

UNIVERSITE PARIS XII - VAL DE MARNE
FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS XII

Spécialité: Pharmacologie moléculaire et cellulaire

présentée par

YAO DATTE Jacques

SUR LE THEME:

**EFFETS PHARMACOLOGIQUES DE L'EXTRAIT DE
PARQUETINA NIGRESCENS (PERIPLOCACEAE) SUR
LA CONTRACTILITE DU MUSCLE CARDIAQUE ET DE
MUSCLES LISSES ISOLES DE MAMMIFERES**

Soutenu le 21 Janvier 1999 à 15 Heures 30

Membres du jury:

Professeur Alain BERDEAUX

Professeur Jean-François GIUDICELLI

Professeur Thomas HERDEGEN

Professeur Bernard SEBILLE, Président

Professeur Jean-Paul TILLEMENT, Directeur

Professeur Thomas UNGER

AVANT-PROPOS

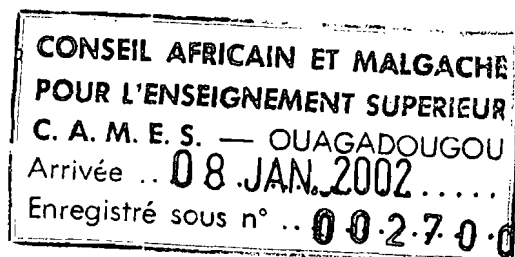
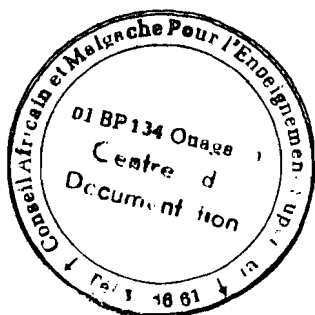
Le travail rapporté dans ce mémoire a été réalisé au Département de Pharmacologie de la section de Pharmacie de l'Université de Kiel (Allemagne), sous la direction scientifique du Professeur Docteur Albrecht ZIEGLER, au Département de Pharmacologie de l'Université de Kiel (Allemagne), et du Professeur Jean-Paul TILLEMENT, Directeur du Laboratoire de Pharmacologie de l'Université de PARIS XII, en collaboration avec l'Institut de Biologie Pharmaceutique de l'Université de Kiel (Allemagne) et l'Institut National de Floristique d'Abidjan (Côte d'Ivoire).

Institut de Pharmacologie:
Directeur: Professeur Thomas UNGER
Hospitalstrasse 4.
24 105 Kiel, Allemagne

en collaboration avec:

le Département de Pharmacologie
Directeur: Professeur Jean-Paul TILLEMENT
8, rue du Général Sarrail
94010 Créteil Cedex, France

l'Institut de Biologie Pharmaceutique
Directeur: Professeur Wolfgang BLASCHECK
Grasweg 9
24 118 Kiel, Allemagne



REMERCIEMENTS

J'ai le devoir et le plaisir d'exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur Docteur Albrecht ZIEGLER, Responsable de la section pharmaceutique du Laboratoire de Pharmacologie à l'université de Kiel, en Allemagne, qui a bien voulu m'accepter dans son Laboratoire. Qu'il soit persuadé de ma très vive reconnaissance.

J'exprime particulièrement mes sincères remerciements au Professeur Jean-Paul TILLEMENT, qui a accepté de me recommander et de juger mon mémoire, je me fais un agréable devoir de lui témoigner ma profonde gratitude pour toutes ses interventions qui ont facilité l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens également à remercier le Professeur Docteur Wolfgang BLASCHECK, Directeur de l'institut de Biologie Pharmaceutique à la faculté de Pharmacie de l'université de Kiel. Je lui adresse tous mes remerciements pour sa disponibilité.

...

Au Professeur Docteur Thomas UNGER, Directeur de l'institut de Pharmacologie de l'Université de Kiel. Je lui dis merci pour m'avoir accepté dans son institut.

...

Au Professeur Docteur Thomas HERDEGEN. Il m'a donné la preuve de toute l'importance qu'il accorde à mon travail. J'ai ainsi pu bénéficier de ses conseils et de ses recommandations. Qu'il soit persuadé de ma sincère admiration.

Au Professeur Jean François GIUDICELLI, de la Faculté de Médecine du Kremlin - Bicêtre, Je lui adresse tous mes sincères remerciements pour sa participation au jury de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Bernard SEBILLE, de l'Université de Paris XII, Val-De-Marne de Créteil, et lui dis merci pour sa participation au jugement de ce travail.

Au Professeur Alain BERDEAUX, Département de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre. Je lui adresse mes sincères remerciements pour le jugement de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Michel OFFOUMOU ATTE, au Laboratoire de Physiologie Animale d'Abidjan (Côte d'Ivoire), je lui dis merci. Il a su être, pour moi, non seulement un directeur scientifique, mais aussi un maître me prodiguant de sages conseils, qui ont permis l'aboutissement de ce travail.

J'exprime également mes sincères remerciements au Professeur KABLAN Brou, Directeur du Département de Pharmacologie à la faculté de pharmacie de l'Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire).

J'exprime mes vifs remerciements au Professeur Laurent AKE ASSI,
pour l'étude systématique et l'iconographie de *Parquetina nigrescens*.

Mes remerciements s'adressent également au personnel technique, notamment Mademoiselle Marion PAUER, pour son aimable collaboration et son assistance technique, de même qu'à tous mes amis, particulièrement à Hélène M. P. BRUN, André Désiré WAD, GBEDJO M.J. et toute l'équipe de travail de même qu'à Monsieur Johannes KRÄFTING, responsable de la communauté estudiantine catholique de Kiel (KSG) et le service allemand d'échanges inter-universitaires (DAAD).

Je ne saurais terminer sans remercier mon père, ma mère et toute ma famille pour leur affection et pour les nombreux sacrifices qu'ils ont généreusement consentis pour mon éducation. Je leur dédie ce travail.

Liste des abréviations

Afz. = Afzelius

ACh = Acétylcholine

α_1 -R = Récepteur alpha de type 1

β_1 -R = Récepteur bêta de type 1

DAG = Diacylglycérol

DMPP = Diméthyle-phényle-pipérenzine

EXPAR = Extrait de *Parquetina nigrescens*

IP3 = Inositol triphosphate

MgO = Oxyde de magnésium

mM = Millimole

mN = Milinewton

n-R = Récepteur nicotinique

N = Normale

NA = Noradrénaline

NMS = N-méthyle-scopolamine

6-OHDA = 6-hydroxydopamine

Rf = Référence de migration

Log = Logarithme

°C = Degré Celsius

HPLC = Chromatographie liquide à haute performance

Les travaux présentés dans cette thèse ont fait l'objet des publications suivantes :

1. Uterotonic effects of hydromethanolic extract of *Parquetina nigrescens* (Periplocaceae) on the spontaneous contractile activity in the isolated myometrium of pregnant rats. - Datté J. Y., Offoumou, A.M. and Manda, O. M. (1996) *Journal of Ethnopharmacology*, 53; p.15-20.
2. *Parquetina nigrescens* extract enhances the contractile force of cardiac and smooth muscles. - Datté J.Y., Offoumou, A.M. and Ziegler, A. (1996) *Suppl. Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol. 353 (4): R56, 194.
3. *Parquetina nigrescens* Contains an Indirect Sympathomimetic. - Datté, J.Y. and Ziegler, A. (1998) *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 357, 27.
4. Sympathomimetic effects of *Parquetina nigrescens* (Periplocaceae) extract in isolated portal vein smooth muscle. - Jacques Yao Datté, Albrecht Ziegler and Jean -Paul Tillement (1998) *General Pharmacology*, (in press).
5. Chromatography studies of *Parquetina nigrescens* (Periplocaceae). - J.Y. Datté, A. Ziegler and J. P. Tillement (1998) (submitted).

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	
REMERCIEMENTS	
1. INTRODUCTION	16
2. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES ET POSITION DU PROBLEME	21
2.1. Glycosides	22
2.1.1. Action sur la contractilité cardiaque	22
2.1.2. Action sur l'activité électrique cardiaque	24
2.1.3. Action vasculaire périphérique	
2. 2. Présentation de <i>Parquetina nigrescens</i>	25
2.2.1. Description éthno-botanique	
2.2.2. Usages thérapeutiques en Médecine Traditionnelle	
2. 3. Structure chimique des glycosides de <i>Parquetina nigrescens</i>	26
3. MATERIEL ET METHODES	30
3. 1. Matériel végétal	31
3.1.1. Systématique de <i>Parquetina nigrescens</i>	
3.1.2. Méthode de préparation de l'extrait végétal (EXPAR)	
3.1.3. Substances chimiques	33
3. 2. Matériel animal	33
3.2.1. Solutions physiologiques	34
3.2.2. Obtention des préparations	34
3. 3. Méthodes expérimentales	36
3. 3.1. Mesure isométrique de l'activité mécanique de l'oreillette de cobaye et de la veine porte	
3.3 2. Mesure isotonique de l'activité mécanique de	37

<i>Taenia coli</i> isolé de cobaye	
3. 3. 3. Stimulations électriques	38
3. 4. Déplétion des amines biogène et endogène	40
3. 5. Exploitation des résultats	40
3. 5. 1. Mécanogramme de la préparation auriculaire	
3. 5. 2. Mécanogramme de la préparation de <i>Taenia coli</i>	42
3. 5. 3. Mécanogramme de la préparation de la Veine porte	42
3. 6. Détermination de groupes chimiques d'EXPAR	45
3.6.1. Essais préliminaires	
3. 6. 2. Tests de reconnaissance de groupes chimiques	
3.6. 3. Etude en chromatographie	47
3. 6. 4. Chromatographie sur couche mince	48
3. 6. 5. Chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC)	48
3. 6. 5. 1. Appareillage	
3. 6. 5. 2. Conditions	
3. 6. 5. 3. Mesure spectrophotométrique	
3. 7. Analyse statistique	49
4. RESULTATS	51
4.1. Comparaison des effets d'EXPAR et de la strophantine G sur les contractions induites au niveau de l'oreillette isolée de cobaye	52
4.1.1. Courbes Dose - Réponse d'EXPAR	52
4.1.2. Influence de la fréquence de stimulation	55
4.1.3. Action de la strophantine G sur l'oreillette isolée	56
4.1. 4. Effets d'EXPAR et de la strophantine G: contracture et réversibilité de l'action d'EXPAR	59
4.1. 5. Influence de substances adrénolytiques sur	

l'effet d'EXPAR au niveau de l'oreillette isolée de cobaye	59
4.1.6. Dépendance calcique sur la contractilité auriculaire	72
4. 2. Effets d'EXPAR sur l'activité contractile spontanée du muscle lisse vasculaire de la veine porte	77
4. 2. 1. Effets des ions potassium	77
4. 2. 2. Courbe dose - réponse d'EXPAR, de la noradrénaline et de la Tyramine	79
4. 2. 3. Influence de la prazosine sur l'effet stimulant d'EXPAR, de la noradrénaline et de la Tyramine	79
4. 2. 4. Influence de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) sur l'effet stimulant de l'EXPAR, de la noradrenaline et de la Tyramine	89
4. 3. Influence d'EXPAR et de la strophantine G sur l'activité contractile induite du <i>taenia coli</i>	92
4. 3. 1. Effets comparés de l'EXPAR et de la strophantine G	94
4. 3. 2. Influence de l'atropine sur l'effet d'EXPAR au niveau de la contraction du muscle	94
4. 3. 3. Influence de l'hexaméthonium sur l'action stimulante de l'EXPAR et de la strophantine G	97
4. 4. Recherche de séparation des substances actives contenues dans l'extrait de <i>Parquetina nigrescens</i>	97
4. 4. 1. Tests de reconnaissances de principes actifs	
4. 4. 2. Etude en chromatographie	99
5. DISCUSSION	104
5.1.Effets digitaliques d'EXPAR au niveau de l'activité contractile auriculaire de cobaye: Influence des récepteurs bêta	105
5. 2. Effets sympathomimétiques indirects d'EXPAR Influence des récepteurs alpha dans l'action stimulante	

d'EXPAR au niveau de la veine porte isolée de rat	110
5. 3. Effets d'EXPAR sur les mécanismes cholinergiques	114
6. CONCLUSION	117
BIBLIOGRAPHIE	120

1 - INTRODUCTION

L'utilisation de médicaments d'origine végétale a toujours eu une importance capitale dans la thérapeutique moderne. Les recherches mises en place pour explorer les plantes médicinales concernent, avant tout, le recensement des plantes auxquelles ont recours les populations, les particularités écologiques des divers milieux naturels tels que les forêts, les savanes, ensuite les modes de préparation et d'administration du remède, les maladies et les symptômes pour lesquels il est proposé, enfin les effets pharmacologiques et ses indications thérapeutiques.

Si nous sommes unanimes pour reconnaître l'importance des substances végétales dans la thérapie moderne, il n'est cependant pas toujours aisé de préciser les effets pharmacologiques et les objectifs thérapeutiques possibles d'une espèce végétale.

Ainsi, l'intérêt que la Recherche Scientifique et Médicale porte au traitement des maladies cardiovasculaires est allé grandissant. De nos jours, ces maladies constituent l'une des principales causes de mortalité, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en développement et frappent actuellement des sujets de plus en plus jeunes. Les causes et mécanismes de ces maladies, aussi bien dans le domaine vasculaire que dans le domaine cardiaque, sont souvent complexes et variés et qu'en partie identifiés.

Les études permettant d'expliquer les mécanismes mis en jeu dans leur genèse, ainsi que la recherche de produits nouveaux susceptibles d'avoir des effets bénéfiques sont d'actualité.

C'est pourquoi, parallèlement au développement de substances de synthèse, l'exploration du règne végétal, la recherche de produits nouveaux et l'analyse de leurs mécanismes d'action, s'avèrent indispensables; D'autant plus que, selon le Professeur René PARIS (1978), un tiers au moins de la flore médicinale du Globe terrestre reste encore inexploré : cela offre donc des possibilités énormes de mise en évidence de médications nouvelles

Même si tous les principes actifs de certaines espèces végétales sont actuellement identifiés et souvent synthétisés, leurs mécanismes d'action paraissent encore obscurs et leurs effets thérapeutiques incomplets; ils entraînent parfois des effets secondaires extrêmement gênants (cas des glycosides).

En Afrique, depuis toujours, le traitement des maladies en tout genre est assumé par des „guérisseurs traditionnels" ou encore Tradithérapeutes dont la „science" est basée sur l'utilisation d'extraits de plantes sous forme d'extraits totaux en: décoctions, infusions, pulvérisations, calcinations, broyages....

La disparition progressive des guérisseurs est un danger pour la conservation des connaissances et des pratiques thérapeutiques. Dans les pays africains, où pour la majorité de ces guérisseurs, la tradition orale est le seul mode d'expression, l'étude de la pharmacopée traditionnelle s'avère indispensable et pressante.

L'utilisation des substances naturelles par les Tradithérapeutes relève de pratiques souvent mystiques, transmises de génération en génération. La préparation des médicaments à partir de substances naturelles reste encore de nos jours, un secret.

Cependant, si l'utilisation de telles substances est basée sur de solides connaissances empiriques et ancestrales, transmises de génération en génération, et continue aujourd'hui de faire ses preuves en venant même, dans bien des cas, en complément de la Médecine moderne, il est toutefois nécessaire de reconnaître que l'efficacité de ces substances serait renforcée si leur obtention et leur utilisation pouvaient bénéficier de conditions d'extraction et de connaissances scientifiques rigoureuses (élimination de déchets, purifications partielles, connaissance précise des doses efficaces et létales, amélioration des espèces végétales et de leurs cultures, identification des molécules actives...).

Les études systématique et ethnobotanique d'AKE ASSI (1991), menées en Côte d'Ivoire, lui ont permis de recenser 1421 espèces de plantes médicinales et 761 recettes médicamenteuses. Des études scientifiques rationnelles sont

nécessaires pour rechercher les propriétés thérapeutiques de ces espèces végétales.

C'est donc pour répondre à ces préoccupations d'une part, et dans le but de mettre au point un produit nouveau ou un produit à mécanisme d'action original pour le traitement des troubles cardiaques d'autre part, que cette étude a été menée sur les extraits d'une plante de la région Akan dans le Sud et l'Est de la Côte d'Ivoire: *Parquetina nigrescens* (Afz.) (famille des Périplocacées).

Dans le cadre de ce travail, notre choix a porté sur cette plante à cause de ses nombreuses utilisations en Médecine traditionnelle. En effet, à proximité des villages de la région littorale, cette espèce est employée pour faciliter les accouchements, comme diurétique et pour le traitement de diverses affections comme la conjonctivite, l'asthme bronchiale. Des études préliminaires ont montré des propriétés stimulantes des muscles lisses et en particulier une action utérotonique au niveau de rate gravide (Datté et al., 1996).

Ce travail réalisé sur l'extrait de *Parquetina nigrescens* (Afz.) a pour objectifs:

1. de mener une étude comparative entre la Strophantine-G cardiotonique, bien connue pour ses propriétés digitaliques et l'extrait obtenu à base de feuilles de *Parquetina nigrescens*, afin d'expliquer son mécanisme d'action au niveau cardiaque.
2. de comparer les effets sympathomimétiques provoqués par l'extrait des feuilles de *Parquetina nigrescens* avec ceux observés avec la noradrénaline.
3. de reconnaître, par les techniques de séparation de chromatographie sur couche mince (DC) et à haute performance (HPLC), les structures chimiques responsables des activités biologiques de l'extrait.

4. de proposer un mécanisme d'action de la substance extraite de *Parquetina nigrescens* au niveau des différentes structures musculaires excitables étudiées au cours de ce travail.

2 - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

2. 1. Glycosides

Sous le terme de Phytothérapie sont regroupés les médicaments qui sont des préparations végétales prêtes à être utilisées chez l'homme. La plupart d'entre elles renferment des principes actifs. Ces principes actifs pris séparément, n'exercent souvent que des activités biologiques plus faibles. Il s'agit, de ce fait, de complexes de substances possédant une activité thérapeutique remarquable.

En phytothérapie, l'utilisation de terme „glycosides" pour traiter les cardiopathies remonte au 16^{ème} siècle. Cette observation a été faite par BAUMGARTEN (1963) avec l'espèce *Papyrus ebers*. Dans son ouvrage de 1542 pages sur les espèces végétales „*de historia stirpium*", Leonhardt FUCHS a décrit les effets cardiaques de l'espèce végétale *Digitalis lanata*. Le nom digitale, vient de la description de cette espèce.

De très nombreux travaux, depuis ceux de WITHERING en 1785, ont été consacrés au mécanisme d'action des digitaliques cardiaques. La strophantine G, la digoxine et la digitoxine sont respectivement extraites et purifiées à partir de *Digitalis purpurea* Ehr., *Strophanthus kombé* Oliv. et *Digitalis lanata*.

Tous les glycosides cardiaques connus renferment les mêmes effets qualitatifs mais diffèrent au niveau de la quantité. Le mode d'utilisation de ces substances s'est nettement amélioré ces dernières années. Cela résulte avant tout de la recherche et de l'isolement de principes actifs purs, par exemple la digitoxine isolée de *Digitalis purpurea* et la digoxine extraite de *Digitalis lanata*. Les substances actives des espèces digitaliques sont les glycosides (MASON et BRAUNWALD, 1964; WEISSLER et al., 1964; MASON et al. 1969, PUECH, 1977, HERZIG, 1987, SANTANA et al., 1998).

2. 1. 1. Actions sur la contractilité cardiaque

L'effet inotrope positif des glycosides cardiotoniques a longtemps été attribué à l'inhibition qu'ils exercent sur le fonctionnement de la pompe métabolique $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -

ATPasique (SCHATZMANN, 1953; REPKE, 1965; AKERA, 1970). Par la suite, plusieurs hypothèses ont été avancées qui n'attribuent plus exclusivement l'effet inotrope positif à la seule inhibition de la pompe métabolique. Mais, elles proposent, une possible dissociation des deux phénomènes (MURTHY, 1972). Enfin, cet inotropisme positif peut, également, résulter d'une action directe des substances sur les sites myocardiques calciques (KLAUS, 1967; LEE et KLAUS, 1971). Si une telle action existe, elle dépend de l'échange sodium - calcium au niveau de la pompe $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ (NEW et TRAUTWEIN, 1972).

Les glycosides cardiotoniques en inhibant l'activité de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dépendante, entraînent un accroissement de la concentration sodique intracellulaire et une accumulation d'ions calcium dans la cellule qui viennent s'ajouter aux réserves intracellulaires disponibles pour la contraction. Ces échanges calciques étant sous la dépendance de la pompe $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, le développement du courant entrant lent n'est pas toujours nécessaire (VASSORT, 1973; Mac DONALD et al., 1975; RICH et LANGER, 1975).

Enfin, très récemment, l'idée d'une possible activation de cette même pompe métabolique $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasique}$ a été avancée. Elle permettrait d'expliquer le mécanisme d'action des glycosides cardiotoniques à faibles doses ou concentrations (COHEN et al., 1976, LÜLLMANN et PETERS, 1976); l'inhibition de la pompe ne se produisant qu'à forte dose. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer les différents effets obtenus au niveau de l'activité électrique cardiaque en fonction des concentrations.

2. 1. 2. Action sur l'activité électrique cardiaque

Les glycosides cardiotoniques sont connus pour modifier certains paramètres

:

- du potentiel d'action des fibres de Purkinje (CORABOEUF et al., 1953)
- du potentiel d'action ventriculaire (HOFFMAN ET SINGER; 1964; ITO et al., 1970).
- du potentiel d'action auriculaire (SLEATOR et al., 1964).

Si les nombreux travaux consacrés à leur étude ont le plus souvent conduit à des résultats assez similaires, il n'est souvent pas moins vrai que les interprétations divergent selon les auteurs, compte tenu de l'extrême diversité des conditions d'expériences: fréquence de stimulation, concentration de l'hétéroside, conditions d'oxygénation, température, pH, espèce animale, fraction tissulaire utilisée...

D'une manière générale, l'action des glycosides cardiotoniques sur l'activité électrique cardiaque est double :

- à faible concentration, ils augmentent les durées et l'amplitude du potentiel d'action (NOBLE 1976; TOKPANOU, 1978).
- à forte dose ou concentration, les effets produits sont négatifs; ils provoquent une chute du potentiel de membrane, avec modification du décours et de l'amplitude du potentiel d'action. Ils raccourcissent sa durée en inhibant l'activité de la pompe métabolique $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasique et ralentissent enfin la vitesse de dépolarisation rapide. L'activité contractile est dans tous les cas facilitée, cela permet d'affirmer que les deux types d'action sont parfaitement dissociés.

2.1.3. Action vasculaire périphérique

Chez le sujet normal, les glycosides cardiotoniques n'augmentent pas le débit cardiaque, et parfois même, le diminuent (BRAUNWALD et al., 1961).

Au cours de l'insuffisance cardiaque avérée, l'état hémodynamique est dominé par une augmentation de l'activité du système sympathique, avec vasoconstriction artériolaire et veineuse systémique. Dans ces conditions, l'action des glycosides cardiotoniques se traduit par une vasodilatation artériolaire et veineuse qui s'accompagne d'une augmentation du débit cardiaque, essentiellement due à l'action inotrope positive de ces substances. Cette action vasodilatatrice indirecte entraîne une augmentation importante du retour veineux, améliorant ainsi dans une certaine mesure, le débit cardiaque, et diminuant la résistance à l'éjection.

2. 2. Présentation de *Parquetina nigrescens*

2. 2. 1. Description ethnobotanique

Parquetina nigrescens (Afz.) BULLOCK (Periplocaceae) est une plante tropicale très répandue en Afrique occidentale. Jusqu'en 1961, la plante a été désignée sous le nom de *Periploca nigrescens* de la famille des Asclépiadacées, sous-famille des Périplocoidées. L'identification de *Periploca* avec *Parquetina* a été faite par DUPARQUET, missionnaire au Gabon, qui en 1863, a découvert la plante. CHEVALIER (1952) rapporte que *Parquetina nigrescens* sert de poison de flèches. Elle est l'une des trois espèces de plantes auxquelles les chasseurs ont recours. Les deux autres sont: *Acokanthera* et *Strophanthus* (ou encore le poison APS). En Afrique occidentale et centrale, *Parquetina* et *Strophanthus* ont les mêmes fonctions. Ces plantes sont extrêmement toxiques, mais possèdent des propriétés semblables dans leur mode d'emploi ((ANGENOT, 1934; DEGROOTE, 1960). On les retrouve depuis le Sénégal jusqu'au Kenya.

2. 2. 2. Usages thérapeutiques en Médecine Traditionnelle

Parquetina nigrescens est une plante mise à profit en Médecine Traditionnelle. Chaque partie de la plante est employée à une fin médicale. La liane est utilisée pour faciliter les accouchements dans la Médecine Traditionnelle. L'extrait des feuilles provoquent une augmentation des contractions du myomètre (DATTE et al., 1996)

En Côte d'Ivoire, les peuples Attié se lavent en cas de fatigue générale avec la décoction de racines. L'extrait de racine est appliqué par voie orale en cas de dysenterie (NEUWINGER, 1994). Une petite quantité de décoction de feuilles diluées sert de boisson au groupe ethnique Ando en cas de fièvre jaune. De même, pour soigner cette fièvre, l'on instille dans les yeux des gouttes d'extrait de feuilles.

Au Sénégal, le latex obtenu du jus des feuilles sert pour le traitement de la conjonctivite grave et les feuilles macérées comme diurétique. L'écorce pulvérisée est employée comme aphrodisiaque (BOUQUET, 1967)

Au Togo, les racines sont utilisées en cas d'intoxication par la nicotine: une décoction aqueuse provenant de 100 g de racine et 3 morceaux de citron provoquent un recul du fumeur devant le tabac (TANNO, 1981).

Dans certaines régions du Ghana, pour lutter contre le rachitisme, les enfants se baignent avec le macéré de feuilles fraîches. Le jus de feuilles sert contre les diarrhées et la dysenterie. Comme diurétique, quelques gouttes du macéré de la plante sont mélangées dans du vin de palme (MERCIER et VIGNOLI, 1939).

