



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

RESTREINTE

DP/ID/SER.A/1323
23 février 1990
Original : FRANCAIS

18260

ASSISTANCE AU CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES PHARMACEUTIQUES
POUR LA FABRICATION DE PRODUITS PHARMACEUTIQUES
A PARTIR DE PLANTES MEDICINALES

1, 2-1
+ 100-1
+ 100-2
+ 100-3
+ 100-4
+ 100-5
+ 100-6
+ 100-7
+ 100-8
+ 100-9
+ 100-10

DP/MAG/84/017

MADAGASCAR

Rapport technique : Manuel pratique de screening
pharmacologique des plantes médicinales*

Etabli pour le Gouvernement de Madagascar
par l'Organisation des Nations Unies pour le développement industriel,
agent d'exécution du Programme des Nations Unies pour le développement

D'après l'étude de F. SANDBERG**,
M. RATSIMBASON*** et M. ANDRIANTSOA***

Fonctionnaire chargé de l'appui : R.O.B. Wijesekera,
Service des industries chimiques

ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR LE DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL
Vienne

43

* Document n'ayant fait l'objet d'aucune mise au point rédactionnelle.

** M. D., Ph. D. h. c., Pharmacien, Professeur ém. de pharmacognosie,
Université d'Uppsala.

*** Dr 3ème cycle, Chercheur au Centre national de recherches
pharmaceutiques, Antananarivo.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>Chapitre 1</u> : Les recherches intégrées des substances naturelles dans le développement des médicaments dérivés des plantes.....	01
<u>Chapitre 2</u> : Tests généraux <u>in vivo</u> : screening hippocratique (rat). Toxicité aiguë et subaiguë (souris, rat).....	06 23
<u>Chapitre 3</u> : Tests <u>in vivo</u>	
I - Test anti-tussif.....	27
II - Test analgésique.....	32
1° Par la technique de Koster.....	32
2° Par la technique de Randall et Selitto...	32
III - Test antipyrétique.....	37
IV - Test antianaphylactique.....	42
V - Test anti-inflammatoire.....	48
VI - Test antisécrétoire.....	52
VII - Test antipaludéen.....	60
<u>Chapitre 4</u> : Tests <u>in vitro</u>	64
I - Test sur l'iléon isolé de Cobaye.....	65
II - Utérus isolé de Rat.....	73
III - Aorte isolée de Rat.....	75
IV - Trachée isolée de Cobaye.....	75
V - Oreillettes isolées de Cobaye.....	77
Liste des appareils et leur prix.....	81
<u>Annexe 1</u> : Formule de RINGER, de KREBS et de LOCKE.....	82

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

=====

<u>Figure 1</u> : Méthode de Triage pharmaco-chimique.....	32
<u>Figure 2</u> : La fiche à remplir pour le screening hippocratique.....	35
<u>Figure 3</u> : Détermination de la DL ₅₀	24
<u>Figure 4</u> : Transformation de pourcentage en Unité PROBIT.....	25
<u>Figure 5</u> : Schéma du dispositif pour provoquer la toux chez le Cobaye	26
<u>Tableau 1</u> : Tableau récapitulatif des expériences de toux provoquée chez le Cobaye.....	33
<u>Figure 6</u> : Variation moyenne du nombre de toux en fonction du temps chez le cobaye.....	31
<u>Figure 7</u> : Analgésie (Technique de Koster). Droite effet/dose de la codéine.....	33
<u>Figure 8</u> : Analgésie (Technique de Koster). Droite effet/dose de l'acide acétyl salicylique.....	32
<u>Figure 9</u> : Analgésie (Technique de Koster). Droite effet/dose du phénylbutazone.....	35
<u>Figure 10</u> : Analgésie (Technique Randall et Selitto). Les courbes de résistance à la douleur pour la codéine.....	35
<u>Figure 11</u> : Droite effet/dose de l'inhibition de l'hyperthermie par l'acide acétyl salicylique.....	39
<u>Tableau 2</u> : Contrôle de la thermorégulation.....	40
<u>Figure 12</u> : Contrôle de l'influence de l'acide acétyl salicylique et d'un extrait végétal sur la thermorégulation.....	41
<u>Figure 13</u> : Schéma du montage de Konzett-Rössler.....	42

...

<u>Figure 14</u> : Enregistrement de la réaction anaphylactique chez le cobaye, 21 jours après la sensibilisation.....	46
<u>Figure 15</u> : Enregistrement de la réaction anaphylactique chez le Cobaye, 30 jours après la sensibilisation.....	46
<u>Figure 16</u> : Enregistrement de la réaction anaphylactique chez le Cobaye, 35 jours après la sensibilisation.....	47
<u>Figure 17</u> : Antianaphylaxie (voir texte).....	49
<u>Figure 18</u> : Enregistrement de la bronchoconstriction induite par voie i.v. chez un cobaye non sensibilisé par l'ovalbumine et non traité par la plante.....	49
<u>Figure 19</u> : Action du phénylbutazone sur l'inflammation de la patte de Rat.....	51
<u>Tableau 3</u> : Activité antisécrétoire (voir texte).....	57
<u>Figure 20</u> : Représentation graphique de l'activité antisécrétoire	59
<u>Figure 21</u> : Courbe d'inhibition de la croissance du <u>Plasmodium berghei</u> chez la souris par la chloroquine et l'amo-diaquine.....	63
<u>Figure 22</u> : Schéma du montage d'un organe isolé.....	66
<u>Figure 23</u> : Schéma pour la localisation de l'iléon.....	67
<u>Figure 24</u> : Réponse d'un extrait végétal contenant des substances contracturantes et relaxantes.....	71
<u>Figure 25</u> : Augmentation de la ligne de base sur l'enregistrement d'un extrait relaxant, supposant la présence de substances contracturantes.....	71
<u>Figure 26</u> : L'extrait de la plante (250 µg/ml) inhibe les contractions spontanées de l'utérus isolé. La présence du propranolol (1×10^{-3} M) entrave cette action de la plante (L = lavage).....	74
<u>Tableau 4</u> : CE ₅₀ de l'isoprénaline, adrénaline et la noradrénaline sur les récepteurs α-adrénergiques de l'aorte isolée de Rat.....	75
<u>Figure 27</u> : Courbe effet/dose de l'isoprénaline, adrénaline et la noradrénaline sur l'aorte isolée de Rat en présence du propranolol.....	76

<u>Figure 28</u> : Schéma montrant l'assemblage de 2 lambeaux de trachée isolée de Cobaye.....	78
<u>Figure 29</u> : Réponse à l'histamine et à l'isoprénaline après une contraction par l'histamine de la trachée isolée de de Cobaye.....	79
<u>Figure 30</u> : Effet de l'isoprénaline sur les oreillettes isolées de Cobaye.....	80

P R E F A C E

Ce manuel pratique de screening pharmacologique des plantes médicinales est le résultat d'un séjour de Monsieur le Professeur ém. Finn SANDBERG, Université d'Uppsala au Centre National de Recherches Pharmaceutiques, Antananarivo, dans le cadre des activités du projet PRED/ONUDI DP/MAG/89/008 : "Technologie et Valorisation des Plantes Médicinales et Aromatiques".

Il expose des méthodes de screening pharmacologique utilisées dans les deux laboratoires et qui sont proposées aux pays du tiers monde qui ont l'intention de développer des médicaments dérivés des plantes, utilisées en soin de santé primaire.

Pour réussir dans cette voie, il est absolument nécessaire d'intégrer les différentes étapes et méthodes de recherches des plantes médicinales. Une telle intégration est explicitée dans le Chapitre 1.

La méthode du "tapis roulant" est universellement applicable et est économique puisqu'elle exclue les plantes toxiques et inactives presqu'au début des investigations.

Le Chapitre 2 concerne deux tests généraux in vivo : le screening hippocratique sur Rat et la toxicité aiguë et subaiguë sur souris (ou Rat). Ces deux tests sont effectués pour chaque plante et selon les résultats obtenus, les investigations sont arrêtées, ou continuées par des méthodes in vivo et in vitro décrites dans les Chapitres 3 ou 4.

Il est nécessaire de limiter les méthodes spécifiques à celles qui sont considérées pour être les plus importantes.

A titre d'information une liste des appareils utilisés est dressée avec leur prix.

Special Technical Adviser
Pharmaceutical Industries Unit,
UNIDO (ONUDI)

Chief Technical Adviser
UNIDO (ONUDI) Proj. DP/MAG/84/017
Antananarivo - Madagascar

CHAPITRE 1

LES RECHERCHES INTEGREES DES SUBSTANCES NATURELLES DANS LE DEVELOPPEMENT DES MEDICAMENTS DERIVES DES PLANTES

Pendant un siècle, la recherche de substances naturelles a été dominée par la phytochimie. L'éventail de nos connaissances chimiques est aussi impressionnant que le manque de connaissance pharmacologique des substances naturelles. Ce désaccord est évident et il constitue certainement un goulot d'étranglement pour le développement de médicaments dérivés des plantes, utilisées en soin de santé primaire.

Les études de l'activité antibactérienne et antifongique étant simples à réaliser au laboratoire, nombreuses sont les investigations faites, concernant les plantes à propriété antimicrobienne. Mais si ces recherches ne sont pas suivies, par une étude de toxicité *in vivo*, les résultats ne peuvent être exploités utilement. L'obstacle le plus fréquent à ces études de toxicité, est que, lorsque le phytochimiste a isolé la quantité de substances pures, nécessaire pour l'élucidation de la structure chimique, il n'en reste plus suffisamment pour effectuer les recherches pharmacologiques.

Ainsi, il serait toujours souhaitable de disposer d'une usine pilote pour préparer les extraits des plantes, afin d'obtenir une quantité d'extrait suffisante pour les expérimentations pharmacologiques.

Pour réussir dans le développement de médicaments dérivés des plantes, il est absolument nécessaire d'intégrer les différentes étapes de recherches des substances naturelles. Une telle intégration est explicitée dans le plan : Méthode du "triage pharmaco-chimique" pour le développement de médicaments dérivés de plantes.

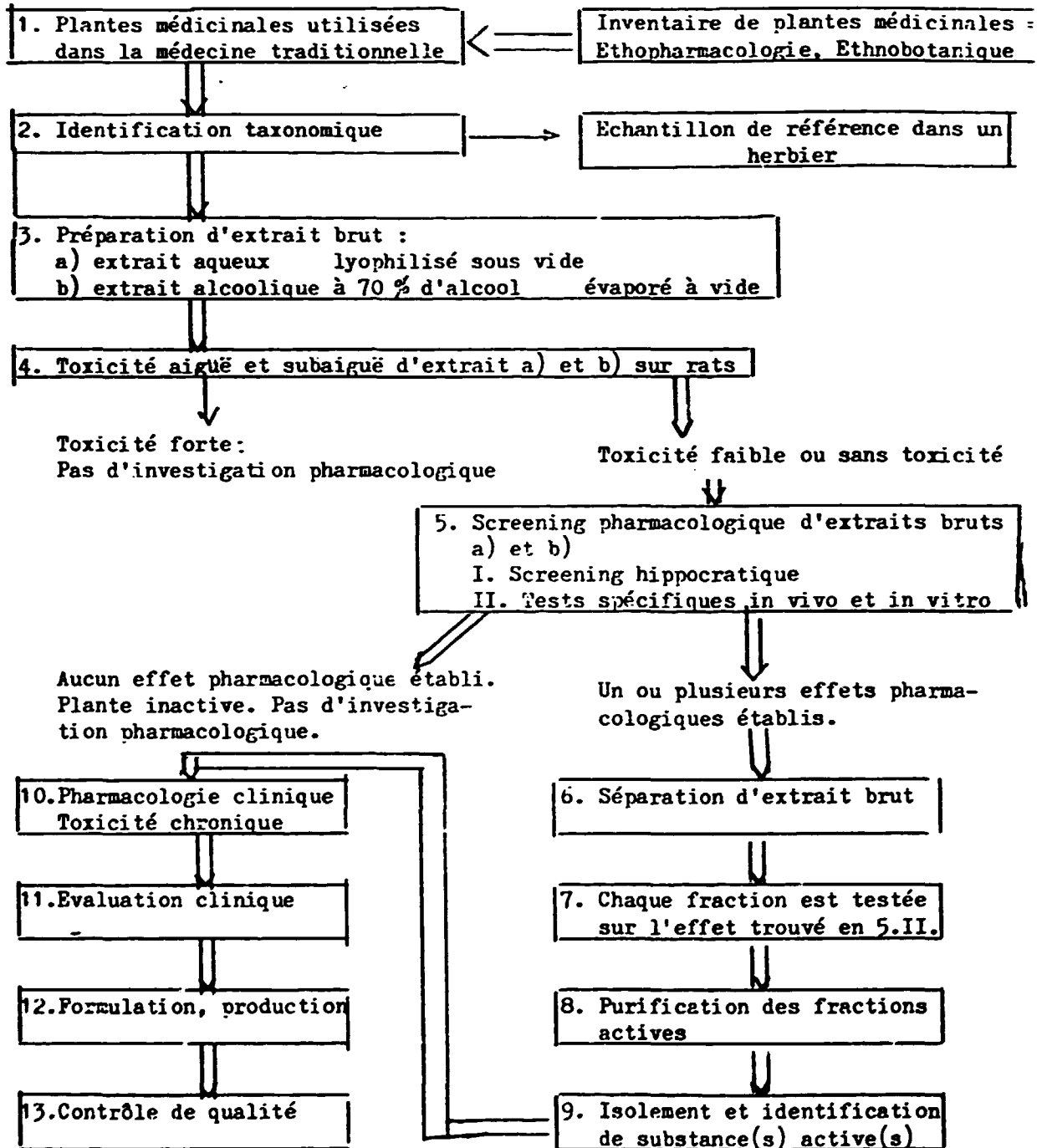
Cette méthode est fondée sur plus de trois décades d'expérience dans ce-domaine dans le Tiers-Monde. Chaque étape est numérotée et les commentaires sont donnés ci-dessous :

ETAPE 1 :

L'inventaire peut être réalisé selon le protocole de l'O. K. S. ou un protocole similaire. Les observations pour chaque plante doivent comporter au moins une information sur la partie de la plante utilisée, son utilisation en médecine traditionnelle, le nom vernaculaire, le lieu de récolte et le numéro de collection.

