%)
 A₂ : suite de A₁ et retour au Mac Ewen de référence
 A₃ : suite de A₂

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de Dz en milieu hyperCa⁺⁺
 B₂ : suite de B₁ et retour au Mac Ewen de référence
 B₃ : suite de B₂

5- Discussion et conclusion

MAÏ-BAO induit une cardioinhibition en diminuant l'amplitude et la fréquence des contractions cardiaques à partir des concentrations supérieures à 5 mg/ml et une hypotension dose-dépendante à partir de 50 mg/ml. Cette hypotension résulterait probablement d'une diminution du volume de sang injecté dans les vaisseaux par le cœur (**MORITA et al, 1982**)⁽¹³¹⁾. Les effets de M-B sur le cœur et la pression artérielle sont semblables à ceux de l'ACh qui, selon **WEBB et HOLLANDER, (1956)**⁽¹⁷⁷⁾, **GALPER et al, (1977)**⁽⁶⁶⁾ et **BOLTON, (1981)**⁽²⁷⁾ conduit à des effets inotrope et chronotrope négatifs sur le cœur et à une hypotension dose-dépendante. Cependant, les effets de M-B aussi bien sur le cœur que sur la pression artérielle sont partiellement inhibés par l'Atropine qui, selon **NARGEOT (1978)**⁽¹³⁶⁾, est l'antagoniste de l'ACh sur les récepteurs cholinergiques de type muscarinique du cœur. A cet effet, M-B pourrait contenir aussi des substances cholinomimétiques qui agiraient sur le cœur selon le mécanisme de l'ACh. En fait, l'ACh en se fixant sur les récepteurs muscariniques de la membrane cellulaire, inhibe les canaux calciques (**WEBB et HOLLANDER, 1956; FIELDS et al, 1978**)^(177, 59). Cette inhibition directe des canaux calciques par l'ACh, se fait à travers l'inhibition de l'adénylcyclase. Par conséquent, la formation de l'AMPC est diminuée. Il y va aussi de la diminution de la phosphorylation des canaux calciques voltage-dépendants et partant de la diminution du courant calcique lent (**IKEMOTO et GOTO, 1977; BIEGON et PAPPANO, 1980; HINO et OCHI, 1980**)^(96, 22, 91) responsable de la diminution de la fréquence cardiaque (**MURAD et al, 1962 ; WATANABE et al, 1978; CARON et al, 1993**)^(132, 176, 31). Cela sous-tend le fait que MAÏ-BAO agirait en partie selon

le mécanisme de l'ACh. Cependant, compte tenu du fait que l'Atr réduit l'effet de M-B sans l'annuler, cela suppose qu'il existe dans M-B des composés muscariniques inhibés par l'atropine et des composés non cholinergiques qui induisent une hypotension et une cardiodépression résiduelles en présence de l'Atr. Ces effets sont semblables à ceux des antagonistes calciques. Car, selon **FABIATO et FABIATO, (1979)⁽⁵⁷⁾** **FLECKENSTEIN, (1983)⁽⁶⁰⁾** et **DAVID MC CALL, (1987)⁽⁴⁴⁾** les phénomènes d'excitation - contraction sont dus à la perméabilité membranaire aux ions calcium à travers le canal calcique lent. Il se trouve que l'excès de calcium annule l'action cardiodépressive de M-B comme dans le cas du Diltiazem, un antagoniste calcique de référence. En effet, le Diltiazem a une haute spécificité pour les canaux calciques voltage-dépendants (**ZANNAD, 1988)⁽¹⁸⁷⁾**. De ces expériences, on peut dire que les effets de M-B sur le cœur sont semblables à ceux des antagonistes du calcium. Les antagonistes du mouvement du calcium agissent essentiellement au niveau des canaux calciques voltage-dépendants (**KATZ, 1983; CARON et al, 1993)^(102,31)**. Par conséquent, les inhibiteurs de l'influx calcique peuvent diminuer le courant entrant calcique dans la cellule et exercer des effets inotrope et chronotrope négatifs sur l'activité du cœur (**GODFRAIND et al, 1986)⁽⁷¹⁾** et une hypertension résiduelle. Aussi, l'effet cardiodépressif résultant de l'accumulation des ions calcium dans leur réservoirs que sont la mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique des cellules cardiaques. MAÏ-BAO pourrait donc stimuler cette accumulation. **OTOKORÉ (1975)⁽¹⁴⁰⁾** a montré à travers ses études sur la cinétique de l'accumulation des ions calcium dans le cœur de porc que la mitochondrie est un véritable réservoir de ces ions.

MAÏ-BAO accentue l'action inotrope négative induite par un excès de Na^+ . Or l'excès de Na^+ dans le milieu extracellulaire entraîne dans un premier temps l'entrée du Na^+ dans la cellule selon le gradient de concentration. Puis, dans un deuxième temps, l'augmentation du taux de Na^+ dans le cytosol induit une sortie du Ca^{++} par le canal d'échange $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ situé sur la membrane cellulaire (**CREPSO et al, 1990; LEDERER et al, 1990; FRANK et al, 1992; MOORE et FAY, 1992**)^(40, 108, 63, 128). L'amplification de l'effet cardiodépresseur du Na^+ par M-B, justifierait l'action anticalcique du breuvage, soit par la stimulation de l'accumulation des ions calcium dans leur réservoirs, soit par le blocage du courant entrant calcique. Ainsi, l'hypotension et la cardiodépresseur induites par MAÏ-BAO en présence d'Atr pourrait être due à l'inhibition de l'entrée des ions Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux calciques. Hormis son activité cardiodépresseur persistante, M-B induit aussi une hypertension compensatrice et une cardiotonicité fugace aux concentrations supérieures ou égales à 15 mg/ml. Cette cardiotonicité peut être due à une dépolarisation liée à l'augmentation transitoire des courants entrants calciques (**KASS et al, 1978**)⁽¹⁰¹⁾. Ces courants seraient aussi liés aux mouvements du calcium à l'intérieur même de la cellule (**MOHABIR et al, 1990**)⁽¹²⁷⁾. A ce titre, M-B agirait comme *Mareya micrantha* qui, selon **ABO et al, (1998)**⁽²⁾ contient aussi bien des substances cardioinhibitrices que cardiotoniques. Cependant, les substances cardioinhibitrices sont prépondérantes sur les substances cardiotoniques et par conséquent, masquent leur effet.

En conclusion, MAÏ-BAO contient des composés cholinergiques muscariniques inhibés par l'Atr et des composés cardioinhibiteurs et non cholinergiques qui seraient des anticalciques. En plus de ces composés, il

existerait dans MAÏ-BAO, des composés hypertenseurs et cardiotoniques à effets fugaces. Ces composés seraient donc en faible quantité dans M-B. Pour séparer ces composés, M-B a été fractionné.

B- ACTIONS DES FRACTIONS DE MAÏ-BAO (MB-F₁; MB-F₂; MB-F₃; MB-F₄) SUR L'ACTIVITÉ CARDIOVASCULAIRES

C- 1- Actions des fractions MB-F₁; MB-F₂; MB-F₃; MB-F₄ sur la pression artérielle carotidienne de lapin

a- Effets dose-réponses des fractions sur la pression artérielle de lapin

Nous allons tester les quatre fractions (F₁, F₂, F₃ et F₄) de M-B sur la pression artérielle carotidienne de lapin par injection de doses croissantes de chaque produit. Des cinq (5) expériences réalisées pour chaque fraction et dont les résultats figurent dans le tableau IX, il en résulte :

* dans la gamme des doses comprises entre 50 et 1 800 mg/kg de PC, la fraction F₁ induit une très faible hypotension allant de $4 \pm 1,00$ mmHg à $6 \pm 1,52$ mmHg. Cette hypotension ne varie pas même pour les concentrations supérieures. L'effet de MB-F₁ est rapidement réversible.

* la fraction MB-F₂ induit une hypotension dose-dépendante qui varie de $6 \pm 1,05$ mmHg pour 50 mg/kg de PC à $20 \pm 4,41$ mmHg pour 2 000 mg/kg de PC (Fig 29). Il faut noter que l'hypotension induite par MB-F₂ a une valeur maximale égale à $20 \pm 4,41$ mmHg quelle que soit l'augmentation des doses de MB-F₂ au delà de 2000 mmHg (Tabl IX).

* la fraction MB-F₃ induit une faible hypotension inférieure $6 \pm 2,01$ mmHg suivie d'une hypertension dose-dépendante qui varie de

$4 \pm 1,00$ mmHg pour 50 mg/kg de PC à $20 \pm 07,16$ mmHg pour 2 200 mg/kg de PC. En outre, l'hypertension reste toujours réversible comme le montre la figure 30 au bout de 142 s pour la dose de 2 200 mg/kg de PC.

* la fraction MB-F₄ n'induit qu'une très faible hypertension dont la valeur maximale est $5 \pm 02,35$ mmHg à 800 mg/kg de PC. Cette hypertension reste faible même pour des doses allant jusqu'à 2 200 mg/kg de PC.

La fraction MB-F₁ induit une très faible hypotension, alors que la fraction MB-F₂ induit une hypotension dose-dépendante semblable à l'effet de MAÏ-BAO. Quant à la fraction MB-F₃, elle induit une hypertension dose-dépendante. La fraction MB-F₄ entraîne une très faible hypertension. Il faut également souligner que les effets des fractions sur la pression artérielle sont réversibles quelle que soit leur concentration.

Tableau VI : hypotension et hypertension induites par MB-F₁; MB-F₂; MB-F₃ et MB-F₄ sur la pression artérielle de lapin

[] mg/kg fractions	NaCl 9‰	50	600	800	1000	1 400	1 600	1 800	2 000	2 200
MB-F ₁	0	- 4	- 4	- 5	- 4	- 5	- 5	- 6	- 6	- 6
		±2,07	±1,98	±2,05	±3,09	±1,35	±3,18	±1,83	±2,12	±1,52
MB-F ₂	0	- 6	- 8	- 9	- 10	- 10,5	- 12	- 15	- 20	- 20
		±1,05	±4,55	±3,98	±2,00	±2,78	±1,47	±4,26	±4,41	±5,02
MB-F ₃	0	+ 4	+ 6	+ 10	+ 11	+ 12	+12,8	+ 14	+ 16	+ 20
		±2,00	±3,11	±2,90	±5,33	±4,43	±3,23	±3,68	±4,65	±7,16
MB-F ₄	0	+ 4	+ 4	+ 5	+ 4	+ 4	+ 2	+ 4	+ 3	+ 3
		±1,35	±2,24	±2,35	±1,27	±2,67	±1,40	±2,05	±1,52	±2,22

Signe (+) : hypertension

Signe (-) : hypotension

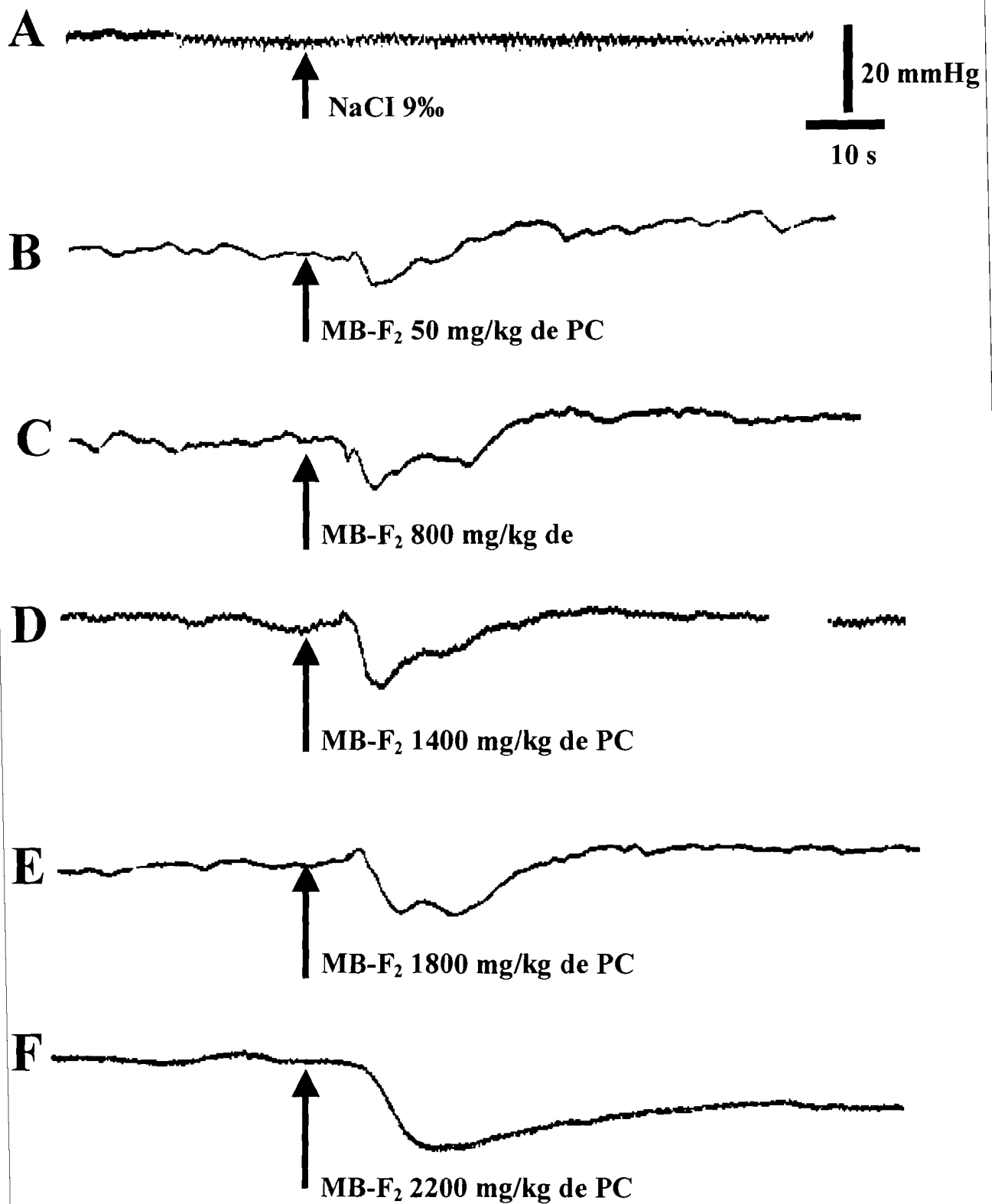


Figure 29 : Effets dose-réponses de MB-F₂ sur la pression Artérielle de lapin

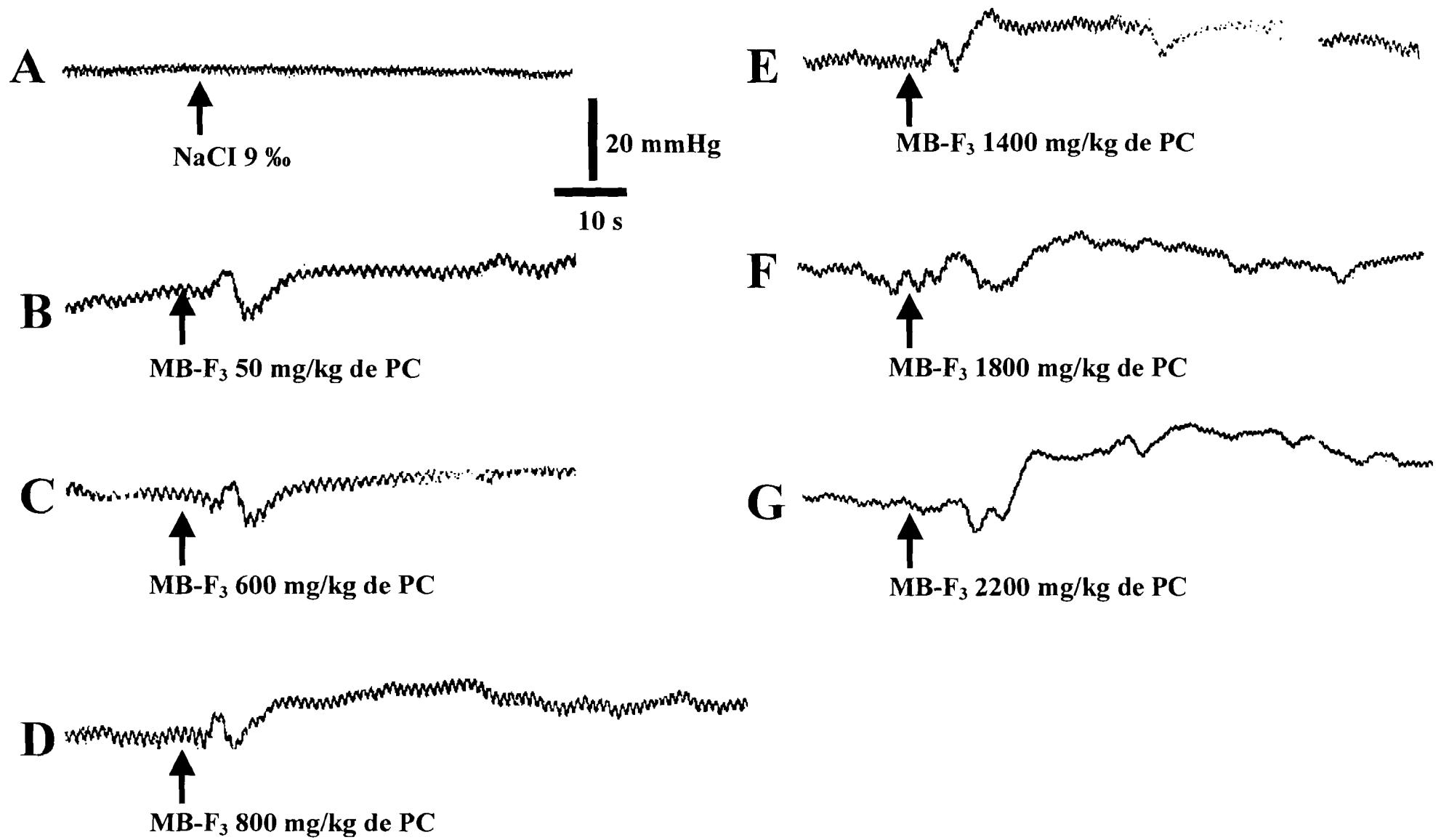


Figure 30 : Effets des dose-réponses de MB-F₃ sur la pression Artérielle de lapin

b - Étude comparative de l'action de MB-F₂ et M-B sur la pression artérielle de lapin

La figure 31 montre que des concentrations 50 à 2000 mg/kg de PC, les hypotensions induites par M-B et MB-F₂ sont similaires. Cependant, l'hypotension induite par MAÏ-BAO est élevée par rapport à celle de MB-F₂. Mais au delà de 1 000 mg/kg de PC, c'est-à-dire à 2200 mg/kg de PC, M-B induit une forte hypotension de valeur égale à $58 \pm 06,33$ mmHg avec une $CI_{50} = 1800$ mg/ml, alors que l'hypotension induite par MB-F₂ reste faible et égale à $20 \pm 05,02$ mmHg avec une $CI_{50} = 1000$ mg/kg de PC. Cependant, la comparaison de l'hypotension induite par ces deux produits selon le test t de Student, indique que dans l'intervalle de 50 à 2000 mg/kg de PC, les valeurs des hypotensions induites par M-B et MB-F₂ ne sont pas significativement différentes.

On peut alors conclure que le fractionnement n'améliore pas significativement l'action de M-B sur la pression artérielle carotidienne de lapin.

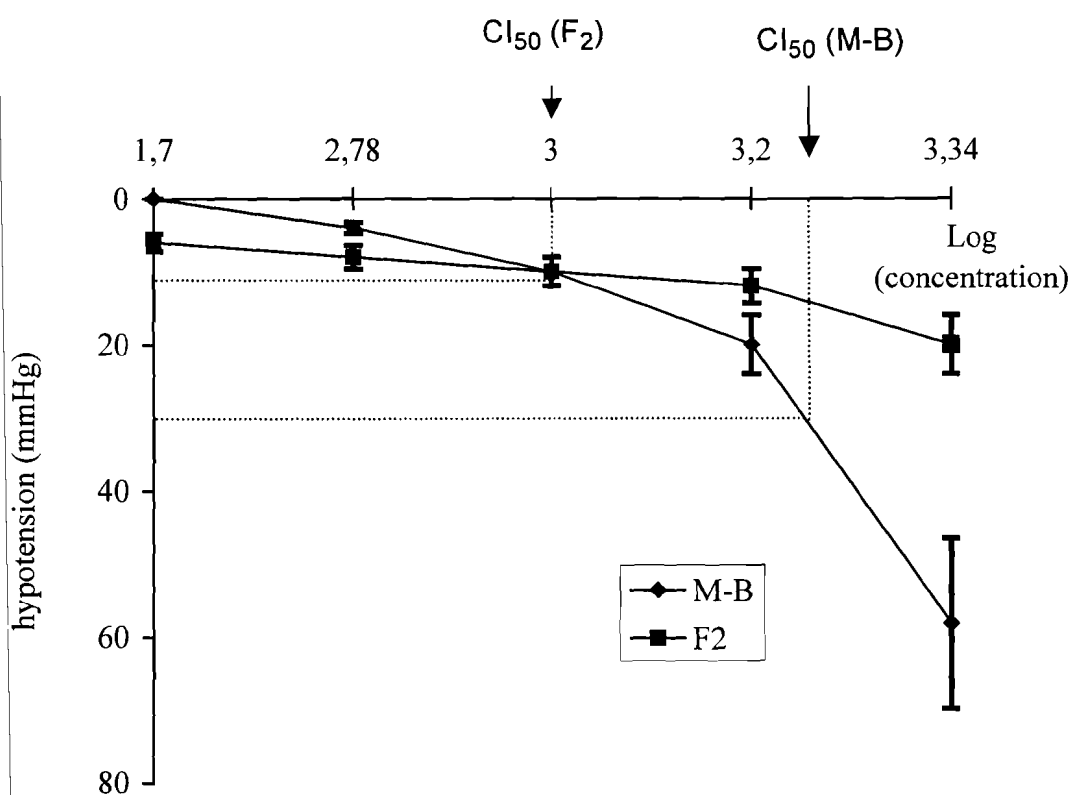


Fig 31: Comparaison des effets hypotensifs de M-B et de F₂ sur la pression artérielle carotidienne de lapin.

c- Interaction MB-F₂--Atr sur la pression artérielle carotidienne de lapin.

La figure 32 montre l'interaction de MB-F₂ (2 000 mg/kg de PC) avec l'Atr à des doses variant de 10⁻⁴ à 10⁻¹ mg/ml. Il apparaît que l'hypotension induite par MB-F₂ à cette concentration, soit 20 ± 5,02 mmHg est de plus en plus réduite par les doses croissantes d'Atr. La réduction maximale par l'Atr de l'hypotension induite par MB-F₂ est de 20%. Par ailleurs, la réversibilité de l'hypotension devient lente et passe alors de 70 s en absence d'Atr à 105 s après injection de 10⁻¹ mg/ml d'Atr.

L'Atr n'entraîne donc qu'une inhibition partielle de l'hypotension induite par la fraction MB-F₂ tout en allongeant la durée de la réversibilité.

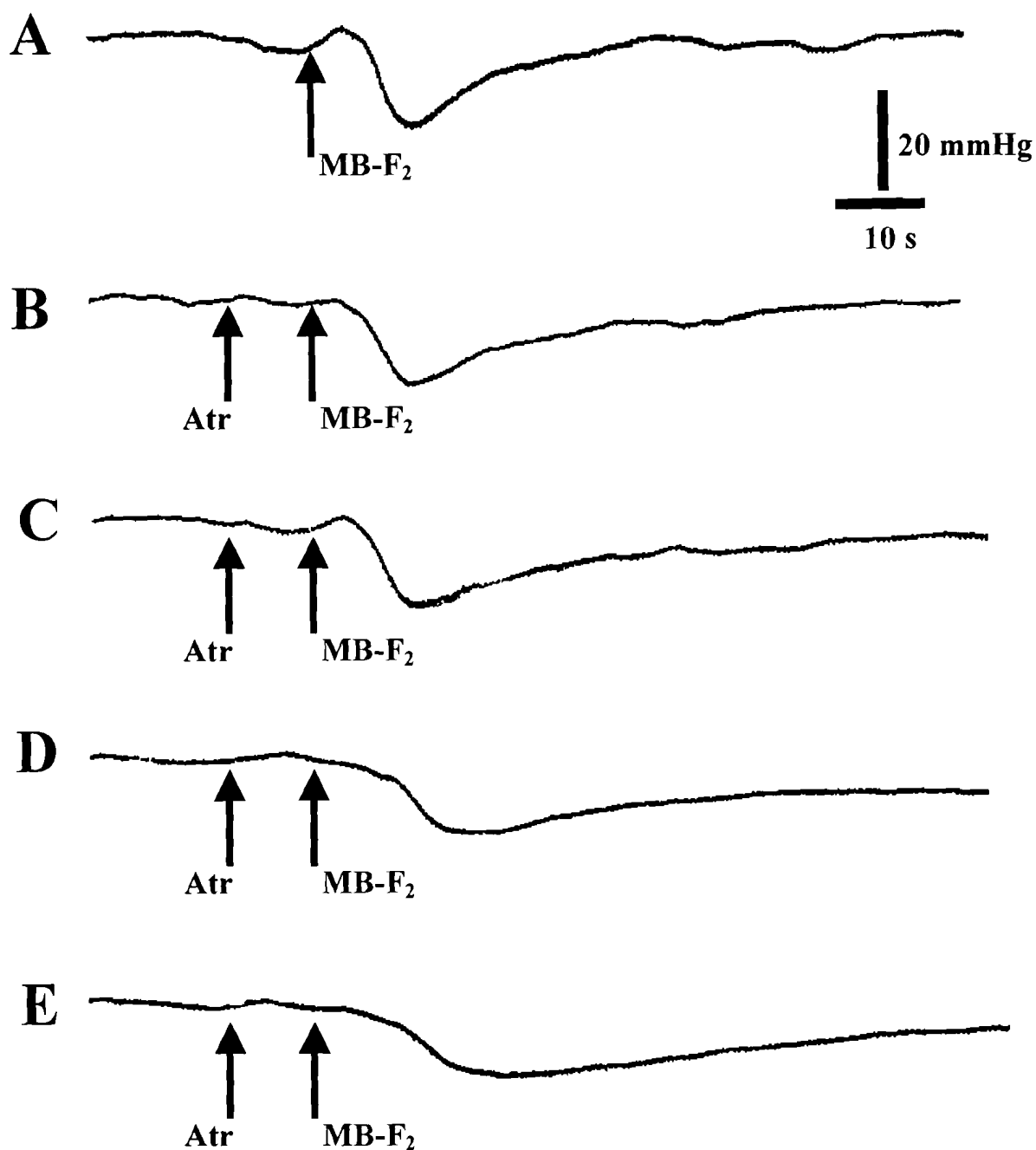


Figure 32 : Effets Interaction MB-F₂ – Atr sur la pression Artérielle de lapin

A : Effets de MB-F₂ à 2000 mg/kg de PC

Les figures suivantes montrent les effets de MB-F₂ 2000 mg/kg de PC après injection respectivement des doses de :

B : 10⁻⁴ mg/ml d'Atr

C : 10⁻³ mg/ml d'Atr

D : 10⁻² mg/ml d'Atr

E : 10⁻¹ mg/ml d'Atr

Après avoir étudié l'action des différentes fractions sur l'animal entier, nous allons tester leur effets sur le cœur de rat. Ces expérimentations visent à expliquer les résultats obtenus sur la pression artérielle qui est tributaire en partie de l'activité contractile du cœur.

2- Actions des fractions MB-F₁, MB-F₂, MB-F₃ et MB-F₄ sur l'activité mécanique de cœur de rat

a- Effets des différentes fractions de MAÏ-BAO sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat.

Les différentes figures de cette étude sont des exemples typiques de cinq (5) expériences réalisées pour chacune des fractions et pour chacune des concentrations testées. A cet effet,

- la figure 33 montre l'action de MB-F₁ sur les contractions du cœur isolé de rat. Cette fraction induit une faible cardioinhibition qui se résume en une faible diminution aussi bien de l'amplitude que de la fréquence des contractions cardiaques. Les pourcentages de diminution n'excèdent pas 10%.