2. 3. Structures chimiques des glycosides de *Parquetina nigrescens*

Des études chimiques ont été menées sur les différentes parties de *Parquetina nigrescens*. Les travaux de recherche avec le bois et l'extrait de racine ont débutés au milieu de notre siècle, lorsque REICHSTEIN et son groupe de travail, ont isolé les premiers cristaux du principe actif à partir de *Parquetina nigrescens* (SCHENKER et al., 1954). *Parquetina nigrescens* est une plante qui renferme beaucoup de cardénolides (Fig.1). Le bois et l'écorce contiennent les cardénolides : strophantidine et strophantidiol (MAULI et TAMM, 1957; SCHENKER et al., 1963; HILBERTH et HILBERTH, 1968).

Les recherches sur les complexes cardénolides de *Parquetina nigrescens* (Afz.) ont montré que, la plante renferme un grand nombre de glycosides cardiaques dont le principe actif isolé est la nigrescigénine (STANLEY, 1908; SCHENKER et al., 1954; BERTHOLD et al, 1965, BRANDT et al., 1966) et dont la structure a été élucidée en 1965.

Les autres travaux, conduits dans le sens de l'isolement et de la reconnaissance des principes actifs, ont été menés grâce à la technique de séparation chromatographique sur cou. Ainsi les molécules des sarmentogénine,

périplorhamnoside, strophadogénine et convallatoxine ont été obtenues. Nigrescigénine et périplogénine ont été isolées à partir de l'extrait du bois (SCHENKER et al., 1954).

Au niveau de l'écorce, aucune trace d'alcaloïde, de saponine, de chinone, de stérol ou de tannins n'a été trouvée (BOUQUET, 1967). Les recherches sur les cardénolides polaires faibles ont permis à SAKUMA et al. en 1975 d'isoler une génine et un sucre: le D - cymarose. OGUNDAINI et OKAFOR (1987) ont montré la présence de triterpènes, d'acide ursique, de flavonoides, d'apigénine et d'isorhoifoline, un apigénine 7-O-rutinoside dans les feuilles séchées.

Par la technique de fractionnement en chromatographie sur gel de silicate, MARKS et al. (1975) ont mis en évidence trois cardénolides: la strophantidine, la strophantidine-glucoside et, dans la racine de *Parquetina*, la cymarine.

Jusqu'à présent, les cardénolides de *Parquetina nigrescens* connus sont au nombre de huit. Comme composante en sucres, le L - rhamnose, le D - glucose, le D - digitoxose et le D - cymarose ont été isolés. Les génines libres, que l'on retrouve sont autre que strophantidine: le 16- β -acetoxy-strophantidine, le 16- β -hydroxy-strophantidine (strophadogénine), et en grande quantité, le 16-dehydro-strophantidine.

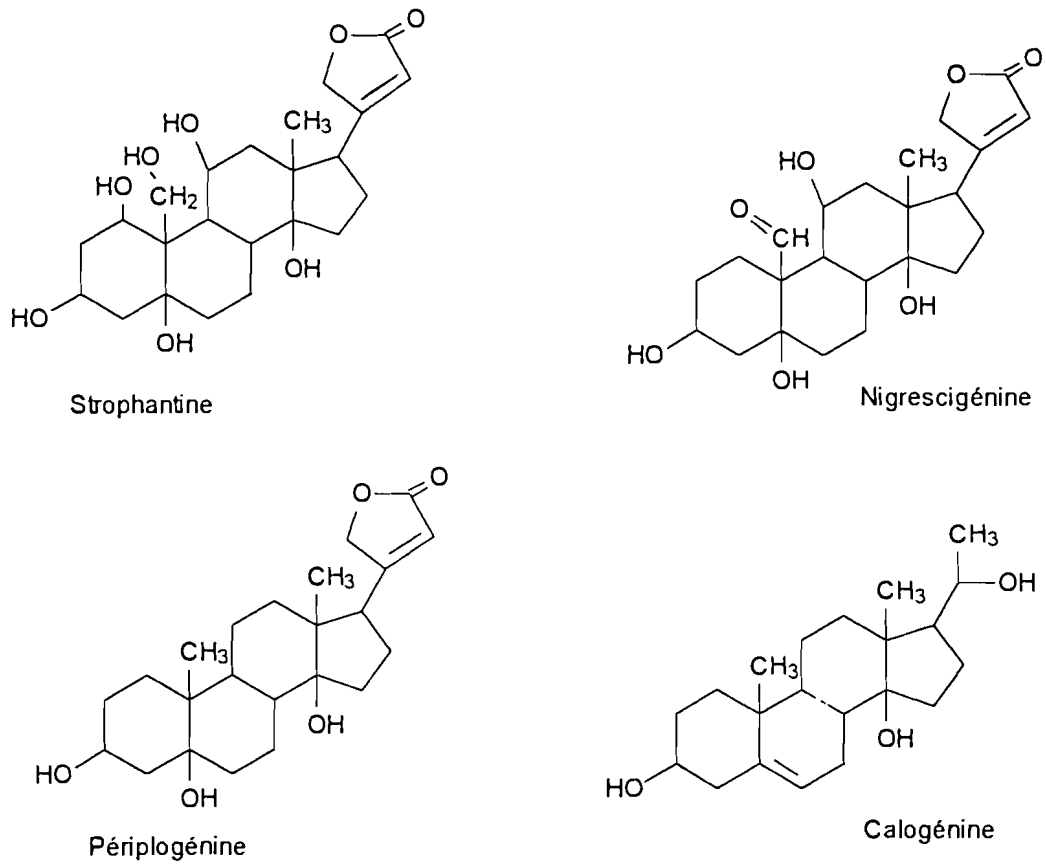


Figure 2 : Représentation des structures de cardénolides obtenues à partir de *Parquetina nigrescens* :

La quantité de nigrescigénine obtenue dans l'extrait s'élève entre 5 et 8 %.

Les glycosides cardiotoniques, connus depuis des siècles, sont représentés par les glycosides cardiaques appelés encore digitaliques. Elles sont à la base du traitement de l'insuffisance cardiaque chronique. Ces substances se trouvent dans les plantes, en particulier la digitale pourpre. C'est le type même de médicament très efficace, mais à marge thérapeutique étroite.

La familiarisation avec l'utilisation des glycosides les plus utilisés de la digoxine et la digitoxine devrait permettre de pouvoir faire face à la plupart des situations cliniques. Accessoirement, l'ouabaine (ou strophanthine G) est parfois utilisé en urgence; leur utilisation n'est toutefois pas recommandée pour les traitements chroniques (SHAPIRO et al., 1969; JÖRGENSEN et SÖRGENSEN, 1970; LICHEY SCHROEDER, 1977 et LEHMANN et al., 1978).

3 - MATERIEL ET METHODES

3.1. Matériel végétal: *Parquetina nigrescens*

Parquetina nigrescens (Afzel.) BULLOCK (1961) est une plante répandue en Afrique occidentale depuis le Sénégal jusqu'au Nigeria. Cette espèce végétale, rencontrée dans les régions forestières tropicales, bourgeonne de janvier à mars et fleurit en juillet (HARAKO, 1976). Ses fleurs sont violettes et ses feuilles de taille et de forme très variables. L'espèce *Parquetina nigrescens* est connue sous le nom de Saniwi par le peuple Abron en Côte d'Ivoire.

3. 1. 1. Systématique de la plante

La description systématique a été faite par ENGLER (1964) :

Embranchement: Spermaphytes
 Sous-embranchement: Angiospermes
 Classe: Dicotylédones
 Sous-classe: Gamopétales
 Ordre: Gentianales (Asclepiadaceae)
 Famille: Périplocaceae
 Sous-famille: Périplocoideae
 Genre: *Parquetina*
 Espèce: *nigrescens*

3. 1. 2. Méthode de préparation de l'extrait de *Parquetina nigrescens*

Pour l'obtention de l'extrait de *Parquetina nigrescens*, les feuilles sont séchées à température de laboratoire de 25° C (date de récolte: décembre 1995). L'identification de l'ensemble du matériel végétal a été confrontée avec celle du matériel authentique recueilli au jardin botanique de l'université d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Les feuilles de la plante ont une odeur faiblement aromatique et un goût amer. Les différentes phases d'extraction sont résumées dans le tableau synoptique suivant :

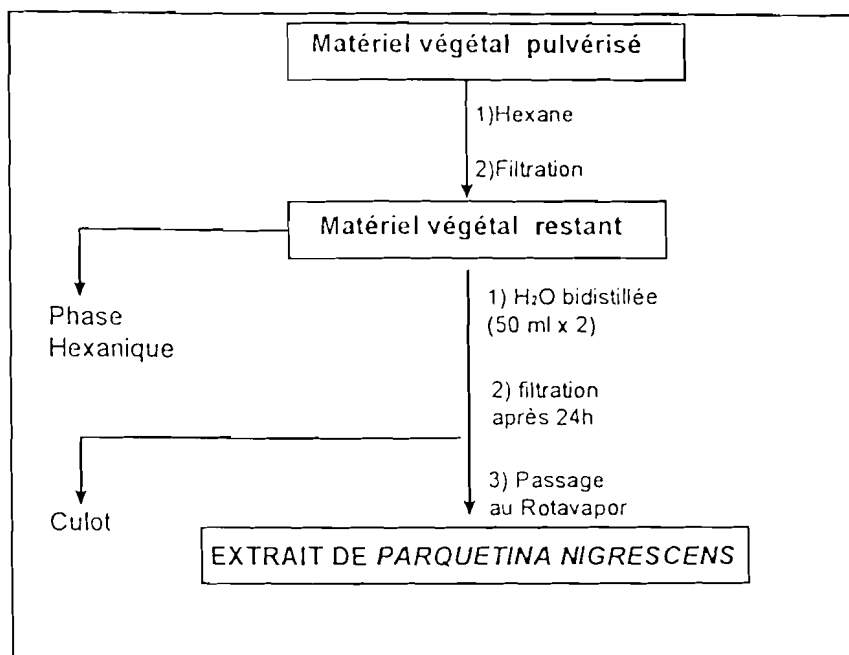


Figure 3: Tableau synoptique d'extraction de *Parquetina nigrescens* (EXPAR) :

Les feuilles sont utilisées; quantité de matériel de départ, environ 10 g, hexane 25 ml, quantité finale d'extrait obtenue 1 g soit un rendement de 10 %.

3. 1 . 3. Substances chimiques

Ci-dessous sont indiquées par ordre alphabétique les différents réactifs pharmacologiques employés au cours des expérimentations avec les laboratoires de provenance:

Substances:	Laboratoires d'approvisionnement:
Carbachol	Merck, Darmstadt, Allemagne
Diméthyl-4-Phényl Pipérazine	Pharmaceutica Aldrich Europa Beerse, Belgique
Digitoxine	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Hexaméthonium	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Hexobarbital	Bayer Leverkusen; Allemagne
6-hydroxydopamine	Aldrich Chemical Co. Allemagne
Isoprénaline (Isoprotérénol)	Sigma Chemical Co, St.Louis, USA
Noradrénaline	Hoechst A.G., Frankfurt, Allemagne
Prazosine	Aldrich Chemical Co. Allemagne
Propranolol (chlorhydrate)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
strophantine G	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Tyramine	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Vérapamil	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Toutes les substances qui n'ont pas été citées sur cette liste proviennent des laboratoires Merck (Darmstadt, Allemagne).

3. 2. Matériel animal

Les animaux, utilisés au cours des différentes manipulations, ont été élevés à l'Animalerie du Département de Pharmacologie de l'université de Kiel (Allemagne). Les animaux en provenance de l'extérieur sont acclimatés pendant au moins une semaine avant leur utilisation. Ils sont nourris aux granulés et abreuvés *ad libitum*.

3. 2. 1. Solutions physiologiques

Les expériences sont réalisées dans une solution physiologique standard de Tyrode de Muralt, ayant la composition chimique suivante (mM) :

NaCl	136,9
KCl	2,70
CaCl ₂	1,8
NaHCO ₃	11,90
MgCl ₂	1,1
NaH ₂ PO ₂	0,21
Glucose:	5,5
et l'eau distillée	un litre

La solution de Tyrode dans laquelle se trouve la préparation est oxygénée à l'aide de carbogène, composé de 95 % O₂ et de 5 % CO₂, et à un débit d'une bulle par 5 secondes. La température du bain à organe isolé contenant la solution physiologique de Tyrode est maintenue à 32° C ou 35° C selon la préparation biologique utilisée.

La solution de Tyrode riche en potassium (80 mM) est utilisée pour la dépolarisation de la préparation. Dans ces conditions, pour maintenir l'osmolarité, la concentration du soluté NaCl est réduite à 97 mM et celle de KCl augmentée à 37,3 mM.

Pour éviter la rapide dégradation *in vitro* des catécholamines, une quantité de 100mg/l d'acide ascorbique (Vitamine C) est additionnée à la solution normale de Tyrode comme antioxydant.

3. 2. 2. Obtention des préparations

Des rats mâles de souche Wistar, pesant de 250 à 300 g et des cobayes mâles et femelles ayant un poids de 400 à 500 g ont été utilisés pour les différentes

expérimentations. Ils sont sacrifiés par dislocation cervicale et par ouverture de la veine jugulaire. La veine porte est prélevée chez le rat. Les oreillettes et le *Taenia coli* sont prélevés chez le cobaye.

3. 2. 2. 1. Préparation de l'oreillette isolée de cobaye

Après avoir sacrifié l'animal, on procède immédiatement à une laparotomie médiane. Le coeur, libéré du péricarde, est isolé après ouverture du thorax. Les deux oreillettes sont débarrassées rapidement des grandes et petites artères dans une boîte de Pétri. Cette boîte est remplie de solution physiologique de Tyrode oxygénée avec du carbogène. Les deux oreillettes sont soigneusement séparées de l'ensemble du muscle cardiaque.

Après l'isolement des deux oreillettes, l'une des deux extrémités d'une oreillette est attachée avec un fil de tresse qui porte un noeud ouvert de 3 mm de diamètre. Ce noeud permet d'accrocher la préparation biologique à une jauge de contrainte. L'autre extrémité porte un noeud pendu permettant la fixation de la préparation sur les électrodes de platine.

3. 2. 2. 2. Préparation de la veine porte de rat

Après une laparotomie, la veine porte est débarrassée de la graisse et des tissus adhésifs. Une longueur d'environ 8 mm est ainsi obtenue et déposée dans une boîte de Pétri contenant la solution de Tyrode, oxygénée avec du carbogène. La veine est isolée et disséquée des autres bifurcations. La dissection est effectuée sous un microscope optique de type Olympus SZ₄₀. Après l'isolement des bandelettes de 3 mm de long, l'une des deux extrémités est attachée avec un fil de tresse qui porte un noeud ouvert de 3 mm de diamètre. Ce noeud permet d'accrocher la préparation biologique à une jauge de contrainte. L'autre extrémité porte un noeud pendu permettant la fixation de la préparation.

3. 2. 2. 3. Préparation du *Taenia coli* de Cobaye

Après avoir isolé le coeur de l'animal, le *Taenia coli* est prudemment séparé du colon, à l'aide d'une paire de ciseaux fins. L'organe est déposé dans une boîte de Pétri contenant la solution de Tyrode, oxygénée avec du carbogène. Comme précédemment, les deux bouts de la préparation d'une longueur de 4 mm, sont noués à l'aide de fil de tresse permettant ainsi sa fixation à la jauge de contrainte de force isotonique.

3. 3. Méthodes expérimentales

3. 3. 1. Mesure isométrique de l'activité contractile et de la fréquence cardiaques

La mesure de l'activité contractile de l'oreillette de cobaye et de la veine porte s'effectue de façon isométrique. Les oreillettes droite et gauche sont prudemment séparées et déposées dans un bain à organe de 20 ml sur deux électrodes de platine, reliées à une jauge de contrainte SWEMA (Stockholm, Suède) tenue de façon verticale parallèlement à la préparation.

La solution de Tyrode contenue dans le bain à organe isolé est oxygénée par du carbogène (95 % O₂ et 5 % CO₂) de pH égal à 7,3 - 7,4. La température du bain, dans lequel un système de circulation de l'eau est adapté, est maintenue constante, à l'aide d'une pompe thermostatée, à 32° C.

La préparation est fixée dans le bain de 20 ml, grâce à un fil de tresse qui permet la liaison avec la jauge de contrainte. L'enregistreur de type HELLIGE (Fribourg, Allemagne) reçoit directement le phénomène contractile grâce à un amplificateur SERVOMED (Fribourg, Allemagne, Fig. 4). La préparation est conditionnée à une tension maximale 10 mN.

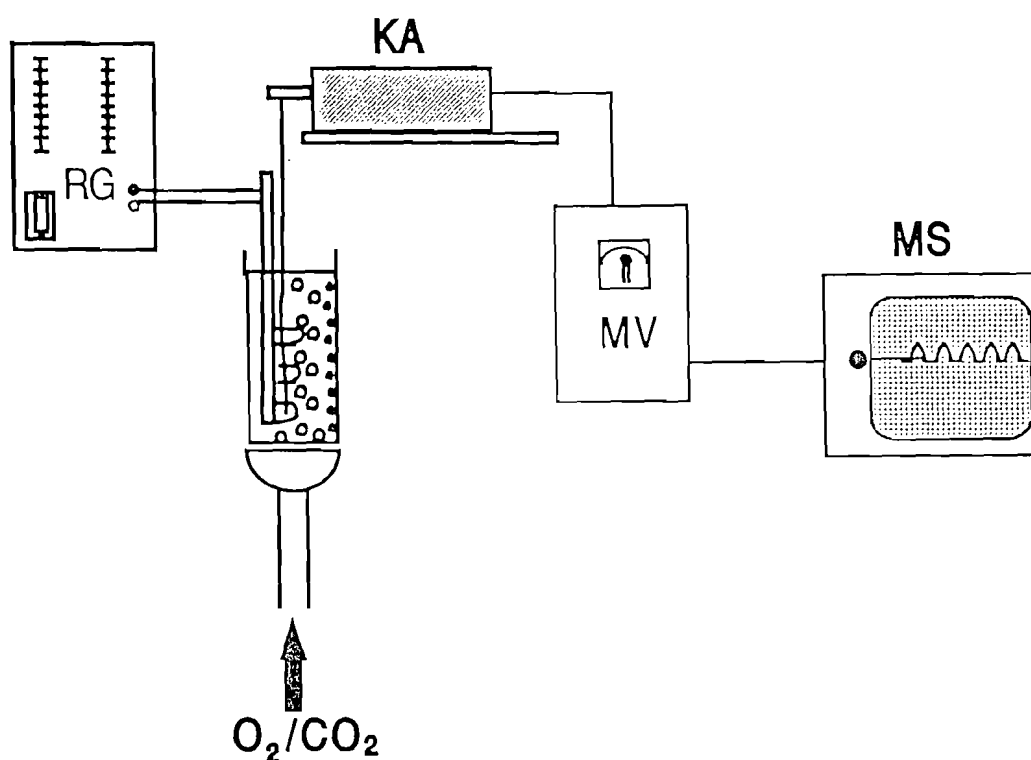


Figure 4: Représentation schématique de l'appareil d'enregistrement de la force contractile isométrique développée par la veine porte isolée de rat.

La préparation se trouve dans une solution physiologique à 32° C, continuellement oxygénée avec du carbogène. Les électrodes de platine contenues dans le bain à organe isolé permettent la stimulation de la préparation. Les impulsions électriques sont délivrées à partir d'un stimulateur (RG). Une jauge de contrainte (KA) permet la transmission des phénomènes contractiles à un enregistreur (MS) par le biais d'un amplificateur (MV).

3. 3. 2. Mesure isotonique de l'activité mécanique du *Taenia coli*

La mesure de l'activité électrique du *Taenia coli* est enregistrée de façon isotonique. Les morceaux de muscle (5 mm de long) sont obtenus et accrochés à la jauge de contrainte. L'autre bout est fixé dans un bain à organe isolé de 20 ml. Quatre préparations sont parallèlement montées sur deux électrodes de platine dans un bain à organe de 20 ml. Elles sont reliées par un fil de tresse à une jauge de contrainte.

La solution de Tyrode contenue dans le bain à organe isolé est oxygénée par du carbogène de pH égal à 7,3 -7,4. Comme dans le cas précédant, la température du bain, dans lequel un système de circulation d'eau est adapté, est maintenue constante à 35° C, à l'aide d'une pompe thermostatée.

L'enregistreur (Type Hellige, Fribourg, Allemagne) reçoit directement le phénomène contractile de façon isotonique grâce à un amplificateur HUGO SACHS (March-Hugstetten, Allemagne). L'enregistreur de type RIKADENKI (Fribourg, Allemagne) reçoit directement la contraction grâce à un amplificateur HF- MODEM (Fribourg, Allemagne, Fig. 5). La préparation est conditionnée à une tension 10 mN.

3. 3. 3. Stimulations électriques

Un appareil de stimulation délivre les impulsions au niveau des faisceaux de l'oreillette gauche à raison de 5 msec. par impulsion. La fréquence de stimulation est réglée à 3 HZ. C'est dans ces conditions que des amplitudes de contraction sont appréciables.

L'oreillette droite se contracte spontanément et n'a donc pas besoin d'être stimulée. Ainsi pouvons-nous apprécier aussi bien l'évolution de la force contractile que de la fréquence cardiaque. Le temps de préparation, du sacrifice de l'animal à la stimulation de la préparation, dure pratiquement 5 minutes

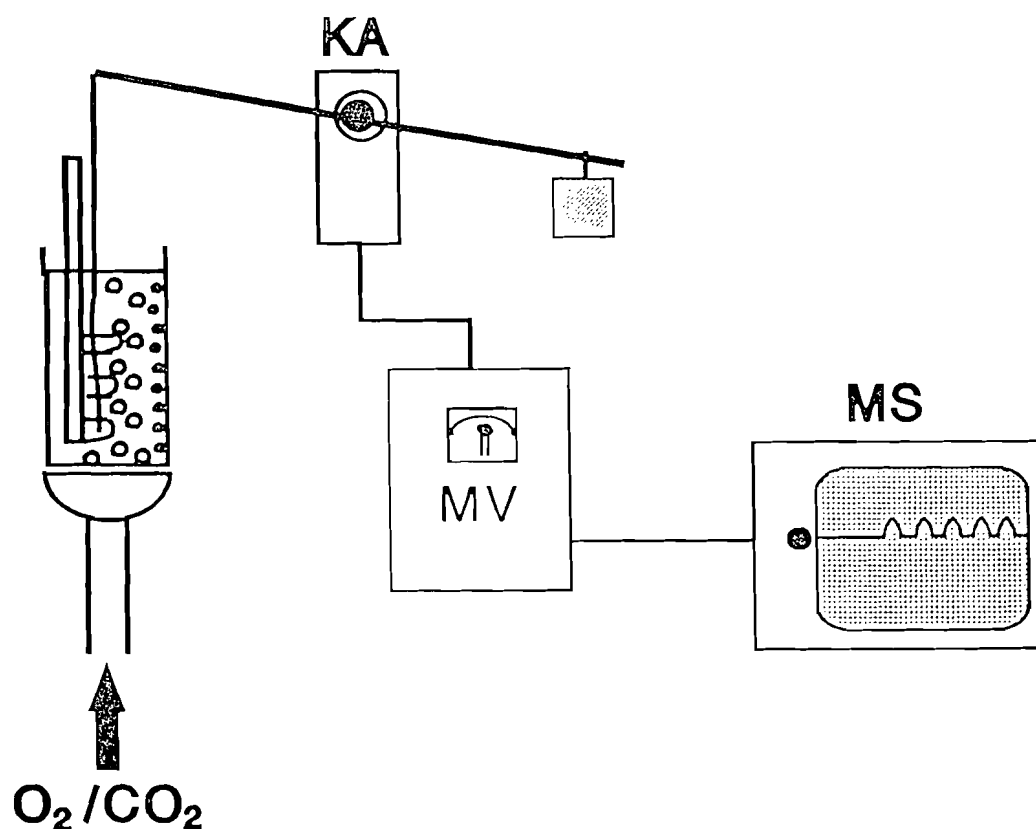


Figure 5: Représentation schématique de l'appareil d'enregistrement de la force contractile isotonique développée par le *Taenia coli* de cobaye.

La préparation se trouve dans une solution physiologique à 35° C, continuellement oxygénée avec du carbogène. Les électrodes de platine contenues dans le bain à organe isolé permettent la stimulation de la préparation. Les impulsions électriques sont délivrées à partir d'un stimulateur (RG). Une jauge de contrainte (KA) permet la transmission des phénomènes contractiles à un enregistreur (MS) par le biais d'un amplificateur (MV).

3. 4. Déplétion des amines biogènes endogènes

Ce protocole a été utilisé au niveau des organes isolés pour la première fois par PORTER et al. (1963), LAVERTY et al. (1965) et par NYBORG et MULVANY (1984). Les faisceaux isolés sont d'abord incubés dans une solution physiologique saline (NaCl, 0,9 %) et après une période de 15 minutes dans la solution de 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 300 µg/ml) en milieu azoté (N₂). Les faisceaux sont ensuite oxygénés avec du carbogène et montés dans un bain à organe isolé. Le temps d'équilibration est d'une heure.

3. 5. Exploitation des résultats

3. 5. 1. Mécanogramme de la préparation auriculaire

La force contractile du muscle cardiaque est mesurée dans le milieu d'incubation de façon isométrique en présence de différentes substances pharmacologiques (Fig. 6). Pour la reconnaissance de l'effet inotrope, la contraction isométrique est considérée comme 100 % dans les conditions normales, avant l'ajout d'une substance test. Le changement dû à la présence d'une substance est quantifié en pourcentage d'augmentation ou de baisse de la force contractile. Cette quantification dépend donc du type de produit employé. De la même manière la fréquence avant l'ajout des substances est considérée comme 100 % de réponse de la préparation; la fréquence initiale de contractions spontanées sert alors comme valeur de référence pour chaque expérience. Les points des courbes dose - effet au niveau de l'oreillette gauche sont enregistrés à la même fréquence de stimulation (3 Hz), et à une même période de 5msec, avec le même contenu de calcium dans la solution de Tyrode.