...

METHODE DE "TRIAGE PHARMACO-CHIRIQUE"
POUR LE DEVELOPPEMENT DE MEDICAMENTS DERIVES DE PLANTES



ETAPE 2 :

Il faut bien souligner qu'un bon échantillon d'herbier est absolument nécessaire pour une identification taxonomique des plantes récoltées. La présence d'un botaniste n'est pas obligatoire lors de la collecte, mais l'identification taxonomique doit être exécutée dans un herbier par un botaniste. Aussi est-il nécessaire qu'une personne de l'équipe de l'inventaire sache monter un bon échantillon de référence à conserver dans un herbier.

ETAPE 3 :

Il est préférable de préparer les extraits bruts à une échelle pilote, par exemple avec l'unité d'extraction et de distillation "multipurpose CR 611" (Tournaire Frères, Grasse - France).

Pour l'étape 3a, on ajoute dans l'eau 2 % d'acide acétique, qu'on élimine ensuite par évaporation sous vide. L'extrait final est lyophilisé. Ceci correspond à l'usage de l'eau pour l'extraction dans la médecine traditionnelle.

Pour l'étape 3b, on utilise de l'alcool à 70 %. Ce solvant est très pratique pour une production industrielle ultérieure car elle est facile à évaporer, et extrait presque toutes les substances hydrophiles et certaines autres qui le sont moins mais qui ont une valeur thérapeutique intéressante. Sinon on isole ces derniers au cours de l'étape 6.

ETAPE 4 :

La toxicité, aiguë et subaiguë qui durent respectivement 1 jour et 7 jours est étudiée sur souris (ou rat) après une injection intrapéritonéale.

Si les extraits de l'étape 3a et/ou 3b ont montré une forte toxicité, il est préférable d'arrêter les investigations pharmacologiques, parce qu'une telle plante n'est pas indiquée pour un usage thérapeutique. Mais si l'étude a une finalité académique les investigations pharmacologiques peuvent être poursuivies pour identifier le principe toxique et son mode d'action.

ETAPE 5 :

- - La screening pharmacologique doit commencer par le screening hippocratique avec une injection intrapéritonéale du produit. Si ce screening a donné un résultat positif, in vivo et/ou in vitro, des tests spéciaux sont exécutés, par exemple le test antisécrétoire, test antitussif, test antipyrétique, test anti-inflammatoire, test analgésique, etc...

Le test spécifique à exécuter dépend des résultats du screening hippocratique et de l'utilisation de la plante préconisée par la médecine traditionnelle.

...

Dans cette étape on peut exclure les plantes inactives caractérisées par l'absence d'effet pharmacologique. Toutefois il faut se rappeler que les effets hormonaux ne peuvent être détectés dans cette étape. De telles études demandent des méthodes spécifiques mieux adaptées.

ETAPE 6 :

Le fractionnement de l'extrait brut utilise généralement les méthodes chromatographiques. On peut commencer par une précipitation avec l'acétone. Le traitement de la plante avec les solvants organiques est aussi utilisé.

ETAPE 7 :

Les fractions obtenues dans l'étape 6 sont testées sur l'effet trouvé en 5.II. Les fractions actives doivent avoir une activité plus élevée que l'extrait de l'étape 3.

ETAPE 8 :

Dans la purification des fractions actives, plusieurs manipulations phytochimiques sont incluses, mais elles sont toujours guidées par un test biologique, qui doit montrer un effet plus élevé à chaque étape de la purification.

ETAPE 9 :

Pour l'isolement et l'identification de(s) substance(s) ^{active(s)} des méthodes employant la CLHP (HPLC), la CPG préparative sont utilisées. Leur identification peut recourir à des méthodes conventionnelles comme le spectre I.R., la R.M.N., la C.P.G.-S.M., ORD.

ETAPE 10 :

Trois produits de différents degrés de puretés peuvent être utilisés en soins de santé primaire :

- a) l'extrait brut (étape 3),
- b) l'extrait purifié (étape 6),
- c) les substances actives pures (étape 9).

Il faut souligner que les extraits bruts et les extraits purifiés reviennent moins chers à la fabrication, alors que la préparation de substances pures est très onéreuse mais pas toujours nécessaire pour l'usage clinique.

Par conséquent en soins de santé primaire, les extraits bruts et les extraits purifiés (étapes 3 et 6) sont recommandés à condition qu'une méthode de standardisation soit établie.

...

La pharmacologie clinique comprend les tests sur des volontaires humains et la toxicité chronique est exécutée sur au moins deux ordres différents d'animal : un rongeur et un non-rongeur, par exemple.

ÉTAPE 11 :

Les tests cliniques doivent -si possible- être réalisés en essai clinique multicentrique.

ÉTAPE 12 :

Si les résultats des étapes 10 et 11 sont concluants, le travail galénique peut commencer et on procède à la mise en forme galénique du produit en vue de son utilisation clinique : sirop, comprimés, capsule, pommade. L'étape suivante est la fabrication à l'échelle industrielle.

ÉTAPE 13 :

Le contrôle de qualité de la forme galénique pour les extraits bruts et les extraits fractionnés doit être fait selon une méthode standardisée, si possible par une méthode chimique, ce qui est le plus simple, autrement on adopte une méthode pharmacologique.

Ce contrôle de qualité permet de vérifier aussi que les règles de "bonnes pratiques de fabrication" ont été suivies.

La méthode du "Triage pharmaco-chimique" est universellement applicable. D'ailleurs cette méthode est décrite pour servir de guide aux pays en voie de développement, qui ont l'intention d'exploiter leur médecine traditionnelle (sous forme d'extraits bruts ou fractionnés standardisés) en soin de santé primaire.

La méthode du "Triage pharmaco-chimique" est économique puisqu'elle exclue les plantes toxiques et inactives presque au début des investigations.

Le principe de la méthode est le suivant : on commence par les tests pharmacologiques et la phytochimie est réservée à la fin ; la purification des fractions actives est guidée par un test biologique, recourant à un test in vitro de préférence, pour éviter un travail phytochimique inutile sur des substances inactives.

Dans les chapitres suivants sont décrits en détail les méthodes mentionnées dans les étapes 4 et 5.

CHAPITRE 2

Ce chapitre concerne deux tests généraux in vivo :

- I - Screening hippocratique sur rat
- II - Toxicité aiguë et subaiguë (souris ou rat)

I - SCREENING HIPPOCRATIQUE D'EXTRAITS BRUTS :

Le screening hippocratique a été effectué sans tenir compte de la raison pour laquelle les plantes avaient été ramassées (taxonomie, médicament traditionnel, plante rejetée par les animaux). Dans ce but, nous avons utilisé et modifié la méthode de Malone et Robichaud (1962).

Ce chapitre donne une description détaillée du protocole opératoire avec nos modifications et notre expérience, afin qu'il puisse servir de modèle d'une méthode standardisée. Le besoin d'un tel "mode opératoire" avait été exprimé à plusieurs reprises par différents pays du tiers monde.

EQUIPEMENT :

L'équipement spécifique suivant est nécessaire :

Cage pour l'observation :

de
En bois / 54 X 58 cm, avec une hauteur de 8 cm, la cage n'a pas de fond parce qu'elle est placée sur une feuille de papier absorbante. Le papier est changé chaque jour après les observations faites, pour noter la quantité et la nature des excréments.

Thermomètre rectal :

Un thermomètre en verre avec la graduation de 28-42° C. La partie qui doit être introduite a un diamètre de 3 mm et une longueur de 24 mm.

Ecran de test :

Un écran en maille de fil métallique renforcé est utilisé pour contrôler la force des muscles locomoteurs et leur coordination. L'écran est large de 30 X 36 cm et construit avec 13 brins espacés de 10 cm.

...

Chronomètre :

subdivisé
Un chronomètre / en secondes avec une capacité de 30 minutes.

Essai du crin de cheval :

Un crin d'une longueur de 5 cm est attaché au bout d'un manche en bois qui a 15 cm de longueur et un diamètre de 2 mm. L'attache est faite avec du fil et de la soie laissant 4 cm de crin à l'extérieur du bout de bois. Le poil est utilisé pour contrôler les réflexes cornéens et pinéaux, le manche de bois pour évaluer la réponse à la suite d'un choc sur la tête.

Papier filtre :

5,5 cm de diamètre, Whatman n° 1 ou une qualité similaire.

Feuille de carton :

Sur un côté d'une feuille de carton de 2 X 15 cm, à un intervalle de 1 cm, des tâches noires sont faites avec les diamètres suivants : 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 4 mm. La feuille de carton sert à mesurer le diamètre pupillaire.

Fiche à remplir :

Un modèle de fiche est donné (page 8)

PROCEDURE EXPERIMENTALE :

A - REMARQUES GENERALES :

Animaux :

Des rats femelles ou mâles nourris normalement, pesant 160 à 180 g sont utilisés. Pendant les six premières heures d'observation du premier jour les animaux n'obtiennent ni eau, ni aliments ; après l'observation, ils sont alimentés ad libitum.

Administration :

Les injections sont en principe faites par voie intrapéritonéale, de préférence au même endroit. Si la suspension est trop visqueuse ou trop épaisse, on peut l'administrer par voie orale.

Solution à tester :

Tous les extraits bruts et les extraits purifiés de la plante sont mélangés à une suspension aqueuse contenant 0,25 ou 0,50 % d'agar. Les extraits sont lyophilisés et réduits en poudre, ce qui facilite la préparation d'une suspension (faite par trituration). Si un extrait contenant des alcaloïdes est difficile à mettre en suspension, on ajoute de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 6.

...

Quelques extraits bruts peuvent être résineux par nature, et il est très difficile d'en faire des suspensions. Dans ce cas, il faut utiliser une quantité d'agar plus élevée et l'on administre la suspension par voie orale. La concentration la plus élevée utilisée pour un extrait est de 100 mg/ml et le volume maximum de la suspension utilisée est de 10 ml/Kg. Cela veut dire que la dose la plus élevée est 1 000 mg/Kg. Pour une substance pure (substance de référence ou nouvelle drogue) on utilise 250 mg, pour un extrait brut ou purifié 2-5 g pour faire un screening.

Dosage et nombre d'animaux :

Le premier but du travail est la détermination de la dose létale, la dose complètement inactive, choisir ensuite au moins 3 doses avec des effets entre les deux extrêmes. / et de situés

Pour les extraits bruts de plantes, on commence par une dose de 500 mg/Kg (dans une suspension de 100 mg/ml - si possible - sinon 50 mg/ml). Si cette dose n'est pas efficace, on administre une dose de 1 000 mg/Kg. Si la dernière dose est active ou létale, on administre une dose de 750 mg/Kg. Dans le cas où la dose de 500 mg/Kg produit quelques effets (mais pas d'effets léthaux) les deux doses plus élevées (750, 1 000 mg/Kg) et les doses les plus basses, par exemple 250, 100, 50, 10, 1 mg/Kg sont administrées, selon les effets obtenus.

Si la dose initiale de 500 mg/Kg est létale, on administre 50 mg/Kg comme deuxième dose. Les doses suivantes sont administrées selon les résultats obtenus.

Dans la description originale de cette méthode, les auteurs proposent que les doses efficaces soient administrées selon une échelle logarithmique. Nous avons préféré modifier ce point pour des raisons pratiques.

Si l'extrait est efficace, on injecte les 5 doses différentes à un ou deux rats pour obtenir une évaluation complète, c'est-à-dire un minimum de 5 rats et un optimum de 10 rats. Pour des extraits inactifs, 2 rats recevant chacun 1 000 et 500 mg/Kg, peuvent être suffisants.

- - Observations :

Le premier jour les observations doivent être faites à 5, 15, 30, 60 minutes, 2, 4, 6 heures après l'administration. Du deuxième au septième jour les rats sont observés une fois par jour. Dans l'intervalle, des observations sont aussi possibles. Chaque espace vide de la fiche doit être rempli aux heures indiquées, avec l'évaluation 0, (+), +, ++, +++, +, ou avec une mesure réelle. Pour l'évaluation d'une fiche l'absence d'un symptôme à une heure donnée signifie qu'on a vraiment contrôlé ce détail.

...

Evaluation des paramètres :

Les paramètres sont groupés sur cette fiche pour faciliter l'évaluation des résultats, mais l'ordre des tests est différent quand on fait le screening (voir plus bas).

B - EXECUTION DES OBSERVATIONS :

On peut distinguer six groupes différents :

- Premier groupe : dépression du système nerveux central ;
- Deuxième groupe : stimulation du système nerveux central ;
- Troisième groupe : observation des yeux ;
- Quatrième groupe : observation des oreilles ;
- Cinquième groupe : symptômes généraux ;
- Sixième groupe : symptômes subjectifs.

1° Premier groupe : dépression du système nerveux central :

la diminution de l'activité motrice est estimée comme suit :

(+) : l'animal est tranquille, bouge de temps en temps spontanément.

+ : ne bouge pas spontanément, mais manipulé, bouge lentement,

++ : manipulé, bouge très paresseusement.

+++ : manipulé, ne bouge pas du tout.