- ◆- la figure 34 montre l'action de la fraction MB-F₂ sur le cœur isolé de rat dans l'intervalle de concentrations de 10⁻⁴ mg/ml à 15 mg/ml. On constate que MB-F₂ induit une cardioinhibition dose-dépendante qui se traduit par des effets inotrope et chronotrope négatifs similaires à ceux de MAÏ-BAO (Tabl VII). Ainsi, à la concentration de 1 mg/ml (planche C) par exemple, MB-F₂ diminue l'amplitude de 0,112 à 0,071g; soit un effet inotrope négatif 33,33 ± 08,07% et la fréquence de 42 à 39 batt/min; soit un effet chronotrope négatif

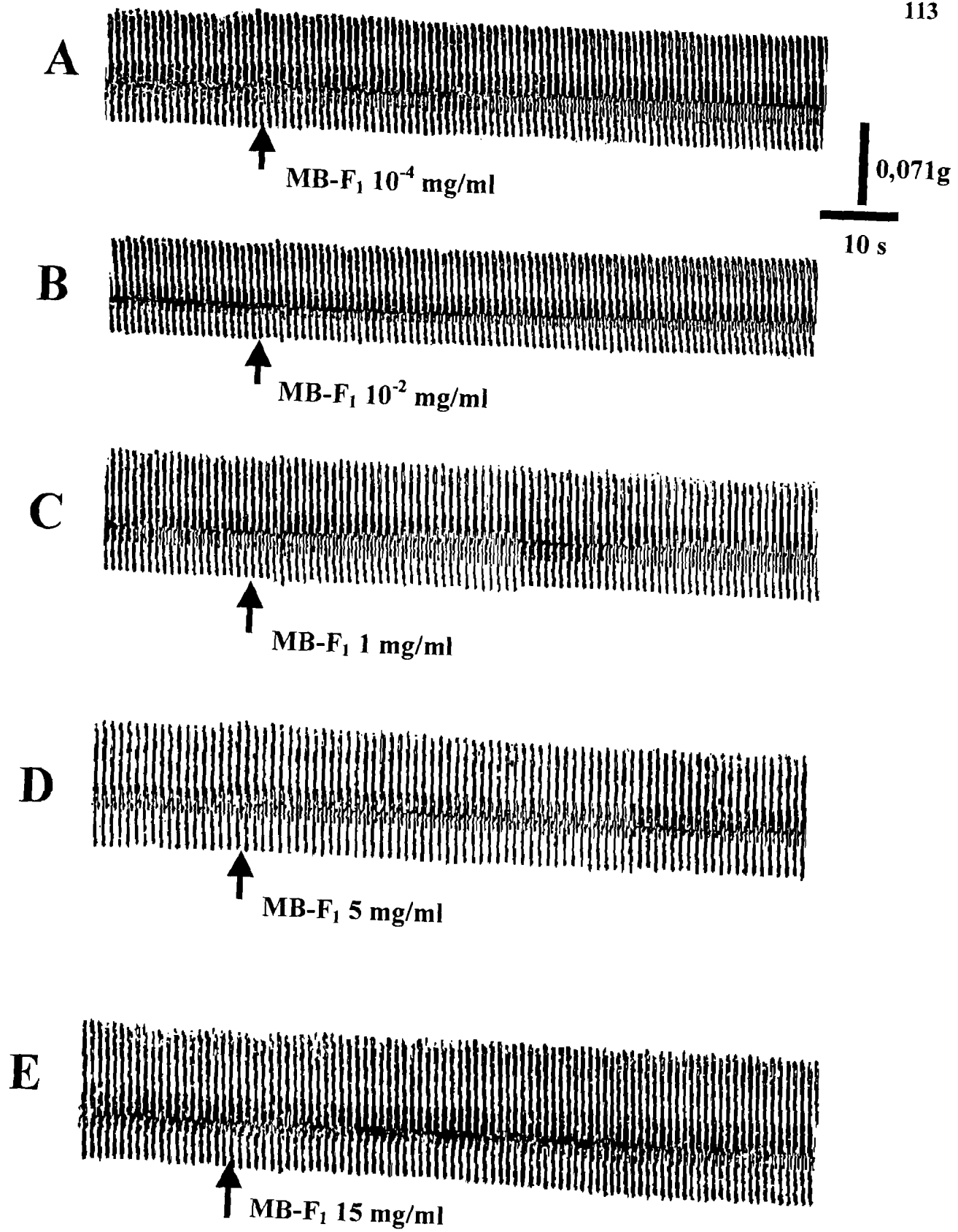


Figure 33 : Effets de MB-F₁ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

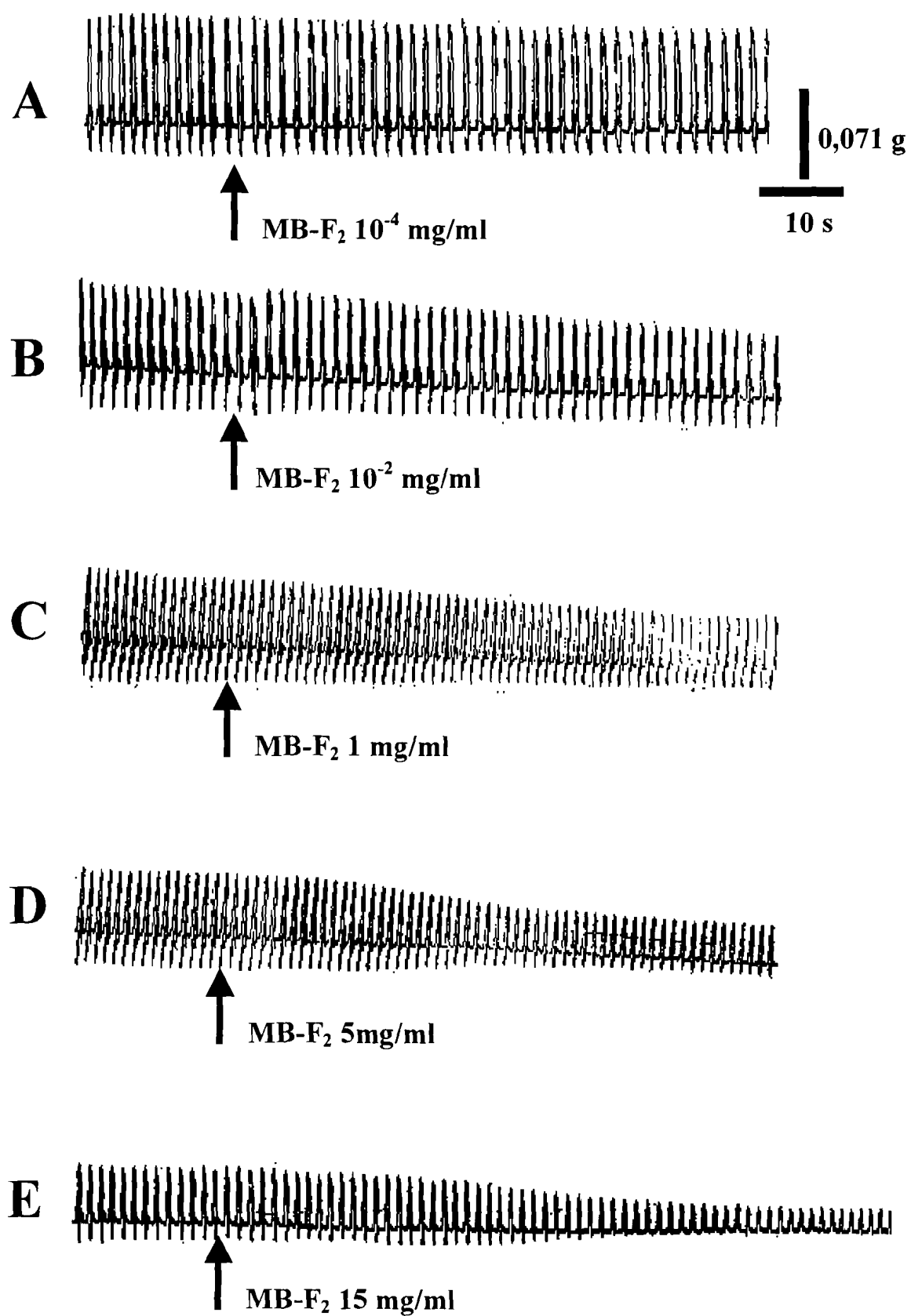


Figure 34 : Effets de MB-F₂ sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat

égal à $7,43 \pm 02,68\%$. Cette cardioinhibition devient de plus en plus forte au fur et à mesure que les doses de MB-F₂ augmentent. C'est ainsi que les concentrations de 5 mg/ml (planche D) et de 15 mg/ml (planche E) induisent une diminution de l'amplitude des contractions respectivement de 0,091 à 0,049g; soit $46,15 \pm 12,28\%$ et de 0,071 à 0,021g; soit $70,00 \pm 10,46\%$. Ces mêmes concentrations (5 mg/ml et 15 mg/ml) entraînent aussi une diminution de la fréquence cardiaque respectivement de 41 à 37 batt/min ($09,75 \pm 01,14\%$) et de 36 à 32 batt/min ($11,11 \pm 04,05\%$). Tous ces effets se produisent au bout de 14s et de 10s de perfusion respectivement pour 5 mg/ml et 15 mg/ml et sont réversibles.

En conclusion, on peut dire que F₂ exerce un effet cardioinhibiteur semblable à celui de MAÏ-BAO sur le cœur isolé de rat.

- la figure 35 montre l'action de la fraction MB-F₃ sur les contractions cardiaques. Ainsi, les enregistrements A et B montrent qu'aux doses de 10^{-4} mg/ml à 10^{-2} mg/ml, MB-F₃ induit de très faibles effets inotrope et chronotrope négatifs. Cependant, à partir de 10^{-1} mg/ml, F₃ induit un effet inotrope positif et chronotrope négatif. C'est ainsi qu'à 1 mg/ml, MB-F₃ entraîne une augmentation de l'amplitude de 0,126 à 0,140g ($11,11 \pm 03,20\%$) et une diminution de la fréquence de 35 à 31 batt/min ($11,43 \pm 1,77\%$). Ces effets sont accentués avec l'augmentation des doses jusqu'à la dose de 15 mg/ml où on obtient une augmentation de l'amplitude de 0,133 à 0,175g ($31,58 \pm 08,05\%$) et une diminution de la fréquence de 46 à 38 batt/min ($17,37 \pm 03,42\%$). Ces effets apparaissent après 37 s de perfusion pour 1 mg/ml et 17s pour la dose de 15 mg/ml. Au delà de 15 mg/ml, les effets induits par MB-F₃

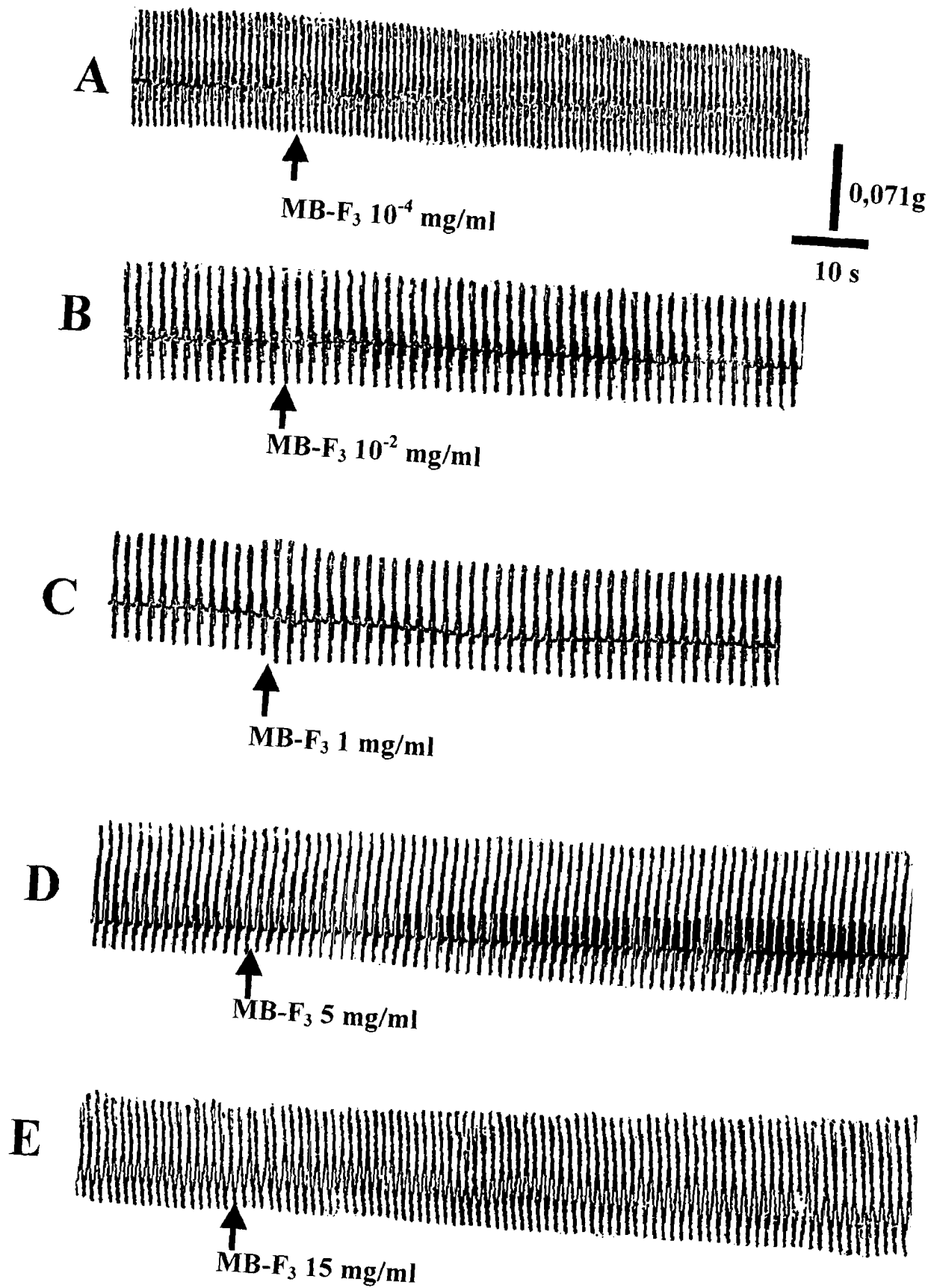


Figure 35 : Effets de F₃ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

restent les mêmes et semblables à ceux de 15 mg/ml. Par conséquent, la Concentration cardiotonique 50% (CT₅₀) est égale à 1 mg/ml. Par ailleurs, il convient de noter que tous ces effets sont réversibles.

En conclusion, à des doses égales ou supérieures à 1 mg/ml, MB-F₃ exerce un effet cardiotonique comparable à celui des digitaliques.

●- la figure 36 montre l'action de MB-F₄ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat. Dans la gamme de concentrations variant de 10⁻⁴ mg/ml à 15 mg/ml, MB-F₄ exerce peu d'effets sur les contractions cardiaques. Ce sont de très faibles effets inotrope et chronotrope négatifs (10⁻⁴ mg/ml) ou inotrope positif et chronotrope négatif (5 et 15 mg/ml).

En conclusion, il convient après analyse, de dire que MB-F₂ et MB-F₃ induisent respectivement des effets cardioinhibiteurs et cardiotoniques sur le cœur isolé de rat. Par contre, les deux autres fractions MB-F₁ et MB-F₄ n'induisent pas d'effets notables sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat.(tabl VII).

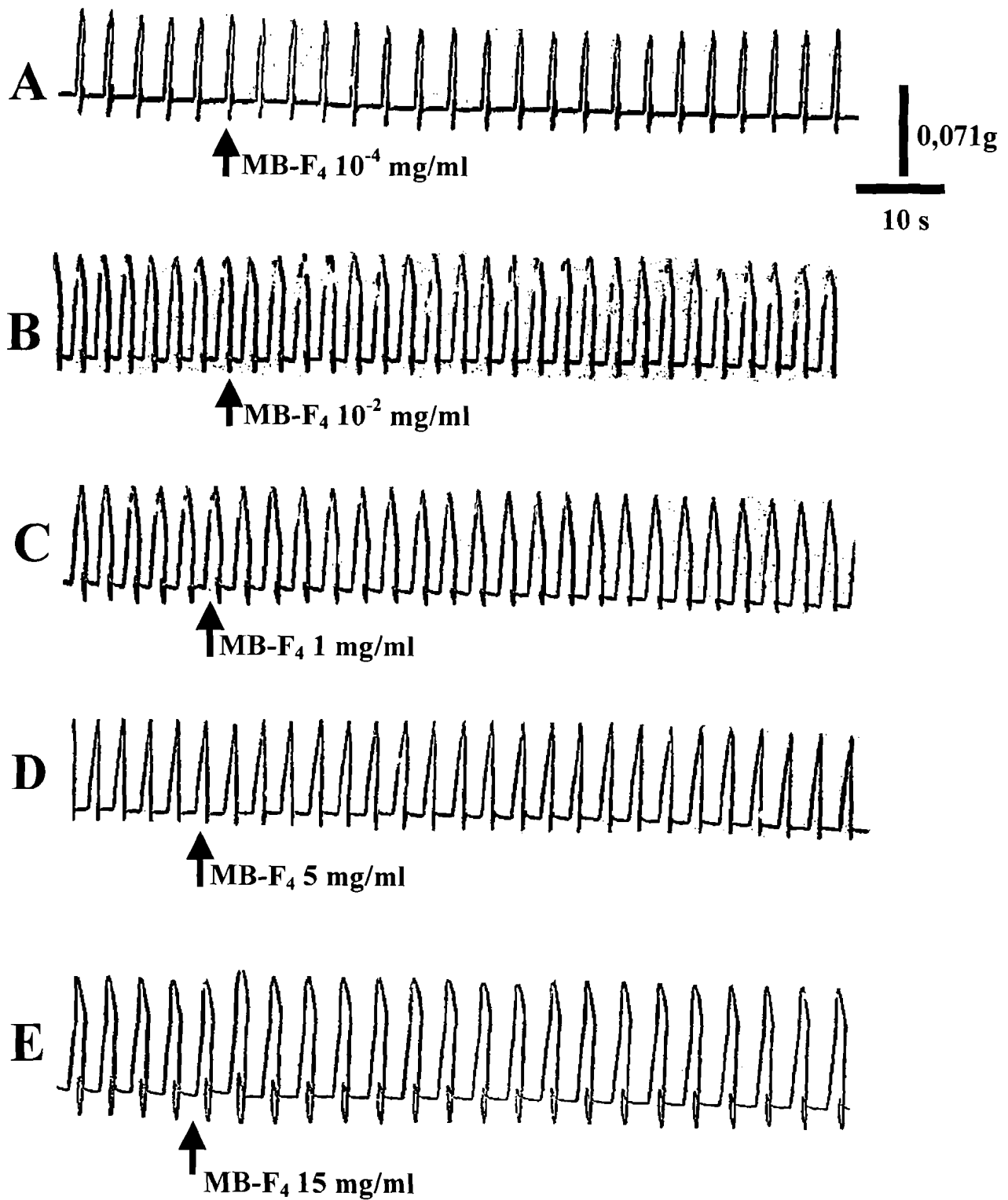


Figure 36 : Effets de MB-F₄ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

TABLEAU VII : Pourcentage de variation de l'amplitude des contractions et de la fréquence maximales cardiaques en fonction des doses des substances pharmacologiques

Substances Doses(mg/ml)	MAI-BAO		F ₁		F ₂		F ₃			F ₄		
	A ⁻ (%)	F ⁻ (%)	A ⁻ (%)	F ⁻ (%)	A ⁻ (%)	F ⁻ (%)	A ⁻ (%)	A ⁺ (%)	F ⁻ (%)	A ⁻ (%)	A ⁺ (%)	F ⁻ (%)
10 ⁻⁴	0	0	0	05,55 ± 01,67	0	0	06,66 ± 02,99	0	05,55 ± 01,48	0	0	0
10 ⁻²	0	0	0	03,70 ± 02,07	04,00 ± 03,05	05,45 ± 01,25	09,37 ± 02,80	0	05,00 ± 01,35	05,00 ± 03,40	0	06,67 ± 02,23
1	0	0	05,55 ± 02,65	05,77 ± 02,36	29,41 ± 08,07	21,43 ± 07,08	0	11,11 ± 03,20	11,43 ± 01,77	0	0	07,14 ± 01,33
5	5,26 ± 00,22	20 ± 06,24	07,69 ± 04,32	02,17 ± 0,97	37,10 ± 06,28	26,08 ± 01,14	0	17,65 ± 04,98	16,66 ± 04,38	0	05,00 ± 02,22	14,28 ± 04,83
15	29,16 ± 03,52	33 ± 06,04	7,69 ± 01,78	01,96 ± 01,00	70,00 ± 11,46	30,00 ± 31,05	0	31,58 ± 02,05	17,37 ± 03,05	0	03,22 ± 01,85	15,38 ± 05,52

A⁻: Effet inotrope négatif.
A⁺: Effet inotrope positif.

F⁻: Effet chronotrope négatif.

b- Études comparatives des effets de M-B et de la fraction MB-F₂ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat.

b.1- Effets sur l'amplitude des contractions

Selon la figure 37, les deux produits (M-B et MB-F₂) entraînent une diminution progressive de l'amplitude des contractions cardiaques dans l'intervalle de concentrations de 10⁻⁴ mg/ml à 15 mg/ml. Cependant, la diminution induite par MB-F₂ est plus forte que celle de M-B. Ainsi, MB-F₂ et M-B induisent le même effet inotrope négatif sur le cœur isolé de rat avec des CI₅₀ respectives de 5 mg/ml et 15 mg/ml.

Le test de comparaison de deux échantillons appariés du test t de Student utilisé pour la comparaison des effets de MB-F₂ et M-B indique que les pourcentages de diminution de l'amplitude de MB-F₂ et M-B sont significativement différents. Alors, nous pouvons conclure que MB-F₂ est plus active sur l'amplitude des contractions du cœur isolé de rat que M-B.

b.2- Effet sur la fréquence des contractions

Les deux produits (M-B et MB-F₂) induisent une diminution de la fréquence des contractions cardiaques dans l'intervalle de concentrations 10⁻⁴ mg/ml à 15 mg/ml (Fig 38). Cependant, contrairement à la diminution progressive induite par M-B sur la fréquence cardiaque, la diminution de la fréquence cardiaque induite par MB-F₂ reste constante à partir de 1 mg/ml.. De cette étude, il ressort donc que MB-F₂ et M-B induisent des effets chronotropes négatifs sur le cœur isolé de rat avec des CI₅₀ respectives de 5 mg/ml et 15 mg/ml.

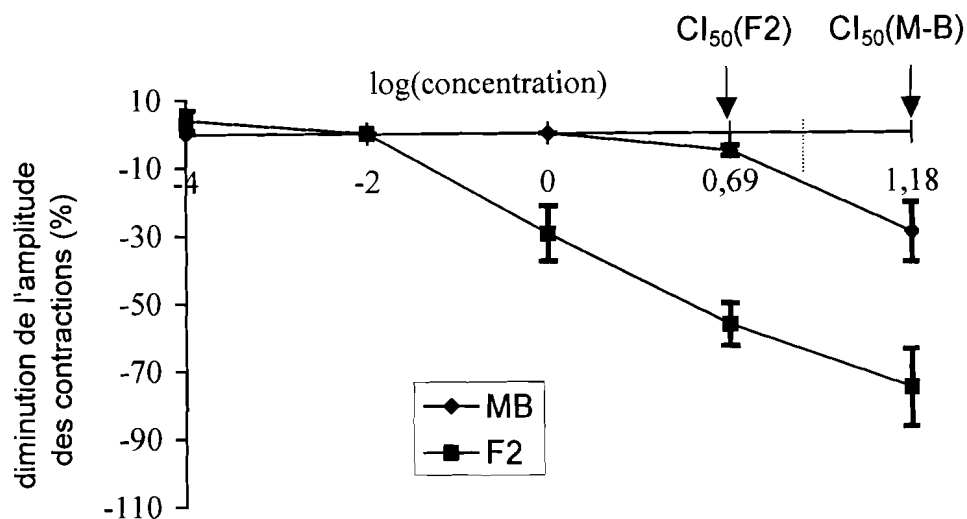


Fig 37: Comparaison des effets F₂ et M-B sur l'amplitude des contractions du cœur isolé de rat

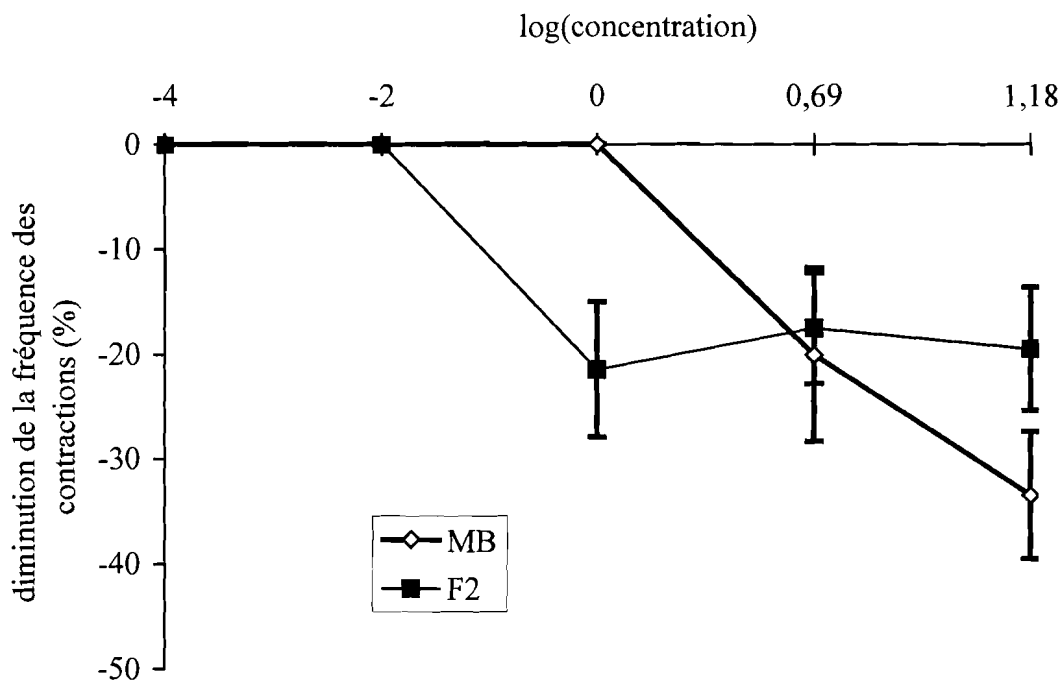


Fig 38: Comparaison des effets F₂ et M-B sur la fréquence des contractions du cœur isolé de rat

Le test de comparaison de deux échantillons appariés du test t de Student utilisé pour comparer les effets des deux produits sur la fréquence des contractions cardiaques, montre que les pourcentages de diminution de la fréquence induits par M-B et MB-F₂ ne diffèrent pas significativement. Donc MAÏ-BAO n'est pas plus active sur la fréquence des contractions que F₂ et vis-versa.

c- Études comparatives des effets de la fraction MB-F₃ et de la digoxine (Dx) sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat.

c.1- Effets de Dx sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat.

Nous avons réalisé cinq tests pour chacune des doses de Dx sur le cœur de rat (Fig 39). De ces expériences, il ressort que Dx exerce un effet inotrope positif dose-dépendant et un effet chronotrope négatif environ 30 s après le début de la perfusion du cœur. Ainsi, les enregistrements de A à D représentant les effets des concentrations de 10⁻⁸ mg/ml à 10⁻² mg/ml sur le cœur, montrent que Dx induit une augmentation de l'amplitude de 07,41 ± 02,20% à 36,00 ± 10,80% et une diminution de la fréquence de 20,00 ± 13,42% à 15,15 ± 07,53%.

Par ailleurs, il convient de noter la courte durée de l'effet inotrope positif, soit environ 70 s pour les doses de 10⁻⁸ à 10⁻⁶ mg/ml. Par contre, pour les concentrations supérieures à 10⁻⁶ mg/ml, l'effet inotrope positif se stabilise sur une longue durée. Tous ces phénomènes induits par Dx sont parfaitement réversibles après un retour au Mac Ewen de référence.

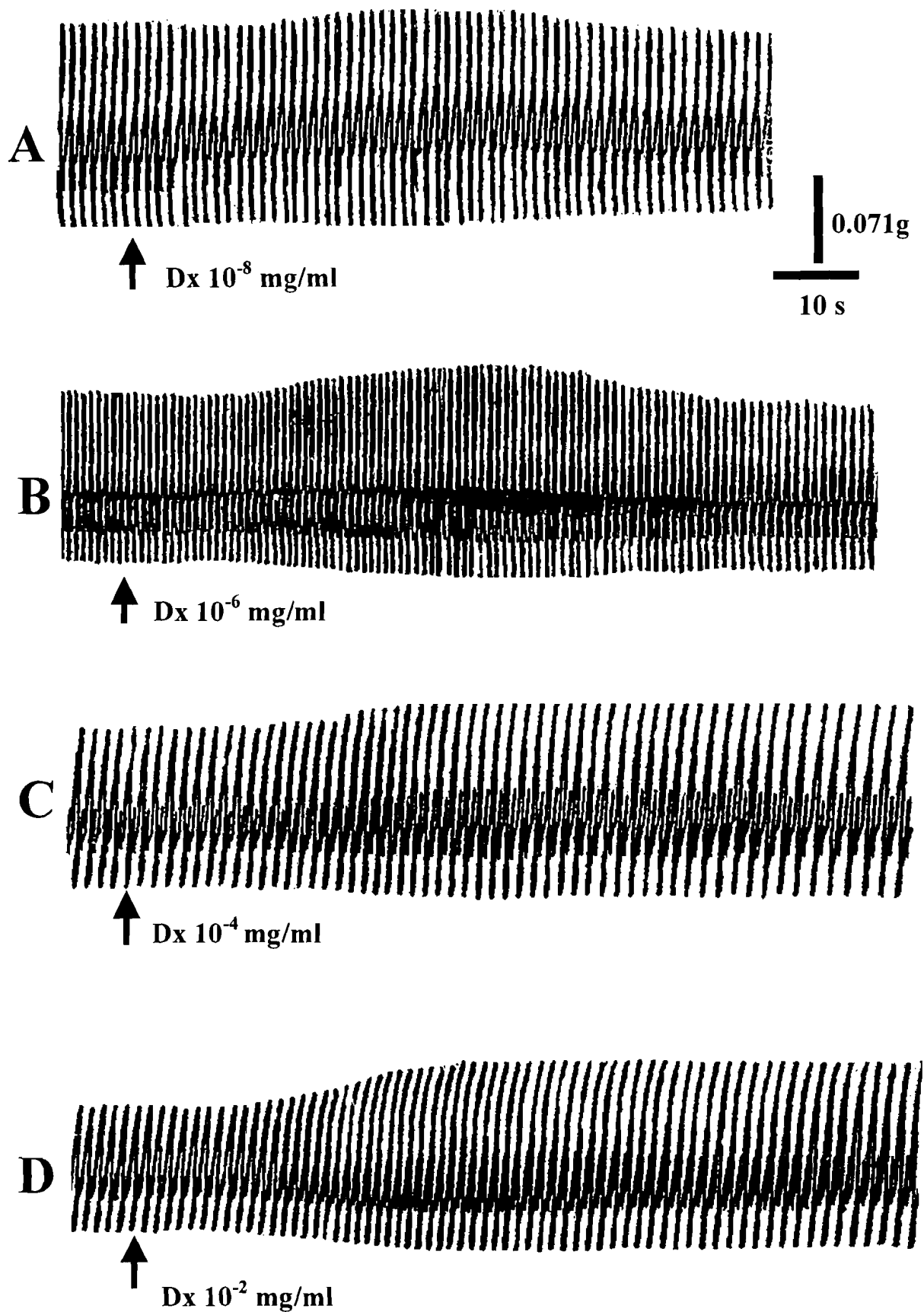


Figure 39 : Effets dose-réponses de Dx sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

c.2- Étude comparative des effets de MB-F₃ et Dx sur l'amplitude des contractions cardiaques.