Dans les différentes expériences menées, une température de 32° C a été choisie pour les préparations cardiaques. Cette température de 32° C évite une éventuelle ischémie au cours de l'expérimentation *in vitro* et permet, par conséquent une nette amélioration des contractions du coeur (BRASCH et IVEN, 1991)

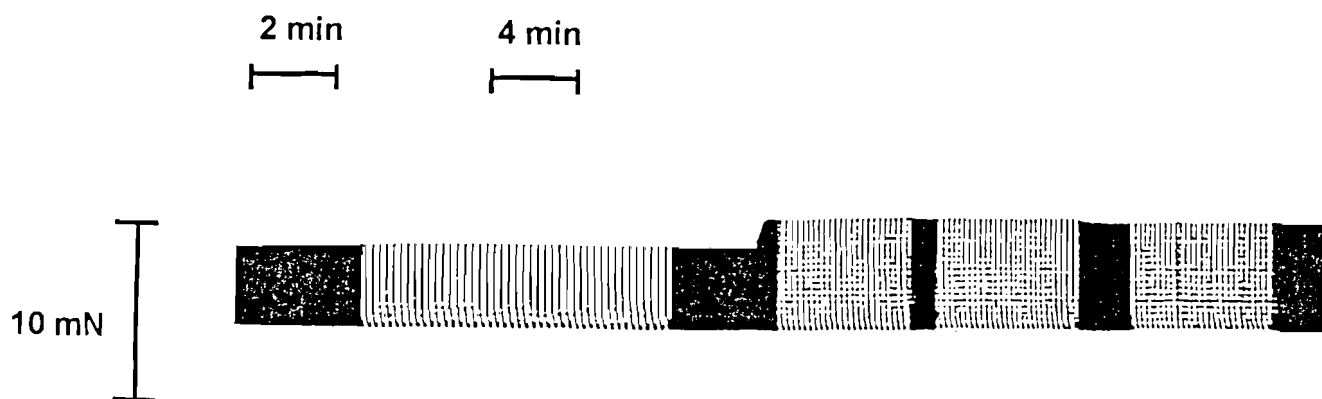


Figure 6: Enregistrement original de la contraction d'une oreillette gauche isolée et électriquement stimulée (3 HZ) de cobaye:

L'enregistrement est réalisé de façon isométrique chez une oreillette isolée de cobaye. Après quinze minutes d'équilibration, nous obtenons des contractions rythmiques obtenues par stimulation directe de l'organe placé dans un bain à organe isolé rempli de solution physiologique de Tyrode.

3. 5. 2. Mécanogramme de la préparation de la veine porte

La force contractile des faisceaux de veine porte est mesurée isométriquement sous EXPAR pour une gamme de concentrations allant de 1 µg/ml à 10 µg/ml dans le milieu d'incubation (Fig. 7). L'activité contractile dans les conditions témoin est égale à 100 %. La force contractile est calculée après l'ajout de la substance dans le bain à organe isolé à concentrations croissantes, c'est-à-dire après l'effet de la substance. Elle peut être quantifiée d'après la formule suivante:

$$[\text{Effet de la substance}] = \frac{\text{Valeur de la mesure en présence de la substance}}{\text{Valeur de la mesure en l'absence de la substance}}$$

La courbe concentration-réponse sert de témoin pour chaque expérimentation.

3. 5. 3. Mécanogramme de la préparation de *Taenia coli*

La force contractile de la préparation est enregistrée de façon isotonique (Fig. 8). Le mécanogramme du *Taenia coli* est obtenu à la fin de la phase d'équilibration pour une période de 30 min.

La préparation a été stimulée toutes les minutes. Après quelques minutes, le bain est de nouveau rempli de solution physiologique de Tyrode normale. Le volume de la solution d'agoniste ou d'antagoniste ajoutée varie de 20 µl à 500 µl. Chaque dose d'agoniste ou d'antagoniste est répétée trois ou quatre fois. La séquence de doses a été choisie en fonction des courbes dose - réponse lors des expériences précédentes. Les doses d'agoniste ont été choisies de sorte que l'on obtienne une réponse comprise entre 20 et 80 pour cent de la réponse maximale

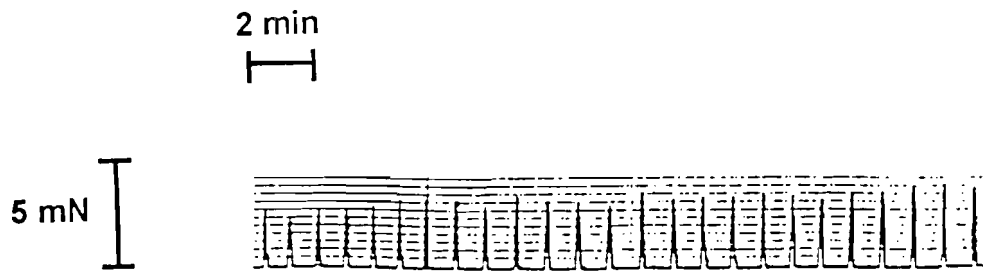


Figure 7: Enregistrement original de la force de contraction spontanée et rythmique d'une veine porte isolée de rat:

L'enregistrement est réalisé de façon isométrique chez une oreillette isolée de cobaye. Après vingt minutes d'équilibration, nous obtenons des contractions rythmiques spontanées de l'organe placé dans un bain à organe isolé rempli de solution physiologique de Tyrode.

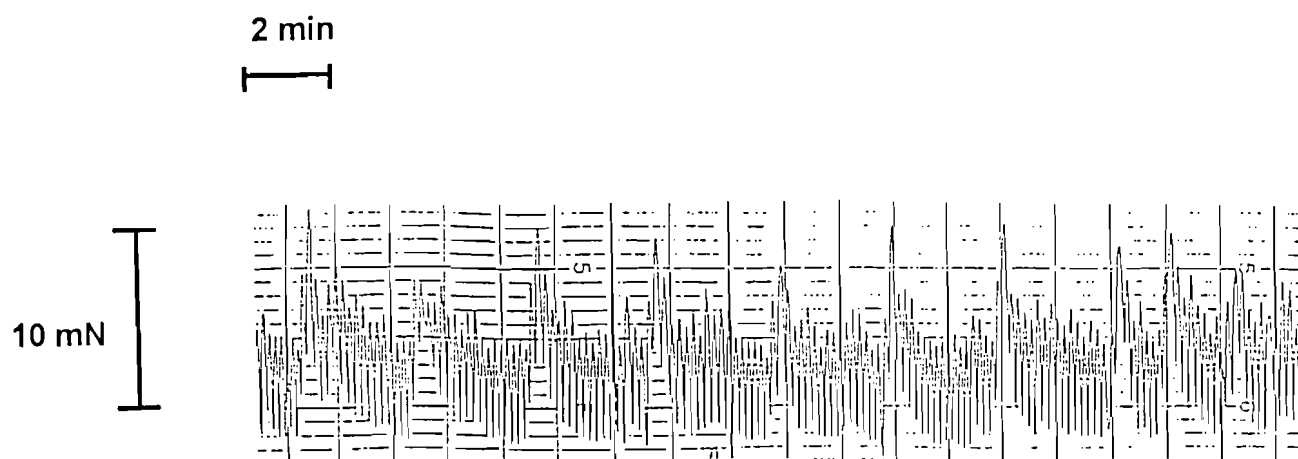


Figure 8: Enregistrement original de la force de contraction d'une préparation de *Taenia coli* isolée de cobaye:

L'enregistrement est réalisé de façon isotonique. Après trente minutes d'équilibration, nous obtenons des contractions rythmiques obtenues par stimulation directe de l'organe placé dans un bain à organe isolé rempli de solution physiologique de Tyrode (durée de stimulation 10 msec avec un train de stimulation d'une durée de deux minutes; force de stimulation: 6 V).

L'antagoniste est ajouté au liquide de perfusion lorsque la réponse est parfaitement constante et reproductible. Pour chaque essai, nous avons utilisé un nouveau segment d'intestin. Les segments de réserve sont conservés dans la solution de Tyrode à 15° C pendant une période maximale de 4 heures. Pour définir le temps de mesure, cinq contractions successives sont enregistrées. Les amplitudes sont mesurées.

3. 6. Détermination de groupes chimiques d'EXPAR

3.6.1. Essais préliminaires

Les essais sont menés pour rechercher les différents groupes chimiques que renferme l'extrait, afin d'avoir une vue générale du spectre chimique de la plante utilisée.

5 mg d'extrait sont dissous dans 5ml d'acide chlorhydrique N au bain marie à 80° C pendant 10 minutes. Après refroidissement, la solution est filtrée. Au filtrat est ajoutée une quantité égale d'hydroxyde de sodium N, et après évaporation au rotavapor, le résidu est testé.

5 mg d'extrait sont dissous dans 5ml d'hydroxyde de sodium N au bain marie à 40° C pendant 5 minutes. Après refroidissement, la solution est filtrée. Au filtrat est ajoutée une quantité égale d'acide chlorhydrique N, et ensuite testé après évaporation au rotavapor.

3. 6. 2. Tests de reconnaissance de groupes chimiques

Nos investigations se sont déroulées en deux parties: dans un premier temps, nous avons appliqué trois méthodes différentes de mise en évidence des glycosides sur des quantités relativement petites de matériel végétal.

- application de la méthode de BALJET
- tentative de séparation des groupes chimiques par formation de picrate.
- application de la technique colorimétrique par spectrophotométrie.

Dans un deuxième temps, compte tenu des effets de type adrénérique observés, nous avons procédé à l'extraction de grande quantité de matériel végétal, dans l'espoir d'obtenir un extrait suffisamment enrichi en alcaloïdes, et d'en étudier la nature.

Finalement nous avons repris le mode opératoire de BALANSARD et DELPHAUT dans le but d'étudier la nature des „hétérosides alcaloïques“ obtenues par ces auteurs.

Pour la recherche de groupe chimique, nous avons employé la réaction de de BALJET (glycosides), la réaction de SMOLENSKI et FONG (alcaloïde) de même que la réaction de DRAGENDORFF.

- Réaction de DRAGENDORFF:

Solution mère: 1,7 g de sous - nitrate de bismuth et 20 g d'acide tartrique sont mis en suspension dans 40 ml d'eau. A la suspension sont ajoutés 40 ml d'une solution aqueuse d'iodure de potassium à 40 %. Le mélange est agité pendant 1 heure avant filtration.

Solution de pulvérisation: Immédiatement avant utilisation, 5 ml de solution-mère sont mélangés avec 15 ml d'eau.

La limite de sensibilité du réactif de DRAGENDORFF peut être augmentée en pulvérisant après la réaction une solution aqueuse de nitrite de sodium à 10 % préparée extemporanément.

- Cas d'amine primaire :

Réaction avec l'acide chlorhydrique à 7 %, additionné de 0,2 ml de solution de nitrite de sodium. Après une ou deux minutes, l'ajout de 1 ml de solution de 2-naphtol provoque une coloration intensive orange qui tire sur la couleur rouge.

3. 6. 3. Etude en chromatographie

Le matériel végétal pulvérisé (2 g) est mélangé à une solution de 10 ml d'éther de pétrole. Le résidu est séché après 30 minutes d'extraction à l'appareil Soxhlet. La poudre est d'abord imbibée de 20 ml de mélange d'éthanol et d'eau (50 %, v/v) et 10 ml de solution d'acétate de plomb (10 %). Elle est ensuite centrifugée. La solution est filtrée avec 2 g de sulfate de sodium et concentrée à l'aide d'un rotavapor BUCHI à 40°C pour permettre le séchage.

3. 6. 4. Chromatographie sur couche mince

L'analyse de l'extrait a été faite par chromatographie sur couche mince dans les conditions suivantes:

Une quantité de 1 mg d'Expar est contenue dans 1 ml de dichlorométhane/éthanol (1:1, v/v). Chaque substance de référence la digoxine et la strophantine G sont employées dans les mêmes proportions (1 mg).

Le matériel d'absorption est constitué de plaques Kieselgur GR 20 x 20 cm. Les dépôts de 20 µl en forme de point sont faits sur papier. La solution est constituée d'acétate d'éthyle, de méthanol, d'éthanol et d'eau (81:11:4:8, v/v). La distance de migration est de 15 cm. La révélation de substances actives est faite par:

- le réactif de JENSEN, composé de chloramine T à 3 % et de solution éthanolique d'acide trichloroacétique à 25 %), est porté pendant 3 à 4 minutes à une température de 100 °C. Les chromatoplaques sont examinées à 365 nm (UV₃₆₅ nm), puis pulvérisées avec un des réactifs de révélation. Les couleurs bleue, jaune ou verte - jaune sont recherchées. Les valeurs de migration ou R_f en ces différents points sont calculées.
- l'acide sulfurique (H₂SO₄, 96 %). Les plaques de chromatographie, après un séchage approprié, sont imprégnées de cette solution d'acide pendant 3 à 4 minutes, à une température de 100 °C, et sont examinées à 365 nm (UV₃₆₅ nm).

Les couleurs bleue, brune ou jaune sont recherchées à la lumière du jour ou à 365 nm. Les plaques de chromatographie sont également photographiées.

3. 6. 5. Chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC)

3. 6. 5. 1. Appareillage

Les éléments suivants ont été utilisés pour les mesures en chromatographie:

- injecteur rhéodyne
- pompe T-414 Modèle LC (Kontron Instruments, Californie, USA)
- photomètre Uvikon 735 LC (Kontron Instruments, Californie, USA)
- potentiomètre linéaire avec imprimante (Metrawatt GmbH, Allemagne)
- enregistreur (Metrawatt GmbH, Allemagne)

3. 6. 5. 2. Conditions

La séparation a été effectuée d'après le principe de la chromatographie en phase reverse avec les colonnes suivantes:

- une pré-colonne (Nucléosil 120-7 C₁₈, 30 x 4 mm ID)
- une colonne (Nucléosil 100-5 C₁₈, 5 µm, 250 x 4 mm ID).

Toutes deux proviennent de Macherey-Nagel (Allemagne).

La phase mobile est constituée d'acétonitrile (HPLC Grade) et d'eau (55:45, v/v) avec une vitesse d'écoulement de 1 ml/min. sous une pression de 100 Bars et une température de 22° C. La détection est faite en UV à 220 nm. La solution d'expérimentation est constituée de chloroforme et d'éthanol dans les proportions (1:1, v/v). Les substances de référence sont la digoxine et la strophantine G. Le volume utilisé est de 20 µl. La mesure est effectuée en UV à une longueur d'onde de 365 nm.

3. 6. 5. 3. Mesure spectrophotométrique

La mesure quantitative de glycosides est réalisée selon la méthode BALJET, par l'utilisation de l'acide picrique et mesure spectrophotométrique en étude

moyenne arithmétique :

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} \quad (1)$$

écart-type de la moyenne :

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{(x-\bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

erreur standard sur la moyenne:

$$SEM = \frac{t S_{\bar{X}}}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

\bar{X} = moyenne arithmétique

n = nombre des mesures ($n \leq 6$)

S = écart - type de la moyenne

SEM = erreur standard sur la moyenne

Les moyennes, les erreurs standards sur la moyenne de même que les représentations graphiques ont été traitées avec le programme informatique „Implot“ et „Graph Pad Prism“ (Californie, USA).

4 - RESULTATS

4.1. Comparaison des effets d'EXPAR et de la strophantine G sur l'activité contractile induite au niveau de l'oreillette isolée de cobaye

Sur des oreillettes isolées de cobaye en milieu de perfusion oxygénée, nous avons comparé l'action cardiotonique de l'extrait de *Parquetina nigrescens* (EXPAR) et de la strophantine G (digitalique) sur les effets chronotropes et inotropes du coeur isolé de cobaye.

4.1.1. Courbes dose - réponse d'EXPAR

Sur huit oreillettes de cobaye stimulées à une fréquence de 3 HZ nous avons comparé l'action cardiotonique (effet sur l'amplitude de contraction) d'une gamme de concentrations d'EXPAR. Cette expérimentation est réalisée en milieu oxygéné par un barbotage de carbogène et à une température de 32° C. L'addition au liquide de perfusion de doses croissantes d'EXPAR, variant de 5 µg/ml à 200 µg/ml, provoque une augmentation dose - dépendante de la force de contraction de l'oreillette isolée de cobaye. La figure 10 illustre la courbe dose - réponse obtenue à partir des doses croissantes d'EXPAR sur la contraction de l'organe. C'est à partir d'une concentration de 5 µg/ml, que l'effet d'EXPAR est perceptible. L'allure de la courbe dose – réponse est sigmoïdale. La valeur-EC₅₀ se situe à une concentration de 7 µg/ml, et la pente à une valeur de 3,5 (pente de Hill).

Dans le cadre de notre travail, l'hexobarbital a été employé. En effet, après une période d'incubation à l'hexobarbital à une concentration de 10⁻⁴ M, il se produit une diminution de 40 % de la force contractile. Cette substance provoque un effet inotrope négatif.

Sous l'imprégnation de l'hexobarbital à 10⁻⁴ M, en présence de doses croissantes d'EXPAR, la force contractile augmente de façon dose - dépendante. Dans ces conditions, la réponse maximale de contraction augmente de 25 %. La pente baisse d'une valeur normale de 3,5 à 0,70 (figure 11).

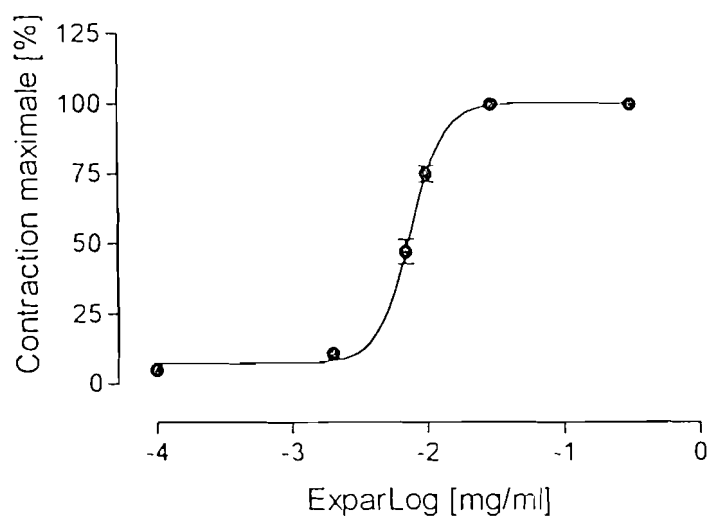


Figure 10: Courbe effet - concentration d'EXPAR sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Courbe dose - réponse d'EXPAR de 5 $\mu\text{g/ml}$ à 200 $\mu\text{g/ml}$. Les abscisses représentent la concentration d'EXPAR en $\mu\text{g/ml}$, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de huit préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=8$).

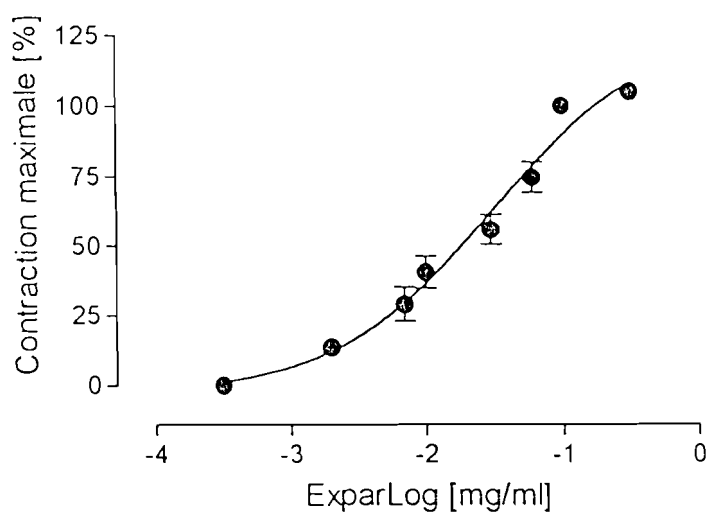


Figure 11: Courbe effet - concentration d'EXPAR sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Courbe dose - réponse d'EXPAR de 5 $\mu\text{g/ml}$ à 150 $\mu\text{g/ml}$ en présence d'hexobarbital à 10^{-4} M. Les abscisses représentent la concentration d'EXPAR en $\mu\text{g/ml}$, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=7$).

4. 1. 2. Influence de la fréquence de stimulation

Les expériences précédentes sur les propriétés des glycosides classiques ont permis de mettre en évidence le rôle de la fréquence de stimulation sur l'inotropisme cardiaque. Selon BENFORADO (1958), l'augmentation de la fréquence provoque une diminution de l'amplitude de contraction cardiaque. Nous voulons savoir si l'effet d'EXPAR peut être influencé par un changement de la fréquence de stimulation comme cela est décrit dans la littérature pour les autres glycosides conventionnels (BUSSE et al., 1979, HERZIG et al., 1995).

La figure 12 comporte une courbe en forme de cloche représentant l'évolution de la force contractile en fonction de la fréquence de stimulation. Une augmentation de la fréquence de stimulation dans une tranche de 0,1 à 2 HZ provoque une augmentation de la force développée par l'oreillette de cobaye électriquement stimulée. Une intensité plus forte de la fréquence de stimulation au-delà de 2 HZ provoque une baisse de la force contractile.

L'analyse montre que le temps nécessaire pour atteindre la tension maximale développée, (TtPT: Time to Peak Tension = temps pour atteindre la tension maximale développée) et le KD 90 % (durée de contraction à 90 % du niveau normal), est dépendant de la fréquence de stimulation (figure 13). Plus la fréquence de stimulation est faible, plus il faut une longue période pour atteindre la contraction maximale auriculaire et *vice - versa*.

4. 1. 3. Action de la strophantine G sur l'oreillette isolée de cobaye

La figure 14 illustre l'effet de la strophantine G sur la contraction auriculaire. Comme dans le cas d'EXPAR, la strophantine G exerce une activité stimulante sur l'oreillette. Aux doses variant de 10^{-9} M à 10^{-5} M, la courbe dose - réponse présente une allure biphasique. Aux faibles concentrations, l'augmentation de la contraction est très minime, elle devient par contre maximale avec de fortes doses de strophantine G. A partir de la dose de 3×10^{-6} M, des phénomènes d'intoxication se

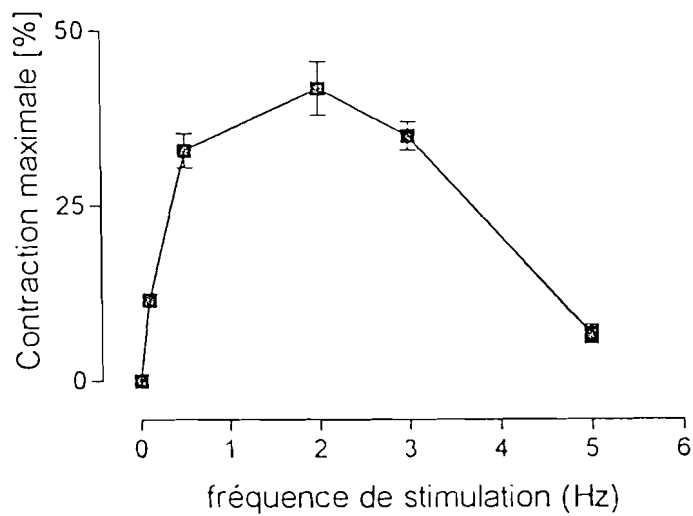


Figure 12: Courbe de la fréquence de stimulation sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye:

Représentation en fonction de la force contractile en présence d' EXPAR à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. Les abscisses représentent la fréquence de stimulation en HZ, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=7$)

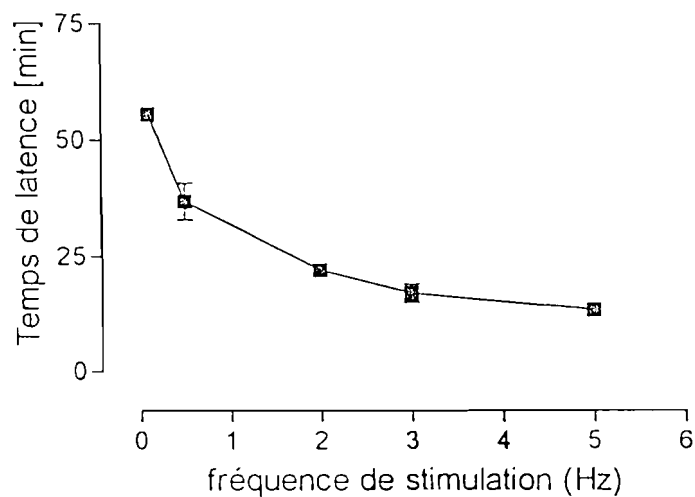


Figure 13: Courbe de la fréquence de stimulation sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Représentation de la force contractile en présence d' EXPAR à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. La figure représente le temps de latence en relation avec la fréquence de stimulation. Les valeurs reportées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$; $n= 7$).

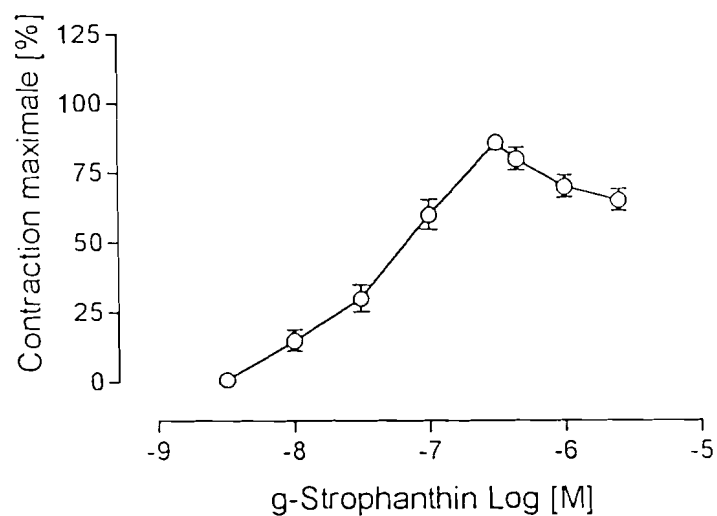


Figure 14: Courbe effet - concentration de la strophanthine G sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

courbe dose - réponse de strophanthine G de 10^{-9} M à 10^{-5} M. Les abscisses représentent la concentration molaire de strophanthine G, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n = 6$).

manifestent. Ils sont caractérisés par une élévation de la ligne de base (contracture) et une baisse de la force de contractile observée avec des doses fortes de la strophantine G.