Ataxie :

(+) : en cas de mouvement, on décèle une incoordination occasionnelle.

+ : en cas de mouvement, incoordination constante, mais le rat marche tout droit.

++ : le rat ne peut pas marcher tout droit, la ligne suivie est irrégulière.

- - +++ : aucune coordination.

Perte du réflexe :

(+) : la partie postérieure du corps avec les pattes postérieures peut être mise sur le côté.

+ : le rat peut être mis seulement sur un côté.

++ : le rat peut être mis sur chaque côté.

...

+++ : le rat peut être mis sur le dos et également sur le côté.

++++ : le rat ne peut pas se retourner même si on lui pince les orteils de la patte postérieure.

Analgesie :

(+) : quand l'ongle de l'opérateur presse fortement l'orteil d'une patte de la partie postérieure du rat, on note une réponse paresseuse : des cris et/ou un essai de fuite ou de morsure.

+ : quand l'ongle presse, il n'y a pas de cris ou de tentative de fuite ou de morsure, mais le rat essaie de retirer sa patte.

++ : pas de réponse

Ce test est subjectif. Il est très important de toujours presser avec la même force.

Anesthésie :

+ : le rat est mis sur le côté, reste ainsi, et ne peut pas être changé de position manuellement.

Rythme et profondeur de la respiration :

La durée pour 50 inspirations et expirations est mesurée avec le chronomètre, et le nombre converti en secondes est noté sur la fiche. Ainsi, une diminution de la respiration est indiquée par un chiffre plus haut que pour la période de contrôle, et une augmentation de la respiration est montrée par un chiffre plus bas. La diminution de la respiration est évaluée ainsi :

(+) : diminution modeste.

+ : diminution moyenne.

++ : diminution importante.

- - La respiration de Cheyne-Stoke est soit absente (0), soit présente (+).

Réflexe cornéen et pinéal ::

(+), : réponse lente, quand le bout du crin de cheval touche la cornée et le conduit auditif.

+ : pas de réponse du tout.

...

Paralysie des pattes antérieures, des pattes postérieures et de la tête :

Ceci est contrôlé en manipulant les parties en question et est évalué ainsi :-

- (+) : la tête ou les pattes tombent en arrière lentement après le soulèvement et la chute.
- + : la tête et les pattes tombent en arrière rapidement après le soulèvement et la chute, le rat ne peut plus faire un mouvement musculaire.

Perte de support à l'écran :

Ce test sert à contrôler la force et la coordination des muscles. Le rat est mis au centre d'un écran horizontal puis l'écran est renversé et agité doucement en arrière et en avant à la position renversée.

- ++++ : le rat qui tombe de l'écran suit un angle de 45°.
- +++ : le rat qui tombe de l'écran suit un angle de 90°.
- ++ : le rat tombe quand l'écran est renversé.
- + : le rat tombe à la première secousse.
- (+) : sans signification.

En bas de la fiche, le chercheur doit noter si les pattes postérieures glissent d'abord ou si les pattes antérieures et postérieures glissent en même temps.

2° Deuxième groupe : stimulation du système nerveux central :

Réaction d'alarme :

La réaction d'alarme est contrôlée en frappant fortement en dehors de la cage d'observation une feuille métallique pliée et évaluée comme suit :

- (+) : le rat sursaute doucement.
- + : le rat fait une secousse visible.
- ++ : le rat fait une secousse, saute et fait un essai frénétique soudain pour se libérer.
- +++ : le rat tombe en convulsions cloniques.

Augmentation de l'activité motrice :

- (+) : le rat regarde autour de lui, bouge, mais ne court pas dans la cage.
- + : le rat bouge constamment, mais normalement, et essuie son nez pas constamment.
- ++ : bouge constamment et rapidement, essaie souvent de fuir.
- +++ : court constamment, tente fréquemment de fuir.

...

Tremblements fins du corps :

On ne peut pas les observer avec les yeux, mais on peut les sentir en mettant les doigts sur le dos du rat au-dessus de la colonne vertébrale. Les tremblements sont évalués comme suit :

- (+) : présence équivoque.
- + : présence de tremblements sporadiques,
- ++ : tremblements continuels.
- +++ : des tremblements occasionnels sont visibles sans toucher le dos.

Tremblements visibles du corps :

L'observation n'est faite qu'avec les yeux:

- (+) : présence équivoque.
- + : présence définitive, mais seulement sporadique.
- ++ : tremblements continuels.
- +++ : tremblements prononcés, proches des convulsions cloniques.

Fasciculation :

La fasciculation est représentée par des mouvements de la peau, similaires aux vagues, vers la partie postérieure : ils sont évalués dans cette partie de la fiche parce qu'il est très important de faire la différence entre ceux-ci et les tremblements visibles et les convulsions cloniques faibles (paramètre suivant). On peut évaluer les fasciculations en observant attentivement, avec les yeux :

- (+) : réponse équivoque.
- + : fasciculations définitives dans une région, mais le mouvement n'est pas continu.
- ++ : fasciculations dans plusieurs régions, mais le mouvement n'est pas continu.
- +++ : fasciculation vue en plusieurs endroits (pattes postérieures, dos, cou) simultanément avec une réponse persistante et continue dans au moins un endroit.
- ++++ : implication continue et totale.

Convulsions cloniques :

Les convulsions cloniques sont évaluées en regardant la gravité et la durée de l'attaque :

- + : convulsions sporadiques.
- ++ : convulsions presque continues.
- +++ : les convulsions sont très fortes et le rat meurt.

...

Convulsions toniques :

- + : le rat étend les pattes postérieures, le corps est rigide et réagit quand on le touche.
- ++ : convulsions répétées, entretemps le rat est couché sur le côté.
- +++ : les convulsions sont très graves et le rat meurt.

Les convulsions de type mixte : avec des convulsions cloniques et toniques à la fois, sont évaluées de la même façon.

Evaluation respiratoire :

Les enregistrements sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

Augmentation de la profondeur respiratoire :

- (+) : augmentation équivoque.
- + : augmentation moyenne.
- ++ : augmentation importante.

3° Troisième groupe : observation des yeux :

Enophtalmie et exophtalmie :

Enophtalmie et exophtalmie sont évaluées subjectivement en comparant les rats du test aux rats non traités :

- (+) : réponse équivoque.
- + : réponse moyenne.
- ++ : réponse importante.

Les agents hypotenseurs sont à l'origine d'une enophtalmie tandis que des agents hypertenseurs provoquent une exophtalmie.

Ptose palpébrale :

La ptose palpébrale est constatée après avoir stimulé le rat manuellement pour être sûr que le ptosis est un effet permanent. La réponse ptotique est notée d'après Rubin et al. (1957) :

- 0 : ouverture normale de la paupière.
- 1 : fermeture remarquable des paupières.
- 2 : paupières demi-fermées.
- 3 : presque complètement fermées.
- 4 : complètement fermées.

La réponse du test, qui va de 0 à 8 pour chaque rat, est la somme des notes pour les deux yeux. Si on observe une fermeture complète, il faudra contrôler si le phénomène n'apparaît pas à cause d'une incrustation à la suite d'une sécrétion des yeux.

...

Grandeur de la pupille :

La grandeur de la pupille est mesurée avec exactitude en tenant la feuille de carton décrite précédemment très près de la pupille. La mesure doit être faite à l'aide d'une source de lumière constante mais diffuse ; il ne faut pas exciter l'animal. Après une observation ordinaire, la pupille est mesurée pour obtenir aussi sa réponse à la lumière : une lampe est tenue vers la pupille à une distance d'à peu près 4 cm. Normalement le rat montre une contraction de la pupille, qui est marquée 0 ; le manque de contractions est enregistré par un + sur la fiche. La réponse à la lumière peut être évaluée aussi en tenant d'abord la main devant les yeux du rat et en la retirant ensuite rapidement ; ainsi la lumière peut frapper ses yeux.

Lacrymation, chromodacryorrhée :

La lacrymation et la chromodacryorrhée sont mesurées d'après Malone et al. (1961) en pliant la moitié d'un papier filtre (Whatman n° 1 ou quelque chose de similaire) d'un diamètre de 5,5 cm et en mettant le coin plié du papier doucement mais fermement dans le canthus intérieur de l'oeil du rat. Le papier absorbant assèche rapidement, en 20 secondes, les liquides du sac conjonctival, et donne une trace permanente des deux réponses de lacrymation-chromodacryorrhée. En pliant à plusieurs reprises un seul papier à filtre, on obtient les résultats du contrôle et des cinq tests. Après avoir séché l'oeil on déplie le papier, et les longueurs de W_2 et de L_2 sont mesurées en mm dans la section mouillée sans couleur. Les distances W_1 et L_1 sont mesurées en mm dans la section qui est rouge-marron. Sur la fiche les chiffres L_2/W_2 indiquent la lacrymation et les chiffres L_1/W_1 indiquent la chromodacryorrhée (larmes sanguinolentes).

4° Quatrième groupe : observation des oreilles :

Pâleur et hyperémie :

Pour obtenir une base solide d'estimation de la pâleur et de l'hyperémie de la peau, le chercheur compte les nombres de petits vaisseaux qui sont visibles à l'oreille droite ou gauche. Pendant le contrôle, l'oreille doit être mise entre la lumière et l'oeil du chercheur pour faciliter les observations. Un dessin des vaisseaux doit être fait sur un petit carré de la fiche pour se rappeler la position relative des vaisseaux. S'il y a pâleur, le nombre des vaisseaux visibles diminue tandis que l'hyperémie augmente le nombre de vaisseaux visibles. L'évaluation de la pâleur et de l'hyperémie faite subjectivement, est fondée sur le nombre des vaisseaux visibles et la couleur générale de l'oreille :

- (+) : effet équivoque,
- + : réponse moyenne,
- ++ : réponse prononcée importante.

...

Cyanose :

La cyanose est évaluée subjectivement en regardant la couleur des oreilles, des pattes et de la muqueuse buccale (+) à ++. Le degré de cyanose est déterminé en comparant l'animal test avec le rat témoin.

5° Cinquième groupe : symptômes généraux :

Salivation :

La salivation est évaluée d'après Malone et al. (1961) en utilisant l'échelle suivante :

- +2 = réponse maximum, la salive tombe activement de la mâchoire
- +1 = les mâchoires et le poil du menton sont mouillés par la salive.
- +0,5 = mâchoires et poil ne sont pas mouillés de façon perceptible, mais ils mouillent le papier filtre (le même que pour le test de lacrymation) quand on essuie avec le papier sous la mâchoire.
- 0 = absence de réponse, réponse normale comme chez les témoins, le papier filtre essuyé sous la mâchoire reste sec.

Erection de la queue :

L'érection de la queue ou phénomène de Straub est évalué comme suit :

- (+) : la queue est levée de 10°-40° ou seulement par intervalles à ce niveau.
- + : la queue est levée de 40°-60°.
- ++ : la queue est levée de 60°-90°.
- +++ : la queue est levée à plus de 90°, une queue tendue qui arque tout près du dos.

Erection pilomotrice :

- (+) : réponse équivoque, l'érection pilomotrice disparaît quand on touche le rat.
- + : érection pilomotrice dans la région du cou.
- ++ : le poil du rat entier est en érection et semble hérissé.

Miction :

La miction est observée avec l'aide des tâches d'urine sur le papier et en observant si le rat est mouillé au-dessus des pattes postérieures.

Diarrhée :

La diarrhée est remarquée quand la température rectale est prise et en observant des excréments qui souillent le papier de la cage. On évalue ainsi :

...

0 ; le thermomètre est propre quand on l'enlève, ou il n'y a que des grains compacts qui suivent le thermomètre.

- (+) : il reste une petite tache perceptible sur le papier quand on enlève les grains.
- + : un grain demi-compact laisse une trace presque aussi grande que le grain.
- ++ : grain mou, la tâche est plus grande que le grain.
- +++ : une masse d'excréments sans forme qui salit le papier distinctement.

La couleur rouge ou marron de l'urine et la couleur noire ou rouge des excréments doivent être évaluées, en utilisant des comprimés "Hematest-Reagent" ou du papier (Ames Co.).

Colpectasie :

A) Chez des femelles : est évaluée en observant s'il y a présence (+) ou absence (0) d'écoulement du canal vaginal, si l'écoulement est clair ou laiteux et si la muqueuse entourant le vagin est rouge et engorgée de sang.

B) Chez des mâles : l'érection du penis (priapisme) est évaluée : équivoque (+) ou présent +.

Test de Robichaud :

On relève la peau du dos du rat entre deux doigts, jusqu'à ce que ses pattes ne touchent plus terre, puis on libère soudain la peau. Chez un animal normal la peau revient à la normale tout de suite. Si le pli reste 3-5 secondes après la libération, la réponse est évaluée +, si le pli reste plus longtemps que 5 secondes, elle est notée ++. Des produits chimiques qui amènent une relaxation des muscles striés, des diurétiques excessifs, et/ou l'acidose encouragent ce phénomène.

Mouvement circulaire :

Un mouvement circulaire est une forme commune de stéréotypie chez les rats du test. Ce symptôme peut venir à la suite d'une infection de l'oreille intérieure, une maladie, qui est très commune dans beaucoup de colonies de rats. Un rat infecté commence à tourner, si on le prend par la queue, même s'il ne montre pas cet effet dans la cage. On ne doit pas utiliser comme animal de test un rat qui pourrait avoir une infection des oreilles. Des mouvements circulaires sont évalués présents (+) ou absents (0).

Frappement de queue :

Si la queue frappe les flancs des deux côtés; c'est un phénomène spontané qu'on peut parfois provoquer en caressant le dos de l'animal. On évalue comme présent + ou absent 0.

...