Les courbes des effets de doses croissantes de Dx et de MB-F₃ indiquent une augmentation progressive de l'amplitude des contractions cardiaques (Fig 40). Cependant, la concentration de Dx qui augmente l'amplitude des contractions cardiaques de 50%, soit 10⁻⁶ mg/ml est très faible par rapport à celle de MB-F₃ qui est égale à 1 mg/ml.

c.3- Étude comparative de MB-F₃ et Dx sur la fréquence des contractions cardiaques.

La courbe de Dx montre que Dx et MB-F₃ exercent une inhibition sur la fréquence cardiaque (Fig 41). En effet, l'inhibition induite par Dx et MB-F₃ est progressive avec des CI₅₀ respectives de 10⁻⁴ mg/ml et 10⁻¹ mg/ml.

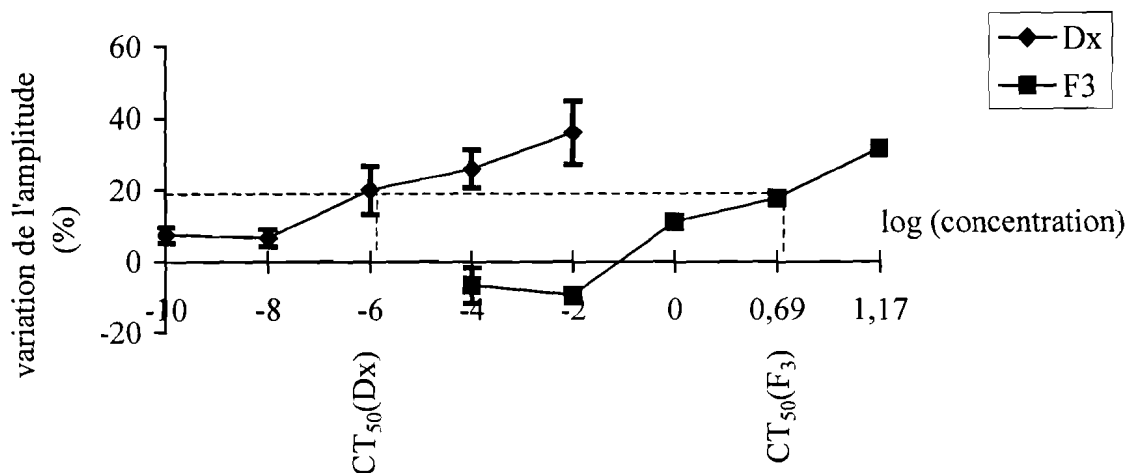


Fig 40: Comparaison des effets de Dx et de F₃ sur l'amplitude des contractions du coeur isolé de rat.

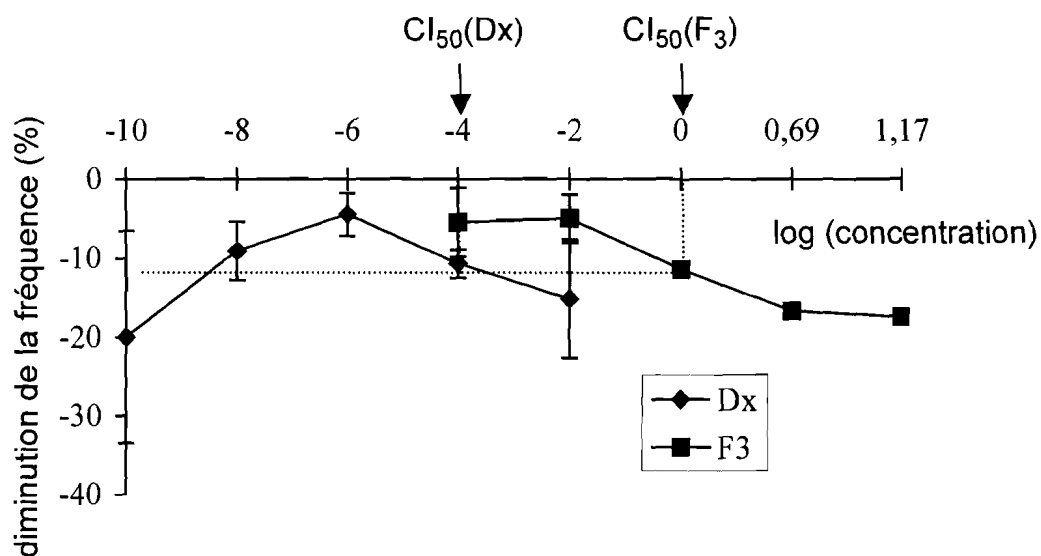


Fig 41: Comparaison de l'action de Dx et de F₃ sur la fréquence des contractions du coeur isolé de rat.

3- Étude de l'interaction MB-F₂ – Atr sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

La figure 42 représente un exemple de cinq (5) expériences effectuées sur l'interaction MB-F₂ - Atr. Ainsi, les enregistrements A représentent l'effet de MB-F₂ (5 mg/ml) sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat. La fraction F₂ induit un effet inotrope négatif faisant passer l'amplitude de 0,105 à 0,077g; soit $26,66 \pm 08,05\%$. Quant aux battements cardiaques, F₂ diminue la fréquence de 46 à 34 batt/min; soit $26,08 \pm 09,33\%$.

Les enregistrements B représentent l'effet du mélange MB-F₂ (5 mg/ml) et Atr (10^{-2} mg/ml) sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat. On constate que ce mélange MB-F₂ + Atr induit une diminution de l'amplitude de 0,105 à 0,091g ($13,33 \pm 03,05\%$) et une diminution de la fréquence, le nombre de battements cardiaques par minute passe de 31 à 27 batt/min; soit $12,90 \pm 05,20\%$.

Ainsi, on remarque qu'en présence d'Atr (10^{-2} mg/ml), l'effet inotrope négatif de MB-F₂ (5 mg/ml) est réduit de 50,53%, quand l'effet chronotrope négatif est relevé de 58,78%. L'Atr antagonise donc partiellement les effets inotrope et chronotrope négatifs induits par MB-F₂.

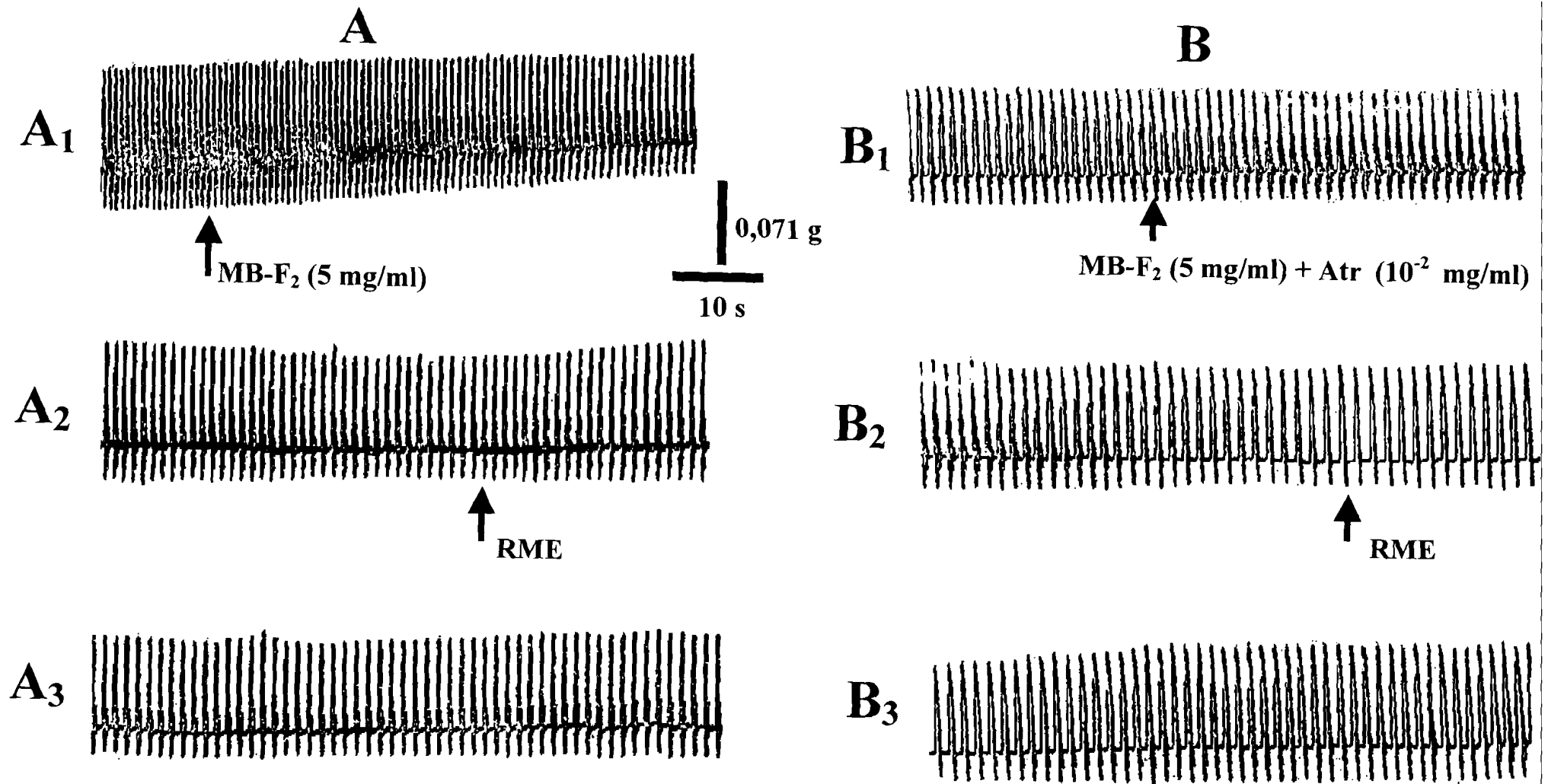


Figure 42 : Effets de F₂ (5 mg/ml) et de F₂ (5 mg/ml) + Atr (10⁻² mg/ml) sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets F₂
 A₂ : suite de A₁ et retour au Mac Ewen de référence
 A₃ : suite de A₂

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets F₂ + Atr
 B₂ : suite de B₁ et retour au Mac Ewen de référence
 B₃ : suite de B₂

4- Effets des solutions physiologiques de composition ionique modifiée dans l'action de MB-F₂ et MB-F₃ sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat.

a- Effets sur la fraction MB-F₂

a.1- Effets de MB-F₂ en milieu hypercalcique

La figure 43 montre l'action de MB-F₂ à 5 mg/ml et l'action de MB-F₂ (5 mg/ml) en milieu hypercalcique (150% CaCl₂) sur le cœur isolé de rat. La diminution de l'amplitude des contractions de 0,105 à 0,063g ($40 \pm 05,30\%$) qu'entraîne MB-F₂ à 5 mg/ml (Fig 43A) est annulée par l'excès de calcium (43 B). On observe alors que, MB-F₂ en milieu hypercalcique, induit un effet inotrope positif de 0,105 à 0,126g; soit $20,00 \pm 07,53\%$ d'augmentation de l'amplitude. Quant à l'effet chronotrope négatif de $26,47 \pm 12,00\%$ induit par MB-F₂ (5 mg/ml), il est accentué en présence de l'excès.

On peut dire que l'excès de calcium inhibe l'action de MB-F₂ sur l'amplitude des contractions cardiaques.

a.2 –Effets de la fraction MB-F₂ en milieu hypersodique

La figure 44 montre deux types d'enregistrement. Les enregistrements A représentent l'effet de la solution hypersodique (150% NaCl) et les enregistrements B représentent l'effet de la fraction MB-F₂ (5 mg/ml) en milieu hypersodique (150% NaCl) sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat.

On note que la solution hypersodique diminue l'amplitude des contractions cardiaques de 0,105 à 0,056g; soit $38,89 \pm 04,02\%$, mais est

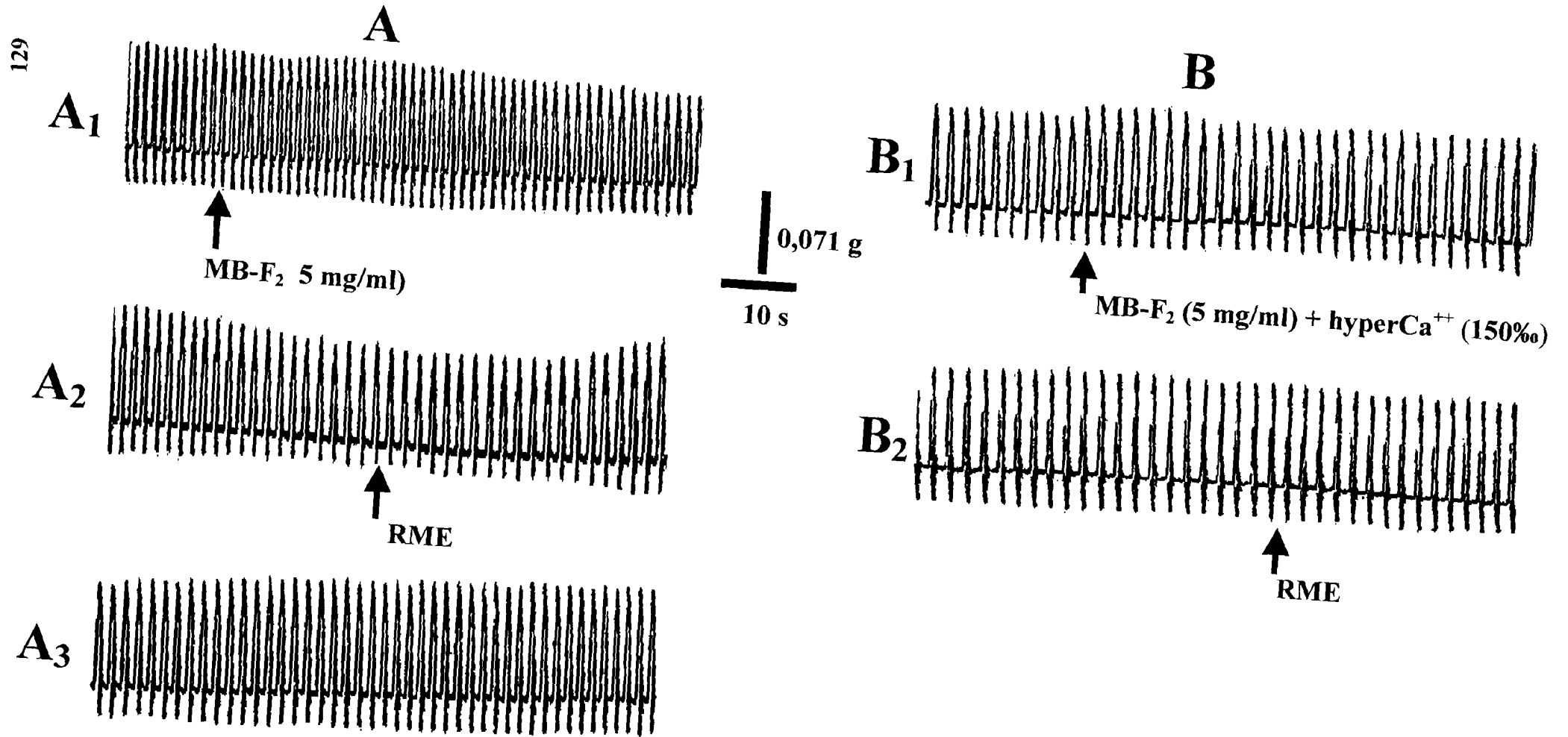


Figure 43 : Effets de MB-F₂ et de MB-F₂ en milieu hyperCa⁺⁺ (150%) sur l'activité mécanique de cœur de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets de MB-F₂ à 5 mg/ml
 A₂ : suite de A₁ et retour au Mac Ewen de référence
 A₃ : suite de A₂

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de MB-F₂ (5 mg/ml) + hyperCa⁺⁺
 B₂ : suite de B₁ et retour au Mac Ewen de référence

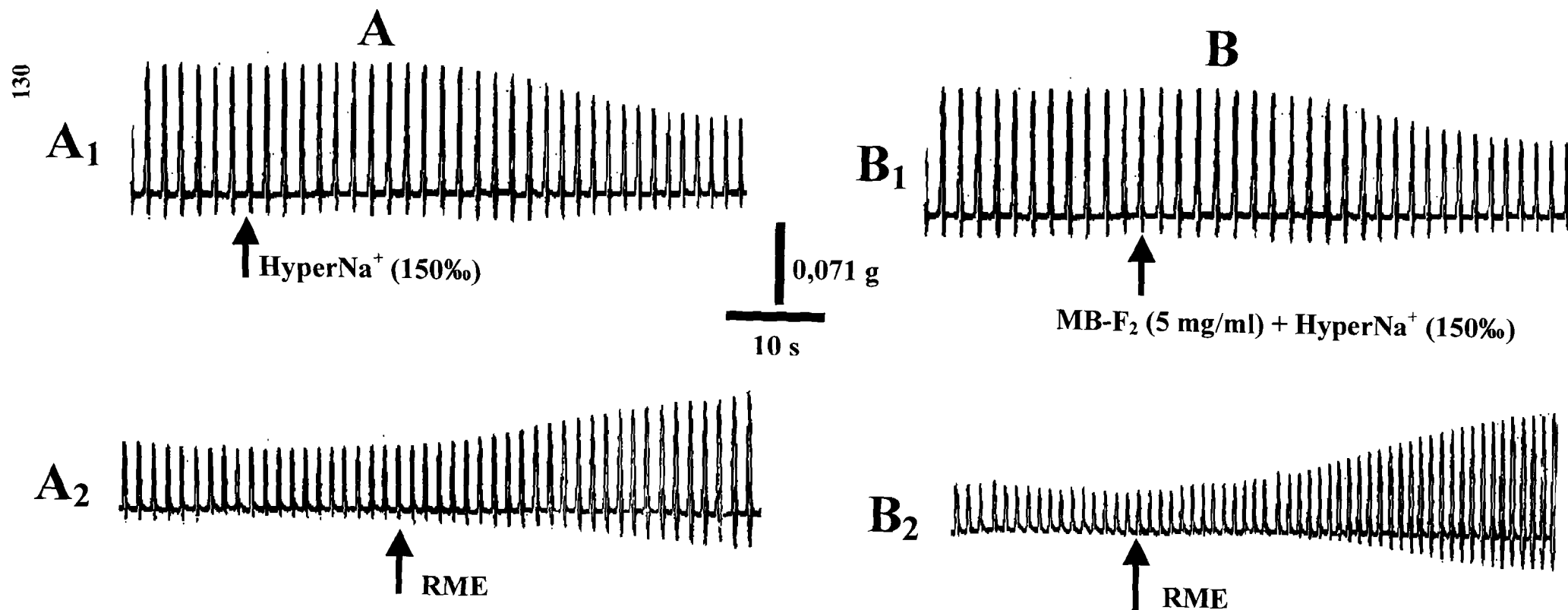


Figure 44 : Effets du milieu HyperNa⁺ (150‰) et de MB-F₂ en milieu HyperNa⁺ (150‰) sur l'activité mécanique de cœur de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets du milieu HyperNa⁺ (150‰)
 A₂ : suite de A₁ et retour au Mac Ewen de référence

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de MB-F₂ (5 mg/ml) + HyperNa⁺ (150‰)
 B₂ : suite de B₁ et retour au Mac Ewen de référence

Sans effet notable sur la fréquence cardiaque. Cependant, l'association MB-F₂ (5 mg/ml) et l'excès de sodium, diminue l'amplitude des contractions du cœur de 0,133 à 0,035g ; soit $73,68 \pm 13,47\%$ et est également sans effet notable aussi sur la fréquence cardiaque.

La MB-F₂ amplifie l'effet inotrope négatif de la solution hypersodique de 34,79% sur les contractions du cœur isolé de rat.

b- Effets sur la fraction MB-F₃

b.1- Effets de la fraction MB-F₃ en milieu

hypocalcique sur l'activité mécanique de cœur isolé de rat.

Les enregistrements A et B de la figure 45 représentent respectivement l'effet de la solution hypocalcique (50% CaCl₂) et celui de MB-F₃ (1 mg/ml) en milieu hypocalcique (50% CaCl₂) sur les contractions de cœur isolé de rat.

De ces enregistrements, on note que la solution hypocalcique (50% CaCl₂) entraîne une diminution de l'amplitude des contractions de 0,133 à 0,105g ; soit un effet inotrope négatif de $21,05 \pm 03,52\%$. Cette solution n'a aucune action sur la fréquence des contractions cardiaques. Par ailleurs, MB-F₃ (1 mg/ml) en milieu hypocalcique (50% CaCl₂) induit une diminution de l'amplitude de 0,119 à 0,105g ; soit un effet inotrope négatif de $11,76 \pm 04,36\%$ sans produire des modifications notables sur la fréquence cardiaque.

On note que MB-F₃ réduit la cardioinhibition induite par la solution hypocalcique d'environ 44,13%.

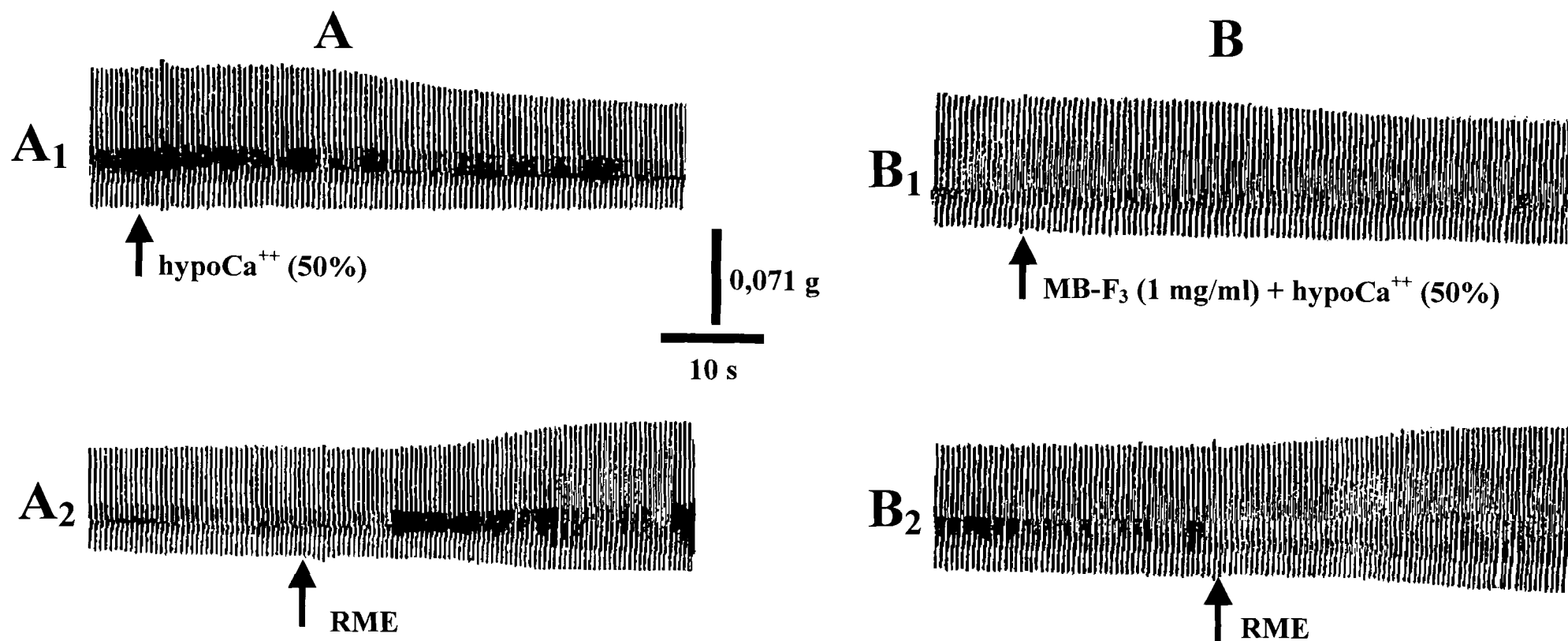


Figure 45 : Effets du milieu hypoCa⁺⁺ (50%) et de MB-F₃ en milieu hypoCa⁺⁺ (5%) sur l'activité mécanique de isolé cœur de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets du milieu hypoCa⁺⁺ (50%)
 A₂ : suite de A₁ et retour au Mac Ewen de référence

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de MB-F₃ (1 mg/ml) + hypoCa⁺⁺ (50%)
 B₂ : suite de B₁ et retour au Mac Ewen de référence

**b.2- Effets de la fraction MB-F₃ en milieu
hypersodique sur l'activité mécanique de cœur
isolé de rat.**

Les enregistrements 46A et 46B représentent respectivement l'effet de la solution hyperNa⁺ (150%) et celui de MB-F₃ (1 mg/ml) en milieu hyperNa⁺ (150%) sur les contractions de cœur isolé de rat.

Il apparaît que la solution hyperNa⁺ entraîne une diminution de l'amplitude des contractions de 0,105 à 0,063g ; soit un effet inotrope négatif de $40,00 \pm 12,34\%$, avec une faible diminution de la fréquence cardiaque. Toutefois, la présence de MB-F₃ (1 mg/ml) dans la solution hyperNa⁺ (150%) induit une augmentation de l'amplitude de 0,126 à 0,140g ; soit un effet inotrope positif de $11,11 \pm 02,31\%$ sans effet notable sur la fréquence cardiaque.

On peut noter que MB-F₃ annule la cardiodépression induite par la solution hyperNa⁺.

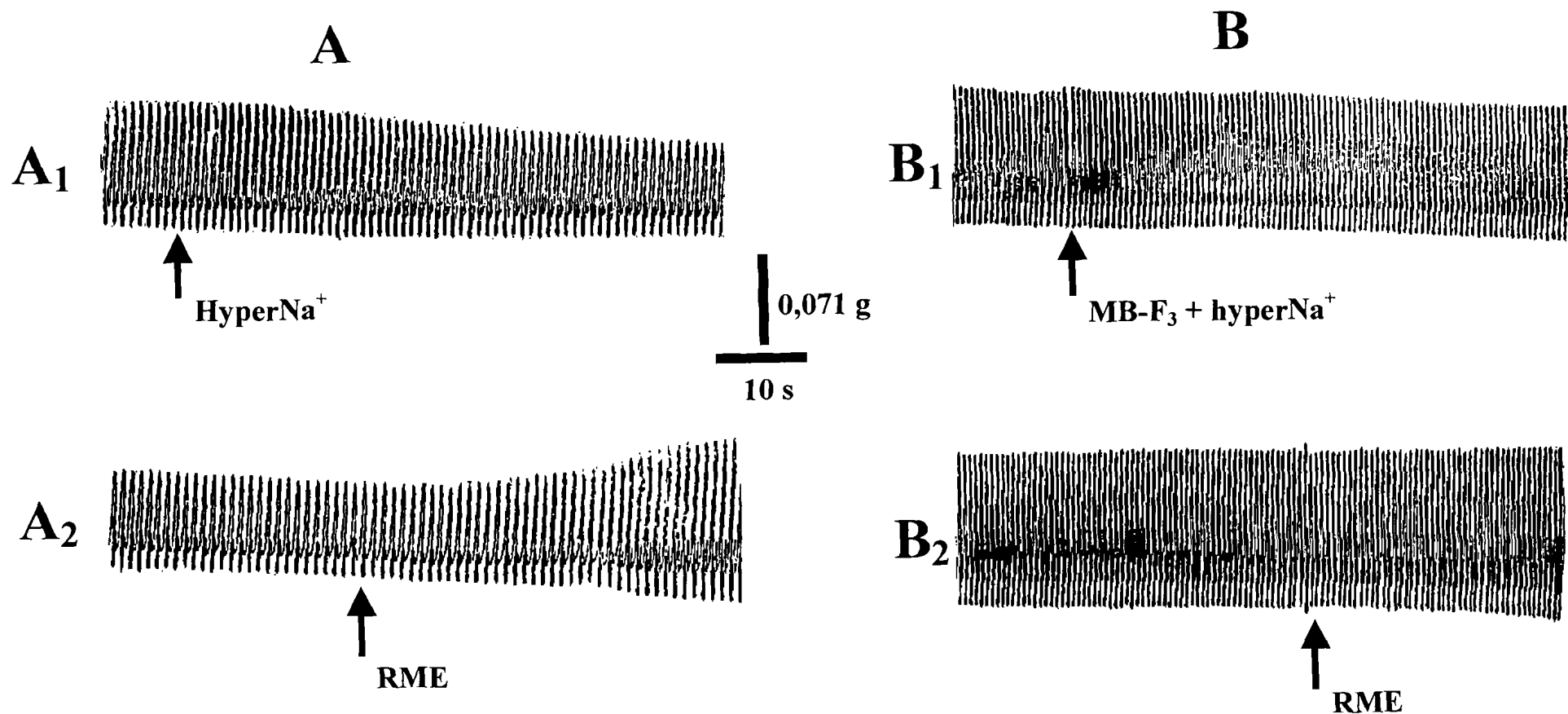


Figure 46 : Effets du milieu hyperNa⁺ (150%) et de MB-F₃ en milieu hyperNa⁺ (15%) sur l'activité mécanique de isolé cœur de rat

A₁ : enregistrements témoin suivi des effets du milieu hyperNa⁺ (150%)

A₂ : suite de **A₁** et retour au Mac Ewen de référence

B₁ : enregistrements témoin suivi des effets de MB-F₃ (1 mg/ml) + hyperNa⁺ (150%)

B₂ : suite de **B₁** et retour au Mac Ewen de référence

5- DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Parmi les quatre (4) fractions de M-B, seules MB-F₂ et MB-F₃ sont significativement actives. En effet, MB-F₂ induit une cardioinhibition doublée d'une hypotension alors que F₃ induit un effet inotrope positif et une hypertension. Ces différents résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle MAÏ-BAO contiendrait plusieurs substances bioactives. En effet, la cardioinhibition persistante induite par M-B est comparable à celle de F₂ qui reste plus intensifiée. Ceci montre que le fractionnement a permis d'isoler seulement les substances cardioinhibitrices dans MB-F₂.