4. 1. 4. Effets d'EXPAR et de la strophantine G: contracture et réversibilité de l'action d'EXPAR

Les effets obtenus en présence d'EXPAR sont comparables à ceux de la strophantine G. Les éléments de la toxicité de l'EXPAR, contracture musculaire basale et diminution de l'effet inotrope positif, sont observés après une période de 15 ± 3 minutes à la concentration de 150 $\mu\text{g/ml}$. En comparaison avec de la strophantine G (5×10^{-6} M), les mêmes effets sont obtenus après une période de 25 ± 5 minutes.

Une nouvelle perfusion de l'organe pendant 5 à 7 minutes, avec la solution physiologique normale de Tyrode dépourvue d'EXPAR, entraîne un retour des contractions normales. Aucun phénomène d'arythmies n'est observé. Par contre, les effets toxiques persistent avec la strophantine G, même après une perfusion avec une solution normale de Tyrode. Les effets de toxicité sont irréversibles dans le cas de la strophantine G alors qu'ils ne le sont pas avec l'EXPAR.

EXPAR induit une tachycardie chez le cobaye. Après une période d'une minute, cette augmentation de la fréquence de l'oreillette est de 67,5 % (figure 15). EXPAR (150 $\mu\text{g/ml}$) augmente la fréquence cardiaque provoquant ainsi à cette dose une tachycardie. Aucun symptôme d'intoxication n'est observé. La force de contraction augmente et atteint son maximum après une période de 45 sec. La valeur de la demi - période (temps nécessaire pour atteindre la moitié de la valeur maximale de contraction) est de 24,3 sec.

L'application de la noradrénaline à 5×10^{-7} M provoque un effet inotrope positif. Elle exerce un effet stimulant sur la force contractile et atteint une valeur maximale après une période de 48,3 sec. L'action de la noradrénaline présente une demi - période de 20,2 sec.

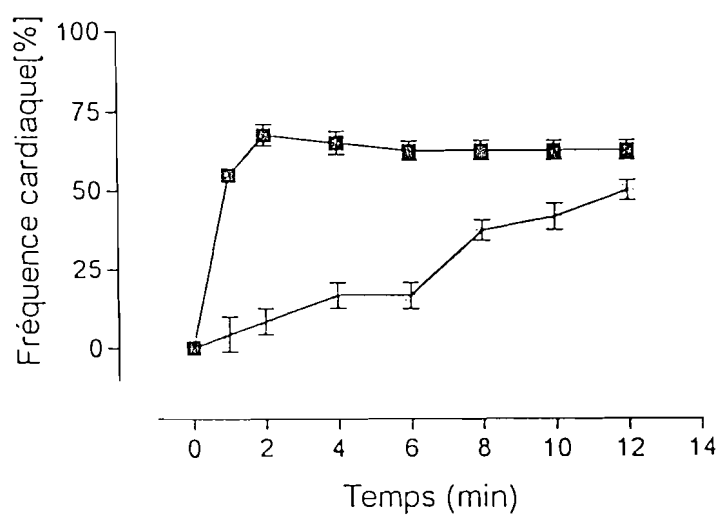


Figure 15: Courbe de l'évolution de l'effet d' EXPAR à 150 µg/ml (■) et de la strophantine G (●) à 5×10^{-7} M en fonction de la fréquence de l'oreillette droite de cobaye.

Les abscisses représentent le temps en minute, les ordonnées, l'augmentation de la fréquence auriculaire en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x, n=7$).

L'application de strophantine G augmente lentement la force contractile pour atteindre sa valeur maximale après une demi-période de 10 minutes (figure 17). Cette concentration de 5×10^{-7} M provoque après une période de 12 minutes une arythmie et des effets digitaliques irréversibles.

EXPAR provoque à faible dose une tachycardie (accroissement du rythme de 40%). Contrairement à la strophantine G, EXPAR, tout en possédant une excellente action cardiotonique, modifie le rythme cardiaque comme les catécholamines. L'ajout d'aténolol ou du propranolol n'a aucune influence sur l'effet chronotrope de la strophantine G. Contrairement à la noradrénaline, la strophantine G présente une demi-période de 180,8 sec.

4. 1. 5. Influence de substances adrénolytiques sur l'effet d'EXPAR au niveau de l'oreillette isolée de cobaye

Dans le cadre du présent travail, nous avons choisi le propranolol et l'aténolol, inhibiteurs des récepteurs bêta pour savoir si le mécanisme d'action d'EXPAR est lié à l'activation de ces récepteurs, prépondérants dans le tissu cardiaque. La noradrénaline sert de substance témoin, puisque l'effet d'EXPAR observé est de type adrénergique (effet inotrope positif rapide et réversible).

4. 1. 5. 1. Influence du propranolol sur l'effet inotrope positif provoqué par EXPAR au niveau de l'oreillette

La figure 18 représente les courbes dose - réponse d'EXPAR en l'absence et en présence de propranolol à 10^{-7} M. Après 30 minutes d'incubation avec le propranolol, la courbe dose - réponse d'EXPAR (valeur- EC_{50} : 7,5 μ g/ml) est modifiée (valeur- EC_{50} : 12 μ g/ml). Dans ces conditions, un net affaïssement de l'effet maximal d'EXPAR apparaît pour les fortes concentrations (diminution de 40 % de la force contractile). La pente de la courbe passe alors d'une valeur de 3,5 à 1,5. Dans les deux cas, la valeur des pentes très significativement différente de 1 (selon le *t* - test de Student-Fisher) fait penser à un antagonisme au niveau de ce type de récepteur.

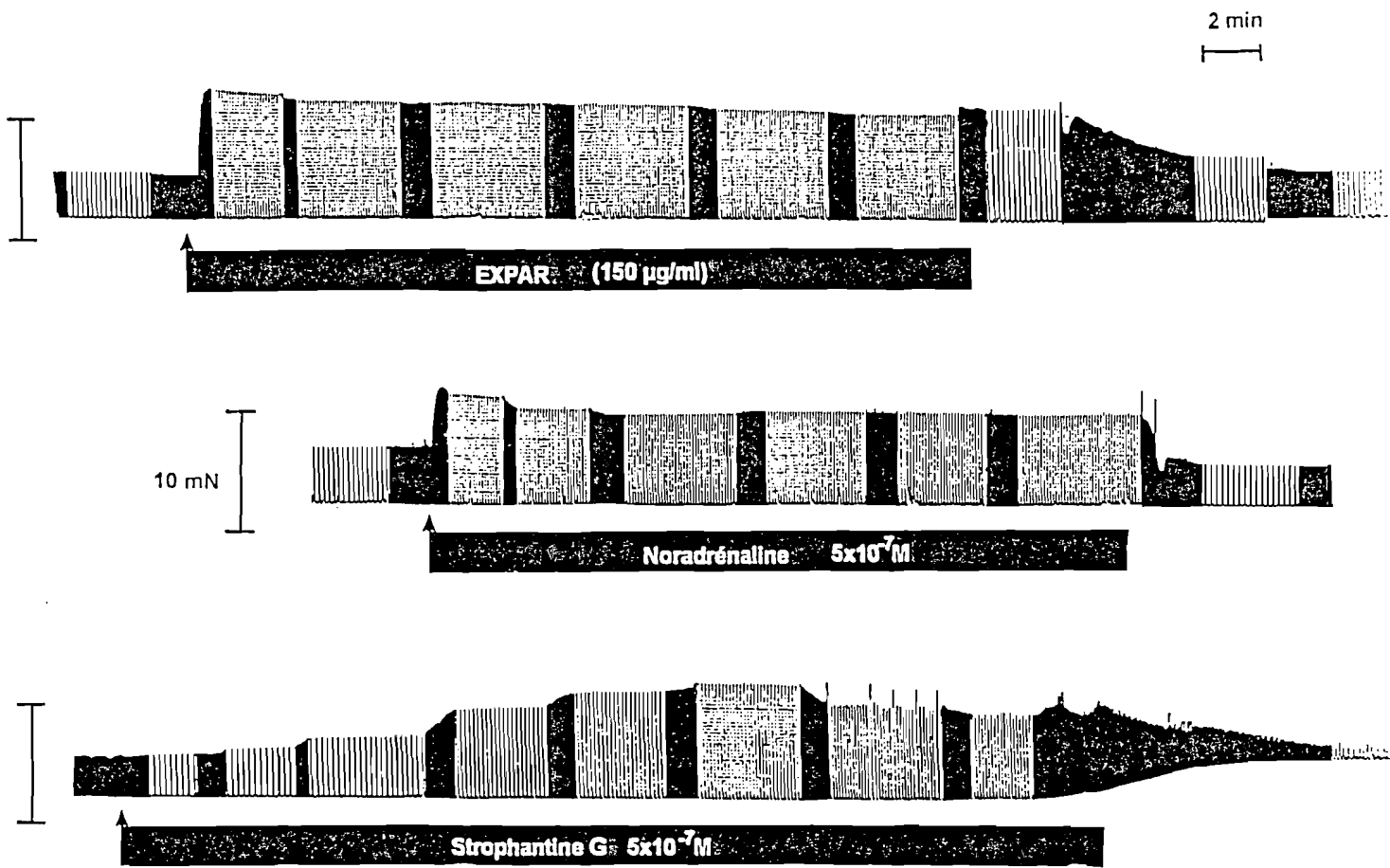


Figure 16: Mécanogrammes originaux de l'activité rythmique spontanée de l'oreillette droite isolée de cobaye :

Les flèches en bas indiquent le moment d'administration de la substance.

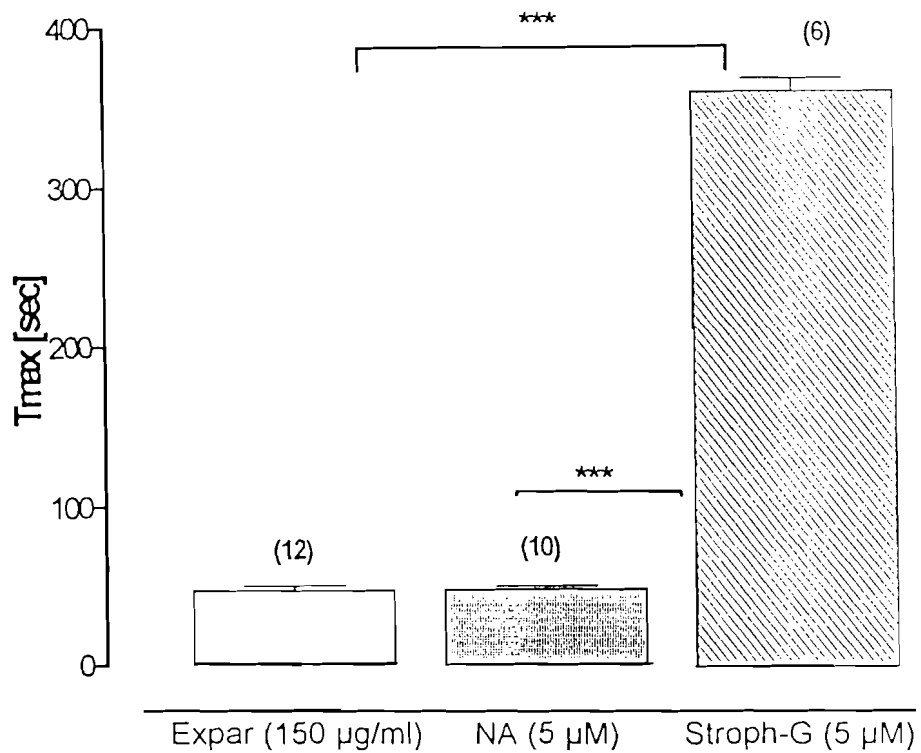


Figure 17: Temps maximaux nécessaires pour obtenir la contraction maximale :

Histogrammes comparatifs du temps d'obtention de l'effet maximal d'EXPAR, de la noradrénaline (NA) et de la strophantine G (Stroph-G). Les ordonnées représentent la moyenne \bar{X} de n préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$; n = 6 - 12, $p < 0,001$).

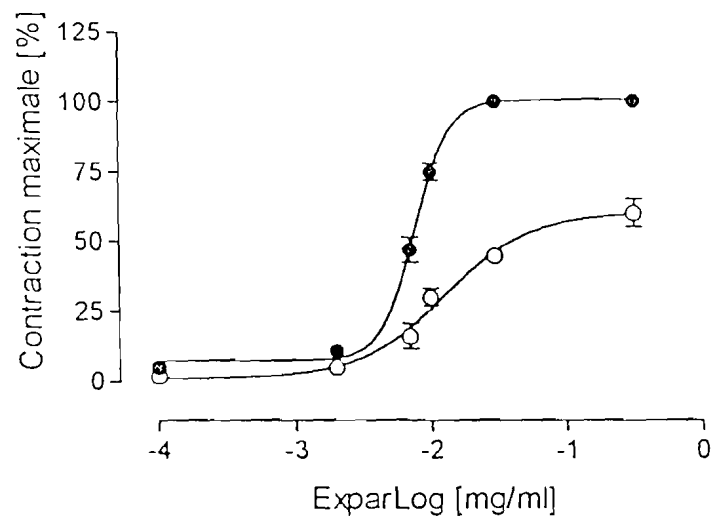


Figure 18: Courbe effet - concentration d'EXPAR sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Courbes dose - réponse d'EXPAR de 5 $\mu\text{g/ml}$ à 200 $\mu\text{g/ml}$ représentant la force contractile en l'absence (●) et en présence (○) du propranolol à 10^{-7} M: Les abscisses représentent la concentration d'EXPAR en $\mu\text{g/ml}$, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=7$).

EXPAR, à la concentration de 150 µg/ml, provoque un effet inotrope positif constant pendant 12 minutes. En présence du propranolol (10^{-7} M), l'augmentation de la force contractile évolue selon deux phases:

- une inhibition totale de la contraction provoquée pendant une durée de 5 minutes
- puis un retour progressif de la force contractile à partir de 6 minutes, jusqu'à la contraction maximale (figure 19).

4. 1. 5. 2. Effet de la noradrénaline en présence du propranolol

La noradrénaline (5×10^{-7} M) exerce une action stimulante sur l'oreillette isolée de cobaye (augmentation de la force contractile de 48,5 %). L'effet inotrope positif induit par la noradrénaline est complètement inhibé par le propranolol à une concentration de 10^{-7} M comme l'illustre la figure 20.

4. 1. 5. 3. Influence du propranolol sur l'effet inotrope positif induit par la strophantine G

Des résultats contraires à ceux observés avec EXPAR se retrouvent avec la strophantine G. Nous ne notons aucune différence entre les deux courbes de la strophantine G avant et après l'incubation avec le propranolol (figure 21). En effet, le propranolol à 10^{-7} M n'a aucune influence sur l'effet inotrope positif induit par la strophantine G.

4. 1. 5. 4. Influence du propranolol sur l'effet chronotrope positif induit par EXPAR et la noradrénaline au niveau de l'oreillette isolée de cobaye

Cette étude est rendue nécessaire par l'observation de l'augmentation de la fréquence cardiaque par EXPAR. L'étude effectuée sur les organes isolés, soustraits à l'environnement physiologique habituel, permet d'apprécier l'action de ces substances, en particulier sur la rythmicité automatique (action chronotrope) du coeur entier ou fragments de coeur. Ainsi si EXPAR contient une substance de type adrénergique, il doit pouvoir entraîner un effet chronotrope positif

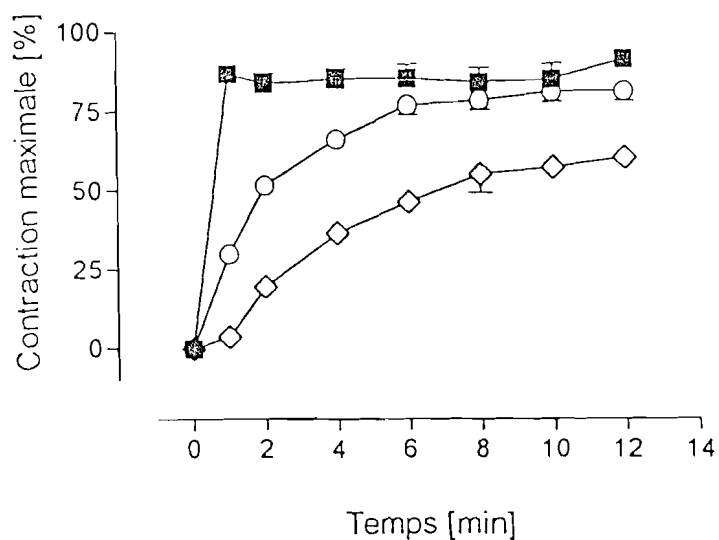


Figure 19: Courbe de l'effet d'EXPAR à dose unique sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Evolution de l'effet d'EXPAR à une concentration de 150 µg/ml sur la force contractile auriculaire de cobaye en l'absence (■) et pendant une période de 12 minutes en présence du propranolol aux concentrations respectives de 10^{-7} M, (○) et 10^{-6} M (◇). Les abscisses représentent le temps en minute, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction auriculaire en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=7$)

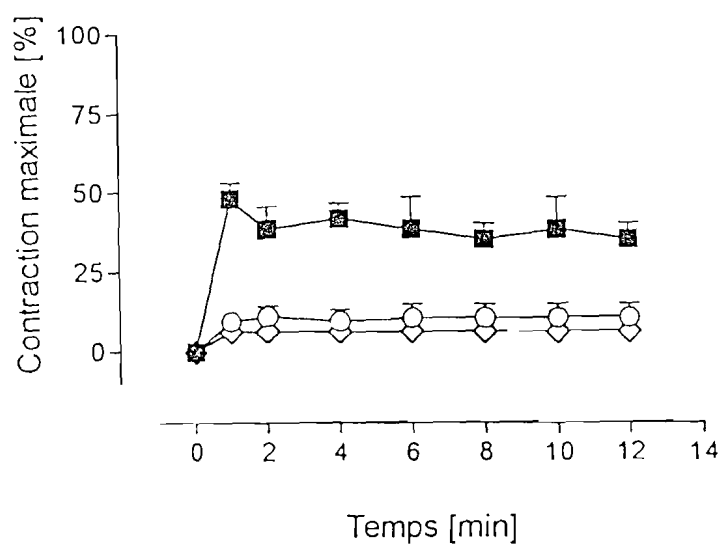


Figure 20: Courbe de l'effet de la noradrénaline à dose unique sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Evolution de l'effet de la noradrénaline à une concentration de 5×10^{-7} M sur la force contractile auriculaire de cobaye en l'absence (■) et en présence du propranolol aux concentrations respectives de 10^{-7} M (○) et 10^{-6} M (□) pendant une période de 12 minutes. Les abscisses représentent le temps en minute, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction auriculaire en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=6$)

4. 1. 5. 4. 1. Influence du propranolol sur l'effet chronotrope positif induit par EXPAR

La figure 22 représente l'évolution de la fréquence cardiaque en fonction du temps. L'augmentation de la fréquence obtenue en présence d'EXPAR est de $62,5 \pm 3,1$ %. Cette valeur reste pratiquement constante durant toute la période d'incubation avec EXPAR (figure 22). Un retour à la solution normale de Tyrode provoque une reprise normale de l'activité cardiaque. L'incubation avec du propranolol aux concentrations de 10^{-7} M et 10^{-5} M, pendant une période de 20 minutes, avant l'application d'EXPAR, entraîne une diminution respective de 28,5 % et de 43 % de la fréquence cardiaque.

4. 1. 5. 4. 2. Influence du propranolol sur l'effet chronotrope positif induit par la noradrénaline

La figure 23 représente l'évolution de la fréquence cardiaque en fonction du temps. La noradrénaline induit un accroissement de la fréquence auriculaire. Après une période d'une minute, l'effet chronotrope positif de la noradrénaline est de 100 ± 5 % (figure 23). Cette valeur reste pratiquement constante durant toute la période d'incubation avec la noradrénaline. L'administration du propranolol à une dose de 10^{-6} M diminue de 40 % l'effet chronotrope positif induit par la noradrénaline. Un retour à la solution normale de Tyrode provoque une disparition de cet effet.

4. 1. 5. 4. 3. Effet de la strophantine G en présence du propranolol

Des résultats contraires à ceux observés avec la noradrénaline, se retrouvent avec la strophantine G à une dose de 5×10^{-7} M. L'effet inotrope positif de la strophantine G n'est pas modifié en présence de propranolol aux concentrations de 10^{-7} M et 10^{-6} M.

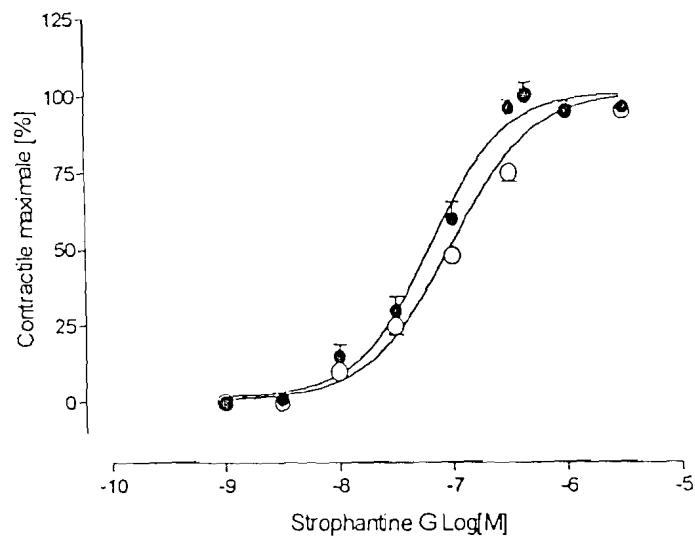


Figure 21: Courbe effet - concentration de la strophantine G sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Courbe dose - réponse de la strophantine G de 10^{-9} M à 10^{-6} M en l'absence (●) et en présence (○) de propranolol à une concentration de 10^{-7} M. Les abscisses représentent la concentration molaire de la strophantine G, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=7$).

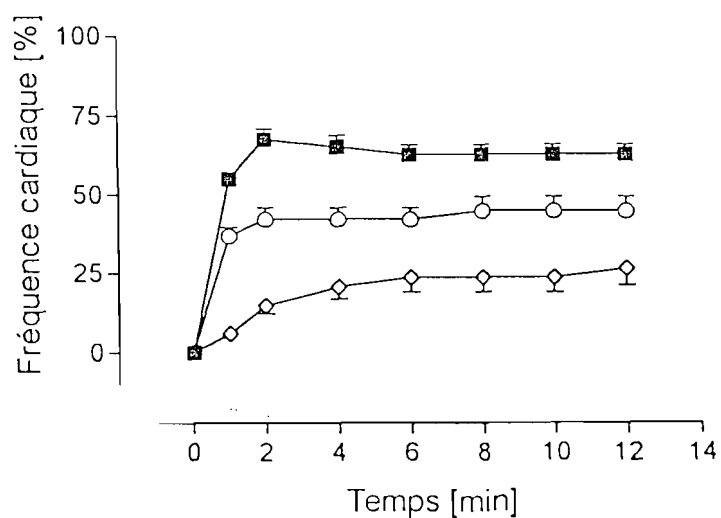


Figure 22: Courbe de l'effet d'EXPAR à dose unique sur la fréquence auriculaire de cobaye :

Evolution de l'effet d'EXPAR à une concentration de 150 µg/ml sur la fréquence auriculaire de cobaye en l'absence (■) et en présence du propranolol aux concentrations respectives de 10^{-7} M, (○) et de 10^{-6} M, (◇) pendant une période de 12 minutes. Les abscisses représentent le temps en minute, les ordonnées, l'augmentation de la fréquence auriculaire en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne X de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($X \pm S_x, n=7$).

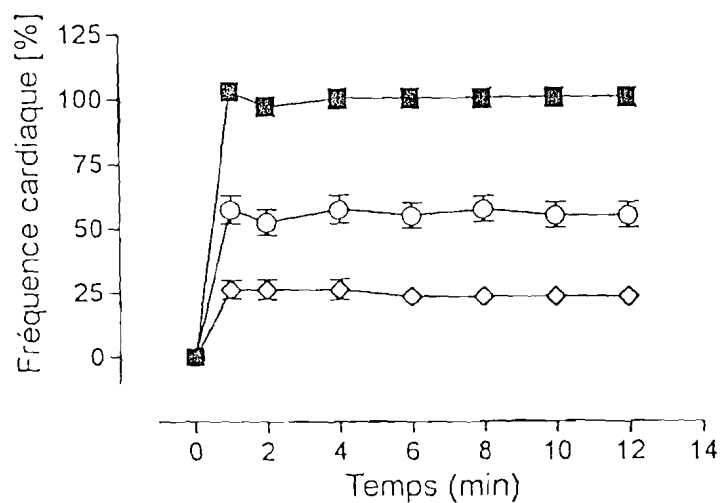


Figure 23: Courbe de l'effet de la noradrénaline à dose unique sur la fréquence auriculaire de cobaye :

Evolution de l'effet de la noradrénaline à une concentration de 5×10^{-7} M sur la fréquence auriculaire de cobaye en l'absence (\blacksquare) et en présence du propranolol aux concentrations respectives de 10^{-7} M (O) et de 10^{-6} M (\diamond) pendant une période de 12 minutes. Les abscisses représentent le temps en minute, les ordonnées, l'augmentation de la fréquence auriculaire en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de sept préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x, n=7$).

L'effet inotrope positif, induit par EXPAR, ayant été déjà apprécié, il nous est apparu indispensable pour la suite de la caractérisation des effets d'EXPAR, de mener une étude complémentaire sur la rythmicité cardiaque. L'aténolol a été choisi par rapport au propranolol comme dans les cas précédents en raison de sa cardio-sélectivité (Cardioprévalence).

Les expérimentations avec l'aténolol sont réalisées dans les mêmes conditions que celles du propranolol et aux mêmes concentrations de 10^{-7} M et 10^{-6} M. Pour une raison de cohérence de doses de propranolol, une dose de 150 $\mu\text{g/ml}$ d'EXPAR et une concentration de 5×10^{-7} M de la noradrénaline et de la strophantine G ont été choisies.