Température rectale :

On détermine la température rectale 30 minutes après l'injection. Il est toujours important d'introduire le thermomètre jusqu'au même point. Les enregistrements sont suivis et notés à la valeur maximale.

Le poids du corps est déterminé après une heure.

6° Sixième groupe : symptômes subjectifs :

Réaction aux coups frappés à la tête :

Avec le bout en bois du "crin de cheval", on frappe 3 coups verticaux rapides et successifs sur la tête du rat, entre les yeux, pour voir sa réaction. Chez les rats on peut distinguer trois types de réactions normales :

- 1° agression (mordre ou attaquer le bout du bois),
- 2° peur (tourner le dos et prendre la fuite),
- 3° passivité (ignorer le bout ou le tolérer).

Il est recommandé de faire les tests en deux séries de 3 coups avec intervalle de 15 secondes. On ne doit pas tester une drogue uniquement avec des rats agressifs, car il faut essayer d'avoir les 3 types de réaction pour le test.

Test pour la prise du corps :

Si la main du chercheur se ferme sur le corps du rat de sorte que les doigts se touchent sous l'abdomen, et si on presse doucement, mais fermement, l'animal montre encore un type de réactions fondamentales. La prise du corps est psychologiquement plus provocante pour le rat que le test où on frappe sur sa tête.

Position staturale (catalepsie) :

La position staturale est basée sur le temps pendant lequel le rat reste dans une position anormale. Une des pattes antérieures est placée sur une pièce de bois qui a une hauteur de 7 cm. Normalement, le rat quitte cette position tout de suite. Si une catalepsie est présente, elle est estimée comme suit :

- (+) : 30-60 secondes.
- + : 1-2 minutes.
- ++ : 2-3 minutes.
- +++ : 3-4 minutes.
- ++++ : plus de 4 minutes.

Si une catalepsie est présente, il est important de noter si l'animal peut être réveillé par un bruit soudain, comme celui utilisé pour déterminer la réaction d'alarme.

...

L'excès de curiosité :

L'excès de curiosité est estimé comme suit :

- (+) : équivoque.
- + : présent.
- ++ : présent continuellement.

Autopsie :

Si le rat meurt à cause des drogues, il est important de faire l'autopsie immédiatement et de déterminer si la mort fait suite à une crise cardiaque ou à un arrêt respiratoire. S'il s'agit d'une crise cardiaque, on peut constater si le coeur s'est arrêté en systole ou en diastole (seulement pour des animaux qui sont morts récemment), et si les oreillettes battent à un rythme régulier.

On regarde aussi systématiquement l'intérieur de l'abdomen autour du point d'injection, pour voir l'irritation locale, le degré de motilité des intestins, la dimension relative des vaisseaux mésentériques, la couleur des poumons, si le sang coagule normalement, et tout ce qui pourrait être anormal.

Après les observations du test entier, le rat est tué le septième jour et une autopsie est faite. Le chercheur doit noter les détails cités plus haut ainsi que la couleur et la taille du foie, des reins, de l'utérus et des testicules.

Conduite des examens du screening hippocratique :

Dans un laboratoire calme, où l'examen pharmacologique seul est accompli, 4 cages d'observation sont placées sur un banc. Dans chaque cage on dépose deux rats, chacun avec une marque d'identification, et on les laisse 15 minutes pour s'habituer à la cage. Un rat sert de contrôle ((sur la fiche) le jour suivant on va lui injecter la drogue) et on poursuit le programme avec ce rat qui a reçu l'extrait ; on note les résultats sur la fiche dans l'ordre suivant :

- 1° Activité motrice,
- 2° Examen de l'amplitude et de la profondeur de la respiration. Si on trouve une respiration du type Cheyne-Stokes ou une dyspnée, on le note (+) au bas de la fiche ainsi que les temps d'apparition et de disparition ;
- 3° Tremblements, fasciculations ;
- 4° Symptômes des yeux ;
- 5° Symptômes subjectifs ;
- 6° Test de Robichaud ;

...

- 7° Réflexe cornéen et pinéal ;
- 8° Analgésie ;
- 9° Ataxie, perte du réflexe ;
- 10° Anesthésie ;
- 11° Paralysie ;
- 12° Perte de support à l'écran ;
- 13° Convulsions ;
- 14° Symptômes des oreilles, de la muqueuse orale ;
- 15° Symptômes généraux, à l'exception du test de Robichaud dans l'ordre cité sur la fiche.

Les injections et les observations sont effectuées en prenant comme modèle le programme ci-après :

Rat	Heure	Heures et temps des observations						
		5 mn	15 mn	30 mn	60 mn	2 h	4 h	6 h
I	8.30	*)						
II	8.35							
III	9.40	*)						
IV	9.45							

*) réalisé tout de suite après l'injection du rat n° 2 et n° 4 respectivement.

Le déjeuner du chercheur pourra être pris entre 10 h 50 et 11 h 40 ou entre 11 h 50 et 12 h 30. Pendant les heures libres entre les observations on pourra effectuer l'autopsie des animaux du septième jour ; on pourra programmer les essais et préparer les dilutions du lendemain.

Le screening est conduit en double-aveugle. Cela veut dire que les suspensions des extraits de plantes et les solutions des substances de référence à injecter sont préparées et codées par des assistants de chimie avant d'être livrées aux assistants de pharmacologie qui accompliront le screening. Après l'explication des résultats par le responsable de la recherche, l'identité et le code de la solution utilisée sont révélés.

...

Il faut souligner une fois de plus qu'il est très important de remplir tous les espaces de la fiche. Chaque symptôme, même s'il n'est pas cité sur la fiche, doit être noté en bas de la page ainsi que les temps d'apparition et de disparition. Le chercheur ne doit jamais négliger un phénomène parce qu'il est imprévu ou difficile à décrire. Lorsque le phénomène observé est équivoque, il doit aussi être noté, parce que si cet effet est à rattacher à la drogue il apparaîtra aussi à un degré plus élevé lorsqu'on administrera des doses plus élevées.

Résultats et discussions :

Pour entraîner la personne qui va effectuer l'examen, il faut d'abord lui faire examiner les effets de doses variées de certaines substances de référence. L'évaluation d'une drogue nouvelle est faite en comparant ses effets au profil des substances de référence.

Les substances de référence suivantes aux doses ci-dessous indiquées ont été utilisées :

- Adréraline bitartrate : 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mg/Kg (calc d. comme base) (stimulation de SNC, exophtalmie),
- Amobarbital : 200, 100, 50, 25, 10 mg/Kg (dépression de SNC),
- Amphétamine sulphate : 80, 40, 20, 10, 5, 2, 1 mg/Kg (stimule le SNC, excès de curiosité),
- Atropine sulphate : 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 mg/Kg (mydriase),
- Carbacholine HCl : 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/Kg (miosis, diarrhée),
- Chlorpromazine HCl : 80, 40, 20, 10, 5 mg/Kg (dépression du SNC sans anesthésie),
- Codéine phosphate : 120, 60, 30, 15, 7.5, 3.8 mg/Kg (analgésique),
- Ephedrine HCL : 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 mg/Kg (40 mg/ml) (stimule le SNC, augmentation de la fréquence respiratoire),
- G-strophanthine : 50, 30, 20, 10, 5, 3 mg/kg (toxique),
- Hexobarbital : 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.2 mg/Kg (depression du SNC)
- Lidocaine HCl : 80, 40, 20, 10 mg/Kg (analgésique locale, convulsions),
- Methadone HCl : 25, 12.5, 6.2, 3.1 mg/Kg (analgésique, Straub),
- Morphine HCl : 320, 160, 80, 40, 20, 10 mg/Kg (analgésique, Straub),

...

- Noradrénaline bitartrate : 10, 5, 2.5, 1.25, 0.5 mg/Kg (stimulation du SNC),
- Papaverine HCl : 50, 30, 20, 10, 5 mg/Kg (enophtalmie),
- Pentazol : 80, 50, 40, 30, 20, 10 mg/Kg (convulsion clonique),
- Physostigmine methylsulphate : 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 mg/Kg (fasciculation),
- Réserpine : 20, 10, 5, 2.5, 1.25 mg/Kg (enophtalmie, ptose palpébrale),
- Scopolamine HBr : 10, 2, 1, 0.5, 0.12, 0.06 mg/Kg (mydriase, depression du SNC),
- Strychnine nitrate : 2, 1.6, 1.4, 1.2, 1 mg/Kg (convulsions toniques)
- Suxamethonium iodide : 5, 3.8, 2.5, 1.9, 1.25 mg/kg, (perte de support à l'écran),
- Tubocurarine chloride : 0.3, 0.2, 0.15, 0.075, 0.05 mg/Kg. (perte de support à l'écran).

Chacune de ces substances de référence montre une ou plusieurs réponses positives, pour les paramètres qui sont inclus sur la fiche. Les substances de référence comme la réserpine, la strychnine et la physostigmine montrent un profil d'effets très caractéristique. D'autres substances comme l'amphétamine, l'atropine, la codéine, l'hexobarbital et la tubocurarine présentent un profil de groupe caractéristique, tandis que l'adrénaline et la G-strophanthine sont moins caractéristiques. Le nombre des substances de référence peut varier : plus il est élevé, meilleurs sont les résultats ; il montre le genre d'effets et le genre de substances qu'on pourra découvrir avec cette méthode.

Ainsi qu'il est souligné plus haut le screening est un test en double-aveugle ; dans le but de vérifier la validité de la méthode, certaines plantes déjà connues de la chimie et de la pharmacologie ont été utilisées.

Dans les racines de Rauwolfia vomitoria et dans les graines de Physostigma venenosum, les effets de la réserpine et de la physostigmine ont été très facilement révélés. D'autre part, les effets cardioactifs des alcaloïdes de l'écorce de Erythrophleum guineense et de E. africanum montrent seulement un effet léthal, précédé par des symptômes dépressifs du SNC. Les effets hallucinogènes des alcaloïdes de Tabernanthe iboga sont révélés uniquement par l'accroissement de l'activité motrice élevée et un tremblement aigu du corps.

Donc il est facile d'ignorer des effets importants, et ceci montre la difficulté de l'interprétation des résultats obtenus. Par conséquent, cette méthode permet seulement un screening simple, et c'est pour cette raison que, par exemple, les effets léthaux, précédés par des symptômes dépressifs du SNC doivent aussi être considérés.

...

Parmi les extraits totaux, approximativement 10-15 % ont été intéressants à purifier. Cette purification chimique a permis de suivre l'accroissement de l'effet trouvé dans un premier temps. De nouvelles combinaisons d'actions ont été trouvées et aussi des effets inattendus, comme par exemple l'action de relaxation des muscles par les alcaloïdes tertiaires des Loganiacées africaines.

En conclusion, on veut dire que cette méthode est très appropriée à un screening général des extraits de plantes. Selon les résultats obtenus, un grand nombre d'extraits totaux doit être choisi pour la purification. Ce n'est que dans ces conditions que les autres procédures d'examen (par exemple organe isolé, préparation du cœur d'après Langendorff, pression sanguine chez les rats, etc...) pourront être appliquées, y compris la discrimination des effets.

II - TOXICITE AIGUE ET SUBAIGUE :

Dans le screening hippocratique, on a déjà une idée de la toxicité aiguë et subaiguë des extraits, lorsqu'ils sont administrés par voie intrapéritonéale. La toxicité est évaluée en calculant la Dose létale 50, c'est-à-dire, la dose de produit qui entraîne une mortalité de 50 %.

Détermination de la DL50 :

On travaille sur des souris ou des rats. L'extrait brut est administré par voie intrapéritonéale et orale. On injecte 3 doses différentes de l'extrait brut et de la substance de référence, en prenant au moins 10 animaux par dose.

Les observations portent sur 1 jour en toxicité aiguë et 7 jours en toxicité subaiguë.

Le pourcentage des animaux morts est transformé en Unité Probit (Figure 4) en fonction du logarithme des doses (voir figure 3).

Pour une question pratique, on établit la droite de régression par une méthode graphique. L'antilogarithme du log de la dose correspondant à 5 unités Probits, est égal à la DL50.

Il faut toujours utiliser une substance de référence pour faire une comparaison avec le produit donné par voie intrapéritonéale et orale.