Paradoxalement, l'hypotension induite par M-B est plus forte que celle de MB-F₂. Cela laisse supposer que l'extrait total (MAÏ-BAO) contiendrait des molécules qui renforceraient l'effet hypotensif de MB-F₂. Le fractionnement a donc débarrassé MB-F₂ de ces molécules. L'Atropine, antagoniste caractéristique de l'ACh sur les récepteurs muscariniques (NARGEOT, 1978; GIACHETTI et al, 1986; MICHELETTI et al, 1987)^(136, 67, 125), annule partiellement l'action de MB-F₂ aussi bien sur la pression artérielle que sur le myocarde. Cette inhibition étant partielle, cela suppose que MB-F₂ contiendrait en plus des substances cholinomimétiques, d'autres substances comme la MB-F₂ de *Mareya micrantha* (ABO et al, 1998)⁽²⁾. Pour ce qui concerne les substances cholinergiques, leur action cardioinhibitrice et hypotensive serait due à leur fixation sur les récepteurs muscariniques du cœur (HAMMER et al, 1986)⁽⁸⁴⁾. Par conséquent, l'entrée du Ca⁺⁺ dans la cellule est freinée. Car, l'ACh provoque une inhibition du courant calcico-sodique (GILES et NOBLE, 1976; IKEMOTO et GOTO, 1975)^(68, 97). L'antagonisme observé entre MB-F₂ et l'Atr laisse supposer que l'action de MB-F₂ sur le cœur passerait par les mêmes mécanismes que l'ACh.

L'effet cardioinhibiteur et vasodilatateur de MB-F₂ est annulé par l'excès de Ca⁺⁺ dans le milieu extracellulaire. Cela suppose qu'en présence de MB-F₂, il y a une réduction de l'entrée du Ca²⁺ dans les cellules cardiaques, entraînant ainsi une diminution de la force des contractions cardiaques. Cet effet cardioinhibiteur de MB-F₂ est partiellement antagonisé par l'atropine, par ailleurs MB-F₂ exerce aussi un effet inhibiteur sur l'influx calcique. De ce fait, les substances cardioinhibitrices non cholinergiques de MB-F₂ pourraient être des anticalciques. Ce qui corrobore l'effet hypotensif exercé par MB-F₂ sur la pression artérielle. Les antagonistes du calcium, en exerçant une inhibition spécifique sur le courant entrant calcique à travers les canaux calciques, réduisent ainsi l'entrée du Ca⁺⁺ dans la cellule. Ainsi, le milieu intracellulaire étant appauvri en Ca⁺⁺, il en résulte une cardiodépression et une vasodilatation dose-dépendante (WEISS, 1977; ROSENBERGER et TRIGGLE, 1978; KARAKI et WEISS, 1984)^(179, 153, 100). Cela est en accord aussi avec les travaux de CAUVIN et VAN BREEMEN, (1985)⁽³⁴⁾ qui ont montré que les inhibiteurs calciques induisent une relaxation dose-dépendante du muscle lisse. La fraction MB-F₂ réduit donc le phénomène excitation-contraction des muscles cardiaques et des muscles lisses des vaisseaux. Ce phénomène se fait à travers le courant calcium entrant lent (LABRID et al, 1979)⁽¹⁰⁵⁾. La fraction MB-F₂ inhibe alors l'entrée du calcium dans la cellule en réduisant la contractilité des muscles cardiaque et vasculaire. Selon WEISS (1977)⁽¹⁷⁹⁾, seuls les canaux calciques de la membrane cellulaire sont inhibés par les antagonistes du calcium, réduisant ainsi l'entrée du Ca⁺⁺ dans la cellule.

A l'instar de MAÏ-BAO, l'effet inotrope négatif induit par l'excès de sodium est renforcé par MB-F₂. L'augmentation du sodium extracellulaire entraîne moins d'entrée de calcium dans la cellule. Car, il existe sur la

membrane de la cellule cardiaque le canal calcico-sodique. Ces deux ions empruntant le même canal. Si la concentration extracellulaire du sodium augmente, il se manifeste une compétition entre le sodium et le calcium pour leur passage à travers la membrane cellulaire. Par ailleurs, l'apport du Ca^{++} extracellulaire relève la cardioinhibition de MB-F₂. A cet effet, MB-F₂ agirait en partie, en bloquant les canaux calciques, empêchant ainsi l'entrée du Ca^{++} dans la cellule.

Nos résultats montrent que la fraction MB-F₂ est partiellement un anticalcique et un cholinomimétique direct, agoniste de l'ACh sur les récepteurs muscariniques du cœur. Afin d'approfondir nos expérimentations sur le mécanisme biochimique de l'action cholinomimétique, nous allons tester MB-F₂ sur l'acétylcholinestérase (AChE). En effet, l'action de MB-F₂ sur le système cardiovasculaire, pourrait résulter de l'inhibition de l'AChE qui est l'enzyme spécifique de l'élimination de l'ACh dans l'espace synaptique (MASSOULIÉ et al, 1993)⁽¹²¹⁾. L'AChE étant une enzyme de régulation, l'étude de l'action de MB-F₂ sur elle, nous précisera l'action cholinomimétique directe ou non de MB-F₂.

En conclusion partielle, la fraction MB-F₂ exerce une cardioinhibition et une hypotension dose-dépendantes. Ces effets ont permis de comparer MB-F₂ aux substances cholinomimétiques grâce à l'action inhibitrice partielle de l'Atr aussi bien sur la cardioinhibition que sur l'hypotension induites par MB-F₂. la cardioinhibition induit par MB-F₂ est levée par l'excès de Ca^{++} , mais accentuée par l'excès de Na^+ en raison de la compétition Na^+ - Ca^{++} . Ces résultats nous ont amené à comparer MB-F₂ aux anticalciques dont le rôle principal est d'inhiber les canaux calciques. Par conséquent, MB-F₂ contiendrait à la fois des substances cholinomimétiques et anticalciques.

Quant à la fraction F₃ de MAÏ-BAO, elle induit un effet inotrope

positif dose-dépendant sur le cœur isolé de rat comparable à celui montré par **CORABOEUF et al (1953)⁽³⁹⁾**, **BRAUWALD et al (1961)⁽²⁸⁾** et **AKERA, (1977)⁽⁸⁾** sur glycosides cardiaques au niveau du tissu isolé du cœur. De cette comparaison, on peut dire que sur le système cardiovasculaire, MB-F₃ a les mêmes effets que les digitaliques dont la propriété pharmacologique essentielle est l'effet inotrope positif et chronotrope négatif (**CATTLE et GOLD, 1938; BRAUNWALD et al, 1961; YANKOPOULO et al, 1968)^(33, 28, 184)**. A cet effet, les glycosides cardiaques sont utilisés pour leur effet bénéfique sur l'insuffisance cardiaque (**BENTFELD et al, 1977; BUSSE et al, 1979; MORGAN et MORGAN, 1984)^(18, 30, 130)**. L'effet inotrope positif de MB-F₃ est comparable à celui de la Mansonine (**GUEDE, 1977; EHILE et al, 1991)^(77, 53)** et de *Parquetina nigrescens* (**DATTÉ et ZIEGLER, 2001)⁽⁴³⁾**. Alors MB-F₃ pourrait donc agir sur le cœur selon le mécanisme d'action des glycosides cardiaques, qui se fonde sur l'inhibition de l'ATPase Na⁺-K⁺ (**DZIMIRI et al, 1987)⁽⁵²⁾** qui est le récepteur des digitaliques **REPKE (1964)⁽¹⁵¹⁾**. Bien que l'inhibition de la pompe à sodium soit responsable de l'effet inotrope positif des digitaliques, elle implique les mouvements ioniques du sodium, du potassium et du calcium (**NOBLE, 1980)⁽¹⁴⁰⁾**. Le calcium en particulier joue un rôle primordial dans le couplage des phénomènes d'excitation-contraction-relaxation. Ces hypothèses nous ont amené à étudier l'action des solutions physiologiques de composition ionique modifiée sur l'effet de MB-F₃ au niveau de l'activité mécanique du cœur isolé de rat. Cette assertion corrobore le mécanisme d'action des digitaliques qui inhibent dans un premier temps l'ATPase Na⁺-K⁺ membranaire. Cela entraîne l'augmentation des ions Na⁺ dans la cellule. Dans un deuxième temps les digitaliques se fixent sur leur propre site qui est le canal d'échange Na⁺-Ca⁺⁺. Par conséquent, le fonctionnement du canal d'échange Na⁺-Ca⁺⁺ électrogénique (**GILLIS et OUEST, 1980)⁽⁶⁹⁾**

transmembranaire se met en place afin de faire rentrer une molécule de calcium contre la sortie de trois (3) molécules de sodium de la cellule. Il en résulte une surcharge calcique du réticulum sarcoplasmique (NAYLER, 1973; CARRIER et al, 1974) ^(137, 32) dont le rôle est de maintenir constante la concentration cytosolique du calcium. Cette surcharge déclenche une libération autocatalytique plus importante du calcium par le phénomène de "calcium induced calcium release" de FABIATO, (1983)⁽⁵⁶⁾. L'augmentation du taux calcique cytosolique entraîne une activation de l'appareil contractile du muscle cardiaque induite par MB-F₃ et les digitaliques. Ce même mécanisme dans les muscles lisses des vaisseaux pourrait expliquer l'élévation de la pression artérielle par MB-F₃. L'excès du sodium induit un effet inotrope négatif sur le cœur isolé de rat. Cependant, en présence de MB-F₃, cet effet est totalement levé en fonction de l'accroissement de l'influx calcique. Ceci préjuge de l'inhibition de l'entrée du sodium dans la cellule par MB-F₃ en ralentissant le courant entrant sodique.

Après le milieu hypersodique, nous avons étudié l'action de F₃ sur le cœur isolé en milieu hypocalcique. Les résultats ont permis de constater que MB-F₃ relève totalement l'effet inotrope négatif du milieu hypocalcique. De ces résultats, on pourrait dire que MB-F₃ augmente le taux de Ca⁺⁺ intracellulaire; soit par l'entrée massive du Ca⁺⁺ qu'il contiendrait; soit par la mobilisation du Ca⁺⁺ intracellulaire ou soit par les deux mécanismes à la fois. Ainsi, tout comme les digitaliques, MB-F₃ pourrait induire une inhibition de l'ATPase Na⁺-K⁺, ce qui aurait pour conséquence la libération du Ca⁺⁺ intracellulaire. Cette libération du calcium intracellulaire justifie le fait que les effets cardioinhibiteurs des milieux hypocalcique et hypersodique soient levés en présence de MB-F₃.

MB-F₃ exerce un effet inotrope positif et chronotrope négatif analogues à ceux des glycosides cardiaques. A l'instar de ces derniers, MB-F₃ pourrait se fixer sur l'ATPase Na⁺-K⁺ et bloquer le fonctionnement de la pompe à sodium. Par conséquent, MB-F₃ augmenterait le flux entrant calcique lent. Car des expériences de voltage-clamp ont montré qu'en présence des digitaliques, le courant entrant calcique est augmenté (SOROLO et al, 1974; FOZZARD et BEELER, 1975)^(163, 62). Ceci, à l'instar du mécanisme d'action de la Digitaline (WEINGART et al, 1978; MARBAN et TSIEN, 1979; NOBLE, 1980; MARBAN et TSIEN, 1982)^(178, 119, 140, 118), de la Mansonine (GUEDE, 1989; GUEDE et al, 1992)^(78, 79) et de la Ouabaïne (MICKAEL et al, 1978; BIEDERT et al, 1979; SEIFEN et al, 1979)^(126, 21, 161). Mais au niveau du myocarde, ce courant entrant calcique reste insuffisant pour déclencher la contraction (RASMUSSEN et al, 1985)⁽¹⁴⁸⁾. Donc, à ce courant calcique, il faut joindre le calcium intracellulaire par l'intermédiaire du phénomène de "calcium induced calcium release". Cela entraîne non seulement la libération du calcium fixé à la membrane du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol (CARRIER et al, 1974; LÜLLMANN et PETERS, 1978)^(32, 113); mais aussi la libération du calcium emmagasiné dans le réticulum sarcoplasmique (DHALLA et al, 1978; DHALLA et al, 1984 1989)^(48, 47). Par ailleurs, nous avons montré que MB-F₃ induit une hypertension dose-dépendante qui peut s'expliquer par son action tonicardiaque. Car, la pression artérielle dépend en partie de la composante cardiaque (force de contraction du cœur) et de la composante vasculaire suite à l'augmentation des résistances vasculaires périphériques (ALLAIN, 2000)⁽⁹⁾. La fraction MB-F₃ agirait donc directement sur les fibres vasculaires lisses artérielles et veineuses pour induire une vasoconstriction. Nous avons aussi montré que l'effet cardiotonique est plus prononcé avec la digoxine qu'avec la F₃ compte de l'état purifié de la

digoxine. Cependant, les deux effets cardiotoniques restent comparables. A partir de nos résultats, il convient donc d'étudier l'action de MB-F₃ sur l'ATPase Na⁺-K⁺ membranaire avec des techniques biochimiques afin de tirer des conclusions plus probantes qui pourraient préciser le mécanisme d'action de MB-F₃ à l'échelle cellulaire.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDES

BIOCHIMIQUES

A- ACTION DE MAÏ-BAO ET DE F₂ SUR L'ACTIVITÉ DE L'ACHÉ DU CŒUR DE RAT

Eu égard aux différents résultats physiologiques sur l'activité mécanique du cœur isolé de rat et sur la pression artérielle de lapin, des analyses et des hypothèses émises, nous avons jugé important de voir l'influence de MAÏ-BAO et de sa fraction F₂ sur l'activité catalytique de l'ACHé du cœur de rat.

1- Détermination du taux de AChE du cœur de rat

Les expériences menées nous montrent que l'extrait enzymatique total du cœur de rat contient $62,66 \pm 10,22\%$ de AChE contre $37,34 \pm 13,30\%$ de BuChE. Le taux de l'AChE dans l'extrait enzymatique est deux fois supérieur à celui de la BuChE dans le cœur de rat.

2- Détermination du temps de linéarité de l'ACHÉ

Le temps de linéarité permet de déterminer le temps nécessaire à l'incubation de l'enzyme. Par conséquent, selon la figure 47, l'activité catalytique varie de façon linéaire jusqu'à 20 min. Après ce temps, l'activité de l'enzyme croît de façon logarithmique.

3- Détermination du pH et de la température d'activité de l'enzyme

Les figures 48 et 49 présentent la variation de l'activité de l'enzyme en fonction du pH et de la température du milieu. Au fur et à mesure de l'augmentation du pH et de la température, l'activité catalytique de l'enzyme

augmente jusqu'à atteindre son activité maximale à pH 7,8 et à 38°C . C'est le pH et la température optimum d'activité.

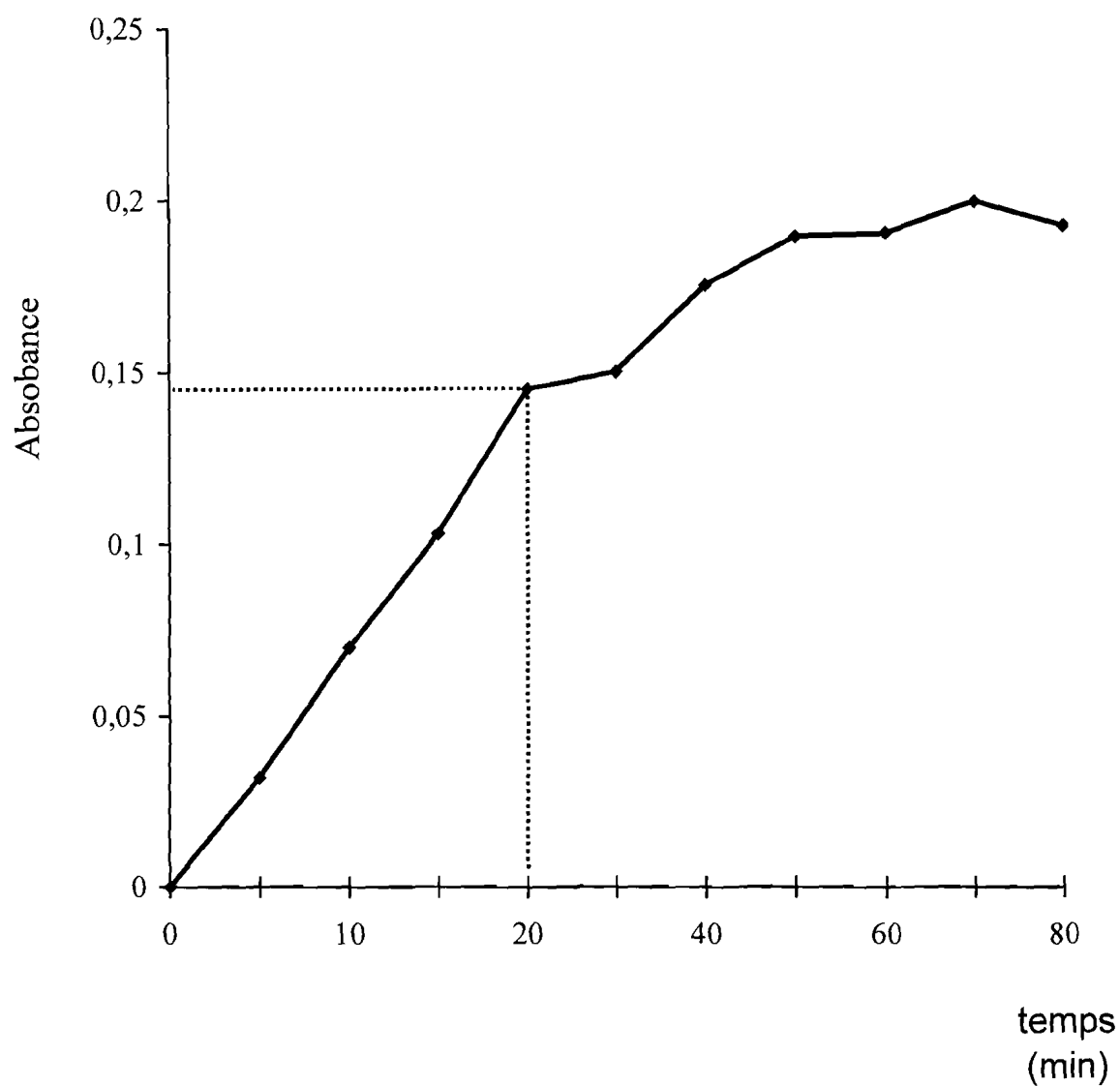


Fig 47: Détermination de la vitesse initiale de l'AChE

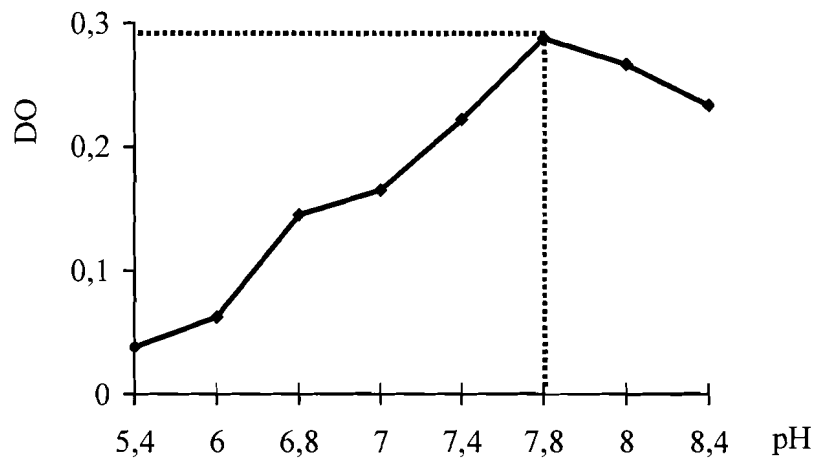


Fig 48: Détermination du pH optimum d'activité de l'AChE

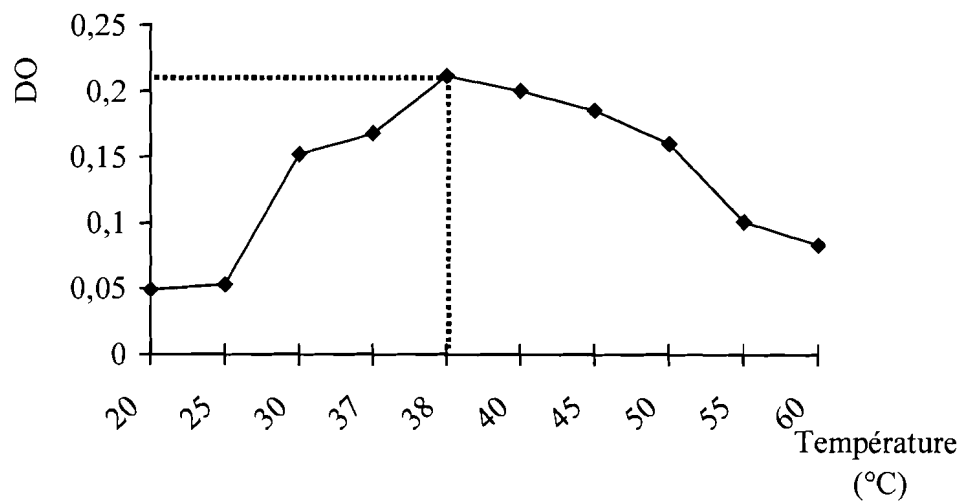


Fig 49: Détermination de la température optimale d'activité de l'AChE

4- Détermination de la concentration en protéine de l'extrait enzymatique

La figure 50 représente la courbe étalon des protéines. Nous avons déterminé la pente de la droite qui est 2,56. A partir de cette pente, nous avons pu déterminer la concentration de l'AChE présente dans le cœur de rat. En effet, l'extrait protéique du cœur de rat a une concentration de $2,99 \pm 0,92$ $\mu\text{g/ml}$.

5- Influence de M-B et de F₂ sur l'activité de l'AChE.

Selon la figure 51, MAÏ-BAO et F₂ exercent une action inhibitrice sur l'activité catalytique de l'AChE. En effet, au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de M-B et F₂ (de 10^{-2} mg/ml à 15 mg/ml), l'activité enzymatique diminue respectivement de 84,00% à 27,00% pour M-B et de 62,00% à 12,00% pour F₂. Nous allons utiliser les CI₅₀ de MAÏ-BAO et F₂ avec lesquelles nous avons réalisé les expériences physiologiques. C'est-à-dire 15 mg/ml pour M-B et 5 mg/ml pour F₂. Cela permettra de tirer des conclusions adéquates quant à l'action de ces produits sur l'enzyme.

6- Influence de la concentration en substrat sur l'activité de l'AChE.

La figure 52 montre la croissance de la vitesse de l'activité catalytique de l'AChE en fonction de l'augmentation de la concentration en acétylthiocholine. Cette catalyse conduit à la formation de l'acétate et de la thiocholine. Cependant, on note que la vitesse de catalyse croît jusqu'à $193,00 \pm 25,42$ $\mu\text{moles.min}^{-1}$ pour la concentration de substrat égale à 11,20 nM. Quant à la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 54), elle a permis de déterminer la V_m de l'AChE du cœur de rat, soit $0,40$ $\mu\text{moles.min}^{-1}$ et la K_m, soit 0,68 nM (Tabl VIII).

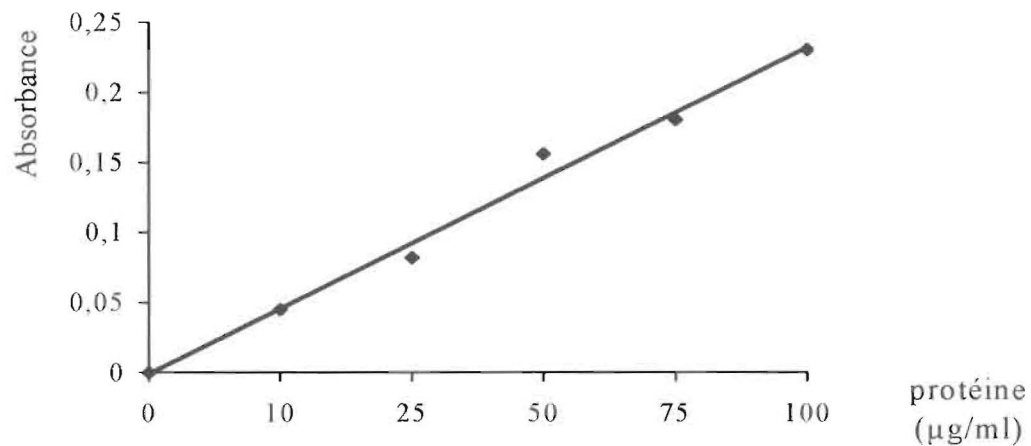


Fig 50: courbe étalon des protéines selon la méthode de Lowry

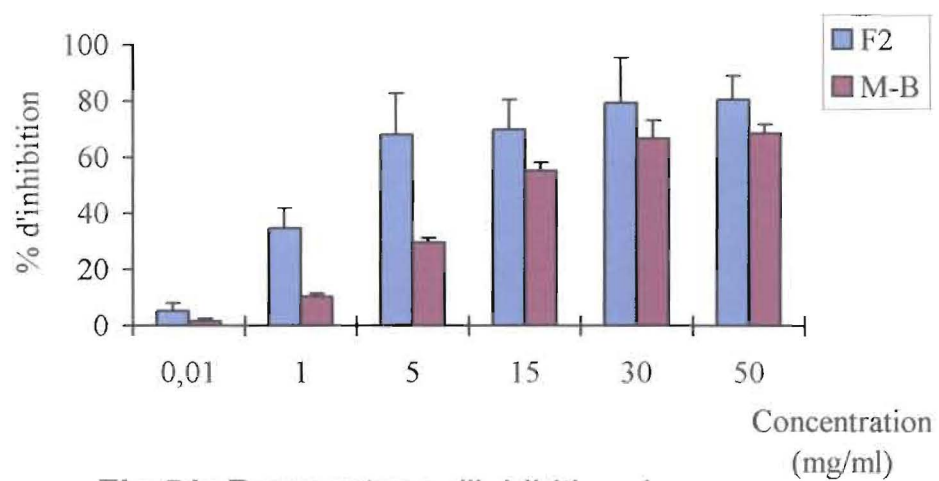


Fig 51: Pourcentage d'inhibition de l'ACHé en fonction des concentrations de M-B et F2

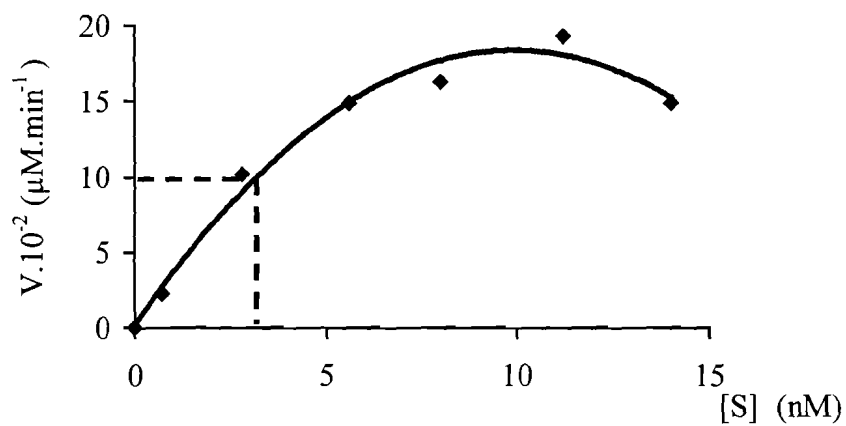


Fig 52: Influence du substrat (ASCh) sur l'activité de l'AChE

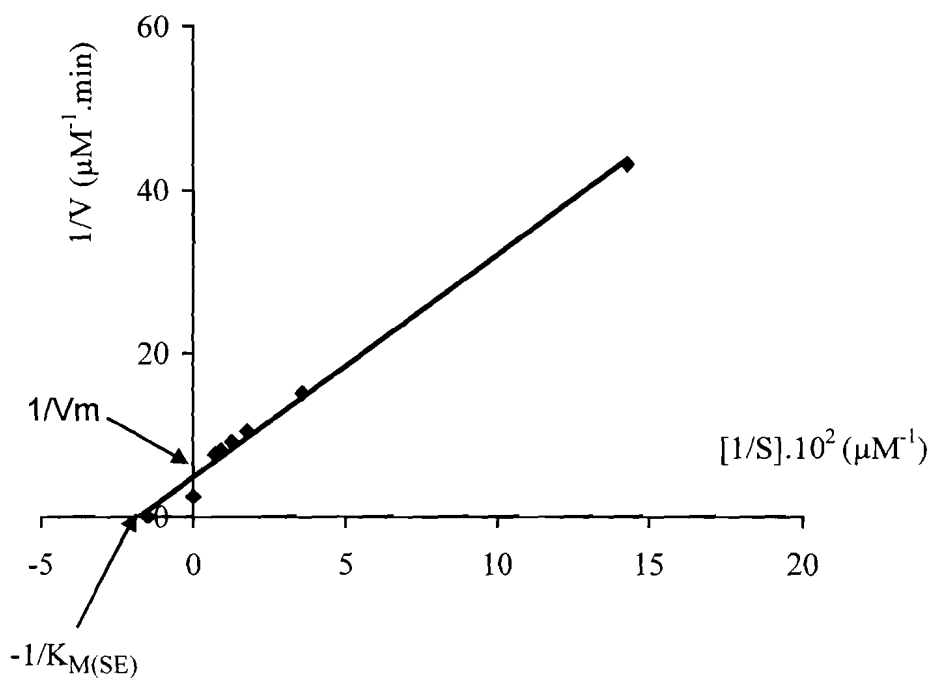


Fig 53: Détermination de K_m et de V_m de l'AChE

7- Influence de MAÏ-BAO (15 mg/ml), de F₂ (5 mg/ml) et de l'atropine (10⁻² mg/ml) sur l'activité de l'AChE.

a- Action de M-B (15 mg/ml) sur l'activité de l'AChE.