4. 1. 6. Dépendance calcique de la contractilité auriculaire

L'augmentation de la force contractile cardiaque (effet inotrope positif) et l'accroissement de la fréquence (effet chronotrope positif) sous l'influence d'EXPAR rendent cette étude nécessaire. En effet, le calcium extracellulaire est très important pour le maintien de la contractilité du muscle cardiaque.

Dans cette partie, nous recherchons dans quelle mesure les variations du calcium extracellulaire peuvent modifier l'effet exercé par EXPAR vis-à-vis de la réponse de l'organe.

Cette étude est menée en l'absence et en présence d'antagoniste calcique (le vérapamil).

4. 1. 6. 1. Concentration extracellulaire en CaCl_2 et son impact sur l'effet d'EXPAR

Les expériences que nous relatons ici ont porté sur les manifestations observées lors de l'administration d'EXPAR, à une préparation baignant dans une solution de Tyrode dont la concentration a été modifiée. Dans la solution de Tyrode

le contenu calcique et le calcium extracellulaire ont une influence décisive sur la qualité et la quantité de l'effet d'EXPAR.

Le changement de la concentration en calcium $[Ca^{2+}]$ dans la solution physiologique normale de Tyrode de 1,8 mM à 0,45 mM, entraîne une baisse de 60 % de la contraction du muscle.

La sensibilité du muscle dans une solution de Tyrode modifiée a été comparée à celle du même muscle en solution de Tyrode normale. La variation de la concentration en $CaCl_2$ extracellulaire modifie la sensibilité d'EXPAR sur l'activité auriculaire.

Les figures 24 et 25 illustrent les résultats expérimentaux obtenus en l'absence et en présence d'EXPAR.

L'augmentation de la concentration en calcium entraîne un accroissement de la contraction et par conséquent une sensibilité du muscle à EXPAR. Les expériences n'ont pas été poursuivies avec des concentrations en $CaCl_2$ supérieures à 2 mM. Ces effets au-delà de 2 mM n'entraînent pas une augmentation des amplitudes qui, d'ailleurs, restent stationnaires.

4. 1. 6. 2. Influence du vérapamil sur l'effet inotrope positif induit par EXPAR

La figure 25 représente la courbe dose-réponse du vérapamil. Le vérapamil, pour une gamme de concentrations variant de 3×10^{-8} M à 3×10^{-6} M, induit une diminution de la force de contraction de l'oreillette isolée de cobaye. La courbe dose - réponse est déplacée vers la droite en présence d'EXPAR à une dose de 10 μ g/ml.

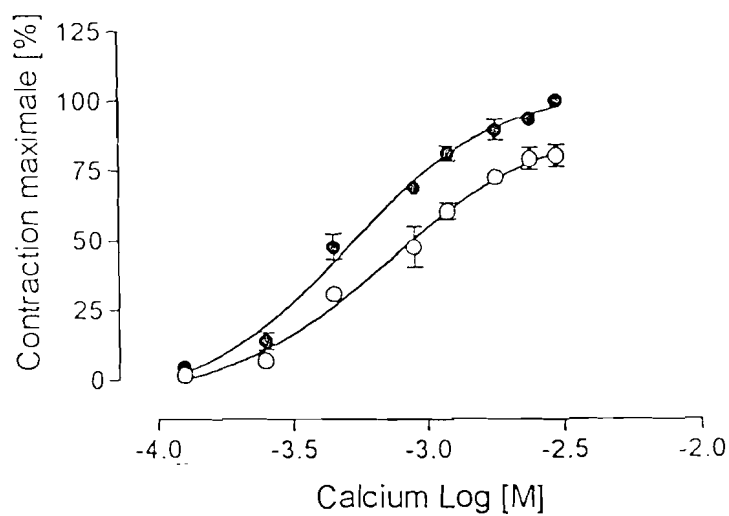


Figure 24: Courbe effet - concentration de calcium sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Courbe dose - réponse de calcium de 0,1mM à 2 mM en l'absence (O) et en présence (●) d'EXPAR à une concentration de 10 µg/ml. Les abscisses représentent la concentration molaire en calcium, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de huit préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n= 8$).

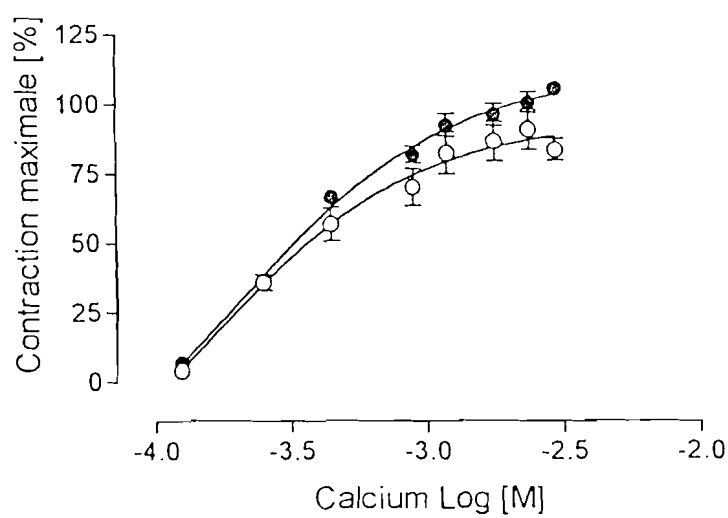


Figure 24: Courbe effet - concentration de calcium sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Courbe dose - réponse de calcium de 0,1 mM à 2 mM en l'absence (O) et en présence (●) d'EXPAR à une concentration de 10 µg/ml. Les abscisses représentent la concentration molaire en calcium, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de huit préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=8$).

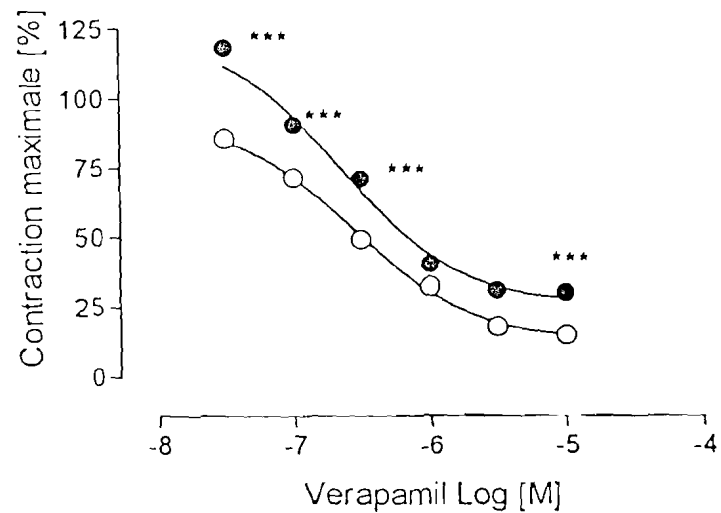


Figure 25: Courbe effet - concentration de vérapamil sur la force contractile développée par l'oreillette de cobaye :

Courbe dose - réponse du vérapamil de 3×10^{-8} M à 3×10^{-5} M en l'absence (O) et en présence (●) d'EXPAR à une concentration de 10 µg/ml. Les abscisses représentent la concentration molaire du vérapamil, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne X de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne Sx ($X \pm Sx$, $n=6$, $p < 0.001$).

4. 2. Effets d'EXPAR sur l'activité contractile spontanée du muscle lisse vasculaire de la veine porte de rat

Bien qu'elle présente une constitution chimique très éloignée de celle des amines sympathomimétiques, la nigrescigénine, principe actif isolé de *Parquetina nigrescens* agit sur le système sympathique (NEUWINGER, 1994) et comme les autres sympathomimétiques, exerce une tachyphylaxie marquée. L'extrait augmente le tonus et les contractions musculaires au niveau du myomètre de rate gravide (BOUQUET, 1967; DATTE et al., 1996).

Ces études sont menées pour savoir si l'effet observé au niveau cardiaque est comparable à celui obtenu au niveau vasculaire. Elles nous permettront de mieux comprendre le mode d'action d'EXPAR au niveau des terminaisons périphériques du système sympathique. Des précisions sur les effets d'EXPAR nous seront données par l'utilisation d'agonistes et antagonistes adrénergiques au niveau du muscle lisse vasculaire de rat.

Pour la caractérisation de l'effet d'EXPAR, une étude comparative est menée avec la noradrénaline et la tyramine, deux substances sympathomimétiques respectivement directe et indirecte et la strophantine G.

4. 2. 1. Effet des ions potassium

Cette expérimentation est menée dans le but de vérifier l'intégrité fonctionnelle de la préparation biologique, c'est à dire la possibilité d'obtenir une réponse contractile.

Après une phase d'équilibration de 30 minutes, la veine porte présente une activité contractile spontanée et rythmique. Une augmentation de la concentration en potassium d'une solution normale de Tyrode (2,7 mM) à 80 mM, provoque une dépolarisation de la préparation vasculaire. Le remplacement de la solution normale par une solution riche en potassium (80 mM) augmente de façon maximale aussi

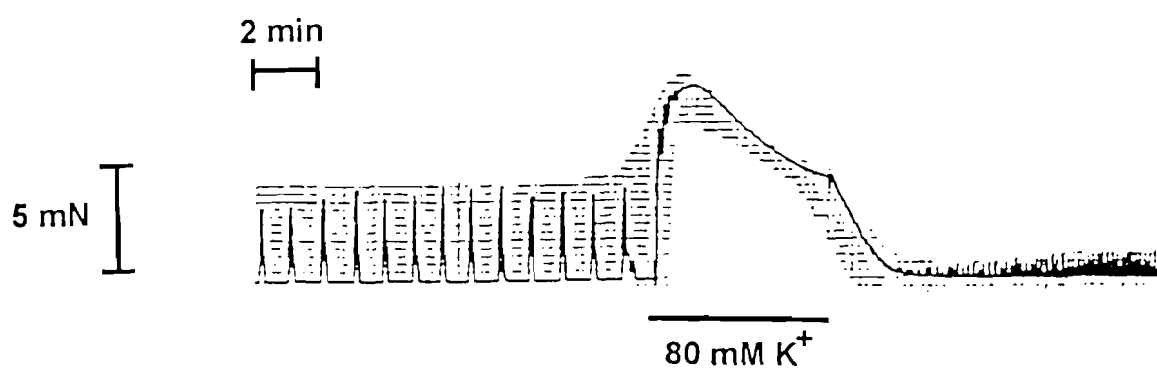


Figure 26 : Enregistrement isométrique du mécanogramme de la contraction rythmique et spontanée de la veine - porte de rat :

Observation en solution normale de Tyrode (concentration en potassium de 2,7 mM) et en milieu hyperpotassique de Tyrode (80 mM K⁺). Vitesse de déroulement de l'enregistreur à 5 mm/min.

bien la tension musculaire que le rythme des contractions spontanées de la préparation (Fig. 26).

4. 2 . 2. Courbes dose - réponse d'EXPAR, de la noradrénaline et de la tyramine

4. 2. 2. 1. Courbe dose - réponse d'EXPAR

A des concentrations variant de 0,125 µg/ml à 10 µg/ml, EXPAR entraîne une augmentation de l'amplitude des contractions rythmiques et spontanées des muscles lisses (Fig. 30). Cette action est immédiate et reproductible sur la même préparation si l'on espace les adjonctions de 15 minutes. La courbe dose - réponse d'EXPAR est représentée sur la figure 27.

La contraction spontanée et rythmique de la préparation augmente de façon dose - dépendante, atteignant une contraction maximale à une concentration de 10µg/ml. La valeur-EC₅₀ se situe à une concentration de 1,1 µg/ml et la pente atteint une valeur de 1,4.

4. 2. 2. 2. Courbe dose - réponse de la noradrénaline

La noradrénaline, à des concentrations variant de 10⁻⁹ M à 10⁻⁵ M, induit une augmentation de l'amplitude des contractions rythmiques et spontanées. Cette action est immédiate et reproductible sur la même préparation bien que les adjonctions soient espacées de 15 minutes. A cet effet se superpose une augmentation passagère du tonus, dépendant aussi bien de l'organe que de la concentration. La contracture musculaire de la préparation est observée en présence des fortes doses de noradrénaline.

La figure 28 illustre la courbe dose - réponse de la noradrénaline. La valeur-EC₅₀ se situe à une dose de 1,6 x 10⁻⁶ M et la pente atteint une valeur de 1,5.

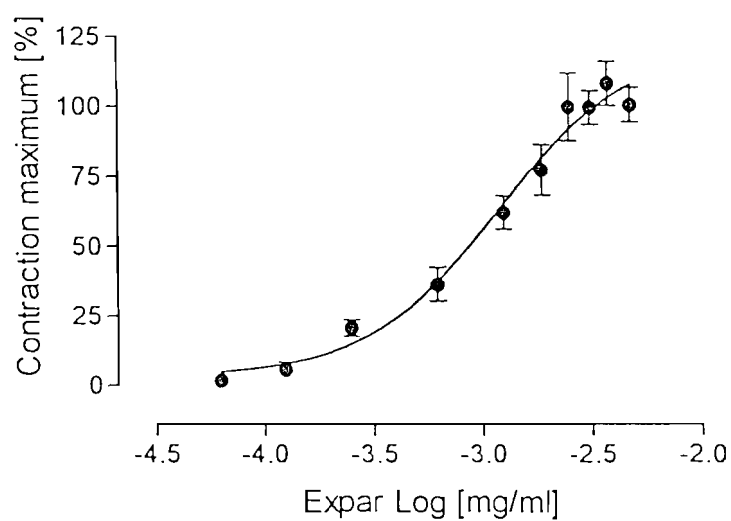


Figure 27 : Courbe effet - concentration d'EXPAR sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse d'EXPAR de 0,1 μ g/ml à 10 μ g/ml. Les abscisses représentent la concentration d'EXPAR en μ g/ml, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne X de neuf préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne Sx ($X \pm Sx$, n= 9).

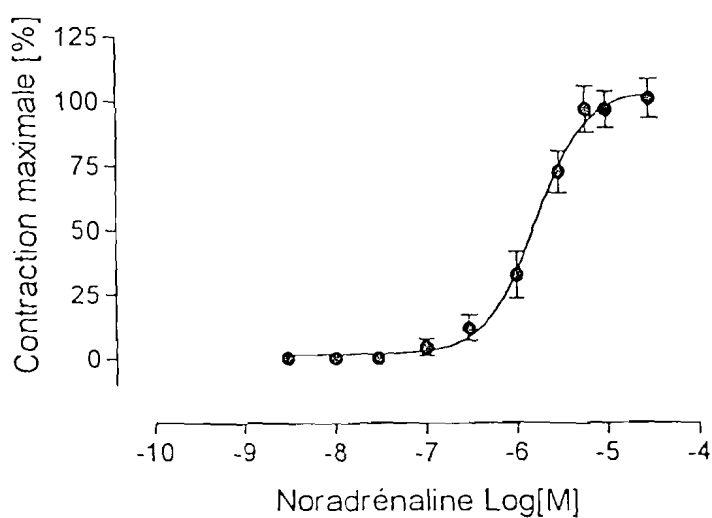


Figure 28 : Courbe effet - concentration de la noradrénaline sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse de la noradrénaline en présence des concentrations allant de 10^{-9} M à 10^{-5} M.. Les abscisses représentent la concentration molaire de la noradrénaline, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=6$).

4. 2. 2. 3. Courbe dose - réponse de la tyramine

Comme dans le cas de la noradrénaline et d'EXPAR, la tyramine exerce une action stimulante sur la veine porte de rat. La réaction de l'organe se caractérise par des mouvements phasiques suivis ou non de contraction tonique immédiate. Des effets similaires sont obtenus en présence de la noradrénaline.

La figure 29 illustre l'effet de la tyramine sur l'activité contractile de la préparation vasculaire. Aux concentrations variant de 3×10^{-7} M à 3×10^{-4} M, la tyramine provoque une augmentation dose - dépendante de la force contractile de l'organe (valeur- EC_{50} $1,8 \times 10^{-6}$ M; pente d'une valeur de 0,5).

4. 2. 2. 4. Courbe dose - réponse de la strophantine G

Contrairement à EXPAR et à la noradrénaline, la veine porte ne réagit pas par une augmentation de la contraction après imprégnation de la strophantine G à 5×10^{-7} M, mais plutôt par une inhibition de l'activité contractile rythmique et spontanée du muscle vasculaire (figure 30).

4. 2. 3. Influence de la prazosine sur l'effet stimulant d'EXPAR, de la noradrénaline et de la tyramine au niveau de la veine porte

Dans le cadre de nos expérimentations, la prazosine, α_1 - sympatholytique, est employée en raison de la prédominance des récepteurs alpha au niveau des muscles lisses vasculaires et surtout à cause de leur plus grande sensibilité à la noradrénaline. C'est une substance qui antagoniste des récepteurs α_1 et sert sur le plan médical comme un antihypertenseur.

Les figures 30-33, regroupent les courbes „ moyennes“ représentant les variations des réponses pharmacologiques en fonction du logarithme des concentrations des agonistes et antagonistes.

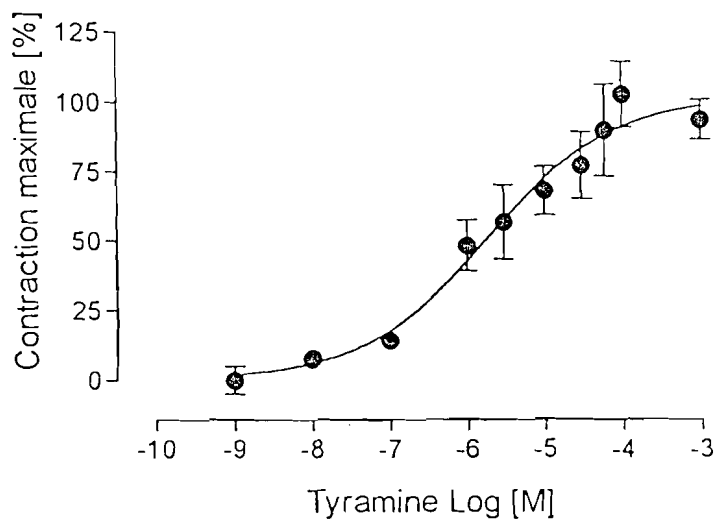


Figure 29 : Courbe effet - concentration de la tyramine sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse de la tyramine en présence des concentrations allant de 10^{-8} M à 10^{-4} M. Les abscisses représentent la concentration molaire de la tyramine, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de huit préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=8$).

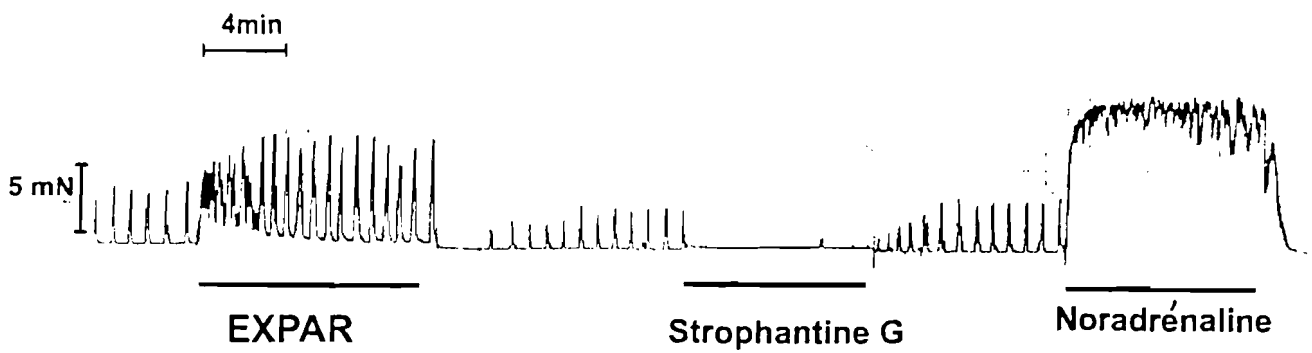


Figure 30 : Mécanogramme de la contraction rythmique spontanée de la veine porte de rat :
Les traits indiqués en bas de l'enregistrement représentent le moment d'application de la substance désignée, respectivement EXPAR, strophantine G et noradrénaline.

4. 2. 3.1. Effet d'EXPAR

La prazosine est incubée pendant une durée de 20 minutes avant l'addition d'EXPAR.

La figure 31 représente la courbe dose - réponse d'EXPAR en l'absence et en présence de prazosine aux concentrations de 1×10^{-8} M et de 3×10^{-8} M. Elle met en évidence un déplacement de la courbe dose - réponse d'EXPAR vers la ligne des abscisses. Plus la concentration de la prazosine est élevée, plus la valeur maximale de la courbe est réduite. Dans ces conditions la valeur de l'effet maximal de la contraction du muscle de la courbe dose - réponse est réduite à plus de 80 % de sa réponse contractile maximale.

4. 2. 3. 2. Effet de la noradrénaline

L'ajout de prazosine induit une diminution de la force contractile développée en présence de la noradrénaline. La courbe dose - réponse de la noradrénaline est déplacée vers la ligne des abscisses en présence de la prazosine. Ce déplacement dépend de la dose de prazosine employée. Dans ces conditions, la réponse contractile maximale diminue de 75 %. En présence de prazosine à une dose de 3×10^{-8} M, la valeur EC_{50} de la noradrénaline diminue, passant ainsi d'une concentration de $5,3 \times 10^{-7}$ M à $1,4 \times 10^{-6}$ M (Fig. 32).

4.2.3.3. Effet de la tyramine

Après 20 minutes d'incubation de la préparation avec la prazosine, la force contractile diminue en présence de tyramine, en comparaison avec les conditions normales. La figure 37 représente la courbe dose - réponse de la tyramine en l'absence et en présence de prazosine aux concentrations de 1×10^{-8} M et 3×10^{-8} M. Elle met en évidence un affaissement de la courbe dose - réponse de la tyramine vers la droite des abscisses. Ce déplacement est dépendant des doses de prazosine. Comme dans les deux cas précédents, la réponse contractile maximale de la courbe dose - réponse est réduite. La valeur de l'effet maximal diminue de plus de 75 %.

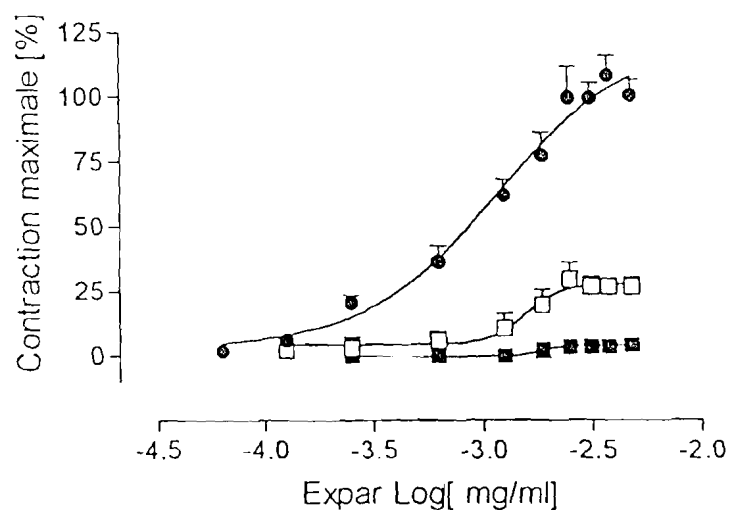


Figure 31 : Courbe effet - concentration d'EXPAR sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse d'EXPAR aux concentrations de 0,1 µg/ml à 10 µg/ml en l'absence (●) et en présence de la prazosine à la concentration de 1×10^{-8} M (□) et 3×10^{-8} M (■). Les abscisses représentent la concentration d'EXPAR en µg/ml, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, n= 7-9).

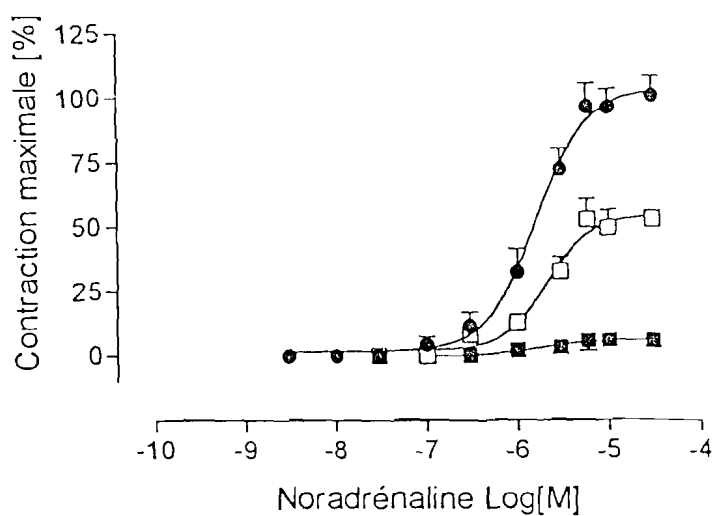


Figure 32: Courbe effet - concentration de la noradrénaline sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse de la noradrénaline en présence des concentrations allant de 10^{-9} M à 10^{-5} M en l'absence (●) et en présence de la prazosine à la concentration de 1×10^{-8} M (□) et de 3×10^{-8} M (◻). Les abscisses représentent la concentration molaire de la noradrénaline, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n = 6$).