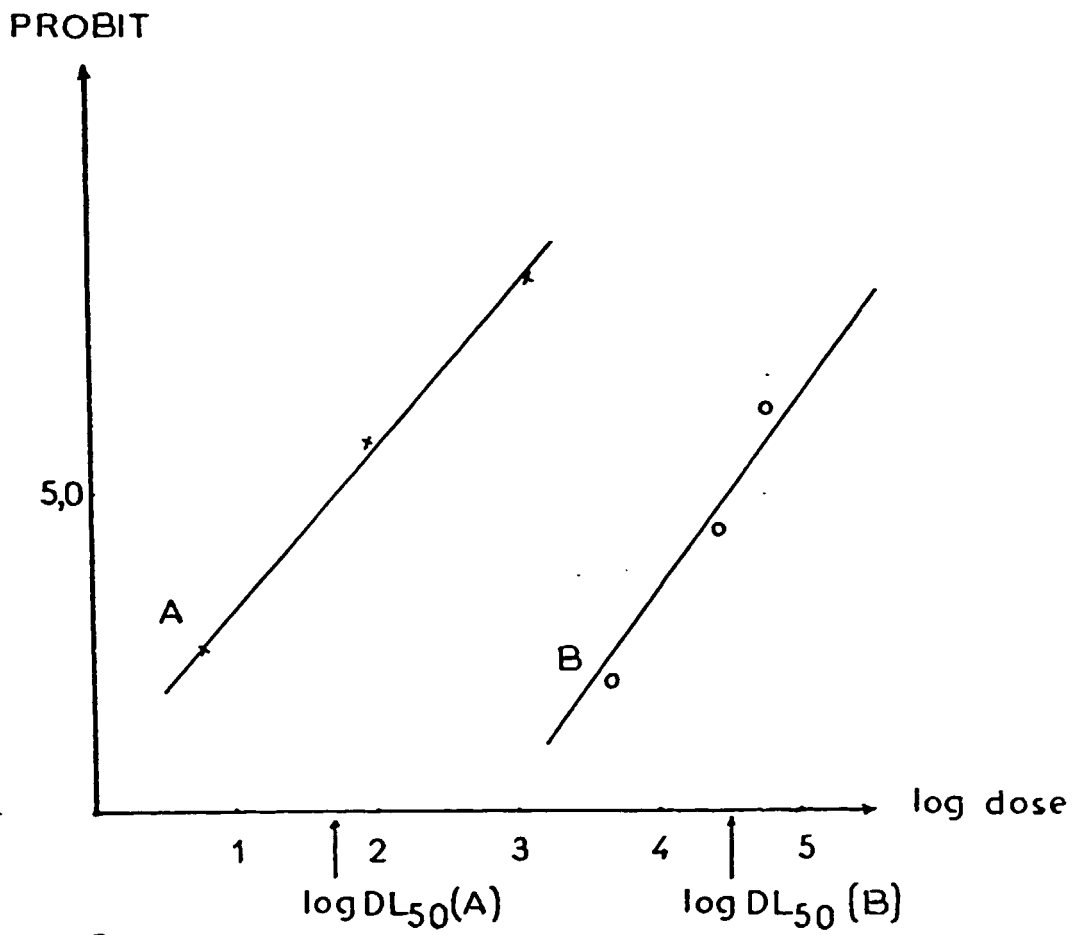


Figure 3 : Détermination de la DL₅₀

Figure 4 : Transformation de pourcentage en Unité Probit

%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	3	4	5
0	—	1-9098	2-1216	2-2522	2-3479	2-4242	2-4879	2-5427	2-5911	2-6344					
1	2-6737	2-7096	2-7429	2-7738	2-8027	2-8299	2-8556	2-8799	2-9031	2-9251					
2	2-9463	2-9665	2-9859	3-0046	3-0226	3-0400	3-0569	3-0732	3-0890	3-1043					
3	3-1192	3-1337	3-1476	3-1616	3-1750	3-1881	3-2009	3-2134	3-2256	3-2376					
4	3-2493	3-2608	3-2721	3-2831	3-2940	3-3046	3-3151	3-3253	3-3354	3-3454					
5	3-3551	3-3648	3-3742	3-3836	3-3928	3-4018	3-4107	3-4195	3-4282	3-4368					
6	3-4452	3-4536	3-4618	3-4699	3-4780	3-4859	3-4937	3-5015	3-5091	3-5167					
7	3-5242	3-5316	3-5389	3-5462	3-5534	3-5605	3-5675	3-5745	3-5813	3-5882					
8	3-5949	3-6016	3-6083	3-6148	3-6213	3-6278	3-6342	3-6405	3-6468	3-6531					
9	3-6592	3-6654	3-6715	3-6775	3-6835	3-6894	3-6953	3-7012	3-7070	3-7127					
10	3-7184	3-7241	3-7298	3-7354	3-7409	3-7464	3-7519	3-7574	3-7628	3-7681					
11	3-7735	3-7788	3-7840	3-7893	3-7945	3-7996	3-8048	3-8099	3-8150	3-8200					
12	3-8250	3-8300	3-8350	3-8399	3-8448	3-8497	3-8545	3-8593	3-8641	3-8689					
13	3-8736	3-8783	3-8830	3-8877	3-8923	3-8969	3-9015	3-9061	3-9107	3-9152					
14	3-9197	3-9242	3-9286	3-9331	3-9375	3-9419	3-9463	3-9506	3-9550	3-9593					
15	3-9636	3-9678	3-9721	3-9765	3-9808	3-9848	3-9890	3-9931	3-9973	4-0014					
16	4-0055	4-0096	4-0137	4-0178	4-0218	4-0259	4-0299	4-0339	4-0379	4-0419					
17	4-0458	4-0498	4-0537	4-0576	4-0615	4-0654	4-0693	4-0731	4-0770	4-0808					
18	4-0846	4-0884	4-0922	4-0960	4-0998	4-1035	4-1073	4-1110	4-1147	4-1184					
19	4-1221	4-1258	4-1295	4-1331	4-1367	4-1404	4-1440	4-1476	4-1512	4-1548					
20	4-1584	4-1619	4-1655	4-1690	4-1726	4-1761	4-1796	4-1831	4-1866	4-1901					
21	4-1936	4-1970	4-2005	4-2039	4-2074	4-2108	4-2142	4-2176	4-2210	4-2244					
22	4-2276	4-2312	4-2345	4-2379	4-2412	4-2446	4-2479	4-2512	4-2546	4-2579					
23	4-2612	4-2644	4-2677	4-2710	4-2743	4-2775	4-2808	4-2840	4-2872	4-2905					
24	4-2937	4-2969	4-3001	4-3033	4-3065	4-3097	4-3129	4-3160	4-3192	4-3224					
25	4-3255	4-3287	4-3318	4-3349	4-3380	4-3412	4-3443	4-3474	4-3505	4-3536					
26	4-3567	4-3597	4-3628	4-3659	4-3689	4-3720	4-3750	4-3781	4-3811	4-3842					
27	4-3872	4-3902	4-3932	4-3962	4-3992	4-4022	4-4052	4-4082	4-4112	4-4142					
28	4-4172	4-4201	4-4231	4-4260	4-4290	4-4319	4-4349	4-4378	4-4408	4-4437					
29	4-4466	4-4495	4-4524	4-4554	4-4583	4-4612	4-4641	4-4670	4-4698	4-4727					
30	4-4756	4-4785	4-4813	4-4842	4-4871	4-4899	4-4928	4-4956	4-4985	4-5012					
31	4-5041	4-5070	4-5098	4-5126	4-5155	4-5183	4-5211	4-5239	4-5267	4-5295					
32	4-5323	4-5351	4-5379	4-5407	4-5435	4-5462	4-5490	4-5518	4-5546	4-5573					
33	4-5601	4-5628	4-5656	4-5684	4-5711	4-5739	4-5766	4-5793	4-5821	4-5848					
34	4-5875	4-5903	4-5930	4-5957	4-5984	4-6011	4-6039	4-6066	4-6093	4-6120					
35	4-6147	4-6174	4-6201	4-6228	4-6255	4-6281	4-6308	4-6335	4-6362	4-6389					
36	4-6415	4-6442	4-6469	4-6495	4-6522	4-6549	4-6575	4-6602	4-6628	4-6655					
37	4-6681	4-6708	4-6734	4-6761	4-6787	4-6814	4-6840	4-6866	4-6893	4-6919					
38	4-6945	4-6971	4-6998	4-7024	4-7050	4-7076	4-7102	4-7129	4-7155	4-7181					
39	4-7207	4-7233	4-7259	4-7285	4-7311	4-7337	4-7363	4-7389	4-7415	4-7441					
40	4-7467	4-7492	4-7518	4-7544	4-7570	4-7596	4-7622	4-7647	4-7673	4-7699					
41	4-7725	4-7750	4-7776	4-7802	4-7827	4-7853	4-7879	4-7904	4-7930	4-7955					
42	4-7981	4-8007	4-8032	4-8058	4-8083	4-8109	4-8134	4-8160	4-8185	4-8211					
43	4-8236	4-8262	4-8287	4-8313	4-8338	4-8363	4-8389	4-8414	4-8440	4-8465					
44	4-8490	4-8516	4-8541	4-8566	4-8592	4-8617	4-8642	4-8668	4-8693	4-8718					
45	4-8743	4-8769	4-8794	4-8819	4-8844	4-8870	4-8895	4-8920	4-8945	4-8970					
46	4-8996	4-9021	4-9046	4-9071	4-9096	4-9122	4-9147	4-9172	4-9197	4-9222					
47	4-9247	4-9272	4-9298	4-9323	4-9348	4-9373	4-9398	4-9423	4-9448	4-9473					
48	4-9498	4-9524	4-9549	4-9574	4-9599	4-9624	4-9649	4-9674	4-9699	4-9724					
49	4-9749	4-9774	4-9799	4-9825	4-9850	4-9875	4-9900	4-9925	4-9950	4-9975					
50	5-0000	5-0025	5-0050	5-0075	5-0100	5-0125	5-0150	5-0175	5-0201	5-0226					
51	5-0251	5-0276	5-0301	5-0326	5-0351	5-0376	5-0401	5-0426	5-0451	5-0476					
52	5-0502	5-0527	5-0552	5-0577	5-0602	5-0627	5-0652	5-0677	5-0702	5-0728					
53	5-0753	5-0778	5-0803	5-0828	5-0853	5-0878	5-0904	5-0929	5-0954	5-0979					
54	5-1004	5-1030	5-1055	5-1080	5-1105	5-1130	5-1156	5-1181	5-1206	5-1231					
55	5-1257	5-1282	5-1307	5-1332	5-1358	5-1383	5-1408	5-1434	5-1459	5-1484					
56	5-1510	5-1535	5-1560	5-1586	5-1611	5-1637	5-1662	5-1687	5-1713	5-1738					
57	5-1764	5-1789	5-1815	5-1840	5-1866	5-1891	5-1917	5-1942	5-1968	5-1993					
58	5-2019	5-2045	5-2070	5-2096	5-2121	5-2147	5-2173	5-2198	5-2224	5-2250					
59	5-2275	5-2301	5-2327	5-2353	5-2378	5-2404	5-2430	5-2456	5-2482	5-2508					

For more detail see values for 95-100

%	0-0	0-1	0-2	0-3	0-4	0-5	0-6	0-7	0-8	0-9	1	2	3	4	5
60	5-2533	6-2559	5-2585	5-2611	5-2637	5-2663	5-2689	5-2715	5-2741	5-2767	3	5	8	10	13
61	5-2793	5-2819	5-2845	5-2871	5-2898	5-2924	5-2950	5-2976	5-3002	5-3029	3	5	8	10	13
62	5-3055	5-3081	5-3107	5-3134	5-3160	5-3186	5-3213	5-3239	5-3266	5-3292	3	5	8	11	13
63	5-3319	5-3345	5-3372	5-3398	5-3425	5-3451	5-3478	5-3505	5-3531	5-3558	3	5	8	11	13
64	5-3585	5-3611	5-3638	5-3665	5-3692	5-3719	5-3745	5-3772	5-3799	5-3826	3	5	8	11	13
65	5-3853	5-3880	5-3907	5-3934	5-3961	5-3989	5-4016	5-4043	5-4070	5-4097	3	5	8	11	14
66	5-4125	5-4152	5-4179	5-4207	5-4234	5-4261	5-4289	5-4316	5-4344	5-4372	3	5	8	11	14
67	5-4399	5-4427	5-4454	5-4482	5-4510	5-4538	5-4565	5-4593	5-4621	5-4649	3	6	8	11	14
68	5-4677	5-4705	5-4733	5-4761	5-4789	5-4817	5-4845	5-4874	5-4902	5-4930	3	6	8	11	14
69	5-4959	5-4987	5-5015	5-5044	5-5072	5-5101	5-5129	5-5158	5-5187	5-5215	3	6	9	11	14
70	5-5244	5-5273	5-5302	5-5330	5-5359	5-5388	5-5417	5-5446	5-5476	5-5505	3	6	9	12	14
71	5-5534	5-5563	5-5592	5-5622	5-5651	5-5681	5-5710	5-5740	5-5769	5-5799	3	6	9	12	15
72	5-5828	5-5858	5-5888	5-5918	5-5948	5-5978	5-6008	5-6038	5-6068	5-6098	3	6	9	12	15
73	5-6128	5-6168	5-6198	5-6219	5-6250	5-6280	5-6311	5-6341	5-6372	5-6403	3	6	9	12	15
74	5-6433	5-6464	5-6495	5-6526	5-6557	5-6588	5-6620	5-6651	5-6682	5-6713	3	6	9	12	16
75	5-6745	5-6776	5-6808	5-6840	5-6871	5-6903	5-6935	5-6967	5-6999	5-7031	3	6	10	13	16
76	5-7063	5-7095	5-7128	5-7160	5-7192	5-7225	5-7257	5-7290	5-7323	5-7356	3	7	10	13	16
77	5-7388	5-7421	5-7454	5-7488	5-7521	5-7554	5-7588	5-7621	5-7655	5-7688	3	7	10	13	17
78	5-7722	5-7756	5-7790	5-7824	5-7858	5-7892	5-7926	5-7961	5-7995	5-9030	3	7	10	14	17
79	5-8064	5-8099	5-8134	5-8169	5-8204	5-8239	5-8274	5-8310	5-8345	5-8381	4	7	11	14	18
80	5-8416	5-8452	5-8488	5-8524	5-8560	5-8596	5-8633	5-8669	5-8705	5-8742	4	7	11	14	18
81	5-8779	5-8816	5-8853	5-8890	5-8927	5-8965	5-9002	5-9040	5-9078	5-9116	4	7	11	15	19
82	5-9154	5-9192	5-9230	5-9269	5-9307	5-9346	5-9385	5-9424	5-9463	5-9502	4	8	12	15	19
83	5-9542	5-9581	5-9621	5-9661	5-9701	5-9741	5-9782	5-9822	5-9863	5-9904	4	8	12	16	20
84	5-9945	5-9986	6-0027	6-0069	6-0110	6-0152	6-0194	6-0237	6-0279	6-0322	4	8	13	17	21
85	6-0364	6-0407	6-0450	6-0494	6-0537	6-0581	6-0625	6-0669	6-0714	6-0758	4	9	13	18	22
86	6-0803	6-0848	6-0893	6-0939	6-0985	6-1031	6-1077	6-1123	6-1170	6-1217	5	9	14	18	23
87	6-1264	6-1311	6-1359	6-1407	6-1455	6-1503	6-1552	6-1601	6-1650	6-1700	5	10	15	19	24
88	6-1750	6-1800	6-1850	6-1901	6-1952	6-2004	6-2055	6-2107	6-2160	6-2212	5	10	15	21	26
89	6-2265	6-2319	6-2372	6-2426	6-2481	6-2536	6-2591	6-2646	6-2702	6-2759	5	11	16	22	27