Selon la représentation de Mickaelis-Menten (Fig 54), on constate que la présence de M-B (15 mg/ml) diminue la vitesse de catalyse de l'enzyme. Donc, M-B exerce une action inhibitrice sur l'AChE. En effet, la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 55) permet de constater que M-B fait varier à la fois V_m de l'AChE de 0,40 à 0,16 μmoles.min⁻¹; soit une diminution de 60,00% et la K_m de 0,60 à 0,25 nM; soit une diminution de 58,33% (tabl VIII). M-B exerce donc sur l'AChE une inhibition non compétitive mixte.

b- Action de F₂ (5 mg/ml) sur l'activité de l'AChE.

La figure 56 qui est la représentation de Mickael-Menten, montre que F₂ inhibe aussi l'AChE en diminuant son activité catalytique. Selon la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 57), F₂ diminue la V_m de l'ACh de 0,40 à 0,12 μmoles.min⁻¹; soit 70,00% de diminution. La constante d'affinité de l'AChE a également diminuée de 0,60 à 0,37 nM; soit une diminution de 38,33% (tabl VIII). La fraction F₂ exerce une inhibition non compétitive mixte sur l'AChE.

En conclusion, l'AChE a une affinité plus grande pour F₂ que pour MAÏ-BAO avec une différence de 32,43%. Quant à la vitesse de catalyse de l'AChE, F₂ la diminue de 37,50% par rapport à M-B. Donc, F₂ inhibe plus l'activité de l'AChE que M-B.

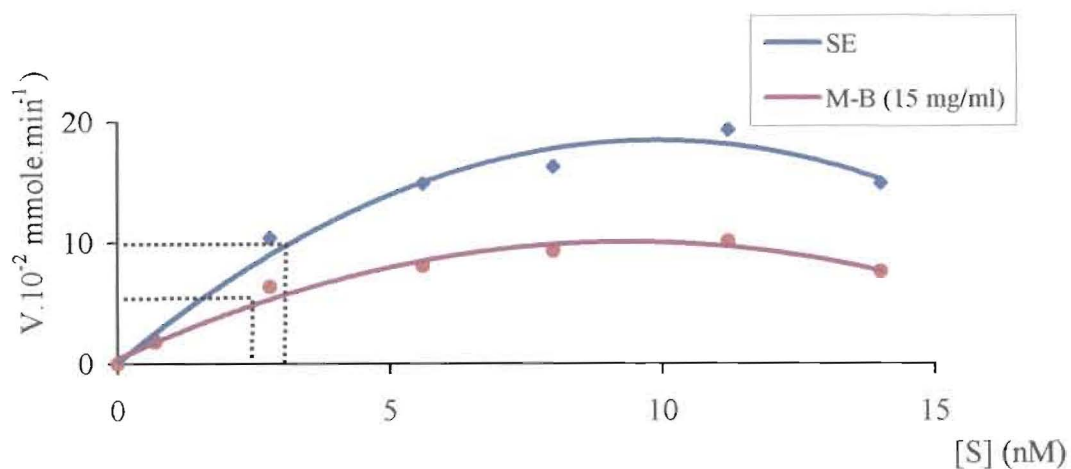


Fig 54: Influence de MAI-BAO (15 mg/ml) sur l'activité de l'AChE

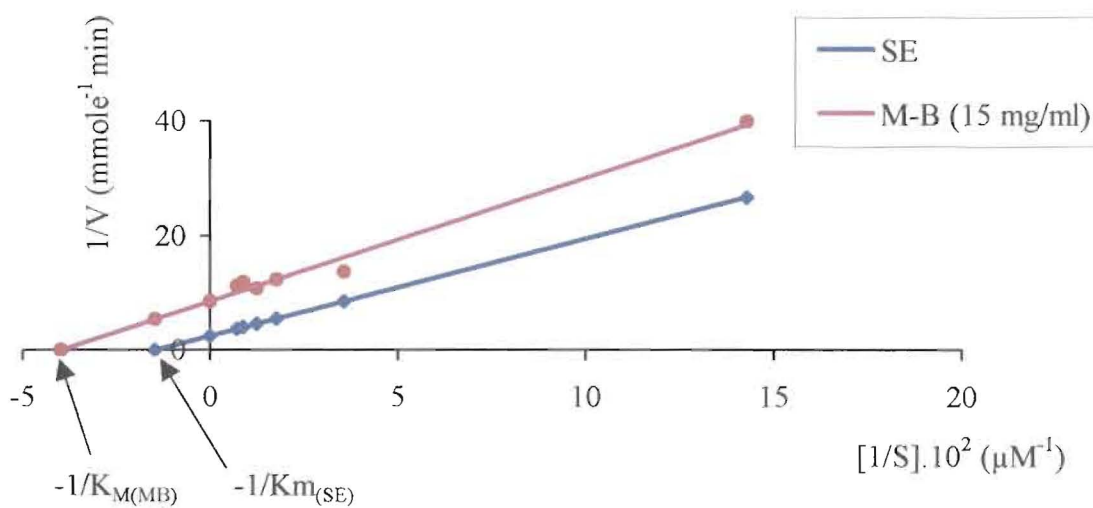


Fig 55: Détermination des V_m et K_m de l'AChE en présence de M-B (15 mg/ml)

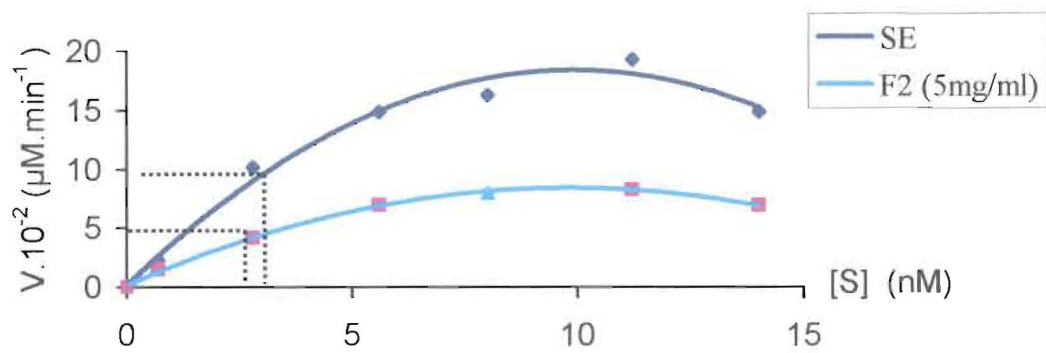


Fig 56: Influence de F_2 (5 mg/ml) sur l'activité de l'AChE

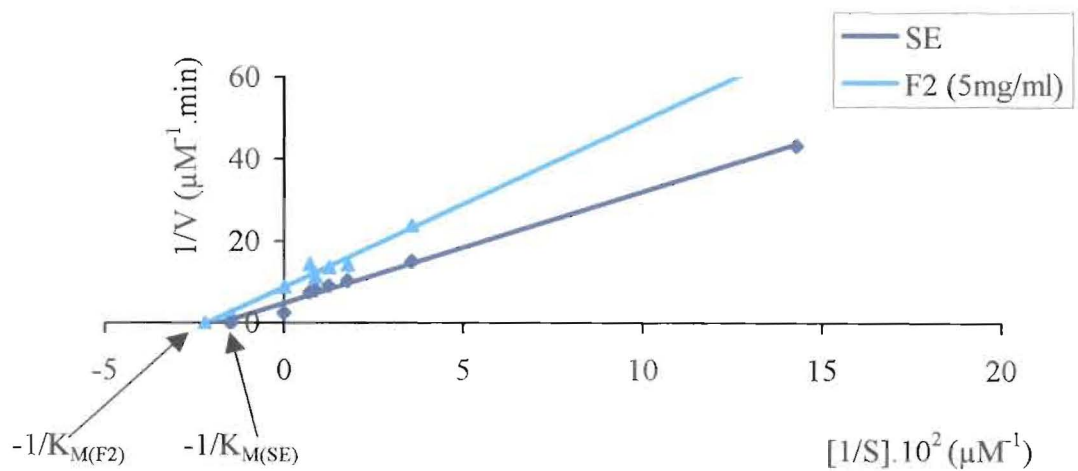


Fig 57: Détermination de K_{m} et de V_{m} de AChE en présence de F_2 (5 mg/ml)

c- Action de l'Atropine 10^{-2} mg/ml sur l'activité de l'AChE.

Selon la représentation de Mickaelis-Menten (Fig 58), l'Atr augmente l'activité catalytique de l'AChE. Donc l'Atr active l'AChE.

La quantification de cette activation enzymatique par l'Atr est montrée par la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 59). Ainsi, l'Atr augmente la vitesse de catalyse de l'AChE en faisant passer V_m de 0,40 à 0,56 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$ tout en maintenant la K_m intacte. Par conséquent, l'Atr exerce une activation sur l'AChE.

8- Influence de l'interaction M-B - Atr et F_2 - Atr sur l'activité de l'AChE.

a- Action de M-B (15 mg/ml) + Atr (10^{-2} mg/ml)

La figure 60 montre l'effet induit par le mélange MB - Atr selon la représentation de Mickaelis-Menten. Le mélange inhibe l'activité catalytique de l'AChE.

Selon la représentation de Lineweaver et burk (Fig 61), le mélange a diminué la V_m de l'AChE de 0,40 à 0,25 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$; soit une diminution de 37,50%. Quant au K_m , il passe de 0,25 à 0,27 nM. Soit une augmentation de 07,40%.(tabl VIII). Le mélange MAÏ-BAO-Atr exerce une inhibition incompétitive sur l'enzyme.

L'Atr lève partiellement l'inhibition induite par M-B sur l'AChE de 36%.

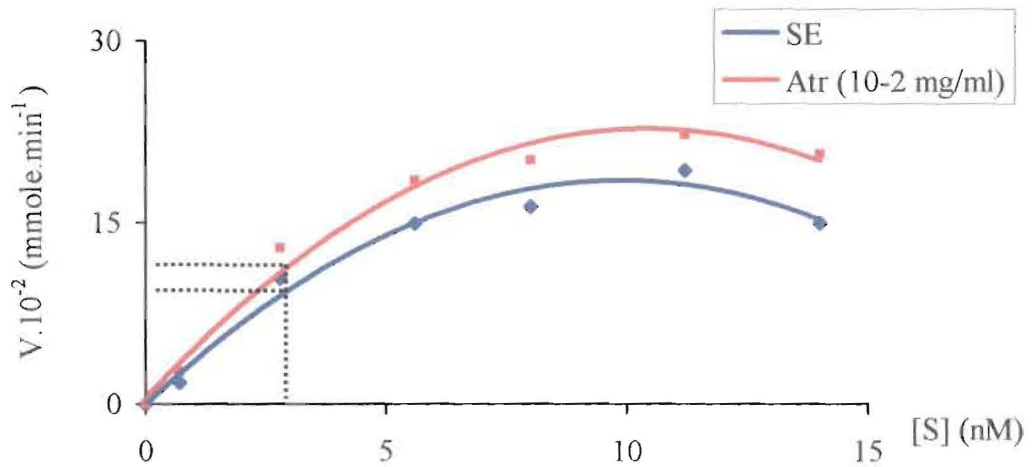


Fig 58: Influence de Atr (10⁻² mg/ml) sur l'AChE

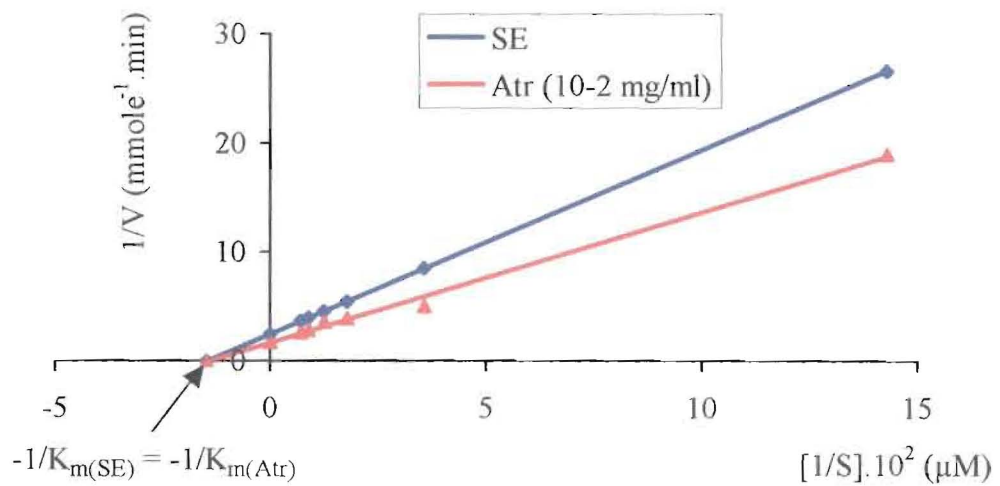


Fig 59: Détermination de V_m et de K_m de l'AChE en présence Atr (10⁻² mg/ml)

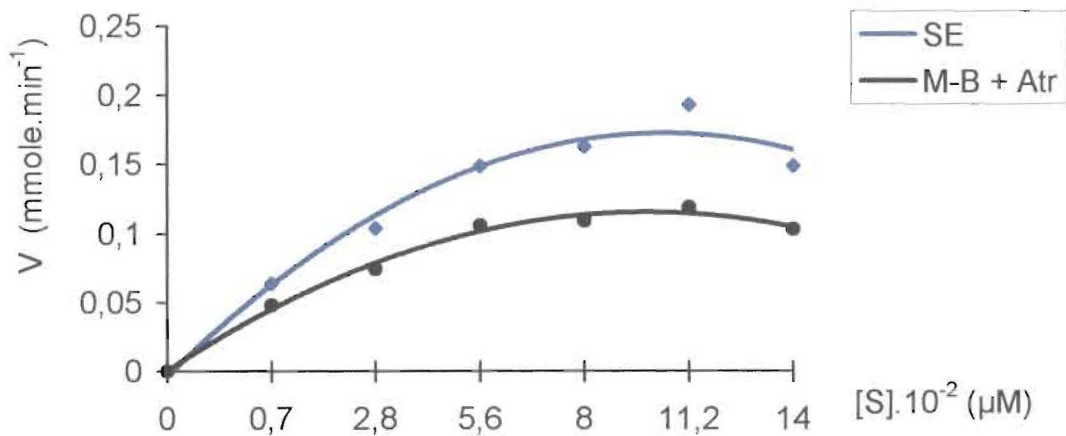


Fig 60: Influence du mélange M-B - Atr sur l'ACHé

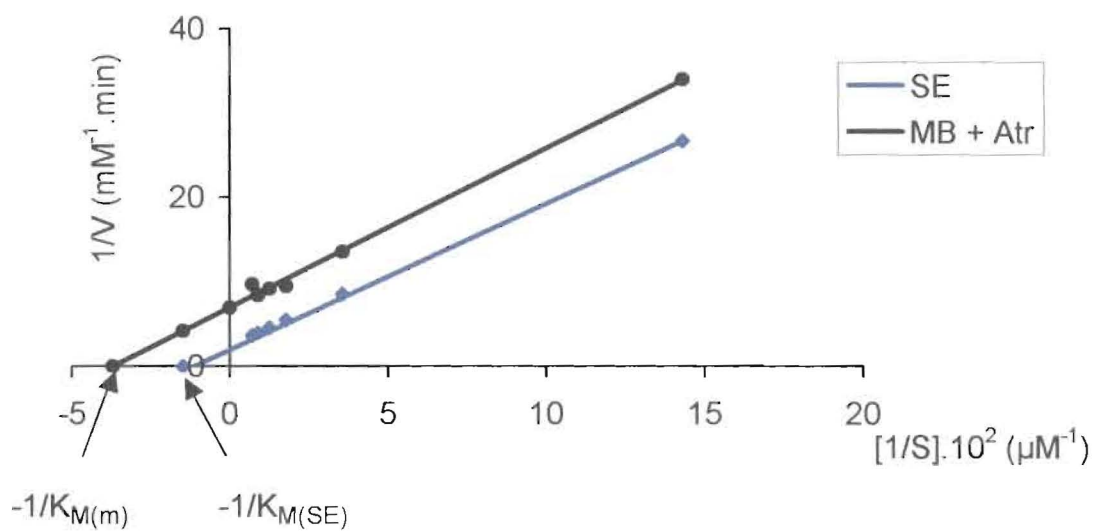


Fig 61: Détermination de V_m et de K_m de l'ACHé en présence du mélange M-B + Atr.

b- Action de F₂ (5 mg/ml) + Atr (10⁻² mg/ml)

La représentation de Mickaelis-Menten montre que le mélange F₂ (5 mg/ml) + Atr (10⁻² mg/ml) inhibe l'activité de l'enzyme (Fig 62). Par ailleurs, la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 63) permet de voir qu'en présence d'Atr, la Vm de l'AChE a diminué de 0,12 à 0,19 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$; soit une diminution de 52,50%. La Km est passée de 0,37 à 0,40 nM, Soit une augmentation de 07,50% (tabl VIII).

En conclusion, on peut dire que l'Atr lève en partie l'inhibition exercée par F₂ sur l'AChE de 36,84%.

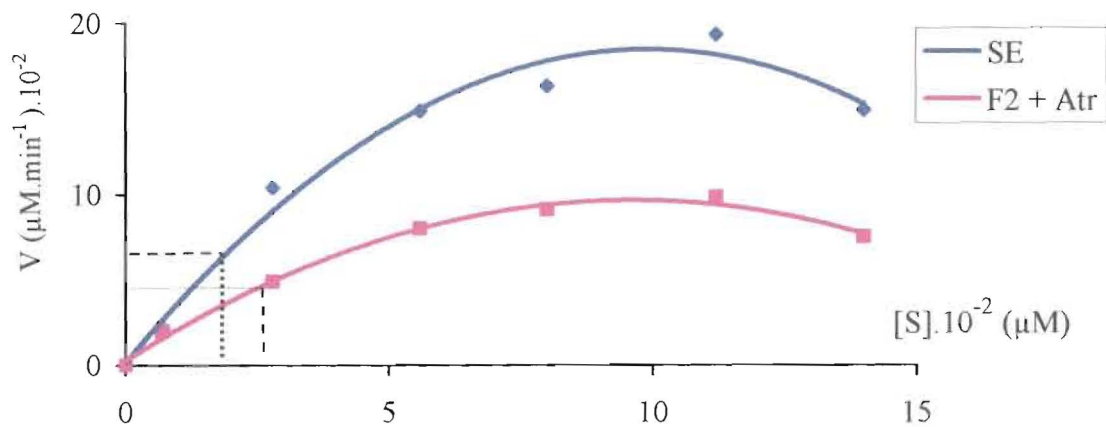


Fig 62: influence du mélange F₂ (5 mg/ml)-Atr (10⁻² mg/ml) sur l'activité l'AChE selon la représentation de Michaelis-Menten

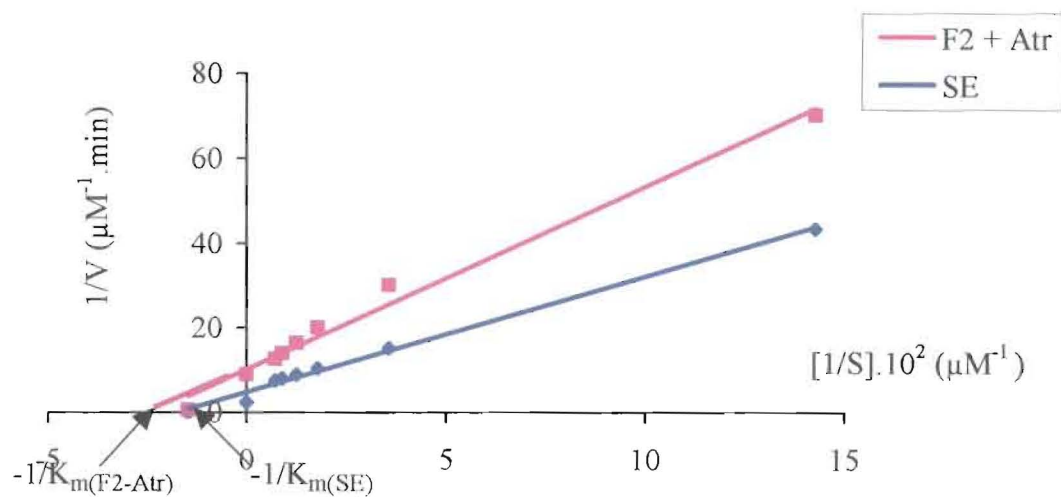


Fig 63: Détermination des V_m et K_m de l'AChE en présence du mélange F₂ + Atr

Tableau VIII : récapitulation des Vm et des Km de l'AChE en présence des différents produits pharmacologiques utilisés.

Produits Paramètres	SE	Atr (10⁻² mg/ml)	MAĪ-BAO (15 mg/ml)	M-B + Atr	F₂ (5 mg/ml)	F₂ + Atr
Vm ($\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,40	0,56	0,16	0,25	0,12	0,19
Km (nM)	0,60	0,60	0,25	0,27	0,37	0,40
% de variation de Vm		+40	-60	-37,50	-70	-52,50
% de variation de Km		0	-58,33	-60,29	-38,33	-33,33

9- Discussion et conclusion

Les différentes expériences menées dans le but de distinguer l'activité catalytique de l'acétylcholinestérase, ont permis de constater que le cœur de rat contient $62,66 \pm 10,22\%$ d'AChE et $37,34 \pm 13,30\%$ de BuChE. Les résultats corroborent ceux de **N'GUESSAN (2001)⁽¹³⁸⁾** qui a montré que le cœur de rat contient 63% d'AChE et 37% de BuChE.

De cette étude, il ressort l'existence de deux types de cholinestérases dans le cœur de rat : l'AChE et la BuChE (**NYQUIST-BATTIE, 1990)⁽¹⁴¹⁾**. Ces deux cholinestérases existent dans les tissus de vertébrés supérieurs (**MASSOULIÉ et al, 1993)⁽¹²¹⁾**, dans le cœur humain (**CHEMNITIUS et al, 1999)⁽³⁵⁾**, dans le cœur de chien (**DARVESH et al, 1990)⁽⁴²⁾**, dans le muscle de certains poissons (**LEIBEL, 1988a,b; STEIGER et al, 1989)^(109, 110, 166)** ainsi que dans tous les muscles des mammifères où prédomine l'AChE sur la BuChE (**VIGNY et al, 1978; LYLES et al, 1982)^(174, 114)**. Chacune de ces enzymes a son substrat spécifique qui est la butyrylcholine pour la BuChE et l'acétylcholine pour l'AChE (**MOORE et HESS, 1975)⁽¹²⁹⁾**. Cela a permis la séparation des deux enzymes en vue de l'utilisation de l'AChE seule pour nos expérimentations par inhibition totale de l'action de la BuChE avec l'éthopropazine. Par conséquent, seule l'AChE s'exprime dans les conditions physico-chimiques qui lui sont propres. Nos résultats montrent que l'AChE exerce son action maximale à 38°C et à pH 7,8 comme l'ont montrée **BAHI (1998)⁽¹⁴⁾** et **TREBISSOU (2001)⁽¹⁷⁰⁾**.

Dans les conditions sus-citées et selon la représentation de Mickaelis-Menten, l'AChE est inhibée par son substrat, MAÏ-BAO et la fraction F₂ de M-B. L'excès de substrat exerce une inhibition sur l'AChE. Selon **FROEDE et al, (1986)⁽⁶⁵⁾**, l'explication de cette inhibition découlerait de la liaison

d'une seconde molécule de substrat au complexe enzyme-substrat (E-S) formant ainsi, un complexe ternaire inactif. L'inhibition de l'AChE par son substrat pourrait avoir l'explication subséquente. Par ailleurs, **WILSON et BERGMAN (1950)⁽¹⁸²⁾**, ont montré que l'acétylenzyme pourrait être inhibée par son substrat. La choline libérée se fixerait sur le complexe E-S formant ainsi un complexe binaire dont l'hydrolyse par l'enzyme se fait lentement rendant l'AChE inactive. L'AChE est inhibée par MAÏ-BAO et F₂. Cet effet inhibiteur exercé par M-B et F₂ sur l'AChE qui corrobore l'action cardioinhibitrice de ces deux produits (M-B et F₂), est similaire à l'action obtenue par **N'GUESSAN (2001)⁽¹³⁸⁾** sur BGG, F₅, par **YAMAMOTO et al (1996)⁽¹⁸³⁾** et par **NAKAHARA et al, (1998)⁽¹³⁴⁾** sur la néostigmine, l'édrophonium et l'ambenonium au niveau du cœur isolé et de l'AChE. En effet, ces auteurs ont montré que l'action bradycardisante de la néostigmine, de l'édrophonium et de l'ambenonium serait due à l'inhibition de l'AChE par ces produits. Ce qui par conséquent, augmenterait le taux de l'ACh dans la jonction neuromusculaire.

Au vu de l'inhibition de l'AChE induite par les organophosphates (**BARTELS et NACHMANSOHN, 1969; ASHANI et al, 1972)^(16, 12)** et les carbonates (**HERTNARSKI et O'BRIEN, 1975)⁽⁹⁰⁾**, on pourrait penser que M-B et F₂ contiendraient des organophosphates et des carbonates.

L'inhibition induite par F₂ est plus forte que celle de M-B avec une affinité plus élevée de F₂ pour l'AChE. La F₂ étant issue du fractionnement de M-B, son action sur l'AChE a été plus renforcée. Ce qui a permis à F₂ d'inhiber plus l'activité de l'enzyme par rapport à M-B, en augmentant le taux d'ACh dans la jonction neuromusculaire. Par conséquent, la cardioinhibition induite par F₂ est plus accentuée que celle de MAÏ-BAO.

La représentation de Lineweaver et Burk a montré que F₂ et M-B exercent une inhibition incompétitive sur l'AChE. Ainsi, selon

l'interprétation moléculaire de cette inhibition, F₂ et M-B se fixent sur le complexe E-S afin d'induire l'inhibition.

A l'issue des expériences, on a constaté que l'Atr augmente la vitesse catalytique de l'AChE du cœur. Il résulte de cette expérience que l'Atr active l'AChE comme l'ont montré TOMLINSON et al, 1982⁽¹⁶⁹⁾ sur certains cations tels que Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ et Mn⁺⁺. En effet, l'antagonisme créé par l'Atr sur l'ACh au niveau des récepteurs muscariniques du cœur, résulte de l'activation de l'AChE par l'Atr. Dans cet état conformationnel, l'AChE hydrolyse rapidement l'ACh et annule son action cardiovasculaire. Cette hypothèse expliquerait aussi l'action antagoniste partielle exercée par l'Atr sur M-B et F₂, en relevant en partie leur effets cardioinhibiteur et hypotensif.

Dans le cœur de rat, il existe plus d'AChE que de BuChE. MAÏ-BAO et F₂ exercent une inhibition incompétitive sur l'AChE. Toutefois, l'action inhibitrice de F₂ est plus forte que celle de M-B. Le fractionnement a donc permis d'améliorer l'action inhibitrice de MAÏ-BAO.

Quant à l'Atr, elle active l'AChE. Elle exerce donc une action opposée à celle de M-B et F₂ sur l'AChE. Cela justifierait d'une part les effets antagonistes de l'Atr et MAÏ-BAO et d'autre part, les effets antagonistes de l'Atr et F₂ sur le système cardiovasculaire.

B- ACTION DE MAÏ-BAO ET DE MB-F₃ SUR L'ATPase Na⁺-K⁺ DU CŒUR DE RAT

Les différentes expériences sur le système cardiovasculaire ont permis de voir que :

- a- MAÏ-BAO exerce un effet inotrope positif fugace.
- b- la MB-F₃ de M-B induit un effet inotrope positif, chronotrope négatif et une hypertension comparables aux effets cardiovasculaires des digitaliques tel que la digoxine.

Eu égard à ces résultats et dans le but de déterminer le mécanisme d'action biochimique de M-B et de MB-F₃, il nous a semblé opportun de voir l'action de ces deux produits sus-indiqués sur l'ATPase Na⁺-K⁺.

1- Détermination du taux de protéine dans le cœur de rat

La figure 50 représente la courbe étalon des protéines. Nous avons alors pu déterminer la pente de la droite qui est 2,56. A partir de cette pente, nous avons calculé la concentration de l'ATPase Na⁺-K⁺ présente dans le cœur de rat. En effet, la concentration de l'extrait protéique du cœur de rat est en moyenne $1,56 \pm 0,38$ µg/ml. Cependant, il convient de noter que la suspension microsomale a une concentration de 5 mg/ml. On en déduit que la concentration réelle de l'extrait protéique (ATPase Na⁺-K⁺) dans le cœur de rat est $0,312 \pm 0,076$ µg/mg de microsome.

2- Étude de l'activité de l'ATPase en fonction du temps

La figure 64 montre que l'activité catalytique de l'ATPase sur l'ATP croît pendant 20 min. Au delà de ce temps, l'activité catalytique de l'enzyme décroît. Cependant, dans l'intervalle de 0 à 15 min, la courbe de DO est une

fonction linéaire du temps. Par conséquent, nous avons retenu 15 min comme le temps nécessaire à l'activité maximale de l'enzyme dans le cadre de nos expériences.