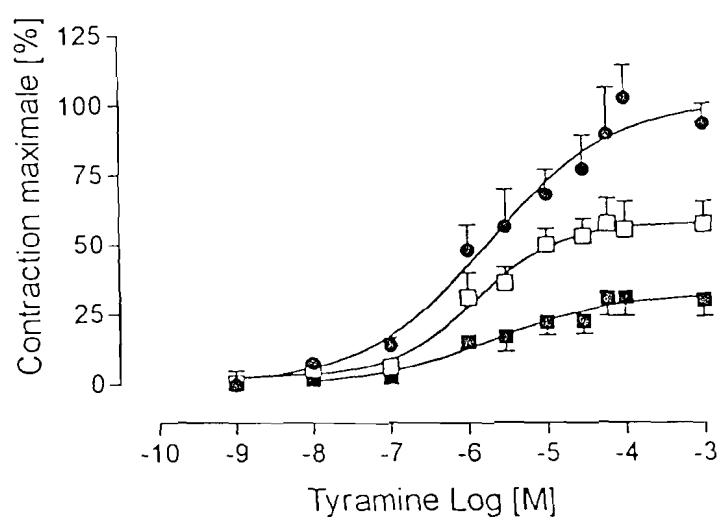


figure 33 : Courbe effet - concentration de la tyramine sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse de la tyramine à des concentrations allant de 3×10^{-8} M à 3×10^{-4} M 10^{-9} M à 10^{-5} M en absence (●) et en présence de la prazosine à la concentration de 1×10^{-8} M (□) et de 3×10^{-8} M (■). Les abscisses représentent la concentration molaire de la noradrénaline, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de huit préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n = 8$).

4. 2. 4. Influence de la 6-hydroxydopamine sur l'effet stimulant d'EXPAR, de la noradrénaline et de la tyramine au niveau de la veine porte

La 6-hydroxydopamine est généralement utilisée pour provoquer une déplétion des catécholamines endogènes neuronales (HOLLANDS et VANOV, 1965). C'est pour cette raison qu'elle est souvent employée dans les tests pharmacologiques.

La tyramine étant un sympathomimétique indirect, elle a été utilisée comme substance de référence dans notre protocole expérimental.

Les préparations isolées de la veine porte ont séjourné pendant une période de 15 minutes dans une solution physiologique saline (NaCl 0,9%), contenant la 6-hydroxydopamine en milieu azoté (milieu anaérobie).

4. 2. 4. 1. Action d'EXPAR

Après traitement par la 6-OHDA, la réponse contractile du muscle vasculaire induite par EXPAR est réduite. La figure 34 représente la courbe dose - réponse d'EXPAR avant et après le traitement à la 6-OHDA. Cette courbe est déplacée vers la ligne des abscisses et la valeur de la contraction maximale de la veine en présence d'EXPAR est réduite de 45 %.

4. 2. 4. 2. Action de la noradrénaline

La figure 35 représente les courbes dose - réponse de la noradrénaline, avant et après le traitement avec la 6-OHDA. Les résultats obtenus en présence d'EXPAR après le traitement avec la 6-OHDA, sont différents de ceux obtenus avec la noradrénaline.

La 6-OHDA ne modifie pas l'effet stimulant de la noradrénaline au niveau de la force contractile du muscle vasculaire, c'est à dire que les deux courbes dose - réponse avant et après le traitement avec la 6-OHDA sont superposables.

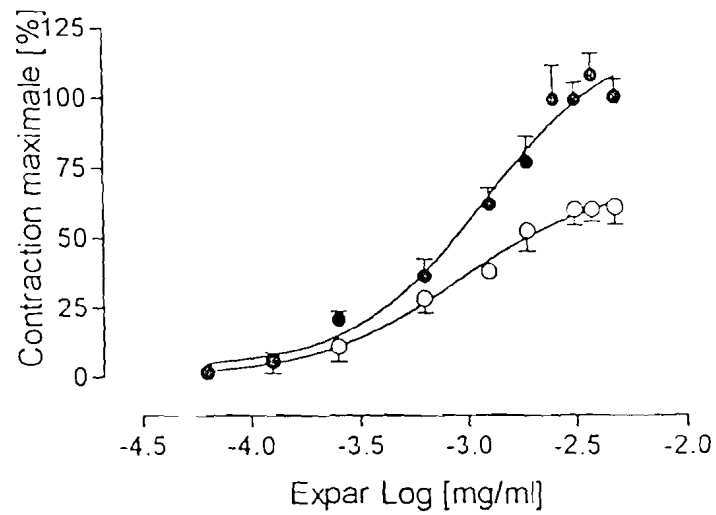


Figure 34 : Courbe effet - concentration d'EXPAR sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse d'EXPAR en présence des concentrations allant de 10^{-9} M à 10^{-5} M avant (●) et après (○) le traitement avec la 6-OHDA. Les abscisses représentent la concentration d'EXPAR en $\mu\text{g/ml}$, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=10$).

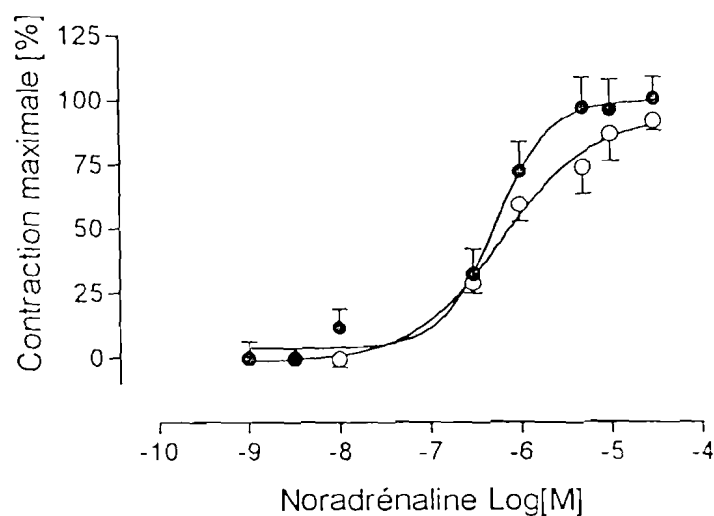


Figure 35: Courbe effet - concentration de la noradrénaline sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse de la noradrénaline en présence des concentrations allant de 10^{-9} M à 10^{-5} M avant (●) et après (○) le traitement avec la 6-HODA. Les abscisses représentent la concentration molaire de la noradrénaline, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=6$)

4. 2. 4. 3. Action de la tyramine

La figure 36 illustre les courbes dose - réponse de la tyramine. Elle met en évidence un déplacement vers la droite des abscisses, la courbe dose - réponse de la tyramine, avec un affaissement très marqué de l'effet maximal après le traitement avec la 6-OHDA (80 % de diminution de l'effet de la tyramine). Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec EXPAR, mais contraires à ceux obtenus avec la noradrénaline.

4. 3. Influence d'EXPAR et de la strophantine G sur l'activité contractile induite de *Taenia coli* de cobaye

Deux agonistes de l'acétylcholine ont été retenus pour caractériser le mode d'action d'EXPAR au niveau du système parasympathique :

- le carbachol, ayant les mêmes effets que l'acétylcholine, mais de durée plus longue, et donc agoniste de référence indiscutable et dont l'activité est essentiellement liée aux récepteurs muscariniques;
- la diméthyl phényl pipérazine (DMPP), stimulant spécifique des récepteurs nicotiniques.

Pour le blocage des récepteurs muscariniques et nicotiniques, les antagonistes ont été administrés dans la cuve à organe isolé 30 minutes avant l'emploi de la première dose de l'agoniste. Ce sont respectivement l'atropine, qui inhibe les récepteurs muscariniques et l'hexaméthonium, qui bloque la transmission de l'influx des structures nicotiniques ganglionnaires.

4. 3. 1. Effets comparés de l'EXPAR et de la strophantine G sur la tension musculaire

La stimulation directe ou indirecte d'une préparation musculaire ou neuromusculaire permet de vérifier si la fibre musculaire reste contractile ou non pendant une paralysie. Une jauge de contrainte à levier a permis de mesurer isotoniqument la tension maximale musculaire développée par la préparation

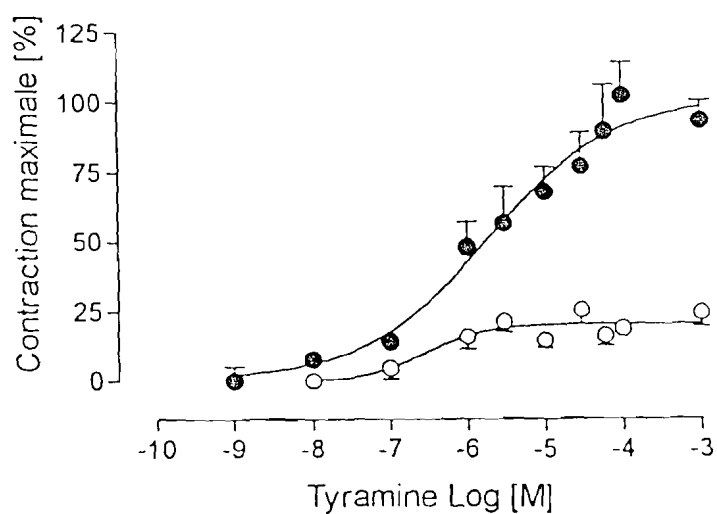


Figure 36 : Courbe effet - concentration de la tyramine sur la force contractile développée par la bandelette de la veine porte de rat :

Courbe dose - réponse de la tyramine en présence des concentrations allant de 10^{-8} M à 10^{-4} M avant (●) et après (○) le traitement avec la 6-OHDA. Les abscisses représentent la concentration d'EXPAR en $\mu\text{g/ml}$, les ordonnées, l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de six préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=8$).

Les histogrammes de la figure 37 représentent les effets d'EXPAR à une concentration de 10 µg/ml et de la strophantine G (5×10^{-6} M) sur la force contractile du muscle intestinal. Ces deux substances exercent une action stimulante sur le muscle intestinal qui se traduit par une augmentation, respectivement de 33 ± 6 % et 40 ± 3 %, de la réponse contractile du *Taenia coli*.

4. 3. 2. Influence de l'atropine sur l'effet d'EXPAR au niveau de la tension musculaire de la préparation de *Taenia coli*

L'atropine, tout comme la N - méthyl - scopolamine (NMS), inhibent les effets muscariniques de l'acétylcholine. Ce sont donc des parasympholytiques.

La figure 38 représente les histogrammes illustrant l'effet d'EXPAR et du carbachol sur l'activité contractile du *Taenia coli*. Après 30 minutes d'incubation de la préparation à l'atropine à une concentration de 3×10^{-7} M, EXPAR à une concentration de 10 µg/ml provoque une augmentation de la force contractile. L'atropine tout comme la NMS ne présente aucune action inhibitrice des effets stimulants d'EXPAR.

L'action stimulante exercée par le carbachol à 3×10^{-7} M (104 ± 4 %) au niveau de la préparation est, contrairement à EXPAR, abolie après les 30 minutes d'incubation à l'atropine ou à la NMS. Par conséquent, EXPAR doit son effet stimulant à l'activation d'autres types de récepteurs que les récepteurs muscariniques.

4. 3. 3. Influence d'hexaméthonium sur l'action stimulante d'EXPAR au niveau de la réponse contractile du *Taenia coli*

La diméthyl phényl pipérazine (DMPP) exerce une action stimulante similaire à celle d'EXPAR sur le muscle intestinal en induisant une contracture du *Taenia coli*. EXPAR et DMPP augmentent respectivement de 33 ± 6 % et 27 ± 5 % la force de contraction de l'organe.

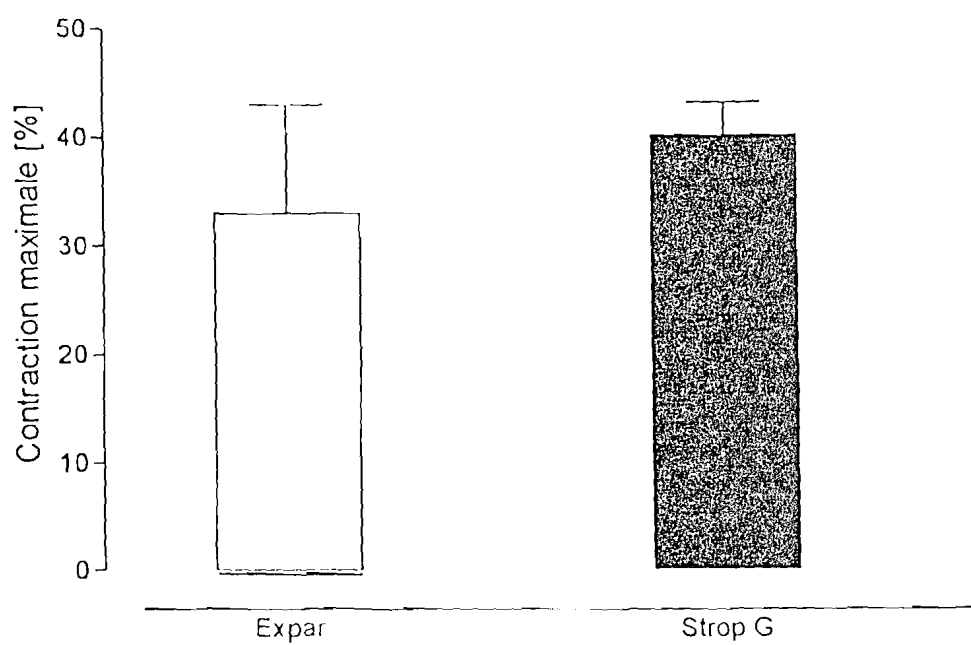


Figure 37: Effet d'EXPAR et de la strophanthine G (Strop G) sur la tension musculaire de la préparation de *Teania coli* :

Les ordonnées représentent l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de n préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n=6-12$).

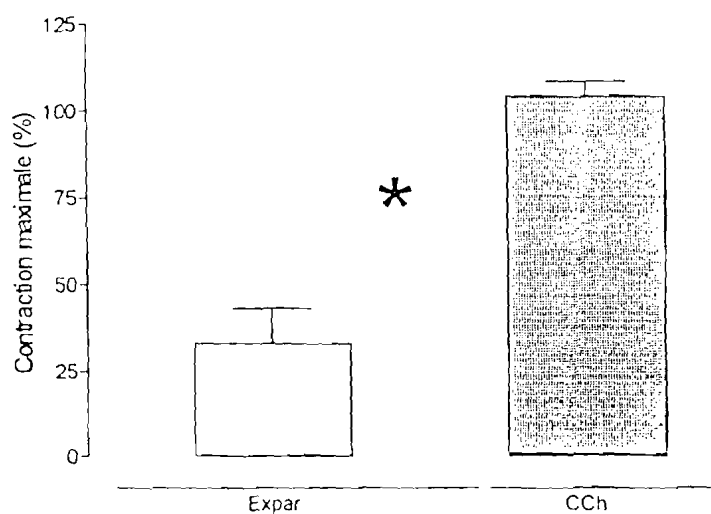


Figure 38 : Effet d'EXPAR et du carbachol (CCh) sur la tension musculaire du *Teania coli*:

Les ordonnées représentent l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de n préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n = 6-12$, $p < 0,05$).

Après une période de 30 minutes d'incubation avec l'hexaméthonium à une concentration de 10^{-4} M, les réponses contractiles développées par le muscle sont inhibées en présence aussi bien d'EXPAR que du DMPP. Par contre, l'effet stimulant du carbachol sur la préparation est très faiblement inhibé en présence d'hexaméthonium contrairement à EXPAR et au DMPP (Fig. 39).

Il faut signaler que l'application de ganglioplégiques, comme l'hexaméthonium, montre que la phase contractile stimulante observée au niveau de la structure musculaire lors de l'administration aussi bien d'EXPAR que du DMPP n'apparaît plus.

Il convient de remarquer que l'atropine n'a pas d'influence sur l'effet du DMPP mais seulement sur celui du carbachol. Ceci suggère la nature cholinergique des récepteurs responsables de la contraction musculaire observée en présence d'EXPAR tout comme la substance de référence, le DMPP.

4. 4. Recherche de separation des substances actives contenues dans l'extrait de *Parquetina nigrescens*

4. 4. 1. Tests de reconnaissance de principes actifs

Nous nous sommes servis des tests de DRAGENDORFF, de BALJET, et d'autres tests chimiques pour caractériser les différents groupes chimiques contenus dans l'extrait de *Parquetina nigrescens* et responsables des effets biologiques. La recherche des alcaloïdes, des hétérosides et de groupes amines ont donné des tests positifs.

4. 4. 2. Etude en chromatographie

La technique de chromatographie permet la séparation des composants contenus dans une substance ou un extrait animal ou végétal. Le présent travail a pour objectif de trouver les techniques favorables à la séparation des principes actifs de *Parquetina nigrescens*

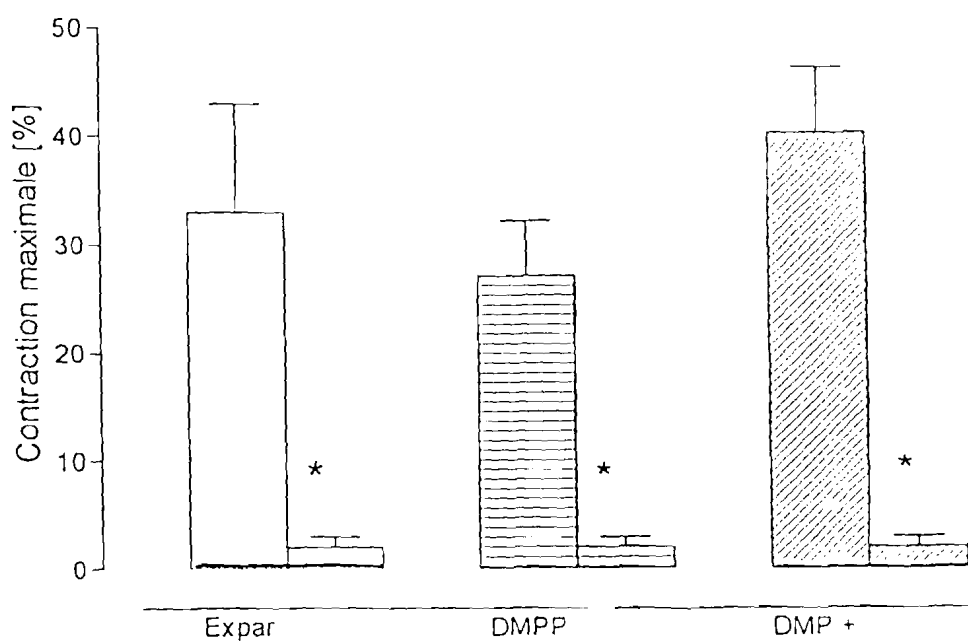


Figure 39 : Effets comparés d'EXPAR et du DMPP sur l'activité contractile du *Tenia coli* avant et après l'incubation avec l' hexaméthonium.

Les ordonnées représentent l'augmentation de la force de contraction en pourcentage. Les valeurs représentées sont la moyenne \bar{X} de n préparations affectées de l'erreur standard sur la moyenne S_x ($\bar{X} \pm S_x$, $n = 6 - 12$, $p < 0.05$).

4. 4. 2. 1. Préparation des essais pour l'analyse chromatographique

Les extractions sont habituellement réalisées avec de l'alcool ou avec un mélange alcool - eau distillée afin de les utiliser directement en HPLC. La technique que nous avons utilisée se différencie des autres pour deux raisons essentielles:

- premièrement, l'extrait obtenu des feuilles peut contenir une quantité de substances accompagnatrices (Chlorophylle, flavonoïde, anthocyane) qui pourraient faire disparaître les points de migration de glycosides cardiaques éventuellement masqués par une grande quantité de pigments.
- deuxièmement, ces substances accompagnatrices non identifiables pourraient saturer les colonnes ce qui les rendrait très vite inutilisables. C'est pour palier ce genre de difficultés que JURENITSCH et al. (1980) ont mis au point cette analyse par *Convallaria* sp. pour confirmer la présence d'autres glycosides cardiaques.

Les meilleurs résultats sont obtenus après précipitation à l'acétate de plomb. Ainsi la chlorophylle et les autres groupes phénoliques qui l'accompagnent (Flavonoïde, anthocyanes) sont isolés de l'extrait (WICHTL et al., 1982).

4. 4. 2. 2. Chromatographie sur couches minces

La meilleure séparation a été obtenue avec le mélange acétone - eau - acétate d'éthyle. La distance de migration est de 15 cm. L'analyse quantitative des glycosides contenus dans *Parquetina* basée sur une réaction colorimétrique est réalisée grâce à la méthode de BALJET.

Seuls les glycosides à quatre sucres peuvent être obtenus jusqu'à une quantité de 600 mg avec 10 ml d'acide sulfurique. La sensibilité de la mesure spectrophotométrique dans de l'acide sulfurique est bien sûr plus grande que la mesure colorimétrique de BALJET (KARTNIG et DANHOFFER, 1970). Par contre l'avantage de la mesure photométrique réalisé sur du MgO est qu'il est possible de dissoudre totalement la substance tirée de la digitale dans la solution d'acide sulfurique.

4. 4.2.3 : chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC)

La figure 41 représente le chromatogramme de glycoside de *Parquetina nigrescens*. Nous avons fait l'analyse quantitative par HPLC selon la méthode de WICHTL et al. (1982) qui permet l'extraction de digitaliques à partir de feuilles de plante (Combinaison de la chromatographie sur papier et la mesure photométrique selon la méthode de BALJET).

A partir d'un extrait homogène de feuilles de *Parquetina nigrescens*, nous avons calculé la moyenne de dix analyses. Les erreurs standards sur la moyenne sont relativement faibles. Dans ces conditions, une faute due à la présence de substances accompagnatrices comme les chlorophylles n'est plus à craindre. La séparation de l'extrait des feuilles de *Parquetina nigrescens* montre des points positifs à la chloramine T à côté de ceux du strophantine G et de la digitoxine (Fig. 40).

L'examen des fractions obtenues par l'analyse HPLC montre que certaines substances contenues dans l'extrait ont été retrouvées. Au niveau des bandes 3 et 4, l'observation en chromatographie sur couches minces dans une solution de migration composée de chloroforme - méthanol - éthanol - eau dans les proportions 80:11:10:8, et après la coloration à la chloramine T, montre la présence de groupes chimiques contenus.

L'ensemble des travaux décrits dans la première partie de ce travail nous autorise à émettre l'idée de la présence de glycosides cardiotoniques et surtout d'une fraction d'alcaloïdes dans les feuilles de *Parquetina nigrescens*. En effet, toutes les méthodes utilisées ont fournis des résultats positifs.

La réaction de BALJET couplée à la technique de spectrophotométrie, très sensible et assez spécifique, ainsi que les différents chromatogrammes sur couches minces réalisés en présence de témoins, nous ont indiqué la présence aussi bien de

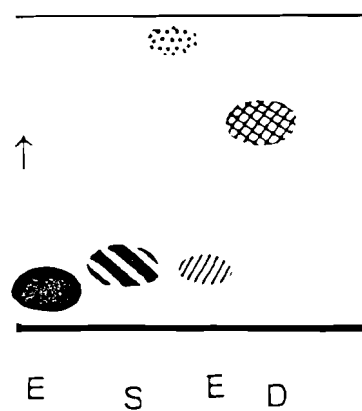


Figure 40: Exemple de chromatographie sur couche mince de *Parquetina nigrescens*

Les lettres E₁ et E₂ correspondent respectivement à l'extraction de *Parquetina nigrescens* à l'eau et à l'éthanol. Les lettres S et D représentent la Strophantine G et la Digoxine.

glycosides cardiotoniques que de groupement amine. Ce résultat confirme donc l'hypothèse selon laquelle la toxicité de *Parquetina nigrescens* serait due à la présence de glycosides cardiotoniques aminés.

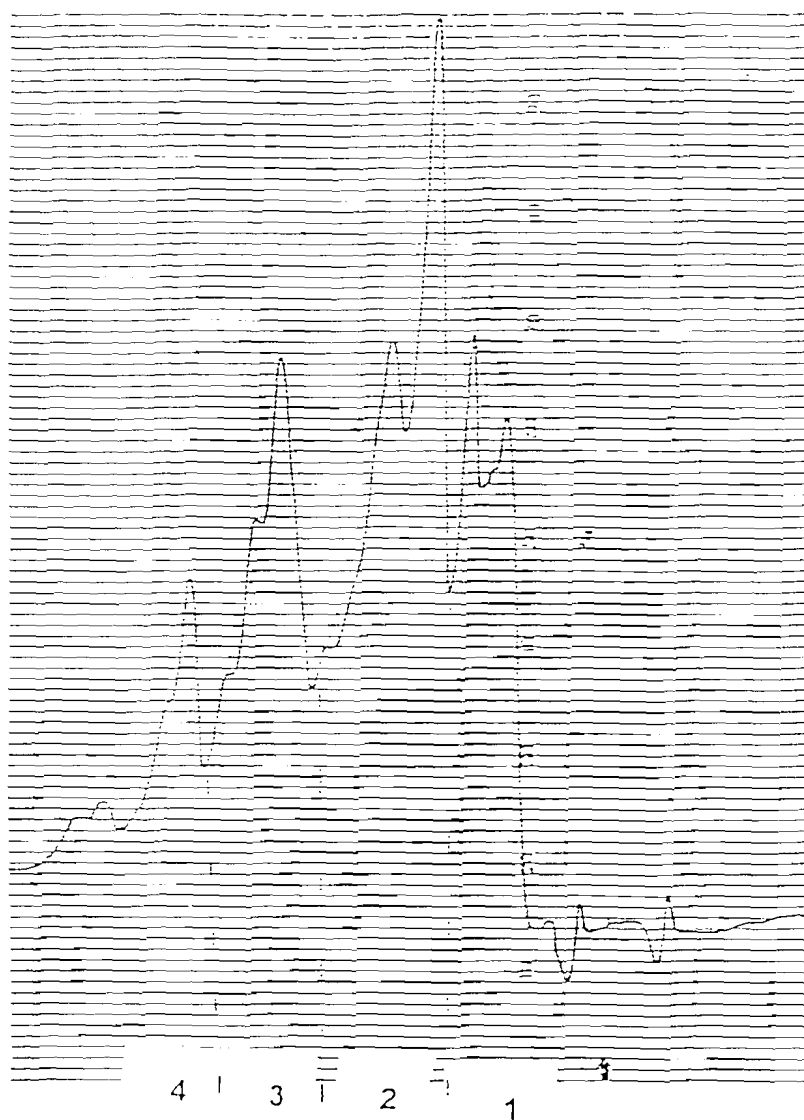


Figure 41: Exemple de séparation de composés actifs contenus dans EXPAR par la technique de chromatographie HPLC.

Les chiffres 1, 2, 3, 4 représentent l'ordre de séparation des composants contenus dans l'extrait.