90	6-2816	6-2873	6-2930	6-2988	6-3047	6-3106	6-3165	6-3225	6-3285	6-3346	6	12	18	24	29
91	6-3408	6-3469	6-3532	6-3595	6-3658	6-3722	6-3787	6-3852	6-3917	6-3984	6	13	19	26	32
92	6-4051	6-4118	6-4187	6-4255	6-4325	6-4395	6-4466	6-4538	6-4611	6-4684	7	14	21	28	35
93	6-4758	6-4833	6-4909	6-4985	6-5063	6-5141	6-5220	6-5301	6-5382	6-5464	8	16	24	31	39
94	6-5548	6-5632	6-5718	6-5805	6-5893	6-5982	6-6072	6-6164	6-6258	6-6352	9	18	27	36	45
95	6-6449	6-6546	6-6646	6-6747	6-6849	6-6954	6-7060	6-7169	6-7279	6-7392					
96	6-7507	6-7624	6-7744	6-7866	6-7991	6-8119	6-8250	6-8384	6-8522	6-8663					
97	6-8808	6-8957	6-9110	6-9268	6-9431	6-9600	6-9774	6-9954	7-0141	7-0335					
	149	153	158	163	169	174	180	187	194	202					
98-0	7-0537	7-0558	7-0579	7-0600	7-0621	7-0642	7-0663	7-0684	7-0706	7-0727	2	4	6	8	11
98-1	7-0749	7-0770	7-0792	7-0814	7-0836	7-0858	7-0880	7-0902	7-0924	7-0947	2	4	7	9	11
98-2	7-0969	7-0992	7-1015	7-1038	7-1061	7-1084	7-1107	7-1130	7-1154	7-1177	2	5	7	9	12
98-3	7-1201	7-1224	7-1248	7-1272	7-1297	7-1321	7-1345	7-1370	7-1394	7-1419	2	5	7	10	12
98-4	7-1444	7-1469	7-1494	7-1520	7-1545	7-1571	7-1596	7-1622	7-1648	7-1675	3	5	8	10	13
98-5	7-1701	7-1727	7-1754	7-1781	7-1808	7-1835	7-1862	7-1890	7-1917	7-1945	3	5	8	11	14
98-6	7-1973	7-2001	7-2029	7-2058	7-2086	7-2115	7-2144	7-2173	7-2203	7-2232	3	6	9	12	14
98-7	7-2262	7-2292	7-2322	7-2353	7-2383	7-2414	7-2445	7-2476	7-2508	7-2539	2	6	9	12	15
98-8	7-2571	7-2603	7-2636	7-2668	7-2701	7-2734	7-2768	7-2801	7-2835	7-2869	3	7	10	13	17
98-9	7-2904	7-2938	7-2973	7-3009	7-3044	7-3080	7-3116	7-3152	7-3189	7-3226	4	7	11	14	18
99-0	7-3263	7-3301	7-3339	7-3378	7-3416	7-3455	7-3495	7-3535	7-3575	7-3615	4	8	12	16	20
99-1	7-3656	7-3698	7-3739	7-3781	7-3824	7-3867	7-3911	7-3954	7-3999	7-4044	4	9	13	17	22
99-2	7-4089	7-4135	7-4181	7-4228	7-4276	7-4324	7-4372	7-4422	7-4471	7-4522	5	10	14	19	24
99-3	7-4573	7-4624	7-4677	7-4730	7-4783	7-4838	7-4893	7-4949	7-5006	7-5063	5	11	16	22	27
99-4	7-5121	7-5181	7-5241	7-5302	7-5364	7-5427	7-5491	7-5556	7-5622	7-5690	6	13	19	25	32
99-5	7-5758	7-5828	7-5899	7-5972	7-6045	7-6121	7-6197	7-6276	7-6356	7-6437					
99-6	7-6521	7-6606	7-6693	7-6783	7-6874	7-6968	7-7065	7-7164	7-7266	7-7370					
99-7	7-7478	7-7589	7-7703	7-7822	7-7944	7-8070	7-8202	7-8338	7-8480	7-8627					
99-8	7-8782	7-8943	7-9112	7-9290	7-9478	7-9677	7-9889	8-0115	8-0357	8-0618					
99-9	8-0902	8-1214	8-1559	8-1947	8-2389	8-2905	8-3523	8-4316	8-5401	8-7190					

I am indebted to Professor R. A. Fisher and Dr F. Yates, and also to Messrs Oliver and Boyd, Ltd. of Edinburgh, for permission to reprint Table I from Table IX of their book *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*.

CHAPITRE 3
LES TESTS *in vivo*

Ce chapitre décrit des tests pharmacologiques *in vivo* qui sont en fait le pendant du test hippocratique. Ils reprennent en général, par des tests spécifiques de confirmation, les observations prises une par une, faites lors du test hippocratique.

I - ANTI-TUSSIF :

PRINCIPE :

La toux est provoquée chez le Cobaye par irritation des muqueuses des voies respiratoires après inhalation d'air chargé d'ammoniaque. On recherche les substances qui peuvent inhiber cette réaction.

MATERIEL ET METHODE :

- Appareil :

. Un habitacle en verre dont le couvercle hermétique reçoit deux tubulures pour la circulation des gaz.

. Un compresseur (MARION, LEROY-SOMER) fournit l'air comprimé qui par une tubulure munie d'un robinet à trois voies peut, soit directement atteindre l'habitacle, soit barboter préalablement dans un flacon contenant la solution irritante à vaporiser. Un schéma du montage est donné en figure 5.

- . Un chronomètre.
- . Un compteur.

- Animal :

Cobayes mâles ou femelles pesant en moyenne 400 g.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

Le Cobaye est placé dans l'enceinte en verre pendant une durée totale de cinq minutes :

- . pendant une minute et demie, il respire de l'air,
- . pendant deux minutes, il inhale de l'air chargé d'ammoniaque,
- . pendant une minute et demie, il respire de l'air.

...

Dispositif pour provoquer la toux chez le cobaye

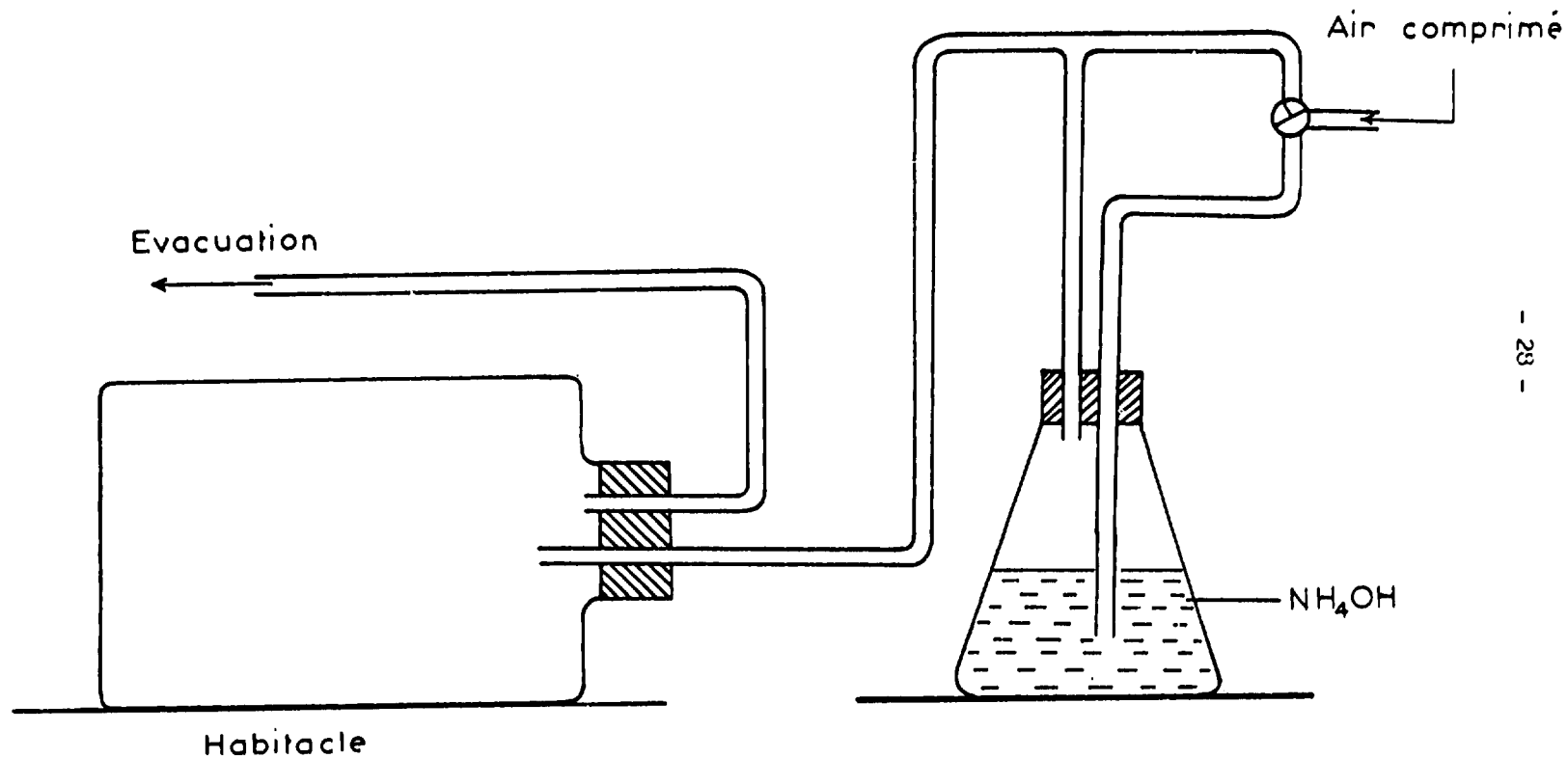


Figure 5 : Schéma du dispositif pour provoquer la toux

Le nombre d'accès de toux est comptabilisé pendant l'inhalation de vapeurs irritantes.

Des études préliminaires ont permis de déterminer la concentration optimale d'ammoniaque. A partir de l'ammoniaque à 34 % (d = 0,89), des dilutions au 1/20, 1/10, 1/5 et 1/2 ont été faites. Les deux premières dilutions ne provoquent pas de toux. Celle du 1/2 provoque la toux, mais entraîne un écoulement de sang au niveau des narines. La dilution au 1/5 a été retenue car elle provoque la toux sans provoquer l'écoulement sanguin.

Afin de maintenir les conditions expérimentales identiques, la solution d'ammoniaque contenue dans le barboteur n'est utilisée qu'une seule fois.

Au moment de l'expérimentation, une première mesure est faite pour vérifier la réaction tussive. Les animaux qui réagissent aux vapeurs irritantes sont répartis au hasard en trois lots :

- Un lot témoin, qui recevra le véhicule,
- un lot de référence traité à la codéine,
- un lot traité à l'extrait.

L'influence de l'heure sur la réaction tussive est minimisée en testant dans un ordre rotatoire les trois lots, d'une série expérimentale à l'autre exemple :

- série I : lot 1, lot 2, lot 3,
- série II : lot 2, lot 3, lot 1,
- série III : lot 3, lot 1, lot 2,
- etc...

Le tableau I et la figure 6 sont des exemples de résultats avec la codéine comme substance de référence et un extrait de plante.

Ces produits sont administrés par voie orale avant le test.