3- Détermination de l'activité spécifique de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ du cœur de rat

Au bout de 15 min (temps d'incubation de l'enzyme), 0,312 $\mu\text{g/ml}$ de protéine libère 1,8 μg de phosphore inorganique (Pi) (Fig 65); soit 0,0581 μmole . Alors, l'activité (A) de la protéine est :

$$A = \frac{\text{Pi libéré } (\mu\text{mole})}{t \text{ (min)}} = \frac{0,0581}{15} = 387.10^{-5} \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1}$$

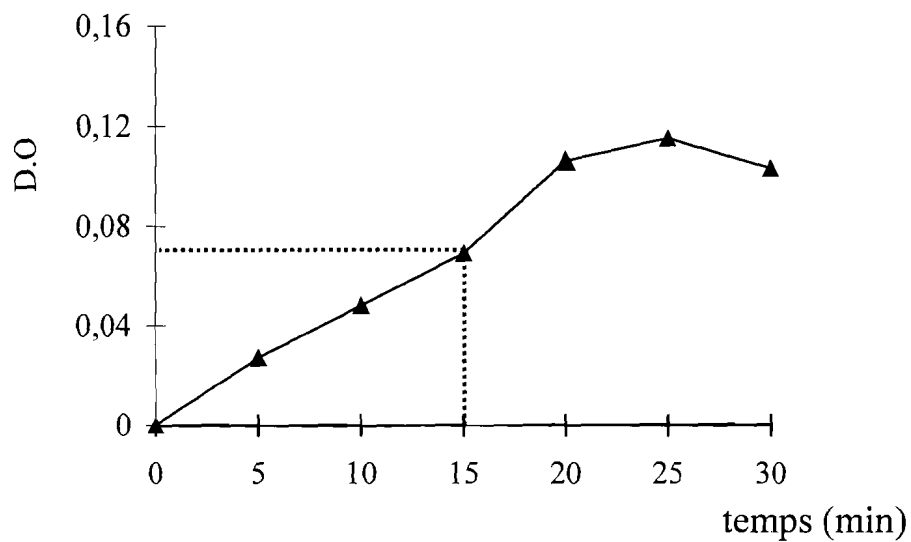


Fig 64: Détermination de la Vitesse initiale de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ du cœur de rat

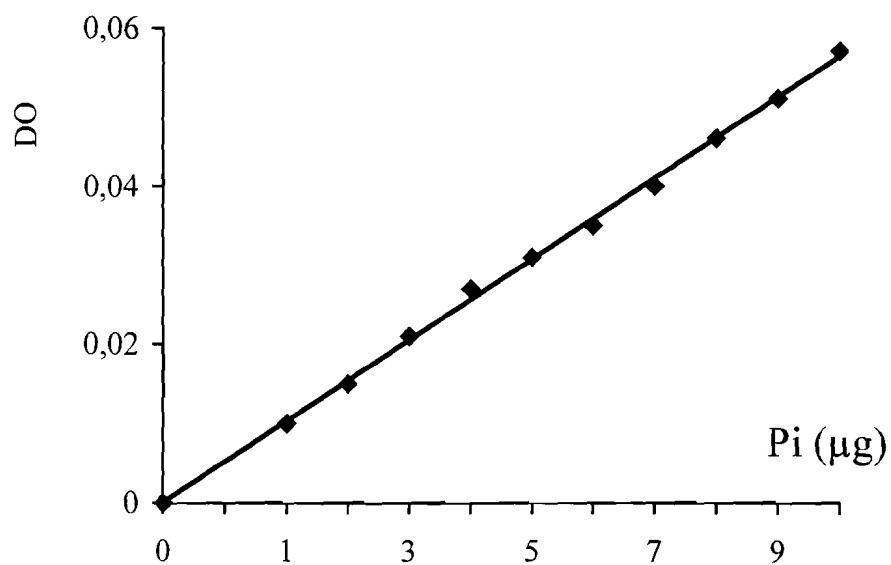


Fig 65: Courbe d'étalonnage de H_2KPO_4 par la méthode de Sumner

4- Détermination de la température maximale d'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺

Selon la figure 66 qui est une courbe en cloche, l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ augmente avec la température jusqu'à 37°C. Au delà de cette température, l'activité décroît. Par conséquent, la température de 37°C est la température optimale d'activité de la pompe à sodium.

5- Détermination du pH optimum d'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺

La courbe en cloche (Fig 67) montre que l'activité de l'enzyme croît avec le pH du milieu jusqu'à 7,4 au delà duquel, l'activité chute. Par conséquent, le pH optimum d'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ est 7,4.

6- Influence de la concentration en substrat sur l'ATPase Na⁺-K⁺

L'influence de la concentration en substrat (ATP Na₂) sur l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ est indiquée par la figure 68. Selon cette figure qui est la représentation de Mickaelis-Menten, l'activité catalytique de l'enzyme croît avec l'augmentation de la concentration du substrat. L'enzyme hydrolyse donc l'ATP en ADP + Pi. Le taux de Pi libéré augmente jusqu'à se stabiliser à partir de la concentration 6mM d'ATP. Les concentrations élevées du substrat inhibent l'activité de l'enzyme.

Selon la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 69) obtenue à partir des données précédentes, les valeurs de V_m et K_m de l'ATPase Na⁺-K⁺ en absence d'effecteur sont respectivement 0,321 μmoles.min⁻¹ et 3,540 μM (Tabl IX).

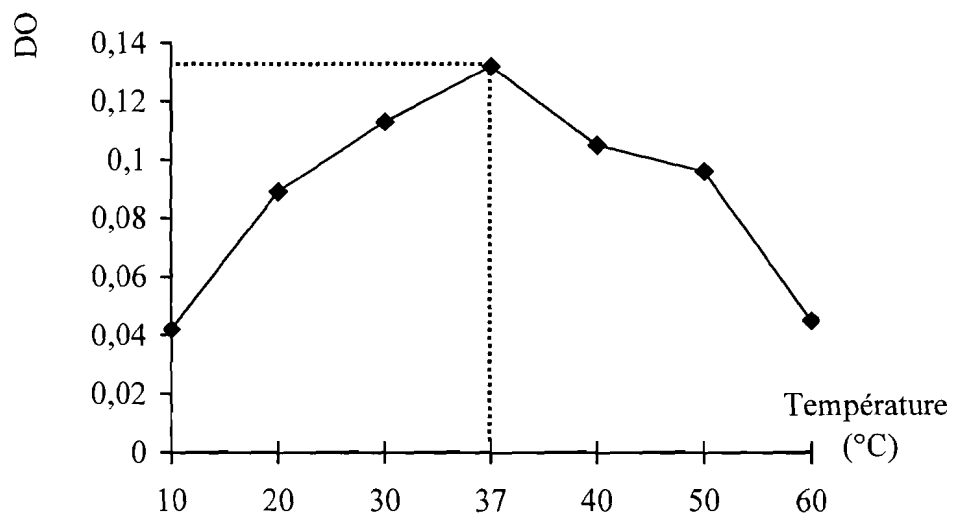


Fig 66: Détermination de la température d'activité de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

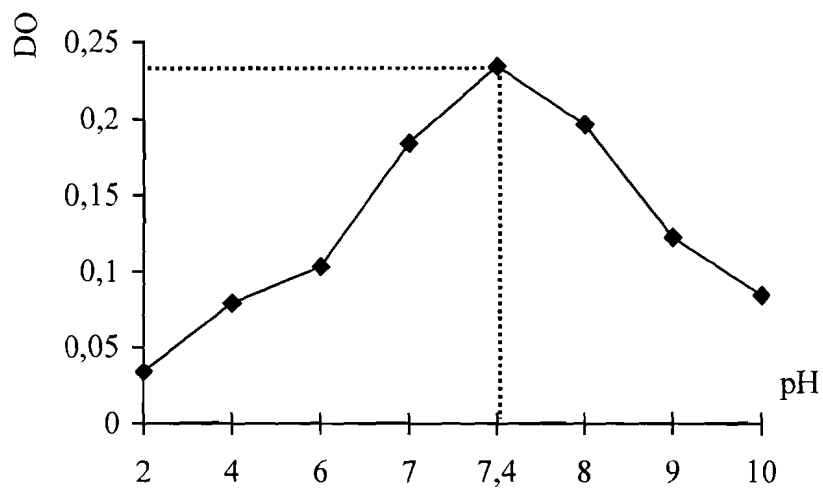


Fig 67: Détermination du pH optimum d'activité de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

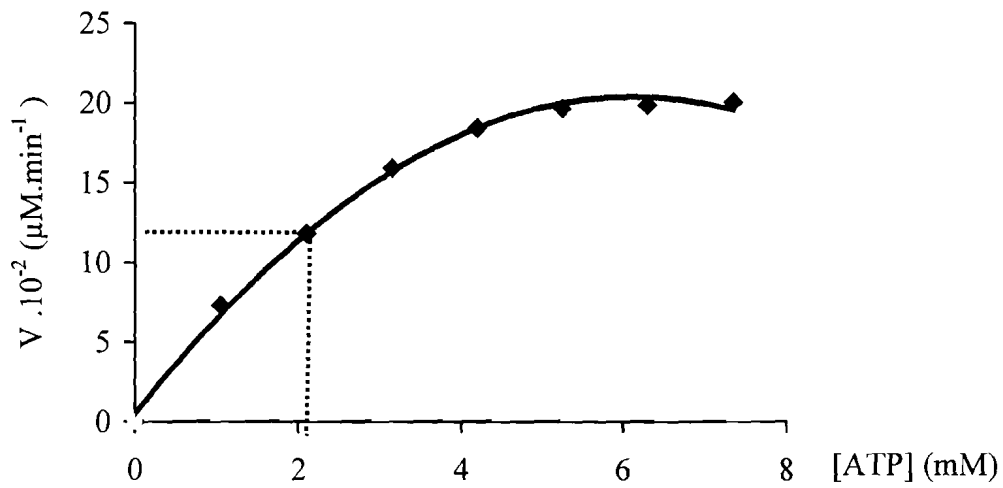


Fig 68: Influence de la concentration en substrat sur l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

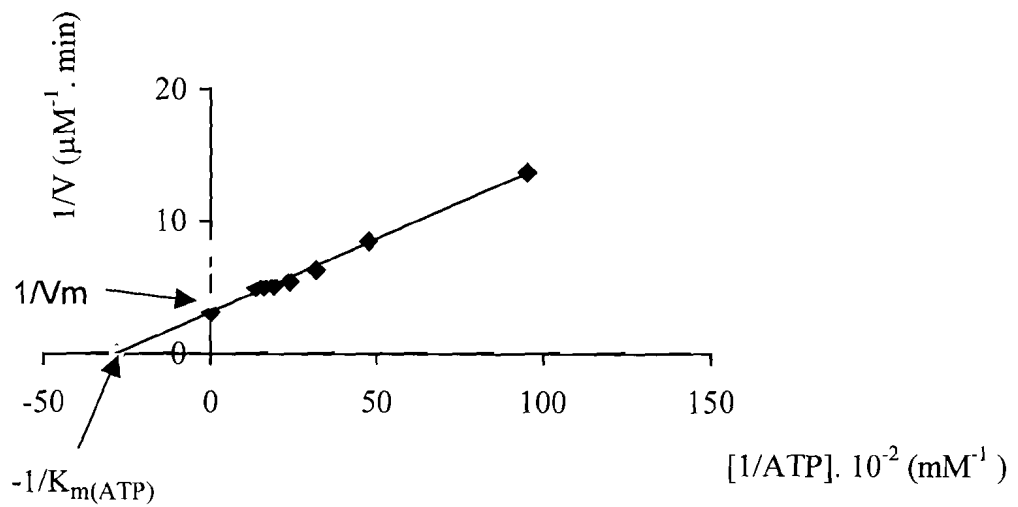


Fig 69: Détermination de V_m et K_m de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

7- Influence de M-B (15 mg/ml) et de MB-F₃ (1 mg/ml) sur l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺

a. Action de M-B (15 mg/ml) sur l'ATPase Na⁺-K⁺

La figure 70 indique la diminution de la vitesse de catalyse de l'ATP par l'ATPase Na⁺-K⁺ en présence de M-B. Cette représentation nous permet de voir que M-B inhibe l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺. Quant à la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 71), elle nous montre que la droite de M-B et celle de l'ATPase sans effecteur se coupent au dessus de l'axe des abscisses. L'inhibition exercée par M-B sur l'enzyme donne une V_m égale à 0,274 μM.min⁻¹ et une K_m égale à 3,320 mM.

En conclusion, M-B (15 mg/ml) exerce une inhibition non compétitive mixte de 14,64% sur l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺ (Tabl IX).

b. Action de MB-F₃ (1 mg/ml) sur l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺

La représentation de Mickaelis-Menten montre que MB-F₃ exerce une inhibition sur la vitesse de catalytique de l'enzyme (Fig 72).

Selon la représentation de Lineweaver et Burk (Fig 73) sur les données précédentes, la droite de MB-F₃ et celle de l'ATPase sans effecteur se coupent aussi au dessus de l'axe des abscisses. A la concentration de 1 mg/ml, MB-F₃ fait passer la V_m de de catalyse de l'enzyme de 0,321 à 0,248 μM.min⁻¹ et la K_m de 3,54 à 3,24 mM.

En conclusion, MB-F₃ (1 mg/ml) exerce une inhibition non compétitive mixte de 22,74% sur l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺ (Tabl IX).

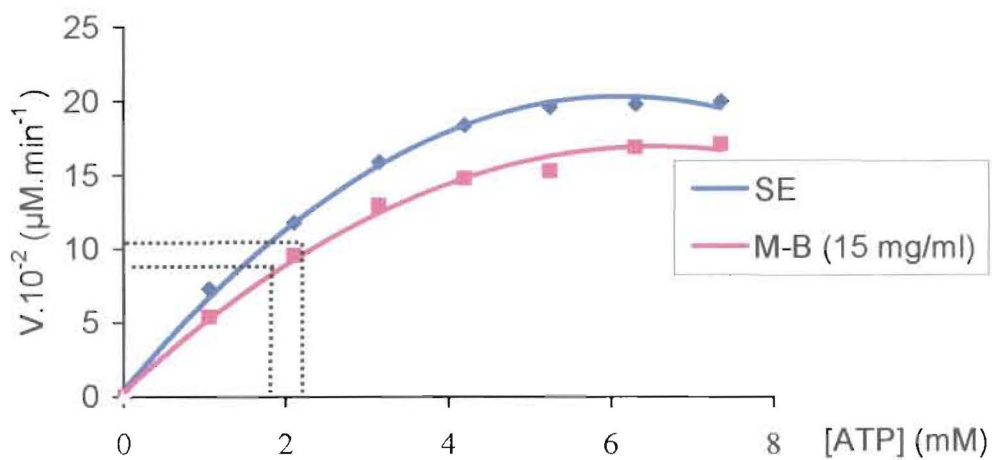


Fig 70: Influence de MAI-BAO (15 mg/ml) sur l'ATPase Na^+ - K^+ du cœur de rat

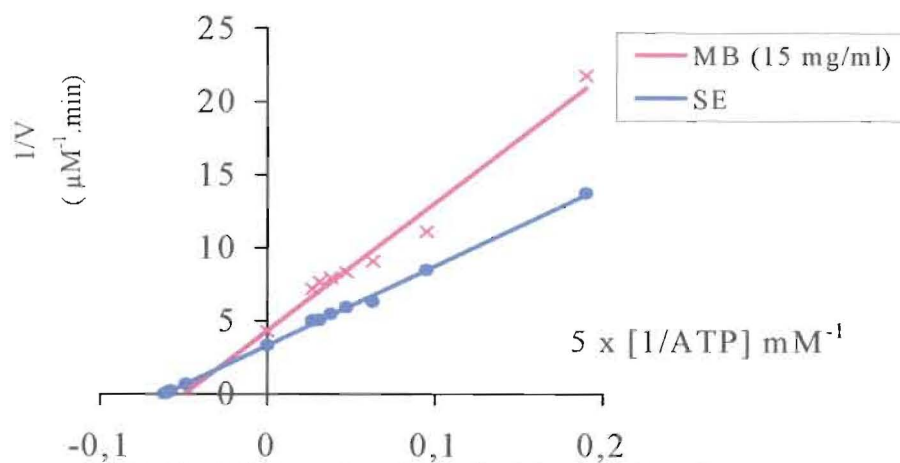


Fig 71: Détermination de K_m et V_m de l'ATPase Na^+ - K^+ en présence de M-B (15 mg/ml)

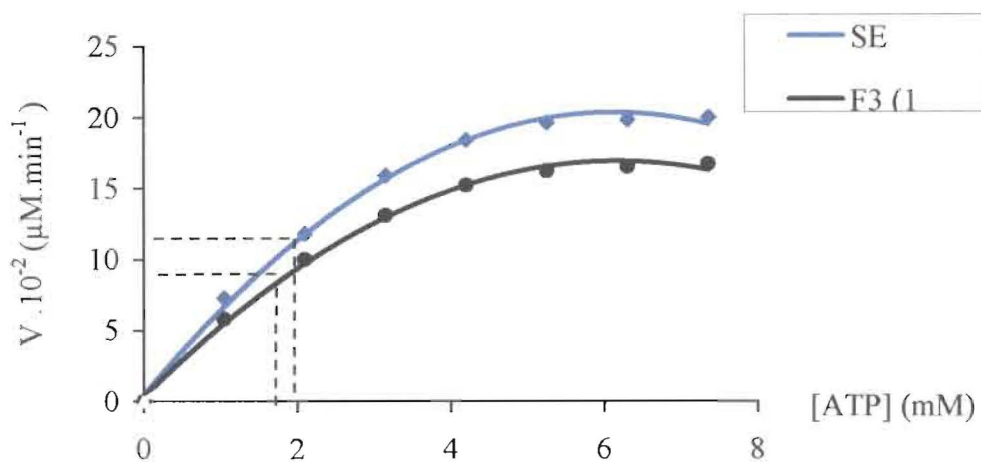


Fig 72: Influence de F_3 (1 mg/ml) sur l'ATPase Na^+-K^+ selon la représentation de Michaelis-Menten.

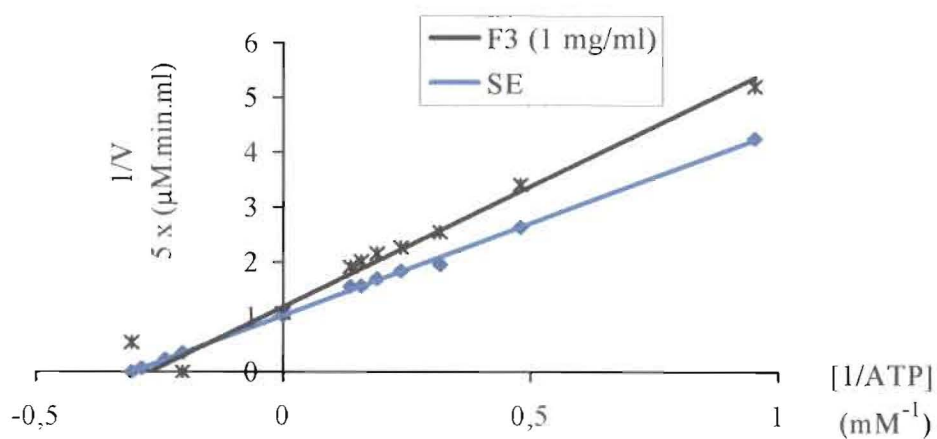


Fig 73: Détermination de V_m et de K_m de l'ATPase Na^+-K^+ en présence de F_3 (1 mg/ml)

8- Comparaison de l'influence de M-B et Dx à 15 mg/ml et de MB-F₃ et Dx à 1 mg/ml sur l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur de rat

a. Comparaison de l'action de M-B (15 mg/ml) et Dx (15 mg/ml) sur l'ATPase Na⁺-K⁺

La figure 74 présente l'influence de M-B et de Dx à la même concentration sur l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur de rat. On remarque que les deux produits (M-B et Dx) inhibent l'activité de l'enzyme. Cependant, l'inhibition induite par Dx est plus élevée que celle induite par M-B.

La représentation de Lineweaver et Burk (Fig 75) des différentes données nous amène à voir que Dx exerce une inhibition non compétitive sur l'ATPase Na⁺-K⁺, car à 15 mg/ml, Dx fait passer la V_m de l'enzyme de 0,321 μM.min⁻¹ à 0,114 μM.min⁻¹ tandis que la K_m ne varie pas; Soit une inhibition de 64,48%. Alors que les résultats précédents nous ont montré qu'à 15 mg/ml, M-B exerce une inhibition de 14,64% sur l'ATPase Na⁺-K⁺ (Tabl IX).

En conclusion, on peut dire qu'à la même concentration, la digoxine inhibe plus l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺ que M-B.

b. Comparaison de l'influence de MB-F₃ (1 mg/ml) et Dx (1 mg/ml) sur l'activité de l'ATPase Na⁺-K⁺.

Selon la figure 76, MB-F₃ (1 mg/ml) et Dx (1 mg/ml) diminuent l'activité catalytique de l'ATPase Na⁺-K⁺. Cependant, l'inhibition induite par Dx est plus forte que celle de MB-F₃ à la même concentration. Les mêmes données en représentation de Lineweaver et Burk (Fig 77), montrent que l'inhibition

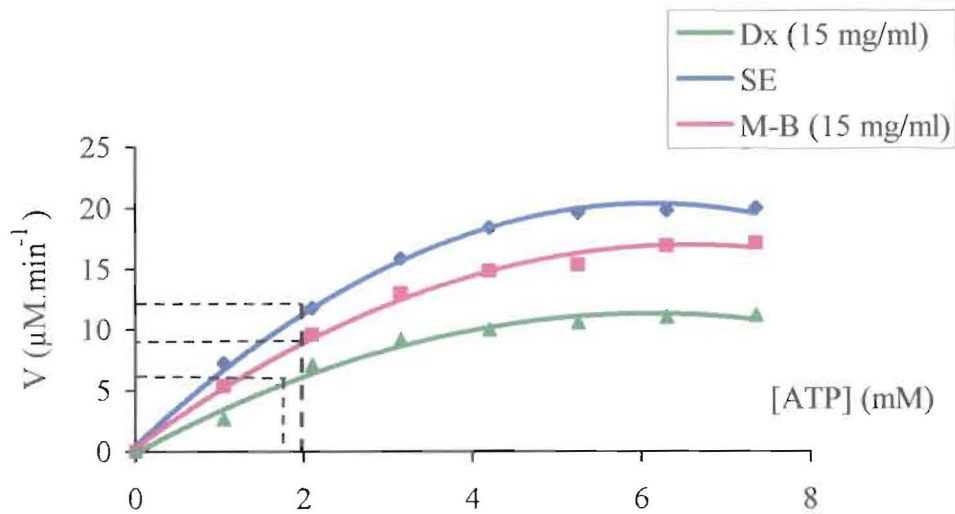


Fig 74: Comparaison de l'action de M-B et de Dx à (15 mg/ml) sur l'ATPase Na^+-K^+

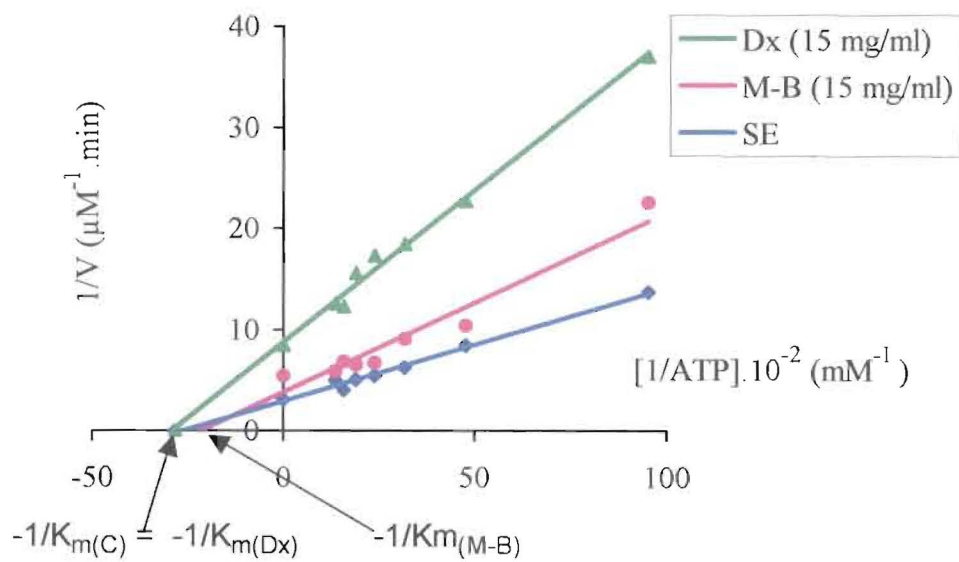


Fig 75: Détermination de V_m et K_m de l'ATPase Na^+-K^+ en présence de M-B et Dx à 15 mg/ml

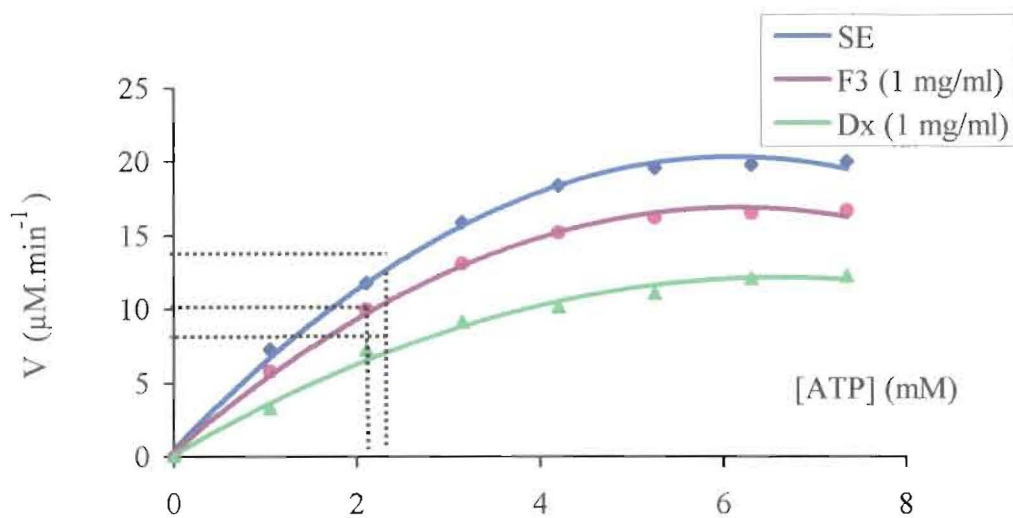


Fig 76: Comparaison de l'action de F₃ et de Dx à 1 mg/ml sur l'ATPase Na⁺-K⁺

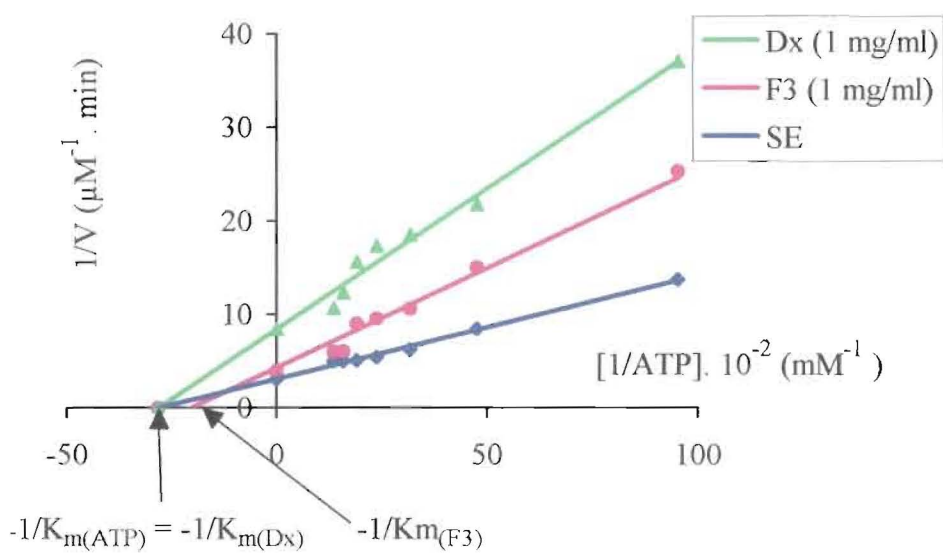


Fig 77: Comparaison de V_m et K_m de l'ATPase Na⁺-K⁺ en présence de F₃ et Dx à 1 mg/ml

exercée par Dx sur l'enzyme est non compétitive. Car, Dx (1 mg/ml) n'agit pas sur la K_m , mais réduit la vitesse de catalyse de l'enzyme de 0,321 à $0,177\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$; soit une inhibition de 44,85%. Quant à F_3 , les données précédentes ont permis de voir que F_3 (1 mg/ml) diminue la vitesse de l'enzyme de 22,74% (Tabl IX).

Au vue de ces pourcentages de réduction, on peut dire qu'à la même concentration, Dx inhibe deux fois plus l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ la F_3 .

9- Détermination de l'activité résiduelle de l'ATPase

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ et des CI_{50} des inhibiteurs (M-B, MB- F_3 et Dx)

Les trois effecteurs (M-B, MB- F_3 et Dx) diminuent l'activité catalytique de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de 100% à 80,81% pour MAÏ-BAO, à 67,33% pour MB- F_3 (Fig 78) et à 21,77% pour Dx (Fig 79). Les différents pourcentages représentent l'activité résiduelle de l'enzyme en fonction des effecteurs. Ces figures 79 et 80 nous ont permis de déterminer la CI_{50} de chacun des effecteurs qui est 5 mg/ml pour M-B, 1 mg/ml pour MB- F_3 et 0,796 mg/ml pour la digoxine.

En conclusion, la CI_{50} et l'activité résiduelle de Dx sont plus faibles que celles de MB- F_3 , qui sont à leur tour plus faibles que celles de M-B. Par conséquent, Dx inhibe plus l'activité catalytique de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que MB- F_3 qui à son tour est plus inhibiteur que M-B.