5- DISCUSSION

5. 1. Effets d'EXPAR sur l'activité contractile auriculaire de cobaye: Influence des récepteurs bêta

Les propriétés cardiotoniques de substances extraites de plantes ont déjà fait l'objet de plusieurs travaux (BENFORADO, 1958; GERSMEYER et HOLLAND, 1963; ALLAN et SCHWARTZ, 1969; GOODMAN et GILMAN, 1975; HERZIG, 1984). Les substances chimiques souvent isolées de ces plantes contiennent des principes très actifs.

En ce qui concerne la famille des périplocacés, SCHENKER et al. en 1956, BERTHOLD et al. en 1965 et 1966, BRANDT et al. en 1966, ont isolé de l'espèce *Parquetina nigrescens* récoltée dans les forêts du Gabon et du Congo, un complexe de glycosides. Le principe actif isolé par ces chercheurs est la nigrescigénine.

Sur les préparations cardiaques battant spontanément ou stimulées à rythme constant, l'action d'EXPAR se traduit par des effets inotrope et chronotrope positifs dont l'intensité est fonction de la concentration; au-delà d'une certaine limite, ils s'inversent. Les mêmes effets sont obtenus avec la strophantine G. EXPAR présente une courbe biphasique, la structure est celle d'un digitalique et son action liée aussi bien au calcium extracellulaire qu'au calcium intracellulaire.

Pour l'explication du mécanisme d'action d'EXPAR au niveau du muscle cardiaque, en comparaison avec la strophantine G ou la noradrénaline, respectivement substance digitalique et substance sympathique, nous nous sommes servis des réactifs pharmacologiques suivants :

1. le propranolol inhibe respectivement les effets cardiaques des substances sympathomimétiques par blocage des récepteurs bêta de façon compétitive (BLACK et al., 1964; NAKANO et SAKATO, 1966).
2. l'aténolol, antagoniste adrénergique agit spécifiquement au niveau des récepteurs β_1 par un blocage des effets sympathiques (NAYLER, 1966).
3. le vérapamil, antagoniste calcique, inhibe les différents canaux calciques.

Les modalités et les mécanismes régissant les effets inotrope et chronotrope positifs peuvent être multiples et se situer à plusieurs niveaux de la cellule cardiaque (RICH et LANGER, 1975). L'hypothèse d'un récepteur adrénergique, plutôt qu'une multitude de récepteurs distincts (ALHQUIST, 1948; HAUSTEIN, 1974) dans la formation du complexe: Agoniste - Récepteur - Protéine de couplage (A - R - Pc) précédant les réactions post - récepteurs, nous apparaît plus cohérente pour l'interprétation des résultats rapportés.

Au niveau des oreillettes isolées de cobayes les courbes doses - réponses de la strophantine G présentent deux phénomènes distincts : une action positive inotrope et un effet toxique. Plus la concentration de la strophantine G est élevée (supérieure à 7×10^{-6} M), plus on observe des arythmies et une contracture musculaire, plus caractéristiques d'un surdosage du glycoside administré.

Les courbes dose - réponse d'EXPAR et de la strophantine G, au niveau des oreillettes de cobayes sont significativement différentes. L'action rapide et réversible d'EXPAR fait penser à une action de type catécholamine car ce groupe de substance présente des effets inotrope et chronotrope rapides et réversibles. Contrairement à EXPAR, l'augmentation de la force contractile du muscle cardiaque en présence de la noradrénaline est totalement inhibée par le propranolol à la différence d'une substance sympathomimétique.

EXPAR n'est pas seulement de type digitalique mais présente aussi un effet sympathomimétique. Cela s'explique par le fait que l'effet d'EXPAR est partiellement inhibé après un traitement au propranolol ou à l'aténolol aux concentrations de 10^{-7} M et 10^{-6} M, et celui de la noradrénaline est complètement bloqué par ces deux antagonistes, alors que l'action de la strophantine G n'est pas influencée par la présence de ces bloqueurs β .

Les travaux menés sur les sympathomimétiques à action directe ou indirecte par REUTER en 1966 et SACHS et JONSSON (1972) montrent un accroissement du courant calcique entrant, provoquant ainsi l'effet inotrope positif. Pendant l'excitation, le courant calcique peut être accru par l'intermédiaire de l'adrénaline et de la noradrénaline. Sans un accroissement de la concentration calcique, une

contraction des protéines contractiles n'est possible (KATZ et al., 1966; WEBER et al., 1967; MEINERTZ et SCHOLZ, 1968).

Dans le cas des échanges ioniques au niveau du coeur, il a été montré, à l'aide de la technique utilisant le $^{45}\text{Ca}^{2+}$, que l'augmentation du calcium entraîne aussi bien l'accroissement de l'effet des catécholamines que de celui des glycosides cardiaques (GROSSMAN et FURCHGOTT, 1964; PETERS, 1982; SANTANA et al., 1998).

Les effets du vérapamil sur la même préparation sont une diminution du rythme et de la force contractile. Ils sont dus à une diminution de la concentration extracellulaire de Ca^{2+} par blocage des canaux calciques. EXPAR s'oppose à ces effets et restaure rythme et force contractiles normaux.

Dans d'autres expériences on peut montrer que l'addition de Ca^{2+} dans le bain de la préparation augmente les effets d'EXPAR, ce qui indique que ce dernier agit par l'intermédiaire du Ca^{2+} .

Les résultats de ces travaux, sur l'influence du calcium et de son antagoniste (le vérapamil), peuvent donc témoigner qu'après un traitement avec EXPAR, l'accroissement du calcium extracellulaire peut également induire une augmentation de la force contractile au niveau des structures contractiles.

On peut donc en déduire que sur la préparation, EXPAR provoque :

- des effets chronotrope et inotrope positifs, dont le mécanisme est en partie de nature sympathomimétique
- et d'autre part voisin de celui des glycosides cardiotoniques.
- les deux effets provoquent une augmentation extracellulaire de calcium donc de la contraction musculaire.
- l'effet sympathomimétique est rapide et transitoire,
- l'effet glycosidique est lent et prolongé

- enfin, l'effet tachycardisant, qui est décrit précédemment comme pouvant résulter d'une accélération de la conduction cardiaque, pourrait avoir des implications dans le cas de troubles du rythme de façon soit bénéfique, soit néfaste.

Il n'est pas évident de démontrer si la phase excitatrice du faisceau musculaire cardiaque à travers les sympathomimétiques, augmente par le courant calcique (REUTER, 1966; REUTER et WOLLERT, 1967) dû à l'activation des récepteurs β . Cet accroissement est prédominant dans le muscle cardiaque (HERZIG, 1988).

Les effets toxiques, diminution de la force contractile s'expliquent ainsi : Lorsque la concentration d'un glycoside cardiaque est très élevée, quand donc plusieurs ATPases sont inactivées, nous assistons à une inhibition du transport Na^+ - K^+ . La perte de potassium par la cellule a pour conséquence une réduction du transport calcique. Il en résulte ainsi une baisse du potentiel transmembranaire, une augmentation de l'état d'excitabilité et un développement de l'automatisme cardiaque suivi d'arythmies (BRADE et al., 1974).

De même, REITER en 1975; LÜLLMANN et al. en 1975 ont montré qu'un changement de la conformation, surtout dans sa partie lipidique de l'ATPase, par la présence d'un glycoside ne peut qu'induire un changement dans le couplage électromécanique du calcium. Ce qui entraîne pour chaque dépolarisation plus de calcium libéré dans le cytosol, avec pour conséquence une augmentation de la contraction des myofilaments.

Bien que l'action inotrope positive et l'effet toxique soient liés à l'activité de substances au niveau de la Na^+ - K^+ ATPase, dans les marges de concentrations thérapeutiques, seulement une partie de l'ATPase serait inhibée par le glycoside. Cette pompe étant en partie inactivée, elle ne peut qu'entraîner une inhibition du transport des ions sodiques et potassiques (AKERA, 1977; BENTFELD et al., 1977; SANDERMANN, 1978. LÜLLMANN et PETERS, 1979).

Contrairement aux glycosides, beaucoup de substances ont un „temps de vie“ moyen, c'est - à - dire que le complexe formé avec l'ATPase est stable pendant un temps défini et court. Par contre les glycosides (la strophantine G) forment avec l'ATPase un complexe au niveau du muscle cardiaque de Cobaye pour un temps relativement long (environ 20 minutes). Ceci explique l'inactivation prolongée de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (BENTFELD et al., 1977), responsable à long terme des phénomènes d'intoxication observés.

Cette connaissance est en accord avec l'interprétation selon laquelle les effets inotropes positifs des dérivés glycosidiques sont similaires à ceux des catécholamines, ou tout au moins induisent tous deux, une augmentation du courant calcique extracellulaire pendant la phase d'excitation, ce qui entraîne un accroissement de la concentration intracellulaire en calcium libre, et donc une amélioration de la contraction.

Un inconvénient dans l'emploi médical des glycosides cardiaques est leur marge thérapeutique très étroite. Bien que l'effet et le mécanisme d'action des glycosides soient en partie connus, que les indications thérapeutiques soient bien connues, le gros problème de l'emploi des glycosides reste leur faible marge thérapeutique. D'où l'intérêt accordé à EXPAR qui possède une marge thérapeutique plus élevée.

Nous observons un parallélisme étroit entre l'augmentation de la force contractile de type digitalique de l'activité auriculaire et l'effet inotrope de type sympathomimétique des groupes amines. Ainsi nous voulons savoir si l'effet d'EXPAR induit au niveau auriculaire de type catécholamine est celui de substance de type noradrénergique à action directe (noradrénaline) ou indirecte (tyramine) d'après la classification de TRENDELENBURG (1963).

5. 2. Effets sympathomimétiques d'EXPAR : Influence des récepteurs alpha dans l'action stimulante d'EXPAR au niveau de la veine porte isolée de rat

Cet organe est intéressant pour l'étude des dérivés sympathomimétiques α . On sait que la veine porte présente une concentration élevée en catécholamines (de l'ordre de 10 μg par gramme de tissu frais) alors que le coeur n'en contient que 0,6 μg par gramme de matière fraîche (SHORE, 1962).

De nos résultats, il ressort que la veine porte de rat réagit aux différents réactifs pharmacologiques de la façon suivante :

1. elle se contracte sous l'effet de la noradrénaline aux concentrations de 10^{-8} M à 10^{-5} M. Avant un deuxième essai à l'aide de cette catécholamine, il faut laisser le muscle se relâcher complètement et même le laver soigneusement pendant un temps suffisant (10 minutes environ) sous peine d'observer une réponse nettement diminuée.
2. la tyramine aux concentrations de 10^{-7} M à 10^{-4} M contracte le muscle; il se produit une tachyphylaxie plus ou moins rapide selon la sensibilité de la préparation.
3. EXPAR aux doses de 1 à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ exerce une action stimulante sur la structure veineuse. Les effets observés avec cette substance sont réversibles et reproductibles.
4. La prazosine, antagoniste spécifique des récepteurs α_1 , inhibe aussi bien les effets stimulants d'EXPAR, de la noradrénaline que de la tyramine.
5. Enfin, la préparation traitée avec la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ne se contracte pas en présence de la tyramine, mais faiblement en présence d'EXPAR. La 6-OHDA n'a aucune influence sur la contraction observée en présence de la noradrénaline.

EXPAR exerce une action stimulante sur la structure musculaire qui est supprimée par la prazosine, adrénolytique α_1 . Les bloqueurs des récepteurs β tels que le propranolol ou l'aténolol semblent peu actifs sur l'effet stimulant d'EXPAR. Le fait que de faibles concentrations de prazosine soient capables d'inhiber l'effet

d'EXPAR est un argument en faveur d'une action directe de type sympathomimétique α_1 .

L'utilisation d'antagonistes des récepteurs α_1 , nous ont permis de démontrer que la réponse du muscle à l'action stimulante d'EXPAR est due à l'activation des récepteurs α_1 . Ce qui sans doute expliquerait son utilisation dans les conjonctivites en Médecine traditionnelle (BOUQUET, 1972). Mais malheureusement les effets cardiaque et vasculaire ne permettent pas de conclure quant à certaines utilisations thérapeutiques traditionnelles de cette plante dans des régions africaines.

Quant à l'action stimulante de la noradrénaline sur la structure musculaire, supprimée par les deux types d'antagonistes α et β des récepteurs noradrénergiques, elle résulte d'une action sympathomimétique directe sur l'activité contractile des vaisseaux. La noradrénaline entraîne une hyperpolarisation des muscles lisses par stimulation des récepteurs α_1 (BÜLBRING et TOMITA, 1987). Cela serait dû aux ions potassiques de la membrane cellulaire.

La 6-OHDA n'a aucune influence sur l'effet stimulant de la noradrénaline au niveau de la veine porte de rat. Par contre, EXPAR perd totalement ou partiellement ses effets stimulants sur les préparations prétraitées à la 6-OHDA.

Après le traitement à la 6-OHDA, la tyramine perd ses propriétés stimulantes. Les effets pharmacologiques de la tyramine sont principalement dus à une libération de la noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses noradrénergiques. La déplétion de la noradrénaline par la 6-OHDA de ses réservoirs, pourrait également empêcher ces deux substances de pénétrer dans la cellule et de libérer la noradrénaline stockée. La tyramine fonctionne comme un sympathomimétique indirect.

La diminution de la force de contraction en présence d'Expar après le traitement avec la 6-OHDA montre clairement que cet extrait agit comme la tyramine par une action sympathomimétique indirecte

Les essais sur la veine porte isolée de rat par REITER et BRANDT (1970); BRADING et SNEDDON (1980) suggèrent que le mécanisme de la sensibilisation à la noradrénaline par EXPAR ressemble à celui que l'on observe dans le cas de la tyramine. La sensibilisation d'EXPAR aux catécholamines semble être due à la fixation de ce produit sur les récepteurs non spécifiques de la noradrénaline qui dès lors se concentre sur les récepteurs actifs. A cela s'ajoute probablement un effet sur la perméabilité de la membrane nerveuse et des granules ce qui aurait aussi pour conséquence d'accroître la concentration des catécholamines à effet α au niveau des récepteurs actifs.

Parallèlement, les travaux de FURCHGOTT et al. en 1963 sur le Cobaye et de LINDMAR et MUSCHOLL en 1965 sur le Rat montrent que l'effet inotrope positif de la noradrénaline au niveau de l'activité auriculaire, serait stimulé par la tyramine. De tels travaux ont été menés par WHITBY et al. en 1961, IVERSEN en 1967 et BRANDT et al. en 1972, au niveau du muscle lisse.

Contrairement aux molécules d'acétylcholine, les catécholamines ne seraient pas décomposées au niveau des terminaisons nerveuses, mais plutôt reprises dans l'axone présynaptique. Ce retour nécessite une dépense d'énergie. Mais ce captage de la noradrénaline peut être entravé par des substances comme les ions cyanure, le dinitrophénol ou par une anoxie. Les substances inhibitrices de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase, comme la strophantine G peuvent également l'inhiber (IVERSEN, 1973).

Cette partie de notre travail montre qu'à côté de l'action de type digitalique produit par EXPAR au niveau du coeur de cobaye, il en existe une autre de type sympathomimétique au niveau de la veine porte (EULER et LISHAJKO, 1960; AXELROD et al., 1962).

La figure 42 schématise le mécanisme d'action d'EXPAR au niveau de cette structure :

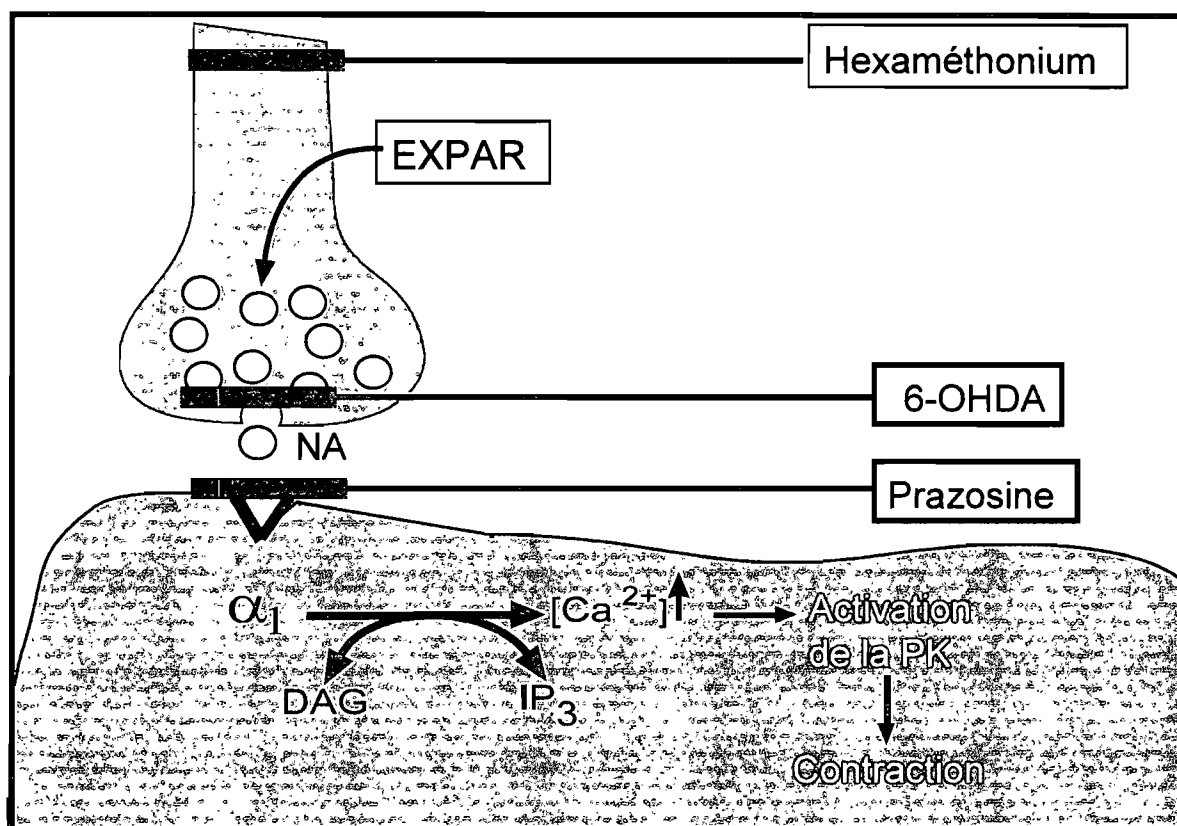


Figure 42 : Mécanisme d'action d'EXPAR sur le muscle lisse de veine porte :

EXPAR, agissant comme un sympathomimétique indirect au niveau de la veine porte isolée de rat. α_1 -R = Récepteur alpha 1, DAG = Diacylglycéril, IP₃ = Inositol triphosphate, NA = Noradrénaline, PK= Protéine kinase.

5. 3. Effets d'EXPAR sur les mécanismes cholinergiques

L'acétylcholine exerçant deux types d'actions bien distincts, muscariniques et nicotiniques, il est possible de préciser les caractéristiques physico-chimiques des molécules susceptibles d'établir une liaison spécifique avec les récepteurs impliqués dans l'un ou l'autre de ces types d'actions (PATON et ZAMIS, 1952; BÜLBRING, 1962).

Le nombre de neurones en comparaison avec les autres structures contractiles lisses est très élevé. Ainsi le tonus musculaire du *Taenia coli* de cobaye est directement dépendent de la concentration en ions calcium libres dans le cytosol, qui activent les éléments contractiles (BORLE, 1981; BOLTON, 1985).

Dans notre expérimentation, le *Taenia coli* sert de modèle, car il renferme une forte concentration de neurones (BOLTON, 1979) et par conséquent des récepteurs cholinergiques influençant l'activité pharmacologique.

Différentes substances ont été testées en présence d'antagonistes des deux types de récepteurs muscariniques et nicotiniques. EXPAR provoque le développement d'une contracture du muscle lisse de *Taenia coli* comme le font le carbachol, le DMPP, la strophantine G.

L'action stimulante du carbachol est inhibée en présence de l'atropine ou de la N - méthyl - scopolamine (NMS). Celle-ci serait donc due principalement à un effet muscarinique.

EXPAR exerce une action stimulante sur le muscle, qui n'est influencée ni par l'atropine ou la NMS, mais inhibé en présence de l'hexaméthonium. De même, le DMPP voit son effet complètement aboli par l'Hexaméthonium. Contrairement à EXPAR et au DMPP, l'effet du carbachol est complètement inhibé par l'atropine et la NMS.

 Inhibition de la force de contraction

Substances	Atropine	NMS	Hexaméthonium
EXPAR	+	+	-
Strophantine G	+	+	+
DMPP	+	+	-
Carbachol	-	-	+

Table 2: Résumé des effets d'EXPAR, de la strophantine G, du DMPP et du carbachol sur l'activité contractile musculaire du *Taenia coli* de cobaye.

Le signe + indique une stimulation et le signe- une inhibition.

La sensibilisation à la noradrénaline de la fibre musculaire lisse des vaisseaux n'est pas due à un effet nicotinique : en effet, l'hexaméthonium inhibe l'action d'EXPAR, alors qu'il ne modifie guère l'action de la noradrénaline, qui sensibilise intensément ce muscle lisse.

Ces observations montrent qu'au niveau des récepteurs cholinergiques EXPAR n'exerce aucune influence sur des récepteurs muscariniques, et par conséquent ne possède aucun site d'action au niveau de ces récepteurs. Les effets antagonistes de ceux du carbachol induits par EXPAR sont possibles grâce aux récepteurs nicotiniques.

6- CONCLUSIONS

Les effets pharmacologiques de l'extrait de *Parquetina nigrescens* en comparaison avec ceux de la digitale et de la noradrénaline sur le muscle cardiaque auriculaire et les muscles lisses de la veine porte et de *Taenia coli*, nous ont permis de révéler les caractéristiques suivantes :

Propriétés:

- Au niveau cardiaque :

1. Il augmente la force de contraction de l'oreillette gauche isolée stimulée électriquement ainsi que la fréquence spontanée de l'oreillette droite de cobaye.
2. Le propranolol et l'aténolol diminuent la vitesse de l'action inotrope positive d'EXPAR. Ils suppriment partiellement l'effet inotrope positif et abolissent l'action chronotrope positive cardiaque induits par EXPAR.

Ces effets sont dus à deux actions qui s'ajoutent, un effet de type glycosidique et un effet sympathomimétique. L'effet glycosidique est le plus important, il est rapide et réversible tout comme l'effet sympathomimétique. Ces effets sont dus à l'inhibition de la pompe ATPasique $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dépendante et à l'activation des récepteurs β .

- Au niveau vasculaire :

3. Expar augmente l'amplitude et accroît la fréquence de la contraction spontanée de la veine porte (α).
4. Les effets sur la préparation vasculaire sont supprimés en présence de prazosine et sont partiellement inhibés après un traitement avec la 6-hydroxydopamine.

Les effets sont dus à une stimulation des récepteurs α de la préparation de la veine porte. Il agit comme un sympathomimétique indirect parallèlement à son action digitalique

- Au niveau du *Taenia coli*

5. Expar provoque une contracture de la fibre lisse musculaire

6. L'hexaméthonium inhibe l'effet d'Expar. Cependant les effets de la strophantine **G** et de la noradrénaline ne sont pas influencés par l'hexaméthonium.

Expar développe son activité au niveau des organes à imprégnation cholinergique par le biais des récepteurs nicotiques.

- Au niveau des tests de chromatographie :

7. Les essais de séparation des cardénolides et des substances sympathomimétiques indirectes, à l'aide de la chromatographie sur couche mince ou celle à haute performance, n'ont pas donné les résultats escomptés. Nous avons seulement pu observer quatre groupes chimiques dont deux détectés par la coloration à la chloramine T sont. Notre technique de séparation n'est par conséquent pas concluante.

Mécanismes :

L'EXPAR développe les propriétés suivantes:

1. Il inhibe la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase
2. Il agit en synergie avec le Ca^{2+}
3. Il provoque des effets sympathomimétiques
4. Il est stimulant de la transmission ganglionnaire.

Composition :

Les principes actifs restent à identifier au niveau de la structure chimique. Ce sont des cardénolides de type nigrescigénine et des substances de type tyramine.

La figure 43 résume le mécanisme général d'action d'EXPAR :

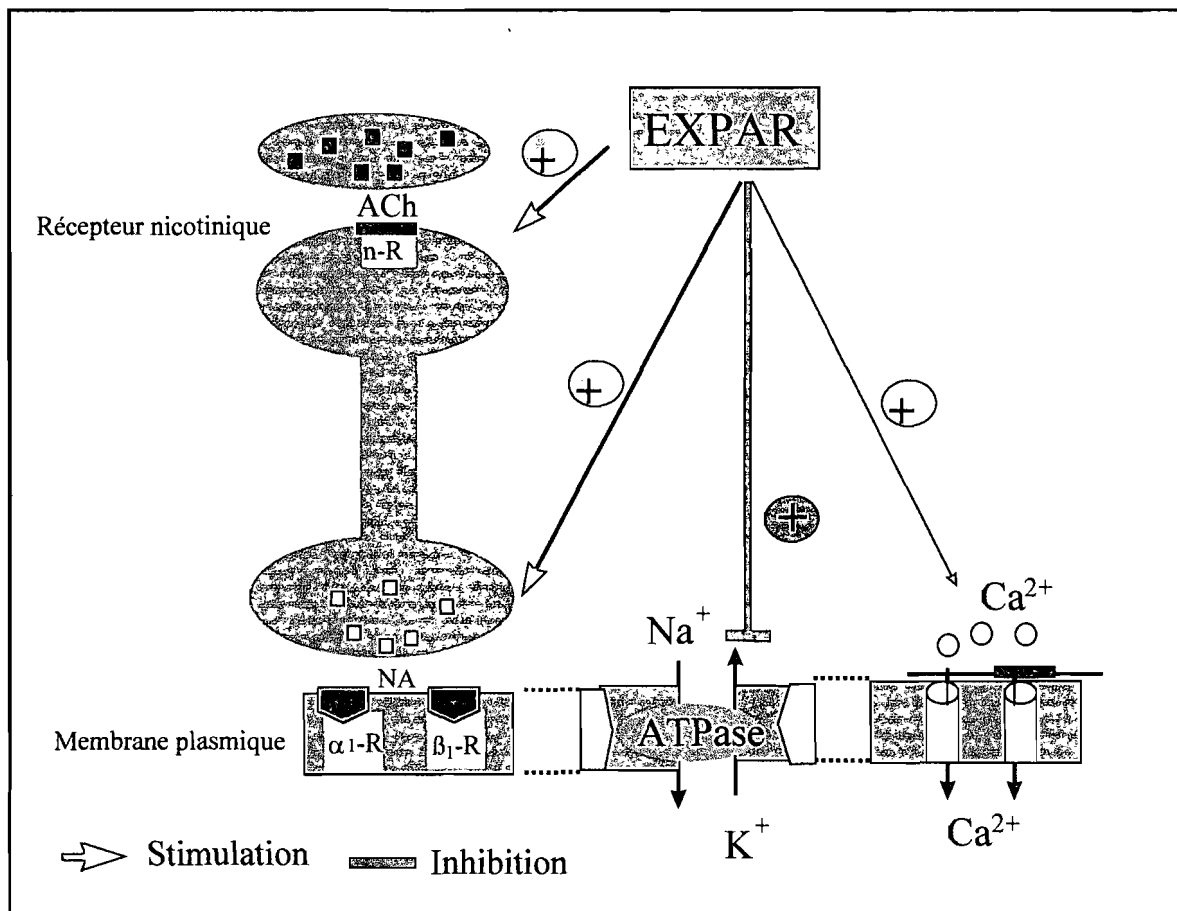


Figure 43: Mécanisme d'action d'EXPAR au niveau des différentes structures contractiles étudiées.