Tableau 1 : Récapitulatif des expériences de toux provoquée chez le Cobaye

Produits	Nombre animaux testés	Avant toute manipulation	Nombre total de toux / groupe / unité de temps de mesure				
			T ₀ Immédiatement après traitement	T ₁ 1 H après traitement	T ₂ 2 H après traitement	T ₃ 3 H après traitement	T ₄ 4 H après traitement
Eau distillée	21	46	35	18	17	14	14
Codéine 100 mg/Kg	21	56	27	16	10	05	02
RP 009 50 mg/Kg	21	48	25	06	02	09	04

Nombre de toux par animal

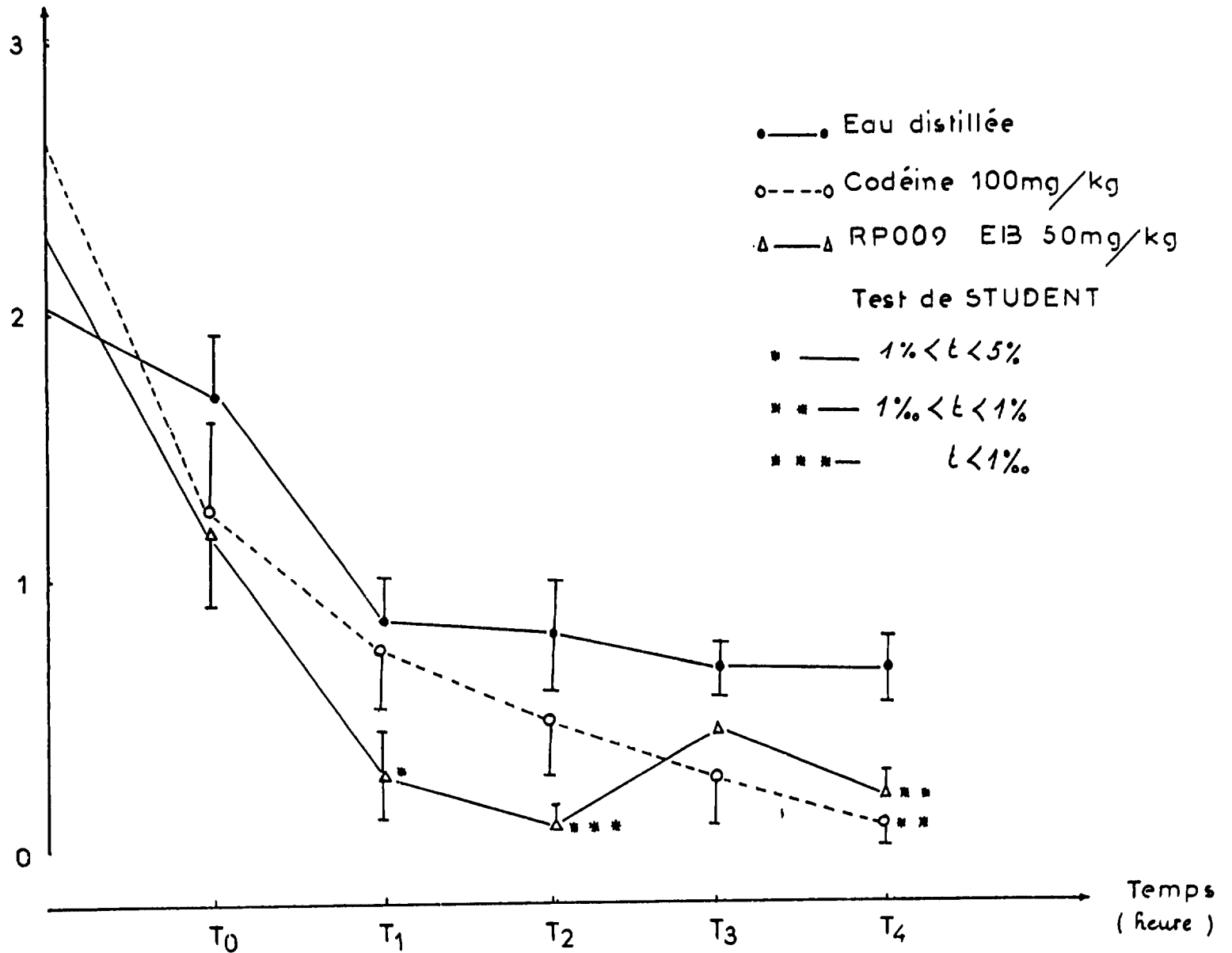


Figure 6 : Variation moyenne du nombre de toux en fonction du temps chez le Cobaye

II - ANALGESIQUE :

II.1. ETUDE DE L'ACTION ANTALGIQUE PAR LA TECHNIQUE DE KOSTER :

Principe :

Une injection intrapéritonéale d'acide acétique (99,5 %) à 6 p. 1 000 chez la Souris provoque un syndrome douloureux qui s'exprime par une contorsion abdominale. L'animal étire son corps, trainant le ventre par terre, avec extension des pattes arrières. Les antalgiques réduisent ou suppriment ces contorsions abdominales.

Matériel et méthode :

- Matériel : cristallisoirs.

- Animal : souris mâles ou femelles pesant en moyenne 25 g.

Protocole expérimental :

Au temps T_0 , les produits à tester sont administrés par voie orale à des souris adultes mâles ou femelles. Une demi-heure après, au temps $T_0 + 30$ minutes, l'acide acétique à 6 p. 1000, dans de l'eau gommeuse à 1 p. 1000, est injectée par voie intrapéritonéale, au même endroit pour toutes les souris, à raison de 0,25 ml par souris.

On compte alors le nombre de contorsions abdominales qui apparaissent dans les dix premières minutes puis de la 10e à la 20e minute. Le nombre de contorsions par souris est alors comptabilisé pour chacune des deux périodes. Dix souris par dose sont utilisées.

L'inhibition est exprimée en pourcentage :

$$\frac{\text{Nombre de contorsions des témoins} - \text{Nombre de contorsions des traités}}{\text{Nombre de contorsions des témoins}} \times 100.$$

En travaillant des doses différentes des produits étudiés, substance de référence ou extraits végétaux, on obtient des droites d'inhibition de la douleur et les DE_{50} sont déterminées graphiquement. La DE_{50} est la dose qui diminue de moitié le nombre des contorsions abdominales. Les figures 7, 8 et 9 reportent les résultats obtenus par cette technique avec la codéine, l'acide acétylsalicylique et le phénylbutazone.

II.2. ETUDE DE L'ACTION ANTALGIQUE PAR LE TEST DE RANDALL ET SELITTO :

Principe :

Ce test permet de déceler un analgésique à effet central. La pression mécanique provoque une sensation de douleur à partir d'une certaine intensité. Dans cette épreuve, la pression est exercée sur une patte enflammée et sur une patte normale. Un analgésique à effet central augmente aussi bien le seuil de sensibilité à la douleur de la patte normale que de la patte enflammée. Un analgésique sans action centrale ne modifie que le seuil de sensibilité à la douleur de la patte enflammée.

% Inhibition de l'analgésie

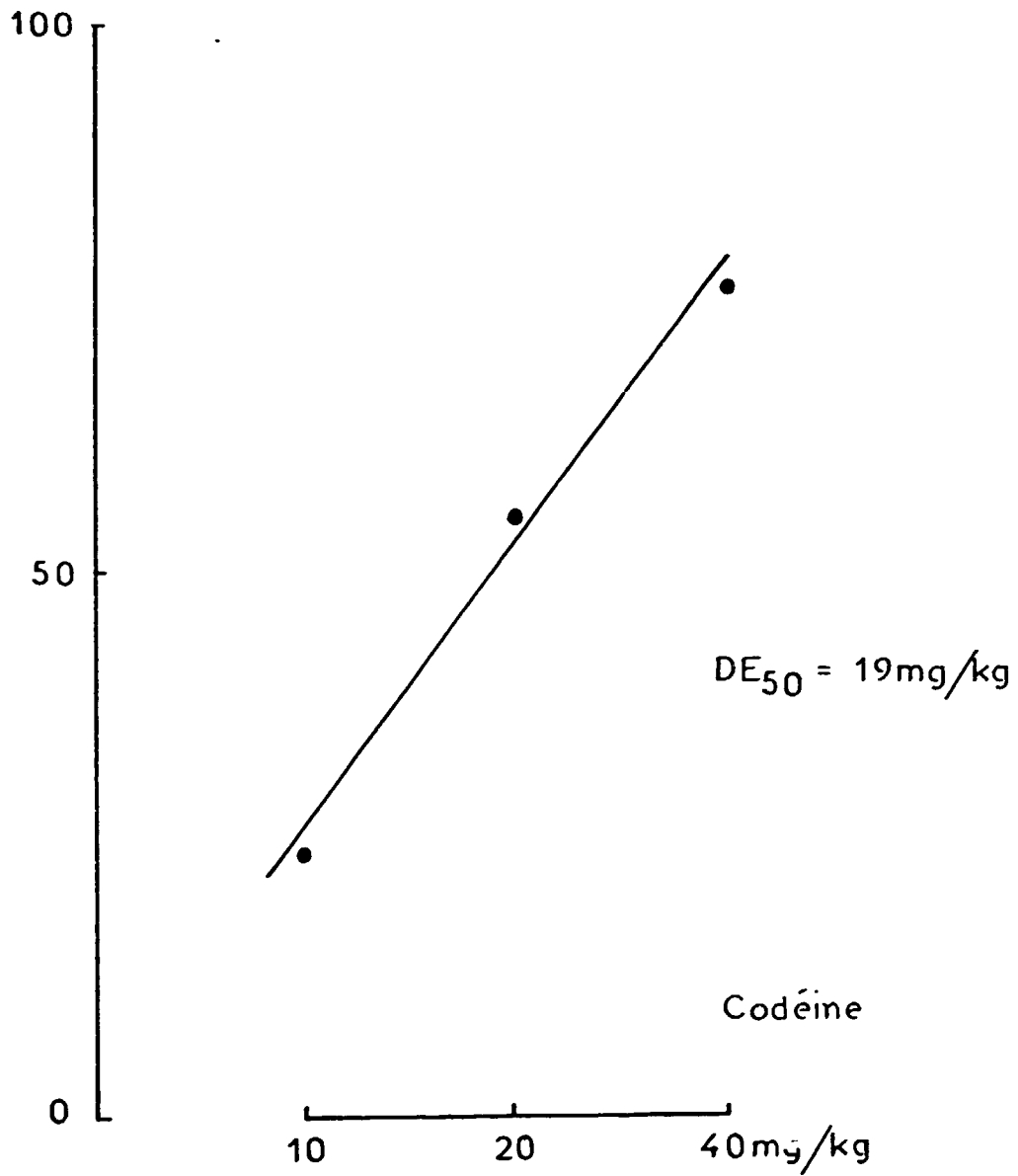


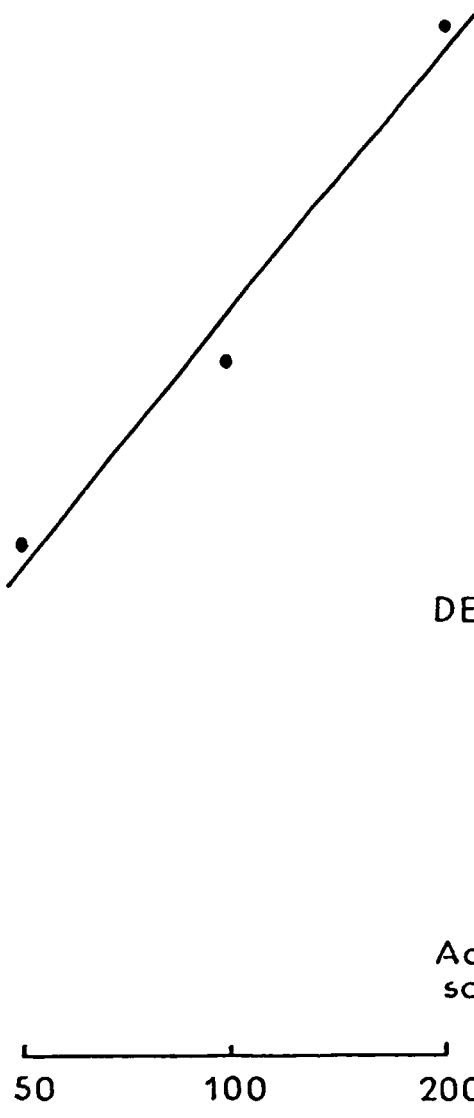
Figure 7 : Analgésie (Technique de Koster).
Droite effet/dose de la codéine.

d'inhibition

100

50

0



$DE_{50} = 59 \text{ mg/kg}$

Acide acétyl
salicylique

50 100 200mg/kg

Figure 8 : Analgésie (Technique de Koster).
Droite effet/dose de l'acide acétyl salicylique.

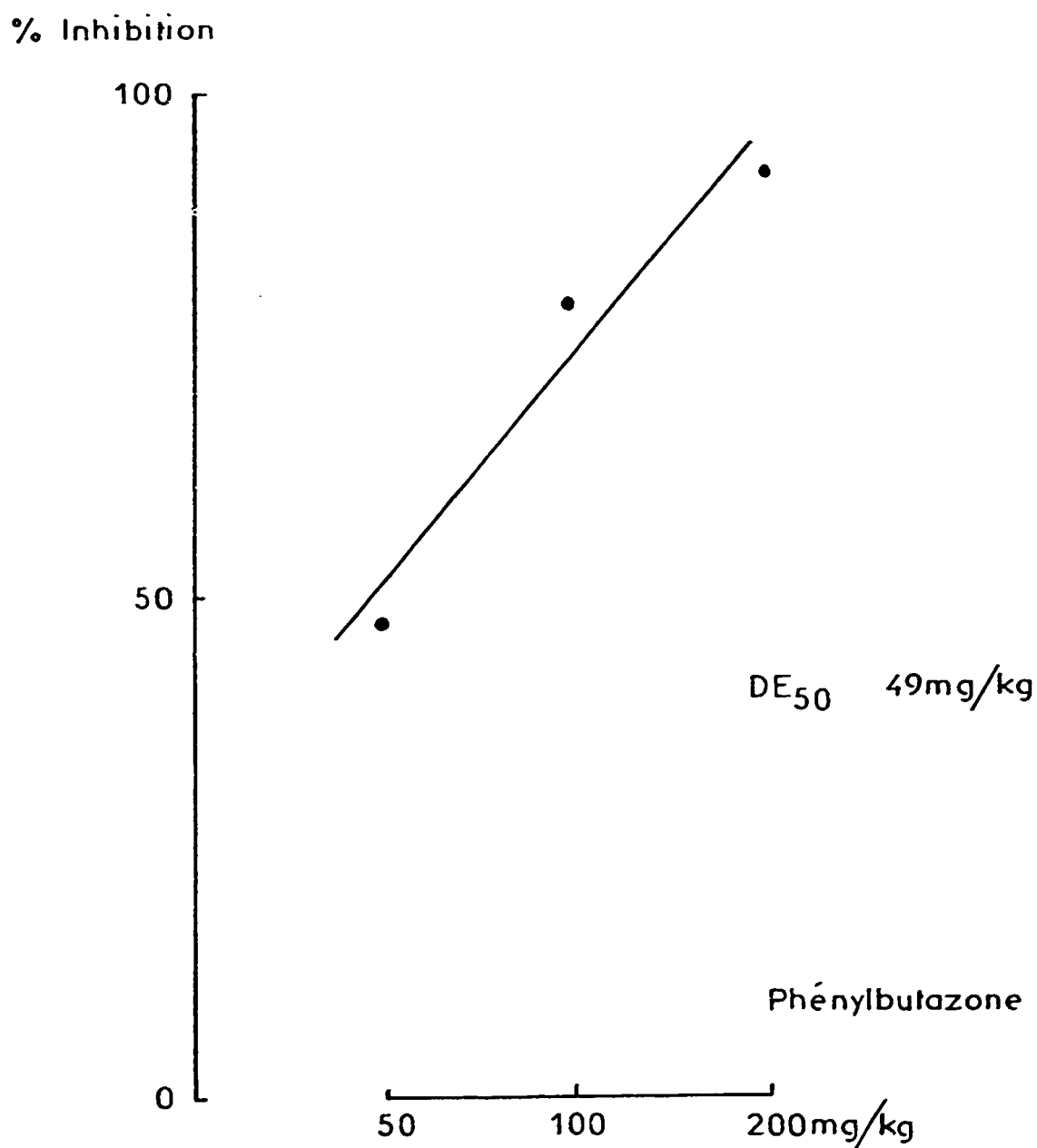


Figure 9 : Analgésie (Technique de Koster).
Droite effet/dose du phénylbutazone.