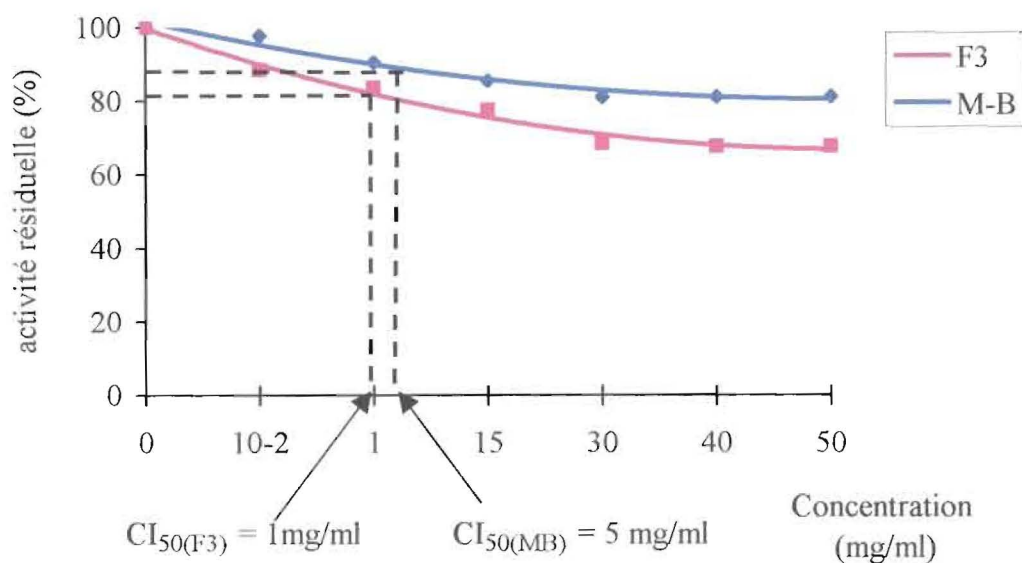


Fig 78: Activité résiduelle de l'inhibition l'ATPase Na^+-K^+ du cœur de rat par de M-B et F₃

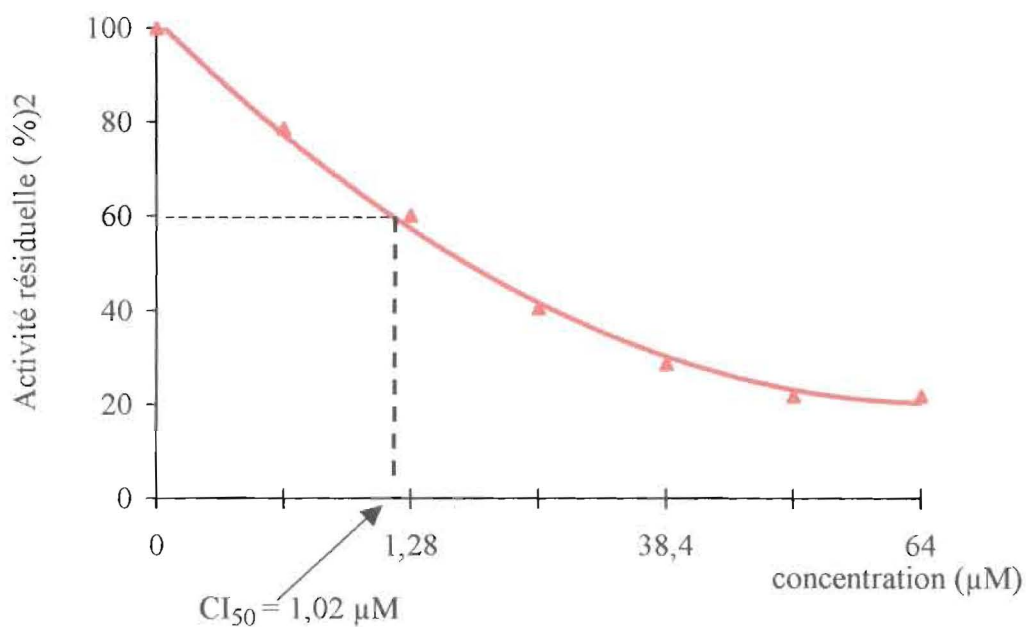


Fig 79: Activité résiduelle de l'inhibition de l'ATPase Na^+-K^+ par Dx

**Tableau IX: récapitulation des V_m et des K_m de l'ATPase Na^+-K^+
en présence des substances pharmacologiques**

Produits Paramètres	Sans Effecteur	MAÏ-BAO (15 mg/ml)	Digoxine (15 mg/ml)	MB-F₃ (1 mg/ml)	Digoxine (1 mg/ml)
V_m ($\mu M \cdot \text{min}^{-1}$)	0,321	0,274	0,114	0,248	0,177
K_m (mM)	3,540	3,320	3,540	3,240	3,540
% de variation de V_m	0	-14,644	-64,485	-22,741	-44,859
% de variation de K_m	0	-06,214	0	-08,474	0

10- Discussion et conclusion

Les expériences que nous avons menées sur le système cardiovasculaire avec MB-F₃, nous ont amené à étudier son effet sur l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur isolé de rat en comparaison avec ceux de M-B et Dx. Nous avons alors déterminé l'activité de cette enzyme, soit 387.10⁻⁵ μM.min⁻¹. Signalons que, l'ATPase Na⁺-K⁺ est une enzyme commune aux membranes cytoplasmiques de toutes les cellules animales exceptée l'érythrocyte de chien (HAÏAT et al, 1995)⁽⁸³⁾. GUEDE en 1975⁽⁷⁶⁾ a montré que l'ATPase Na⁺-K⁺ du cerveau de lapin a une activité spécifique égale à 0,152 μmole.min⁻¹.mg⁻¹; quand ATTILIO (1975)⁽¹³⁾ montra que l'activité spécifique ATPasique du cœur de porc après purification est de 120 à 160 μmoles de Pi/min/mg de protéine. Bien que l'ATPase Na⁺-K⁺ soit extraite d'un même organe, son activité spécifique peut varier en fonction de l'organite. Ainsi, l'ATPase Na⁺-K⁺ du réticulum sarcoplasmique donne une activité spécifique plus élevée que 28-35 UI/mg (MACLENNAN, 1970)⁽¹¹⁶⁾ avec un maximum à 43,5 UI/mg (MACLENNAN et HOLLAND, 1975)⁽¹¹⁷⁾. D'autres auteurs tels que OWENS et al, (1972)⁽¹⁴³⁾ et DE MEIS et TUME, (1975)⁽⁴⁵⁾ avancent des valeurs respectives de 16,8 UI/mg et 7 à 11,4 UI/mg.

Par ailleurs, nous avons déterminé les conditions d'activité maximale de l'ATPase Na⁺-K⁺ qui sont pH 7,4 et la température de 37°C. Ces différentes valeurs sont en accord avec celles de MACLENNAN, (1970)⁽¹¹⁶⁾; GUEDE, (1989)⁽⁷⁸⁾; ALMOTREFI et DZIMIRI, (1991)⁽¹¹⁾. On a constaté qu'au delà de pH 7,4 et de 37°C, l'activité de l'enzyme baisse. Ceci est dû à la dénaturation de la protéine à forte température et aux pH extrêmes (KAMOUN, 1987)⁽⁹⁸⁾. Par conséquent, dans ces conditions sus-citées, nous

avons mesuré l'activité spécifique et déterminé les vitesses d'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en présence de divers ligands que sont M-B, MB-F₃ et Dx .

L'influence du substrat sur l'activité de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ nous a permis de voir qu'en présence d'un excès de substrat (l'ATP- Na_2), c'est-à-dire pour les fortes concentrations, l'activité de l'enzyme atteint son maximum et ne varie plus. Ce résultat nous amène à dire qu'à des concentrations élevées de substrat, la quantité totale de molécules d'enzymes est saturée. Par conséquent, la quantité d'ATP transformée par l'ATPase ne varie plus quelle que soit la quantité de substrat introduite. La vitesse d'hydrolyse de l'enzyme reste alors constante. L'activité de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ du cœur de rat diminue sous l'influence des trois effecteurs que sont MAÏ-BAO, la fraction MB-F₃ et la digoxine. Les trois ligands constituent donc des inhibiteurs pour l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Lors de nos études, il a été constaté que Dx inhibe plus l'activité catalytique de l'enzyme que MB-F₃ qui à son tour est plus inhibiteur que M-B. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la digoxine est un produit purifié comme la ouabaine dont la CI_{50} reste faible (ERDMANN et al, 1984 ; ALMOTREFI et DZIMIRI, 1991)^(55, 11). En outre, ces résultats confirment le fait que MB-F₃ est issue du fractionnement de M-B et montrent par la même occasion, l'existence de substances antiATPasiques qui seraient en faible quantité dans M-B, mais prépondérantes dans la fraction F₃ Par ailleurs, comme l'ont décrit BLOOD et NOBLE, (1977)⁽²⁵⁾; SEIFEN et al, (1979)⁽¹⁶¹⁾; AKA, (1980)⁽⁶⁾; GUEDE et al, (1992)⁽⁷⁹⁾ sur les digitaliques au niveau du muscle cardiaque, MB-F₃ et M-B augmenteraient le flux calcique entrant suite à une réduction de l'activité de la pompe ionique par inhibition de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dépendante. Le cytosol s'appauvrit en Na^+ et s'enrichit en Ca^{++} par inversion de l'échangeur $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ qui fait entrer un (1) ion Ca^{++} pour trois (3) ions Na^+ qui sortent (HERCHUELZ et al, 1995)⁽⁸⁹⁾. Ainsi, la concentration

intracellulaire du Ca^{++} augmente (LEBLANC et HUME, 1990)⁽¹⁰⁷⁾. Ce qui explique l'action cardiotonique de MB-F₃ et des digitaliques. Cependant, l'inhibition induite par MB-F₃ et M-B sur l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ du cœur reste faible malgré leurs fortes concentrations. Ces résultats sont en accord avec ceux de TROTZ et al , (1989)⁽¹⁷¹⁾ et de WEITMAN et al (1989)⁽¹⁸⁰⁾ sur les antiarythmiques de classe I. Selon ces auteurs, la faible inhibition de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ par les fortes concentrations des antiarythmiques de classe I, serait liée à leur effets cardiaques indépendamment de leur action sur le système nerveux sympathique. Mais, cette faible inhibition peut être aussi due à l'effet stabilisant de la membrane ou à l'inhibition des canaux sodiques voltage-dépendants (IJZERMAN et al, 1987)⁽⁹⁵⁾. Il convient de noter que le bon fonctionnement de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dépend de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (UMESH, 2000)⁽¹⁷²⁾. Or, comme les glycosides cardiaques, MB-F₃ et M-B, en inhibant partiellement l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, diminuent l'hydrolyse de l'ATP et partant, diminue l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'enzyme. Cela conduit à la réduction de la vitesse d'hydrolyse de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ de 14,64% pour M-B (15 mg/ml); de 22,74% pour MB-F₃ (1 mg/ml); 44,85% pour Dx (1 mg/ml) et de 64,48% pour Dx (15 mg/ml). Ces résultats obtenus corroborent l'hypothèse selon laquelle la Dx est un produit purifié et que MB-F₃ provient du fractionnement de M-B.

L'action de l'ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ est d'hydrolyser l'ATP afin de fournir de l'énergie à la pompe à sodium pour son fonctionnement. Mais en présence de Dx, MB-F₃ et M-B, l'hydrolyse de l'ATP est partiellement inhibée. Par conséquent, l'activité de la pompe se voit diminuée par ces trois produits. Cependant, de la comparaison de MB-F₃ et M-B à Dx, un glycoside cardiaque de référence, il ressort que MB-F₃ est plus inhibiteur que M-B, mais moins que Dx.

Cependant, de la comparaison de F₃ et M-B à Dx, un glycoside cardiaque de référence, il ressort que F₃ est plus inhibiteur que M-B, mais moins que Dx.

Conclusion

Générale

et

Perspectives

Les études que nous avons menées ont porté sur MAÏ-BAO et ses fractions bioactives (F_2 et F_3) sur le système cardiovasculaire et sur leur mécanisme d'action biochimique.

Les expériences réalisées au niveau de la toxicologie ont montré que, seules deux des quatre fractions de M-B, c'est-à-dire F_2 et F_3 sont faiblement toxiques alors que F_1 et F_4 sont non toxiques dans l'intervalle de concentrations utilisées. Car, les DL_{50} de M-B, F_2 et F_3 sont respectivement 24 000, 20 000 et 25 000 mg/kg de PC et sont par ailleurs supérieures à 5 000 mg/kg de PC. Ces DL_{50} correspondent respectivement à des volumes de 8,0 l ; 6,6 l et 8,3 l en une prise.

Au niveau pharmacodynamique, nous avons constaté après les expériences faites, que MAÏ-BAO et F_2 sont cardioinhibiteurs et hypotensifs comme l'ACh et le diltiazem qui sont des cardioinhibiteurs de référence. Cependant, aux concentrations égales ou supérieures à 15 mg/ml, MAÏ-BAO induit un effet cardiotonique fugace qui précède l'effet cardioinhibiteur prépondérant.

L'effet cardioinhibiteur et hypotensif de M-B et F_2 nous ont conduit à faire l'interaction MAÏ-BAO-Atr et F_2 -Atr. Comparativement à l'action antagoniste de l'Atr sur l'ACh sur les sites muscariniques du cœur, les interactions ont montré que l'Atr reverse partiellement la cardioinhibition induite par M-B et F_2 . Ainsi, on a conclu que M-B et F_2 contiendraient des substances cholinergiques et d'autres substances cardioinhibitrices non cholinergiques. Dans le but de déterminer la nature de ces substances non cholinergiques, nous avons étudié l'action de MAÏ-BAO et F_2 en milieux hypercalcique 150% et hypersodique 150%. Il a été constaté que le milieu hypercalcique reverse totalement l'action cardioinhibitrice de M-B et F_2 . Par contre, l'effet cardioinhibiteur du milieu hypersodique est potentialisé par les deux produits. Nous avons alors dégagé l'hypothèse selon laquelle les autres substances cardioinhibitrices seraient des anticalciques.

La F₃ induit un effet cardiotonique et hypertensif. La comparaison des effets de F₃ à ceux de la digoxine et a permis de supposer que F₃ induit un effet digitalique sur le cœur isolé de rat.

L'effet cardiotonique de F₃ reverse la cardioinhibition induite par les milieux hypocalcique (50%) et hypersodique (150%). Cela corrobore l'action digitalique de F₃. Car, à l'instar des digitaliques, F₃ augmenterait le taux du calcium dans le cytosol en vue de déclencher la contraction cardiaque.

L'explication biochimique des effets cardiovasculaires de M-B, F₂ et F₃ nous ont conduit à étudier d'une part, l'action *in vitro* de M-B et F₂ sur l'AChE du cœur de rat et d'autre part, l'action *in vitro* de M-B et F₃ sur l'ATPase Na⁺-K⁺ du cœur de rat.

Les expériences ont montré que M-B (15 mg/ml) et F₂ (5 mg/ml) inhibent l'AChE respectivement de 60% et 70%. Cependant, l'interaction avec l'Atr a montré que l'Atr antagonise M-B et F₂ sur les sites de l'AChE. Ce qui confirme l'effet cholinergique de M-B et F₂.

MAÏ-BAO (15 mg/ml) et F₃ (1 mg/ml) inhibent l'ATPase Na⁺-K⁺ respectivement de 14,64% et 22,74% à l'instar de la digoxine qui est un digitalique de référence dont les pourcentages d'inhibition *in vitro* de l'ATPase Na⁺-K⁺ sont 64,48% à 15 mg/ml et 44,85% à 1 mg/ml. Les résultats de ces expériences montrent que M-B et F₃ ont des effets digitaliques sur le cœur.

MAÏ-BAO apparaît comme une substance à action essentiellement cardioinhibitrice et hypotensive malgré la présence de substances cardiotoniques dont l'effet est fugace et peu perceptible. De ce fait, MAÏ-BAO pourrait contribuer au traitement de l'hypertension artérielle. Pour cela, il reviendrait à consommer 15 mg/kg en dose unique. Ce qui correspond à 350 ml pour un homme standard de 70 kg. Car 500 ml de M-B produisent environ 1498,85 mg de poudre après lyophilisation.

Il convient de noter que nos études ont été faites sur l'extrait brut et sur les fractions. D'autres études pourront nous permettre de mieux élucider nos appréhensions sur les vertus cardiovasculaires de MAÏ-BAO. Ainsi, nous envisageons ultérieurement de

- Faire un tri phytochimie afin de déterminer la composition chimique de M-B et ses fractions actives,
- Purifier les fractions actives de MAÏ-BAO (F₂ et F₃) afin de déterminer la structure chimique des principes actifs.
- Étudier plus finement le mécanisme d'action de MAÏ-BAO sur les différentes structures excitables par des méthodologies de pointe telles que la microélectrode, le potentiel imposé ou le "patch clamp" ect.....

REFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

6- 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 ès-sciences, Université d'Abidjan, n° 55, 333 pages.

7- AKÉ-ASSI L. (1991)

Médecine traditionnelle et pharmacopée. Rapport sur le colloque international sur la médecine traditionnelle africaine à Abidjan, Côte d'Ivoire.

Bull. Med. Trad. Pharm., ACCT, 4 (2) : 203

8- AKERA, T. (1977)

Membrane adenosinetriphosphatase/ a digitalis receptor?

Science 198: 569-574

9- ALLAIN, P. (2000)

Les médicaments.

CdM éditions 3, nov. pp.500.

10- ALLEN, C. M. (1998)

Past research on Kombucha tea

The Kombucha FAQ part 6. Research and test results.

11- ALMOTREFI, A. A. and DZIMIRI, N. (1991)

Effects of β -adrenergic Blockers on Na^+ - K^+ -ATPase Activity in Guinea-pig Heart Preparations: Comparison with Ouabain.

Arch. Intern. de Pharmacodynamie et de Ther., 30: 94-101.

12- ASHANI, Y., WINS, P. and WILSON, I. B. (1972)

The Inhibition of Cholinesterase by Diethyl phosphoro-chloridate.
Biochem. Biophys. Acta, **284**: 427.

13- ATTILIO, D. P. (1975)

Isolement et propriétés de l'ATPase Mitochondriale de Cœur de Porc.
Diplôme de Doctorat de spécialité (3è cycle) de chimie (biochimie) n°457,
pp.75.

14- BAH, C. (1998)

Mécanisme biochimique d'une action cholinolytique de BGG, un
concentré de source végétale.
Thèse de doctorat 3è cycle. Université de Cocody 103 pages.

15- BALENTINE, D A. (1997)

Special issue: tea and health
Critical reviews in food Science and Nutrition, **8**: 691-692.

16- BARTELS, E. and, NACHMANSOHN, D. (1969)

Organophosphate inhibitor of Acetylcholine-receptor and Esterase Tested
on Electoplax.
Arch. Biochem. Biophys., **133**: 1-6

17- BARTLETT, G. R. (1959)

Phosphorous assay in column chromatography
J. Biol. Chem., **234**: 466-468.

- 18- BENTFELD, M., LÜLLMANN, H., PETERS, T., PROPPE, D. (1977)**
Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle
Br. J. Pharmacol. **61**: 19-27.
- 19- BERHENS, B. et KARBER, G. (1935)**
Comment sont les calculs de recherche pour analyses biologiques.
Arch. Exp. Path. Pharm., **117**: 379-388.
- 20- BERTRAND, E., RAVINET, L. and ODI ASSAMOI, M. (1981)**
L'hypertension artérielle envisagée comme un problème de santé
publique en Côte d'Ivoire.
Cardiologie Tropicale, **7** : 155-159
- 21- BIEDERT, S., BARRY, W. H. et SMITH (1979)**
Inotropic effects and changes in sodium calcium contents associated with
inhibition of monovalent cation active transport by ouabain in cultured
myocardial cells.
J. of General Physiology, **74**: 479-494.
- 22- BIEGON, R. L. et PAPPANO, A. J. (1980)**
Dual mechanism for inhibition of calcium-dependent action potentials by
acetylcholine in avian ventricular muscle. Relation ship to cyclic AMP.
Circulation Research, **46**: 353-362.
- 23- BILJANA, B.-P. et LIDIJA, P.-TOZI (2 000)**
Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink.
Journal of food Science and technology, **35**: 201-205.
-

24- BLANC, P. J. (1996)

Characterization of the tea fungus metabolites.

Biotechnol. Lett. **18**: 139-142

25- BLOOD, B. E. et NOBLE, D (1977)

Glycoside induced inotropism of heart. More than one mechanism?

J. Physiol. (London), **266**: 76-77

26- BODO, C., MARKUS, F., MICKAEL, S. and MICKAEL, B. (1997)

Effects of the novel T-type calcium channel antagonist Mibefradil on human Myocardial contractility in Comparison with Nifedipin and Verapamil.

J. of cardiovasc. Pharmacol., **29**: 692-696.

27- BOLTON, T. B. (1981)

Action of acetylcholine on the smooth muscle membrane. In : smooth muscle.

Edited by BÜLBRING, E., NRADING, A. F., JONES, A. W. ET TOMITA, T., EDWARD ARNOLD, London. pp 199-217.

28- BRAUWALD, E., BLOODWELL, R. Y. and GOLDBERG, I. I.

(1961)

Studies on digitalis IV: observation in man on the effects of digitalis preparations on the contractility of the failing heart and on total vascular resistance.

J. Clin. Invest., **40**: 52-58.

29- BUHLER, F. R., HULTHEN, U. L. and KIWISKI, W. (1982)

The place of the calcium antagonist Verapamil in the antihypertensive therapy.

J. Cardiovasc., 4: S350-S357.

30- BUSSE, F., LÜLLMANN, H., PETERS, T. (1979)

Concentration dependence of the binding of ouabain to isolated guinea pig atria.

J. Cardiovasc. Pharmacol. 1: 687-698

31- CARON, J., GUEDON-MOREAU, L. et LIBERIA, C. (1993)

Antagoniste des mouvements du calcium et du rythme.

Thérapie, 48: 685-695.

32- CARRIER, G. O., LÜLLMANN, H., NHURAUER, I. et PETERS, T. (1974)

The significance of fast exchanging superficial calcium fraction for the regulation of contractile force in heart muscle.

J. Mol. Cell. Cardiol., 6: 333-347.

33- CATTLE, M. and GOLD, H. (1938)

The influence of digitalis glycosides on the force of contraction of mammalian cardiac muscle.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 62:116-123.

34- CAUVIN, C. and VAN BREEMEN, C. (1985)

Different Ca⁺⁺ channels along the arterial tree.

J. Cardiovasc. Pharmacol., 7 (suppl 4): 54-65.

35- CHEMNITIUS, J. M., SADOWSKI, R., WINKEL, H. and ZECH, R. (1999)

Organophosphate inhibition of human heart muscle cholinesterase isoenzymes.

Chem. Biol. Inter. **119-120**: 183-192.

36- CHEN, C. and LIU, B. Y. (2 000)

Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation.

Journal of Applied Microbiology, **89**: 834-839.

37- CHOBANIAN, A. V. (1984)

Treatment of the elderly hypotensive patient.

Am. J. of med., **2**: 22-27.

38- COLLARD, M. (1998)

Importance du traitement anti-hypertenseur dans les accidents vasculaires cérébraux sous les tropiques.

Méd. d'Afrique Noire, **45** (8-9) : 530-534.

39- CORABOEUF, E., DE LOZE, C., BOISTEL, J. (1953)

Action de la digitale sur les potentiels de membrane et d'action du tissu conducteur du cœur de chien étudiée à l'aide de micro-électrodes intracellulaires.

C. R. Soc. Biol. **143**: 1329-1331.

40- CREPSO, L. M., GRANTHAM, C. J. et CANNELL, M. B. (1990)

Kinetics stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes.

Nature Lond., **345**: 618-621.

41- DARVESH, S., MAC DONALD, S. E., LOSIER, A. M., MARTIN, E., HOPKINS, D. A. and ARMOUR, J. A. (1998)

Cholinesterase in cardiac ganglia and modulation of canine intrinsic cardiac neuronal activity.

J. Auton Nerv. Syst., **71** (2-3): 75-84.

42- DANIEL, J. (1983)

Medicaments, nature et chimie.

Edition Le Hameau (Paris), mars 1983: 219 pages

43- DATTÉ, J. and ZIEGLER, A. (2001)

Pharmacological investigation on nigrescigenin-a cardenolide from *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock: comparative studies on cardiotoxic effects of *Parquetina nigrescens*, g-strophanthin and noradrenaline in guinea-pig isolated atria.

J. Pharmacy and Pharmacology **53**: 859-866

44- DAVID MC CALL, M. D. (1987)

Excitation-contraction coupling in cardiac and vascular smooth muscle: modification by calcium-entry blockade.

Circulation **75** (suppl.V): V-3-9.

45- DE MEIS, L; and TUME, R. K. (1977)

A new mechanism by which an H^+ concentration gradient drives the synthesis of adenosine triphosphate, pH jump, and adenosine triphosphate synthesis by the Ca^{++} -dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum.

Biochem., **16**: 4455-4463.

46- DEFEUDIS, F. V. (1985)

Calcium subgroups.

Trends pharmacol. Sci., **6** : 237-239.

47- DHALLA, N. S., ALTO, L. E., HEYLIGER, C. E., PIERCE, G. N., PANAGIA, V. and SINGAL, P. K. (1984)

Sarcoplasmic reticular Ca^{++} -pump adaptation in cardiac hypertrophy due to pressure overload in pigs.

Euro. Heart J., **5** (suppl F): 323-328.

48- DHALLA, N.S., DAS, P. K. et SHARMA, G. P. (1978)

Subcellular basis of cardiac contractile failure.

J. Mol. Cardiol., **10**: 363-385.

49- DHALLA, S. N., PIERCE, G. N., PANAGIA, V., SINGAL, P. K. and BEAMISH, R. E. (1982)

Calcium movements in relation to heart function.

Basis Res. Cardiol., **77**: 117-139.

50- DUFRESNE, C. and FARNWORTH (2000)

Tea, Kombucha, and health: a review.

1- ABADIE, M. (1962)

Association de *Candida mycoderma* Rees Lodder et d'*Acetobacter xylinum* Brow dans la fermentation acétique des infusions de thé.

Annales des Sciences Naturelles, Botanique et Biologie végétale,
2 : 765-800.

2- ABO, K. J-C., AKA, K. J., EHILE, E. E., TRAORE, F. et GUEDE-GUINA, F. (1998)

Effets cholinergiques de la fraction 2 (F₂) d'un extrait aqueux de *Mareya micrantha* (MAR) sur la pression artérielle et l'activité cardiaque.

Ann. Univ. Bénin, Sér. Sciences, XIV : 57-76

3- ABO, K. J.- C. (1996)

Effets pharmacologiques d'un extrait aqueux de *Mareya micrantha* (Euphorbiacée) sur l'activité cardiovasculaire de mammifère.

Thèse de doctorat 3^e cycle 132 pages. Université Nationale de Côte d'Ivoire.

4- ADJANOHOUN E. J. (1990)

État de l'évolution de l'ethnopharmacopée africaine;

Bull. Med. Trad. Pharm., 4 (1) : 59-63

5- AHUA, K. M. (1996)

Action de MAÏ-BAO ou Champignon-Thé-Trésor sur quelques bactéries et levures.

Mémoire D.E.A de Biotechnologie, Université de Cocody 30 pages.

Food research international, **33**: 409-421.

51- DUPIN, H., CUQ, J., MALEWIAK, M., LEYNAUD-ROUAND, C. et BERTHIER, A. (1992)

La toxicologie alimentaire. Dans : ESF (éd.)

Alimentation et nutrition humaine. Paris, pp 1339-1363.

52- DZIMIRI, N., FRICKE, U. and KLAUS, W. (1987)

Influence of derivation on the lipophilicity and inhibitory actions of cardiac glycosides on myocardial $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

Brit. J. Pharmacol., **91**: 31-38

53- EHILE, E. E., MENSAH-NYAGAN, A., GUEDE, G. F. et AKA, K. J. (1991)

Effets pharmacologiques de la Mansonine sur des arythmies induites au niveau du Coeur isolé de rat.

J. of Ethnopharmacology, **33** : 179-185.

54- ELLMAN, G. L., COURTNEY, D. K., ANDRES, V. et FEATHERSON, R. M. (1961)

A new and rapid colorimetric determination of AChE activity.

Biochem. Pharmacol., **1**: 88-95.

55- ERDMANN, E., BROWN, L., WERDAN, K. and KRAWICTZ, W. (1984)

Quantitative evolution of ouabain binding to contracting heart muscle, positive inotropy, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ inhibition and Rb^+ uptake in several species.

In: Current topics in membrane transport, **19**. Structure mechanism and function of Na^+ - K^+ pump.

BRONNER, F. and KLEINZELLER A. EDS.

56- FABIATO, A. (1983)

Calcium and cardiac excitation-contraction coupling.

Annu. Rev. Physiol., **41**: 743-750.

57- FABIATO, A. and FABIATO, F. (1979)

Tension developed and intracellular free calcium concentration reached during the twitch of an isolated cardiac cell with closed sarcolemma.

J. Gen. Physiol., **74** : 6-13a.

58- FEINSON, Y.I. et WONG, N. (1980)

Parlons de MAI-BAO.

Quotidien le "Pékin Daily" 16-juillet, 1-3.

59- FIELDS, J. Z., ROESKE, W. R., MORKIN, E. and YAMAMURA, H. I. (1978)

Cardiac muscarinic cholinergic receptors. Biochemical identification and characterization.

J. Biol. Chem., **253**: 3251-3258.

60- FLECKENSTEIN, A. (1983)

History of calcium antagonists.

Circ. Res., **52** (suppl.I): 1-16.

61- FOUCHE, J.-G., MARQUET, A. et HAMBUCKERS, A. (2001)

Les plantes médicinales: de la plante au médicament.

dans Observatoire du Monde des Plantes éd. Sart-Tilman, Liège, 31 pages.

62- FOZZARD, H. A. and BEELER, G. W. (1975)

Voltage clamp and cardiac electrophysiology.

Circ. Res., **37**: 403-410.

63- FRANK, J. S., MOTTINO, G., REID, D., MOLDAY, R. S. et PHILIPSON, K. D. (1992)

Distribution of the Na-Ca exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labelling study.