Les traits indiqués en vert représentent une stimulation et en rose une inhibition au niveau de la structure. ACh = Acétylcholine, NA = Noradrénaline, α_1 -R = Récepteur alpha de type 1, β_1 -R = Récepteur bêta de type 1, n-R = Récepteur nicotinique

BIBLIOGRAPHIE

AHLQUIST, R.P. (1948)

A study of adrenotropic receptors.
Am. J. Physiol. 154, 586-599.

AKE 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*, vol 4 n°2, 203 p.

AKERA, T.(1977)

Membrane adenosintriphosphatase: A digitalis receptor? *Science* 198, 569-574

ANGENOT, L. (1934)

Les poisons de flèches africaines. 1.Zaire, Rwanda et Burundi. *Africa Tervuren* 8, 72-4.

ARIENS, E.J. (1964)

Molecular Pharmacology The mode of action of biologically active compounds. Academic Press, New York and London.

AXELROD, J. HERTING, G. et PORTER, L.T. (1962)

Effect of drugs on the uptake and release of H-norepinephrine in the rat ear.
Nature, 194, 297.

BAUMGARTEN, G. (1963)

Die herzwirksamen Glykoside. Edition Leipzig, 1-9.

BAYER, R., KALUSCHE, D , KAUFMANN, R. et MANNHOLD, R. (1975)

Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D_{600} in mammalian myocardium. III Effects of the optical isomers on transmembrane action potentials. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 290, 81-97

BENFORADO, J.M. (1958)

Frequency -dependent pharmacological and physiological effects on the rat ventricle strip. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 122, 86-100.

BENTFELD, M., LÜLLMANN, H., PETERS, T. et PROPPE, D. (1977)

Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle. *Br. J. Pharmacol.* 61, 19-27

BERTHOLD, R., WEHRLI, W. et REICHSTEIN, T. (1965)

Die Glykoside von *Parquetina nigrescens* (Afz.) BULLOCK *Helv. Chim. Acta* 48, 1634-1658.

BERTHOLD, R., WEHRLI, W. et REICHSTEIN, T. (1965)

Die Glykoside von *Parquetina nigrescens* (Afz.) BULLOCK *Helv. Chim. Acta* 48, 1659-1665.

BLACK, J. W., CROWTHER, A. F., SHANKS, R. G., SMITH, L. H. et DORNHORST (1964) A new adrenergic β -receptor antagonist. *Lancet* I, 1080.

BORLE, A. B. (1981)

Control, modulation and regulation of cell calcium. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 90, 13-153

BOLTON, T.B. (1985)

Calcium exchange in smooth muscle. In Parrat, J. R. (Edition) *Control and manipulation of calcium movement*. Raven Press New York, 147-168

BOLTON, T. B. (1972)

The depolarizing action of acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle. *J. Physiol. (London)* 220, 647-671

BRANDT, W., REITER, M et SEIBEL, K. (1972)

„Supramaximal“ Enhancement of the inotropic effect of noradrenaline by Tyramine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 273, 294-306

BRASCH et IVEN (1991)

Inotropic and electrophysiological effects of BDF 9148, a congener of DPI 201-106, in guinea-pig atria and papillary muscles. *Br. J. Pharmacol.*, 103: S. 1939-1945 (1991)

BÜLBRING, E. (1962)

Electrical activity in intestinal smooth muscle. *Physiol. Rev.* 42, 160-178

Kuriyama, H. (1968) Ionic basis of smooth muscle action potentials. In *American Physiol. Society. Handbook of Physiology*, Section 6: The alimentary canal 1767-1791.

BÜLBRING, E. et TOMITA, T. (1987)

Catecholamine action on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 39, 49-96

Bülbring, E. und Tomita, T. (1969)

BULLOCK, A. (1961)

Notes on African Asclepiadaceae IX. *Kew Bulletin* 15, 193-206

BUSSE, F., LÜLLMAN, H. et PETERS, T. (1979)

Concentration dependence of the binding of ouabain to isolated guinea pig atria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1, 687-698

CHEVALIER, A. (1951)

Découvertes récentes de plantes intéressantes dans le Haut-Oubangui. *Rev. Bot. Appl. Agric. Trop.* 31, 131-132

COHEN, I, DAUT, J et NOBLE, D (1976)

An analysis of the action of low concentrations of ouabain on membrane currents in Purkinje fibers. *J. Physiol. London*, 260, 75-103.

CORABOEUF, E. de LOZE, C. BOISTEL, J. (1953)

Action de la digitale sur les potentiels de membrane et d'action du tissu conducteur du coeur de chien étudiée à l'aide de micro - électrodes intracellulaires. C.R. Soc. Biol. 143, 1329-1331.

DATTE, J.Y., OFFOUMOU, A.M. et MANDA, O.M. (1996)

Uterotonic effects of hydromethanolic extract of *Parquetina nigescens* (Periplocaceae) on spontaneous contractile activity in the isolated myometrium of pregnant rats. Journal of Ethnopharmacology 53, 15-20.

DEGROOTE, V. (1960)

Note préliminaire sur les flèches empoisonnées et les poisons de flèches au Congo belge. Ann. Soc. Belge Med, tropicale 40, 97-104.

ENGLER, A. (1964)

Syllabus der Pflanzenfamilien. 2, 414

EULER, U.S. et LISHAJKO, F. (1960)

Release of noradrenaline from adrenergic transmitter granules by tyramine. Experientia 16, 376-377

FÖRSTER, W. et HOEFKE, W. (1960)

Vergleich der Wirkung von Spartein, Chinidin und Nicotin am isolierten Herzmuskel von Ratte und Katze Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 239, 383-392.

FURCHGOTT, R. F., KIRPEKAR, S. M., RIEKER, M. et SCHWAB, A. (1963)

Actions and interactions of norepinephrine, tyramine and cocaine on aortic strips of rabbits and left atria of guinea-pig and cat. J Pharmacol. Exp. Ther. 142, 39-58

GABELLA, G. (1976)

Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell Tissue Res.* 170, 161-185

GERSMEYER, E.F., HOLLAND, W.C. (1963)

Influence of ouabain on contractile force, resting tension, Ca^{45} entry and tissue Ca content in rat atria. *Circ. Res.* 12, 620-622.

GOLENHOFEN, K. (1970)

Spontaneous activity and functional classification of mammalian smooth muscle. In Bülbüling, E., Shuba, M.F. *Physiology of Smooth muscle*, 91-97 (1976), Raven Press, New York.

GROSSMAN, A. et FURCHGOTT, R. F. (1964)

The effects of external calcium concentration on the distribution and exchange of calcium in resting and beating guinea-pig auricles. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 145, 162-172

HARAKO, R. (1976)

The Mbuti as Hunters. *Kyoto University African Studies* 10, 37-99.

HAUSTEIN, K.O. (1974)

Studies on cardioactives steroid. I. Structure-activity relationships on the isolated atrium. *Pharmacology* 11, 117-126

HERZIG, S. (1984)

Über den Einfluss von Herzglykosiden und von Ca^{++} auf die mechanische Aktivität der Herzmuskulatur von Ratten. Dissertation, Universität Kiel.

HERZIG S., JISCHA J., BEINHAUER, A., GEIRHOS, B., TACKE, K. et HEMPELMANN, R.G. (1995)

Quinidine-induced potentiation of cardiovascular effects of nitrendipine: functional aspects and possible molecular mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*;351, 636-643

HILBERTH, E. et HILBERTH, J (1968)

Contribution à l'éthnographie des Gbaya. *Studia Ethnographica Upsaliensia* 29.

HOFFMAN, B.F. et SINGER, D. H. (1964)

Effects of digitalis on electrical activity of cardiac fibers. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 226-260.

HOLLANDS, B.C.S. et VANOV, S. (1965)

Localization of catecholamines in visceral and ganglia of the rats in membranes. *Circulation* 65 (suppl.I), 2-20

ITO, M., HOLLANDER, P.B., MARKS, B.H. et DUTTA, S. (1970)

The effects of six cardiac glycosides on the transmembrane potential and contractile characteristics of the right ventricle of guinea-pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 172, 188-195.

IVERSEN, L. L. (1967)

The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves. Cambridge Press, London

IVERSEN, L. L. (1973)

Catecholamine uptake processes. *Br. med. Bull.* 29, 130-135

JÖRGENSEN, A. W., SÖRENSEN, O.H. (1970)

Digitalis Intoxication. *Acta Med Scand.* 188, 179-183

BOLTON, T. B. (1979)

Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59, 606-718.

BOUQUET, A. (1967)

Note sur la préparation du poison de flèches dans le Nord-Congo (Brazzaville). *J. Agric. Trop. Bot. Appl.* 14, 359-361.

BOUQUET, A. (1972)

Plantes médicinales du Congo-Brazzaville. Uvariopsis, Pauridiantha, Fiospyros. *Travaux et Documents de l'ORSTOM*. Nr. 13

BRANDT, R., KAUFMANN, H. et REICHSTEIN, T., (1966)

Nigrescigenin, Identifizierung mit Sarmentosigenin. *Helvetica Chimica Acta* 25, 1844-1849.

BRAUNWALD, E. , BLOODWELL, R.D., GOLDBERG, L. I. et MORROW, A.G.

(1961) Studies on digitalis. IV: Observations in man on the effects of digitalis preparations on the contractility of the nonfailing heart and on total vascular resistance. *J. Clin. Invest.*, 40, 52-59.

BRADY, H., LÜBBERS, H. et PETERS, T. (1974)

Isolation and properties of a microsomal plasmamembrane fraction from guinea-pig ventricular muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 282, R 11.

BRADING, A. F. et SNEDDON, P. (1980)

Evidence for multiple sources of calcium for activation of contractile mechanism of guinea-pig taenia coli on stimulation with carbachol. *Br. J. Pharmacol.* 70, 229-240

- JURENITSCH, J., KOPP, B. et BAMBERG KUBELKA, E. KUBELKA, W. (1982).
Journal of chromatographie.240 235
- KATZ, A. M. MESSINEO, F.C. et HERBETTE L. (1982)
Ion channels in membranes. Circulation 65 (suppl.I), 2-20
- KATZ, A.M. , REPKE D. J. et COHEN B. R.(1966)
Control of the activity of highly purified cardiac actomyosin by calcium sodium
and potassium. Circulation Res. 19, 1062.
- KLAUS, W. (1967)
Comments on the role of cellular calcium in digitalis action. In: Factor
influencing myocardial contractility. Ed. By R.D. TANZ, F. KAVALER and
ROBERTS. New York, Academic Press, 533-547.
- LAVERTY , R., SHARMAN, D.F. et VOGT, M (1965)
Action of 2,4,5-trihydroxyphenylethylamine on the storage and release of
noradrenaline. Brit J. Pharmacol. 24, 549.
- LEE, K. S. et KLAUS, W. (1971)
The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac
glycosides. Pharmacol. Rev. 23, 194-261.
- LEHMANN, H.-U., WITT, E., TEMMEN, L., HOCHREIN, H., (1978)
Lebensbedrohliche Digitalisintoxikationen mit und ohne saluretische
Zusatztherapie . Dtsch. Med. Wschr. 103, 1566-1571.
- LICHEY, J., SCHRÖDER, R., (1977)
Aktuelle Plasma-Digoxinkonzentrationen von Patienten bei Krankenhaus-
aufnahme Dtsch. Med Wschr. 102, 1056.1060

LINDMAR, R. et MUSCHOLL, E. (1965)

Die Verstärkung der Noradrenalinwirkung durch Tyramin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 252, 122-133

LÜLLMANN, H. et PETERS, T. (1979)

Action of cardiac glycosides on the excitation - contraction coupling in heart muscle. Progr. Pharmacol. 2, 1-54.

LÜLLMANN H., PETERS, T., PREUNER, J. et RÜTHER, T. (1975)

Influence of ouabain and dihydro-ouabain on the circular dichroism of plasmalemmal microsomes. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290,1-19.

Mac DONALD , T. F. NAWRA, Th. H. et TRAUTWEIN, W. (1975)

Membrane currents and tension in cat ventricular muscle treated with cardiac components. Circulation Research, 37, 674-682.

MARKS W.H, FONG, H.H.S., TIN-WA, M. et FARNSWORTH ,N. R. (1975)

Cytotoxic Principles of *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock (Asclepiadaceae). Journal of Pharmaceutical Sciences vol.24 (10), 1674-1976.

MARKS, W.H., FONG, H.H.S., TIN-WA, M., et FARNSWORTH, N.R. (1975)

Cytotoxic principles of *Parquetina nigrescens*. J. Pharm. Sci 64, 1674-1676.

MASON, D. T. et BRAUNWALD, E. (1964)

Studies on digitalis. X: Effect of ouabain on forearm vascular resistance and venous tone in normal subjects and in patients in heart failure. J. Clin. Invest. 43, 532-543

MASON, D T.; SPANN, J.F. et ZELIS, R. (1969)

Données nouvelles dans la compréhension de l'action des glucosides digitaliques Acquisition nouv Pathol. Cardiovasc., 11, 501.

MAULI, R., TAMM, Ch. (1957)

Die Glykoside von *Periploca nigrescens* Afz. Helv. Chim. Acta 40, 299-305.

MERCIER, F., VIGNOLI, L. (1939)

Note pharmacologique préliminaire sur une Asclépiadacée du Dahomey, l'assonbokan (*Omphaloonus nigrigans*). C.r. Soc Biol. 130, 1285-1388.

MEINERTZ, T. et SCHOLZ, (1969)

Über den Einfluß von Mangan-Ionen auf die positiv inotrope Wirkung von Adrenalin, Theophyllin und Digitoxin an isolierten Meerschweinchen Vorhöfen. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 265, 131-148

MURTHY, R. V. (1972)

The role of sodium and potassium activated adenosine triphosphate inhibition on digitalis action. In basic and clinical pharmacology of digitalis. Ed. By B:H: Maarks and WEISSLER, Charles C. THOMAS, Springfields Ill.

NAKANO, J. et SAKATO, M. (1966)

Competitive antagonism between norepinephrine and propranolol. Experientia (Basel) 12, 112

NAYLER, W. G. (1966)

The effect of pronethalol and propranolol on the lipid-facilitated transport of calcium ions. J. Pharmacol. Exp. Ther. 153, 479-484.

NEW, W. et TRAUTWEIN, W. (1972)

The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. Pflügers Arch. 334, 24-38.

KARTNIG, Th. et DANHOFER, R. (1970)

Zur Identifizierung und quantitativen Analyse von Strophanthusglykosiden. J. Chromatog., 52, 313-320.

OGUNDAINI, A.O., OKAFUR, E.O: (1987)

Isorhoifolin, a flavonoid glycoside from *Periploca nigrescens* leaves. Phytochem. 391.

PARIS, R. (1978)

Communication personnelle. Débat télévisé „La vie par les plantes“

PATON, W.D.M. et ZAMIS, E. J. (1952)

The methonium compounds. Pharmacol. Rev. 4, 219-229

PETERS, T. (1982)

Dependence of the dose-response relationship for cardiac glycosides on the experimental conditions. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, R 43,

PORTER, C.C. TOTARO, J.A. and STONE C.A., (1963)

Effect of 6-hydroxydopamine and some other components on the concentration of norepinephrine in the heart of mice. J. of Pharmacol. Exptl. Therap. 140 308

PUECH, P. (1977)

Les anti - arythmiques, indications et posologie. In Médecine actuelle, 4, 231-236.

REITER, M. (1972)

Differences in the inotropic cardiac effects of noradrenaline and dihydro-ouabain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 243-250

REPKE, K. (1965)

Effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase on cardiac muscle. In Drugs and enzymes, Proceeding of 2nd International Pharmacological Meeting Pergamon Press, New York, 65-87.

REUTER, H. (1965)

Über die Wirkung von adrenalin auf den Zellulären Ca-Umsatz des Meerschweinchenvorhofs. Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exp. Path. Pharmak, 251, 401.

REUTER, H. et WOLLERT, U. (1967)

Über die Wirkung verschiedener sympathomimetischer Amine auf Kontraktionskraft und Calcium Aufnahme isolierter Meeschweineinvorhöfe. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 258, 288-296

RICH, T. L. et LANGER, G. A. (1975)

A comparison of excitation-contraction coupling in heart and skeletal muscle: An examination of „Calcium-induced Calcium Release“. J. Molec. Cell. Cardiol. 7, 747-765

SACHS, C. et JONSSON, G. (1972)

Noradrenaline uptake mechanisms in human atrium. Acta pharmacol. et toxicol. 31, 456-470

SANDBERG, F., CONLUND, A. (1982)

An ethnopharmacological inventory of medicinal and toxic plants from Equatorial Africa. J. Ethnopharmacol. 5, 187-204.

SANDERMANN, H. (1978)

Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim. Biophys. Acta. 515, 209-237.

SANTANA L. F., GOMEZ, A.M. LEDERER, W. J. (1998)

Ca²⁺ flux trough promiscuous cardiac Na⁺ channels: slip-mode conductance. Science 279, 1027-1033.

SCHATZMANN, M. J. (1953)

Herzglykosid als Hemmstoffe für den activen Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocytenmembran. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 11, 346-354.

SCHENKER, E., HUNGER, A. et REICHSTEIN, T. (1954)

Die Glykoside von *Periploca nigrescens* Afzel. *Helv. Chim. Acta* 37, 1004-1036.

SCHOLZ, H. et REUTER, H. (1968)

Über die Beziehung zwischen Membranpotential und Kontraktion am Herzen unter dem Einfluß von Adrenalin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* 260, 196-197

SCHWARTZ, D. (1966)

Méthode statistiques à l'usage des Médecins et des Biologistes 2^o édition, Flammarion, Paris 7,

SEEMANN, P. (1972)

The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* 583-655

SHAPIRO, S., SLONE, D., LEWIS, G.P., JICK, H., (1969)

The Epidemiology of Digoxin : A Study in Three Boston Hospitals. *J. Chronic Dis.* 22, 361.

SHORE, P. A. (1962)

Release of serotonin and catecholamines by drugs. *Pharmacol. Rev.* 531-550

SLEATOR, W., FURCHGOTT, R.F., DE GUBAREFF, T. et KRESPI, V. (1964)

Action potentials of Guinea-pig atria under conditions which alter contraction. *Amer. J. Physiol.*, 206, 270-282

STANLEY, H.M. (1908)

Im dunkelsten Afrika. Brockhaus, Leipzig, Band I, 171-72.

TANNO, T. (1981)

Plant utilization of the Mbuti Pygmies. African Study Monographs, Kyoto University, 1, 1-53.

TOKPANOU-N'DJOLE-ASSOUHO, I. (1978)

Effets des extraits totaux de *Gmelina A.* (Verbenaceae) sur l'activité électrique et mécanique cardiaque. Doctorat de Spécialité, Poitiers.

TRENDEBENBURG, U (1963)

Supersensitivity and subsensitivity to symphomimetic amines. Pharmacol. Rev. 15, 225

VASSORT, G. (1973)

Influence of sodium ions on the regulation of frog myocardial contractility. Pflügers Arch., 339, 225-240.

WEBER, A., HERZ, R. et REISS, (1967)

The nature of the cardiac relaxing factor. Biochim. Biophys. Acta (Amst.)131, 188

WEISSLER, A.M., GAMEL, M.G., GOODE, H.E., COHEN, S. et SCHOENFEL, C.D.

(1964) The effects of *Digitalis* on ventricular ejection in normal human subjects. Circulation, 29, 721.

WHITBY, L. G., AXELROD, J. et WEIL-MALHERBE, H. (1961)

The fate of H³ -Norepinephrine in animals. J. Pharmacol. Exp. Ther. 132, 193-201

WICHTL, M., MANGKUDIDJOJO, M., et WICHT-BLEIER, W., (1982)

Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographische Analyse von Digitalis -
Blattextrakten. Journal of Chromatography 234, 503-508.

WITHERING, W. (1785): An account of the foxglove and some of its medical uses
with practical remarks on dropsy and other diseases., printed by M. Swinney,
Birmingham.

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF *PARQUETINA*
NIGRESCENS EXTRACT ON THE CONTRACTILITY OF
ISOLATED MAMMALIAN CARDIAC AND SMOOTH
MUSCLE

Summary: The effects of *Parquetina nigrescens* (Periplocaceae) extract (EXPAR) on isolated right and left guinea-pig atria, on isolated guinea-pig *Taenia coli* and on isolated rat portal vein were studied by measuring the effect of EXPAR on the contractility of these preparations.

In electrically driven left atria EXPAR increased the force of contraction dose dependently (ED_{50} 20mg/ml). The positive inotropic response differed from that of ouabain by its high rate of onset and its complete reversibility upon removal of the extract from the incubation medium. In spontaneously beating right atria EXPAR increased the beating frequency. The positive chronotropic effect could be completely antagonised by propranolol, a β -adrenoceptor blocking drug, indicating the presence of an adrenergic acting principle in EXPAR. In contrast to the positive chronotropic effect the inotropic response to EXPAR could not be completely suppressed by the β -blocking agent, suggesting that the force of contraction is not only increased by a sympathomimetic ingredient of EXPAR but also by the cardenolides (e.g. Nigrescigenine) known to be present in *Parquetina nigrescens*.

In experiments on the *Vena portae* of the rat using Prazosine as an antagonist at α -adrenoceptors, the Noradrenaline-like effect of EXPAR could be verified. This effect seems to be brought about by a direct and by an indirect effect since in portal vein preparations pharmacologically sympathectomized by 6-Hydroxydopamine pretreatment the responses to EXPAR were partially suppressed.

In isolated *Taenia coli* preparations EXPAR, as well as, Dimethyl Phenyl Piperazine (DMPP, a nicotin-receptor stimulant drug), increased the basal tone of the muscle (contracture). The effects of EXPAR or DMPP were suppressed by hexamethonium, a classic ganglion-blocking agent, but not affected by Atropine or N-Methyl-Scopolamine, muscarin receptors blockers. These results suggested that EXPAR stimulates the release of a mediator of contraction which is different from acetylcholine since the effects were not blocked in the presence of atropine.

The attempt to identify the chemical nature of the sympathomimetic principle of EXPAR using Thin-Layer Chromatography and High-Performance-Liquid-Chromatography unveiled the presence of an amine beside the cardenolides in the extract, the chemical structure of which remains unknown.

RESUME : Les actions de l'extrait de *Parquetina nigrescens* (EXPAR) ont été étudiées sur le muscle auriculaire et sur les muscles lisses (*Taenia coli* de cobaye et veine porte de rat) en mesurant ses effets sur les contractions musculaires isométrique et isotonique. Les effets d'EXPAR sur les structures musculaires sont inhabituels. Il développe une importante activité cardiotonique composée d'un effet inotrope positif et d'une action chronotrope positive rapides. Comparativement à la strophantine G ou à la digoxine, sa toxicité est moindre, ses effets sont réversibles et son coefficient thérapeutique est plus élevé. La rapidité d'action d'EXPAR évoque des propriétés de type adrénérique. L'effet d'EXPAR est partiellement bloqué par le propranolol ou par l'aténolol à 10^{-7} M, concentration qui bloque complètement celui de la noradrénaline et n'a aucune influence sur l'action de la strophantine G. Le fait que la prazosine bloque l'effet d'EXPAR au niveau de la veine porte est aussi un argument en faveur d'une action de type sympathomimétique, due à l'activation des récepteurs α_1 . Si les extraits ne sont pas constitués uniquement de principes actifs de type glycoside cardiotonique, ils pourraient renfermer une seconde molécule proche d'une substance sympathomimétique stimulant à la fois les récepteurs α et β . La diminution de la force de contraction après traitement par la β -hydroxydopamine montre clairement qu'EXPAR agit aussi comme la tyramine par une action sympathomimétique indirecte. Au niveau du *Taenia coli*, EXPAR comme la Diméthyl Phényl Pipérazine (DMPP, substance stimulante des récepteurs nicotine), augmente la contraction basale du muscle (contracture). Les effets d'EXPAR ou de DMPP sont supprimés par l'hexaméthonium, mais ne sont pas modifiés par l'atropine ou la N-Méthyl-Sépoctamine. Les résultats suggèrent que EXPAR stimule la libération de médiateur de contraction qui est différent de l'acétylcholine, expliqué par le fait que les effets ne sont pas bloqués en présence d'atropine. Les tests de chromatographie sur couches minces et à haute performance confirment la présence de deux différents groupes de substances.

MOTS-CLES : Extrait de *Parquetina nigrescens* (EXPAR), Strophantine G, Noradrénaline, Oreillette, Veine porte, *Taenia coli*, Digitales, Sympathomimétiques.