J. Cell. Biol., **117**: 337-345.

64- FRISHMAN, W. H., WEINBERG, P., PELED, H. B., CHARLAP, S. and BEER, N. (1984)

Calcium entry blockers for treatment of severe hypertension and hypertension crisis.

Am. J. of med., Special issue on antagonists, 35-41.

65- FROEDE, H. C., WILSON, J. B. et KAUFMAN, H. (1986)

Acetylcholinesterase: Theory of non Competitive Inhibition.

Arch. of Biochem and Biophys., **247** (2): 420-423.

66- GALPER, J. B., KLEIN, W. and CATTERALL, W. (1977)

Muscarinic acetylcholine receptors in developing chick heart.

J. of biological Chem., **252**: 8692-8699.

67- GIACHETTI, A., MICHELETTI, R. and MONTAGNA, E. (1986)

Cardioselective profile of AF-Dx116, a muscarinic M₂ receptor antagonist.
Life Sci., **38**: 1663-1672.

68- GILES, W. R. and NOBLE, S. J. (1976)

Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by Acetylcholine.
J. Physiol. London, **261**: 130-123.

69- GILLIS, R. A. et OUEST, J. A. (1980)

The role of the nervous system in the cardiovascular effects of digitalis.
Pharmacological Rev., **31**:19-25

70- GLOSSMANN, H., FERRY, D. R., LUBBECKE, F., MEWES, R. and HOFFMANN, F. (1982)

Calcium channels. Direct identification with radioligand binding studies.
Trends pharmacol. Sci., **3**: 431-437.

71- GODFRAIND, T., MILLER, R. et WIBO, M. (1986)

Calcium antagonism and calcium entry blockade.
Pharmacol. Rev., **38**: 321-416.

72- GOODMAN, D. J., TOSSEN, R. M., INGHAM, R., RIDER, A. K. and HARRISSON, D. (1975)

Sinus node function in the denervated human heart. Effect of digitalis.
Br. Heart J., **37**: 612-618.

73- GOULD, B. A., MANN, S. et KIESO, H. (1982)

The 24 hour ambulatory blood pressure profile with Verapamil.

Circulation, **65**: 22-27.

74- GREENWALT, C. J., STEINKRAUS, K. H. and LEDFORD, R. A.

(2 000)

Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects.

Department of food science, cornell University Ithaca,

Association for food protection **63**: 976-981.

75- GREENWALT, C. J., LEDFORD, R. A. and STEINKRAUS (1998)

Determination and Characterization of the antimicrobial Activity of the Fermented Tea Kombucha

Department of food Science, Cornell University, Ithaca,

Association of food protection, **31**: n°3.

76- GUEDE, G. F. (1975)

Étude de quelques effets physiologiques du "Glow", un poison extrait du bois « bété »: *Mansonia altissima* (Sterculacées).

Thèse de doctorat 3è cycle à l'université Nationale de Côte d'Ivoire n°31 67 pages.

77- GUEDE, G. F. et ATTIAS, J. (1977)

Inhibition de l'ATPase Na⁺-K⁺ microsomale du cerveau par des extraits de *Mansonia altissima*.

C. R. Acad. Sci. (Paris), **284**: 2162-2184.

78- GUEDÉ, G. F. (1989)

Études pharmacologiques et biochimique de la Mansonine:

- 1- Propriétés cardiovasculaire de la Mansonine, une pharmacologie expérimentale.
- 2- Réactivité de la Mansonine avec les récepteurs aux digitaliques de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$.

Thèse de doctorat d'état. Université Nationale de Côte d'Ivoire
n° 224 pages.

79- GUEDE-GUINA, F., BERREBI-BERTRAND, I., SMITH, M. O. et OCHILLO, R. F. (1992)

Pharmacological characterization of a novel ouabain analog from *Mansonia altissima*: an in vitro investigation of effects on Na^+ , K^+ -ATPase.

Cellular and Molecular Biology, **5**: 240-247.

80- GÜNTHER, W.F. (1996)

La boisson au champignon de longue vie: instruction pratiques de préparation et d'utilisation.

Ennsthaler Verlag éd.,A-4402 STEYR, 4è edition, 149 pages.

81- GUTTAPADU, S. YANG, Z. and WIEGER, K. (2000)

Kombucha fermentation and it's antimicrobial activity.

J. Agric. Chem. 48: 2589-2594.

82- GUYTON, A. C. (1976)

Traité de physiologie médicale.

5è édition. Doin pp. 148-173.

83- HAÏAT, R., BERDEAUX, A., GESLIN, P. et LECHAT, P. (1995)

Dans : « Digitaliques, l'ère de la digoxine ».

Ed. Frison-Roche, Paris, pp 112-114.

84- HAMMER, R., GIRALDO, E., SCHIAVI, G. B., MONFERINI, E. and LANDISKY, H. (1986)

Binding profile of a novel cardioselective muscarinic receptor antagonist, AF-Dx116, to membrane of periferal tissues and brain in the rat.

Life Sci., **38**: 1653-1662.

85- HARA, Y., LUO, S.-J., WICKREMASHINGHE, R. L. and YAMANISHI, T. (1995a)

Botany of tea.

Food Reviews International, **11**: 371-374

86- HARA,Y., LUO, S.-J., WICKREMASHINGHE, R. L. and YAMANISHI, T. (1995c)V

Chimical composition of tea.

Food Reviews International, **11**: 435-456.

87- HARA,Y., LUO, S.-J., WICKREMASHINGHE, R. L. and YAMANISHI, T. (1995d)VI

Biochemistry of processing black tea.

Food Reviews International, **11**: 457-471.

88- HARA,Y., LUO, S.-J., WICKREMASHINGHE, R. L. and YAMANISHI, T. (1995e)VIII

Flavor of tea.

Food Reviews International, **11**: 477-525.

89- HERCHUELZ, A., EYLEN, V. F. et LEBRUN, F. (1995)

L'échange sodium-calcium.

Méd. Sci., **11**: 232-238.

90- HERTNARSKI, B. and O'BRIEN, R. D. (1975)

Electron-Donor and Affinity Constants and Their Application to the inhibition of Acetylcholinesterase by Carbamate.

J. Agr. Food Chem., **23**: 709-715.

91- HINO, N. et OCHI, R. (1980)

Effects of acetylcholine on membrane currents in guinea-pig papillary muscle.

J. of Physiol., **307**: 183-197.

92- HOLLMAN, P. C. H., HERTOOG, M. G. L. and KATAN, M.B. (1996)

Analysis and health effects of flavonoids.

Food chemistry. **57**: 43-46

93- HOUPE, J. P., PERROT, B., ETHERENOT, G., CHERRIER, F. et FAIVRE, G. (1983)

Action des digitaliques sur le nœud sinusal normal.

Arch. Mal. Coeur, **76**: 878-885.

94- IBRAHIM, N. D. G., KWANASHIE, H.O., NJOKU, C. D. and OLUVINOLA (1993)

Screening of "Kargasok tea" IV: studies of pathological effect in BALB/C mice and Wistar rats.

Vet. Hum. Toxicol., **35** (5): 339-402.

95- IJZERMAN, A. P., NAGESSE, A. and GARRITSEN, A. (1987)

The membrane stabilization activity of β -adrenoceptor ligands. Quantitative evaluation of the interaction of phenoxipranolamines with [3 H] batrachotoxinin A 20- α -benzoate binding site on voltage-sensitive sodium channels in rat brain.

Biochem. Pharmacol., **36**: 4239-4244.

96- IKEMOTO, Y. et GOTO, M. (1975)

Nature of the negative inotropic effect of Acetylcholine on the myocardium: an elucidation on the bullfrog atrium.

Prod. Japan Acad., **51**: 501-505.

97- IKEMOTO, Y. et GOTO, M. (1977)

Effects of Ach on slow inward current and tension components in the bullfrog atrium.

J. of molecular and cellular cardiology, **9**: 313-326.

98- KAMOUN, P. (1987)

Dans : "Appareils et Méthodes en Biochimie ".

Flammarion Méd.-Sci. 3è éd., Paris, Oct. pp.193-206.

- 99- KAPLAN, N. M. et LIEBERMAN, E. (1978)**
Clinical hypertension.
2^e édition Baltimore williams and wilkins, **94**: 117-130.
- 100- KARAKI, K. et WEISS, G. B. (1984)**
Calcium channels in smooth muscle.
Am. Gastroenterology Association, **87** :960-970.
- 101- KASS, R. S., TSIEN, R. W. and WEINGART, R. (1978)**
Ionic basis of transient inward current induced by strophanthidin in cardiac purkinje fibers.
J. Physiol. **281**: 209-226.
- 102- KATZ, A. M. (1983)**
What are calcium channels and how do drugs act on them.
J. Cardiovasc. Med., **8**: 435-449.
- 103- KHOA-BUT et OCHILLO, R. F. (1987)**
Characterization of cholinesterase of Muscularis muscle of *bufo marinus*.
Comp. Biochem. Physiol., 87c, **1**: 107-111.
- 104- KRAFT, M. M. (1959)**
Le champignon du thé.
Nova Hedwigia, **1**: 297-304.
- 105- LABRID, C. A., GROSSET, G., DURENG, J., MIRONNEAU, C. and
DUCHENE-MARULLAZ, P. (1979)**
Some membrane interactions with bepridil, a new antianginal agent.
-

J. Pharmacol. Exp. Ther., 211-546.

106- LANGENDHORFF, O. (1895)

Recherches sur le coeur d'animaux domestiques.

Pflügers Arch., **61**: 291-339.

107- LEBLANC, M. et HUME, J. R. (1990)

Sodium current-induced release of calcium from cardiac-sarcoplasmic reticulum.

Science Wash. DC, **248**: 372-376

**108- LEDERER, W. J., BERLIN, J. R., COHEN, N., HADLEY, W. R.,
BERS, D. M. and CANNELL, M. B. (1990)**

Excitation-contraction coupling in heart cells. Role of the sodium-calcium exchange, the calcium current, and the sarcoplasmic reticulum.

Ann. N. Y. Acad. Sci., **588**: 190-206.

109- LEIBEL, W. S. (1988a)

Characterization of a pseudocholinesterase purified from surgeonfish tissues confirms the atypical nature of this enzyme.

J. Exp. Zool. **247**: 198-208.

110- LEIBEL, W. S. (1988b)

Antisera probes to an atypical pseudocholinesterase from surgeonfish reveal immunochemical variability and tissue-specific molecular polymorphism.

J. Exp. Zool., **247**:209-233.

111- LIU, C. -H., HSU, W. -H., LEE, F.-L. and LIAO, C.-C. (1996).

The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation.

Food Microbiology, **13**: 407-415.

112- LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. (1951)

Method of proteins titration by Folin reagent.

J. Biol. Chem., **19**:265.

113- LÜLLMANN, H. et PETERS, P. (1978)

Action of cardiac glycosides on the excitation-contraction coupling in heart muscle.

Progr. Pharmacol., **2**: 3-10.

114- LYLES, J M., SILMAN, I., Dt GIAMBERARDINO, L., COURAND, J-Y. and BERNARD, E. (1982).

Comparison of the molecular forms of the cholinesterase in tissues of normal and dystrophic chickens.

J. Neurochem. **38**: 1007-1021.

115- MAC EWEN, L. M. (1956)

The effect of the isolated rabbit heart of vagal stimulation and its modification by cocaine hexamethonium and ouabain.

J. Physiol., (Londres), **131**: 678-689.

116- MacLENANN, D. H. (1970)

Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum.

J. Biol. Chem., **245**: 4508-4518.

117- MacLENANN, D. H. and HOLLAND, P. C. (1975)

Calcium transport in sarcoplasmic reticulum.

Ann. Rev. Biophys. Bioengin., **4**: 377-404.

118- MARBAN, E. et TSIEN, R. W. (1982)

Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: positive feed-back regulation by intracellular calcium?

J. Physiol. (London), **329**: 589-614.

119- MARBAN, E. et TSIEN, R. W. (1979)

Ouabain increases the slow inward calcium current in ventricular muscle of the ferret.

J. Physiol., London, **292**: 72-73.

120- MASON D. T., SPANN, J. F. et ZELIS, R. (1969)

Données nouvelles dans la compréhension de l'action des glycosides cardiaques.

Aquis. Pathol. Cardiovasc., **11**: 501-539.

121- MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L. BON, S., KREJCI, E. and VALLETTE, F.-M. (1993)

Molecular and cellular biology of cholinesterases.

Progress in Neurobiology, **41**: 31-91.

- 122- MAYSER, P., FROMME, S., LEITZMANN, C. and GRÜNDER, K. (1995)**

The yeast spectrum of the tea fungus Kombucha.

Mycoses, **38**: 289-295.

- 123- MERSSON, L., ANDREN, L., ORO, L. and RYNAN, T. (1983)**

Pharmacokinetic et pharmacodynamic parameters in patients treated with Nitrendipine.

Hypertension 5 (supp.II), **11**: 11-25.

- 124- MEYER, H., BOSSERT, F., WEHINGER E., TOWART, R. et BELLEMANN, P. (1983)**

Chemistry of calcium antagonists.

Hypertension 5 (suppl.II), **11**: 6-73.

- 125- MICHELETTI, R., MONTAGNA, E. and GIACHETTI, A. (1987)**

AF-Dx116, a cardioselective muscarinic antagonist.

J. Pharmacol. Exp. Ther., **241**: 628-634.

- 126- MICKAEL, C., PITTS, B. J. R. and SCHWARTZ, A. (1978)**

The issue of inotropy and possible Na⁺-K⁺ ATPase exchange pump stimulation in heart muscle.

Science, **200**: 1287-1289.

- 127- MOHABIR, R., CLUSIN, W. T. and LEE, H. C. (1990)**

Intracellular calcium alternans and the genesis of ischemic ventricular fibrillation. In Zipes D. P., Jalife J., eds. *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside*.

Philadelphia : W. B. Saunders Co: 448-462.

128- MOORE, E. D. W. et FAY, F. S. (1992)

A privileged line of communication between the sodium-calcium exchanger and the SR.

Biophys. J., **60**: 907-916a.

129- MOORE, D. E. and HESS, G. P. (1975)

Acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of an amide.

Biochem., **14**: 2386.

130- MORGAN, J. P., MORGAN, K. G. (1984)

Calcium and cardiovascular function.

Am. J. Med. **142**: 33-46.

131- MURAD, F., CHI, Y. M., RALL, T. W. et SUTHERLAND, E. (1962)

Adenylcyclase III. The effect of catecholamines and choline esters on the cardiac muscle and liver.

J. Biol. Chem., **237**: 1233-1238.

132- MURPHY, K. M., GOULD, R. J. , LARGENT, B. L. and SNYDER, S. H. (1983)

A unitary mechanism of calcium antagonists drug action.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**: 860-864.

- 133- NAKAHARA, T., KAWADA, T., SUGIMACI, M., MIYANO, H., SATO, T., SHISHIDO, T., YOSHIMURA, R., MIYASHITA, H. and SUNAGAWA, K. (1998)**

Cholinesterase affects dynamic transduction properties from vagal stimulation to heart rate.

Am. J. Physiol. **275** (2pt2): R 541-547.

- 134- NAKAO, T., TASHIMA, Y., NAGANO, K. et NAKAO, M. (1965)**

Highly specific sodium potassium-activated ATPase from various tissues of rabbit.

Biochem. Biophys. Res. Com., **19**: 6-19.

- 135- NARGEOT, J. (1978)**

Étude électrophysiologique du récepteur cholinergique muscarinique des fibres myocardiques.

Thèse de doctorat ès Sciences. Spécialité Physiologie Animale, Université François Rebalais de Tours. 211 pages.

- 136- NAYLER, W. G. (1973)**

An effect of ouabain on the superficially located stores of calcium in cardiac muscle cells.

J. Mol. Cell. Cardiol., **5**: 101-125.

- 137- N'GUESSAN, J.D. (2001)**

Mécanisme de l'action cardiodépressante et hypotensive de BGG, F5 une substance antidiarrhéique de source naturelle.

Thèse de doctorat 3^e cycle. Université de Cocody, Abidjan PP.150.

138- NIEDERGERKE, R. ET PAGE, S. (1977)

Analysis of catecholamines effects in single atrial trabecule of the frog heart.

Proc. R. Soc. London (Biol) **197**: 333-362.

139- NOBLE, D. (1980)

Le couplage excitation-contraction. Rôle des courants ioniques et des pompes ioniques.

J. Physiol., Paris, **76**:89-95.

140- NYQUIST-BATTIE, C. (1990)

Changes in the expression of acetylcholinesterase molecular forms during rat heart development.

Int. J. DevNeurosci., **8** (3): 327-335.

141- OTOKORÉ, D.A. (1975)

Les ions Mg^{++} et Ca^{++} dans le myocarde de porc : répartition intracellulaire et étude du transport dans les mitochondries.

Thèse de doctorat 3è cycle de chimie (biochimie), Université Claude Bernard de Lyon 81 pages.

142- OWENS, K., RUTH, R. C. and WEGLIICKI, W. B. (1972)

Lipid composition of purified fragmented sarcoplasmic reticulum of the rabbit.

Biochem. Biophys. Acta, **288**: 479-481.

143- PEDERSON, O. L. (1983)

Calcium blockade in arteriol hypertension.

Hypertension 5 (suppl.II), **11**: 74-79.

144- PERRON, A.D., PATTERSON, J.A. and YANOFSKY, N. N. (1995)

Kombucha « mushroom » hepatotoxicity.

[letter]. Ann. Emerg. Med., **26**: 660-661.

145- PERRY, N. (1995)

Culture shock.

Emerg. Med. Serv., **24**: 35-36.

**146- PHAN, T.G., ESTELL, J., DUGGIN, G., BEER, I., SMITH, D. et
FERSON, M. J. (1998)**

Lead poisoning from drinking Kombucha tea in ceramic pot.

Medical Journ. Of Austrelia, **169** (11-12): 644-646.

**147- RASMUSSEN, H. H., TEN EICK, R. E., OKITA, G. T., HARTZ, R. S.
and SINGER, D. H. (1985)**

Inhibition of electrogenic Na⁺ pumping attributable to binding of cardiac steroids to high-affinity pump sites in human atrium.

J. Pharm. Exp. Ther., **236**: 629-635.

148- REIFFEL, J. A., BIGGER, J. T. and CRAMER, M. (1979)

Effects of Digoxin on sinus nodal disfunction.

Am. J. cardiol., **43**: 983-989.

149- REISS, J. (1994)

Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus.

Zeitsch. für Lebensmittel-Untersuchung undforschung, **198**: 258-61.

150- REPKE, K. (1964)

Mode d'action biochimique des digitaliques.

Klein. Wochenschr., **42**: 157-166.

151- REUTER, H. ET SCHOLZ, H. (1977)

The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline.

J. Physiol. (Lond.) **264**: 49-52.

152- ROSENBERGER L. et TRIGGLE D. J. (1978)

Calcium translated and specific calcium antagonists.

in WEISS G. B. ed. Calcium in drug action. New York Plenum:3-31.

153- ROSS, E. M., MAGUIRE, M. E., STURGILL, T. W., BILTONEN, R. L. et GILMAN, A. G. (1977)

Relation ship between the β -adrenergic receptor and adrelylate cyclase: studies of ligand binding and enzyme activity in purified membrane of S49 lymphoma cells.

J. Biol. Chim., **252**: 5761-5775.

154- ROUSSIN, M R. (1996)

Analyses of Kombucha ferments: report on growers.

Information Resources, LC. Salt Lake city. Utah.

155- SAFAR, M. et ROLAND, E. (1981)

Traitement médical de l'hypertension artérielle.

Guide de thérapeutique pratique, Baillière éd. PIL; 51 pages.

156- SAFAR, M. E., SIMON, A.CH., LEVENSON, J. A. and CAZAR, J. L. (1983)

Hemodynamic effects of Diltiazem in hypertension.

Cir. Res. **52** (suppl.I): 169-173.

157- SAI RAM, ANJU, B., PAULINE, T., DIPTI, P., KIAN, A. K., MONGIA, S. S., SHARMA, S.K., SINGH, B., SINGH, R., ILAVAZHAGAN, G., DEVENDRA, K. and SELVAMURTHY, W. (2000)

Effect of Kombucha tea on chromate (VI)-induced oxidative stress in albino rats.

Journ. of ethnopharmacology, **71**: 235-240.

158- SCHWARTZ, A., BBARCHELARD, H. S. et MC ILWAIN, H. (1962)

The sodium stimulated ATPase activity and other properties of cerebral microsomal fractions and subfractions.

Biochem. J., **84**: 626.

159- SCHWINGER, R. H. G., BÖHM, M. and ERDMANN, E. (1990)

Negative inotropic properties of Isradipin, Nifedipin, Diltiazem and Verapamil in diseased human myocardial tissue.

J. cardiovasc. Pharmacol., **15**: 892-899.

160- SEIFEN, N., ADAMS, R. J. et REIMER, R. K. (1979)

Sanguinarine: a positive inotropic alkaloid which inhibits cardiac Na⁺, K⁺-ATPase.

Euro. J. Pharmacol., **60**: 373-377.

161- SINGH, B. N. and VAUGHAN-WILLIAMS, E. M. (1972)

A fourth class of antidyarrhythmic action?

Effect of verapamil on ouabain toxicity, on atrial and ventricular intracellular potentials, and on other features of cardiac function.

Cardiovas. Res., **6**: 109-119.

162- SOROLO, R. J., WISE, R. M., SHINRE, J. S. and BRIGGS, F. N. (1974)

Calcium requirement for cardiac myofibrillar activation;

Circ. Res., **34**: 525-530.

163- SPEDDING, M. (1985)

Calcium antagonists subgroups.

Trends pharmacol. Sci., **6** : 109-114.

164- SRINIVASAN, R., SMOLINSKE, S. and GREENBAUM, D. (1997)

Probable gastrointestinal toxicity of Kombucha tea; is a beverage healthy or harmful?

Journal of General Internal medicine, **12** (10): 643-644.

165- STEIGER, S., GENTINETTA, R. and BRODBECK, U. (1989)

Cholinesterase from flounder muscle. Purification and characterization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and collagen-tailed forms differing in substrate specificity.

Euro. J. Biochem., **181**: 633-642.

- 166- STEINKRAUS, K. H., SHAPIRO, K. B., HOTCHKISS, J. H. et MORTLOCK, R. P. (1996)**

Investigations into the antibiotic activity of tea fungus kombucha beverage.

Acta Biotechnologica, 16: 199-205

- 167- SUMNER, J. B. (1944)**

Crystallization of enzymes.

J. Biol, 100: 413-414.

- 168- TOMLINSON, G., MUTUS, B., McLENNAN, I. and OOIBROEK, M. (1982)**

Activation and Inactivation of Purified Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* by Lanthanum (III).

Biochemica et Biophysica Acta, 703: 142-148.

- 169- TREBISSOU, J. N. D. (2001)**

Action myostimulante de MISCA F₂ et son mécanisme biochimique sur le duodénum.

Thèse de doctorat 3^e cycle. Université de Cocody, Abidjan, 119 pages.

- 170- TROTZ, M., JELLISON, E. J. and HOSTETLER, K. Y. (1989)**

Propranolol inhibition of neutral phospholipases A of rat heart mitochondria, sarcoplasmic reticulum and cytosol.

Biochem. Pharmacol., 36: 4251-4256.

171- UMESH, R. D. (2000)

In "Cardiovascular Therapeutics: Cardiac Glycosides".
VCU School of Pharmacy, January-5: 1-9.

172- VEZINET, B.,BOURILLET, F. et BOULU, R. (1981) T

Détermination de la DL50.
Sci. et Tech. Pharmaceutique. Paris, 10 (6): 252-254.

173- VIGNY, M., GISIGER, V. and MASSOULIE, J. (1978)

Non specific cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues:
molecular forms, structural and catalytic properties and significance of
the two enzymes systems.
Proc. Nat. Acad. Sci; U.S.A.,, 675: 2588-2592.

174- WAEBER, B., NUSSBERGER, J. et BRUNNER, H. R. (1989)

Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications
thérapeutiques.
Edition Frison-Roche et Slatkine pp.265.

**175-WATANABE, A. M., MC CONNAUGHEY, M. M., STRAWBRIDGE,
R. A., FLEMMING, J. W., JONES, L. R. et BESCH, H. R. JR (1978)**

Muscarinic cholinergic receptor modulation of β adrenergic receptor
affinity for catecholamines.
J. Biol. Chem., 253: 4833-4836.

176- WEBB, J. L. and HOLLANDER, P. B. (1956)

The action of acetylcholine and epinephrin on the cellular membrane
potentials and contractility of rat atrium.

Circulat. Res., 4: 332-336.

177- WEINGARD, R., KOSS, R. S. and TSIEN, R. W. (1978)

Is digitalis inotropy associated with enhanced slow inward calcium current?

Nature, 273: 389-392.

178- WEISS G. B (1977)

Calcium and contractility in vascular smooth muscle.

in: NARAHASHI T., BIANCHI, C. P. eds. Advances in general and cellular pharmacol., II. New York: Plenum. 71-154.

179- WEITMAN, S. D., PHELAN, A. M., LECH, J.J. and LANGE, D. G; (1989)

Propranolol induced alterations in rat erythrocyte membrane fluidity and apparent phase-transition temperatures: A depth-dependent process.

Biochem. Pharmacol., 38: 2948-2955.

180- WERNER, W. K. (1984)

Treatment of hypertension with calcium channel blockers: European data. Am. J;med., spezial issue on calcium antagonists, 143-149.

181- WILSON, I. B. and BERGMAN, F. (1950)

Acetylcholinesterase : dissociation of the active groups.

J. Biol. Chem. 186 (2): 683-692.

- 182- YAMAMOTO, K., SHIMIZU, M., OHTANI, H., HAYASHI, M., SAWADA, Y. and IGA, T. (1996)**

Toxicodynamic analysis of cardiac effects induced by four cholinesterase inhibitors in rats.

J. Pharmacol., **48** (9): 935-939.

- 183- YANKOPOULO, N. A., KANNI, C., FREDERICI, E. E., ALDER, C. N. and ABELAMNN, W. H. (1968)**

The hemodynamic effects of ouabain upon the diseased left ventricle.

Am. Heart J., **76**: 466.

- 184- YANG, C.S. and WANG, Z.-Y. (1993)**

Tea and Cancer: review.

Journal of the National Cancer Institut, **85**: 1038-1049.

- 185- YUKERVICH, D. I. and KUTYSHENKO, V. P. (1998).**

Study of glucose utilisation during the growth of the tea fungus by ¹HNMR spectroscopy.

Biofizika, **43**: 319-322.

- 186- ZANNAD, F. (1988)**

Pharmacologie des antagonistes du calcium.

Rev. Prat. (Paris), **38** (27): 1965-1970.

RESUME

MAÏ-BAO est une boisson préparée à partir du thé sucré dans lequel on plonge le Champignon Thé-trésor. Au bout de deux semaines, le thé devient acidulé avec un goût semblable à celui de la citronnelle et prêt à être consommé.

Les études toxicologiques effectuées sur les rats avec M-B et ses quatre fractions, nous ont permis de constater que M-B et ses fractions ne sont pas toxiques. Les DMT et les DL_{50} sont très élevées et supérieures respectivement à 15000mg/kg de PC et 20000mg/kg de PC. Cependant, sur le système cardiovasculaire, M-B et ses fractions (MB-F₂ et MB-F₃) sont actives.

- MAÏ-BAO induit des effets cardiodépresseur et hypotenseur avec une $CI_{50} = 15\text{mg/ml}$ doublés d'effets cardiotonique et hypertenseur fugaces. Par conséquent, ces effets nous ont conduits au fractionnement de M-B qui pourrait contenir plusieurs substances à effets opposés. Des quatre fractions obtenues, seules les fractions MB-F₂ et MB-F₃ induisent des effets notables aussi bien sur la pression artérielle que sur l'activité cardiaque. Ainsi,

* La fraction MB-F₂ induit une hypotension et une cardiodépresseur dose-dépendantes avec une $CI_{50} = 5\text{mg/ml}$. Les expériences d'interaction effectuées d'une part entre M-B - Atr et MB-F₂ - Atr, ont montré que M-B et MB-F₂ seraient en partie cholinomimétiques et d'autre part, celles effectuées entre les solutions physiologiques de composition ionique modifiée (hyper Ca^{++} ; hyper Na^+) et les produits (MAÏ-BAO et MB-F₂), nous ont permis de constater que M-B et MB-F₂ contiendraient aussi des composés anticalciques.

* La fraction MB-F₃ et M-B, de par leur effets cardiotonique et hypertenseur non seulement, mais aussi de par leur action inhibitrice sur l'effet cardiodépresseur des milieux hyper Na^+ et hypo Ca^{++} , nous ont amenés à dire que MB-F₃ et M-B auraient des effets semblables à ceux des digitaliques.

La vérification des effets cholinergiques de M-B et MB-F₂ d'une part et des effets digitaliques de M-B et MB-F₃ d'autre part, a conduit à faire des études biochimiques :

M-B et MB-F₂ induisent un effet anticholinestérasique *in vitro* respectivement de 60,00% et de 70,00%. Ceci nous montre que MAÏ-BAO et MB-F₂ inhibent l'activité de l'AChE afin de renforcer l'action cardiodépresseur et hypotensive de l'acétylcholine.

MAÏ-BAO et MB-F₃ inhibent l'activité de l'ATPase *in vitro* respectivement de 14,644% et de 22,741%. Par conséquent, M-B et MB-F₃ agiraient comme les digitaliques en induisant des effets cardiotonique et hypertenseur.

En somme, les études effectuées ont montré que M-B contiendrait d'une part des substances cardiodépresseur et hypotensives exprimées dans la fraction MB-F₂ et d'autre part, une faible quantité de substances cardiotoniques et hypertensives retrouvées dans la fraction MB-F₃.

Mots clés : MAÏ-BAO ; cardiodépresseur ; hypotension ; cardiotonique ; hypertension ; anticholinestérasique ; antiATPasique ; M-B-F₂ ; M-B-F₃