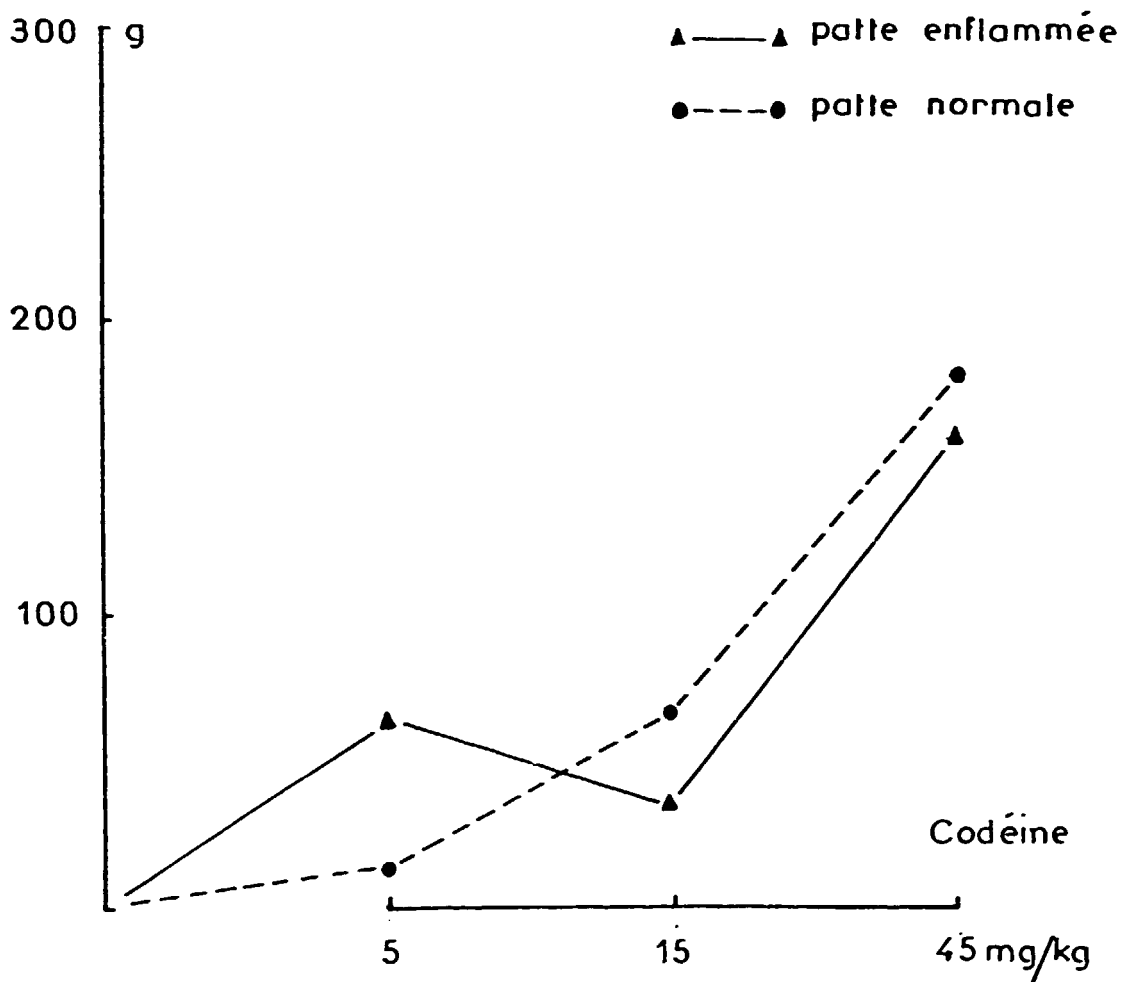


Figure 10 : Analgésie (Technique de Randall et Selitto).
Les courbes de résistance à la douleur pour
la codéine.

Matériel et méthode :

- Appareil : Analgésimètre de Randall et Selitto (Ugo Basile).
- Animal : Rats mâles pesant entre 100-120 g.

Protocole expérimental :

Les rats sont sélectionnés la veille de l'expérience. Leur sensibilité à la douleur est mesurée au niveau des deux pattes arrières sur l'analgésimètre. Seuls sont retenus les animaux qui répondent à la douleur pour des pressions inférieures à 50 g.

Le jour du test, les animaux sont répartis en 3 groupes de 6 animaux et reçoivent respectivement : la substance de référence, la codéine, l'extrait à tester, le véhicule. Trente minutes après l'administration des produits par voie orale, l'inflammation est provoquée à la patte arrière droite en injectant sous le coussinet plantaire 0,1 ml d'une suspension de levure de bière à 15 p. 100 dans l'eau distillée.

Les mesures de sensibilité sur l'analgésimètre sont effectuées 1 H, 2 H et 4 H après l'induction de l'inflammation.

La figure 10 représente les résultats obtenus avec la codéine 2 H après l'induction de l'inflammation.

III - ANTIPYRETIQUE :

Principe :

Une hyperthermie provoquée pour la levure de bière injectée par voie sous-cutanée chez le Rat est diminuée par l'acide acétyl salicylique.

Matériel et méthode :

- Appareil : Thermosonde (Thermophil, Ultrakust).
- Animal : Rats mâles pesant entre 150-250 g.

- Protocole expérimental :

Le problème est d'obtenir des animaux homogènes au point de vue température aussi bien à un instant donné qu'au cours de la journée. Des Rats mâles de trois à quatre mois pesant entre 150-250 g sont acclimatés dans une salle où la température est maintenue à $21^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Leur température rectale est mesurée à 9 H, 10 H et 12 H à l'aide d'une thermosonde. Au bout de 10 jours, la température rectale des animaux devient dans la majorité homogène.

Après avoir écarté les animaux dont les variations de température sont trop importantes, on arrive à constituer un ensemble où l'erreur standard de la moyenne de trois mesures de la température journalière ne dépasse pas $0,2^{\circ} \text{C}$.

...

La veille du test, les animaux sont répartis au hasard en quatre groupes de 6 animaux pour chaque produit à tester. La nourriture est enlevée. 18 H avant le test, une suspension de poudre de levure de bière à 15 p. 100 dans l'eau distillée est injectée s.c. dans la région dorsale, à raison de 1 ml/100 g de poids de l'animal. Cette injection entraîne au bout de ce temps, une hyperthermie de 2° C et qui persiste au-delà de 24 H.

Le jour de l'expérience, l'hyperthermie des animaux est vérifiée. L'acide acétyl salicylique est mis en suspension dans de l'eau gommeuse à 1 p. 1000. Trois concentrations en progression géométriques de cette substance de référence sont préparées.

On prépare aussi 3 concentrations de l'extrait à tester dans de l'eau distillée. Les préparations sont administrées aux animaux par voie buccale à raison de 1 ml/100 g de poids.

Les groupes témoins reçoivent le véhicule.

Les températures rectales sont ensuite relevées 1 H, 2 H et 4 H après l'administration du produit.

La réduction de l'hyperthermie est appréciée en comparant les Rats traités au lot témoin. Elle est exprimée en pourcentage par la formule :

$$y = 100 \left(1 - \frac{T}{T_p} \right)$$

où T_p est la température des animaux traités par le produit et T la température des animaux témoins.

La figure 11 représente l'effet des 3 doses d'acide acétyl salicylique 4 H après leur administration. On obtient graphiquement une droite qui permet de calculer la dose qui réduit de 50 % l'hyperthermie. Cette DE_{50} est égale à 74 mg/Kg dans les conditions expérimentales décrites ici.

Lorsqu'une activité antipyrétique a été mise en évidence ou quand on a observé un effet sur la température lors du test hippocratique, il est important de vérifier les effets de ces extraits sur la température corporelle normale.

Ce contrôle permet de savoir si l'extrait végétal est un vrai antipyrétique, c'est-à-dire, que son activité ne se manifeste que si l'hyperthermie est installée, ou de confirmer si l'extrait est un hypothermisant, c'est-à-dire, qu'il abaisse aussi la température normale, en dehors de toute hyperthermie. Ce contrôle est capital puisque la finalité de l'extrait est d'être administrée à des homéothermes.

Les conditions de travail pour réaliser ce contrôle sont les mêmes que celles pour l'activité anti-pyrétique.

Les rats mâles sont sélectionnés et conditionnés dans une salle maintenue à 21 + 1° C. Trois lots de 14 rats sont constitués :

...

% Inhibition de l'hyperthermie

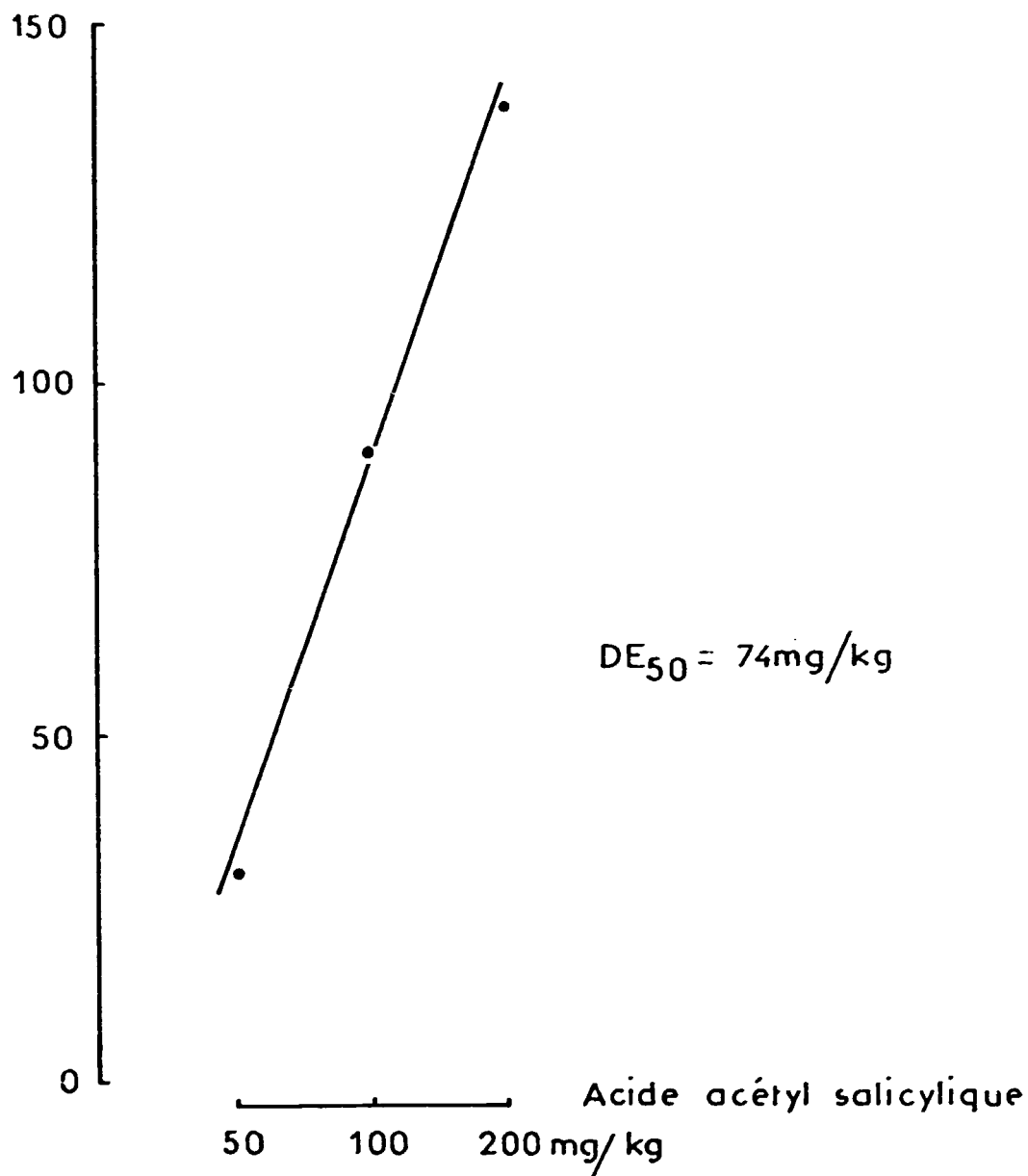


Figure 11 : Droite effet/dose de l'inhibition de l'hyperthermie par l'acide acétyl salicylique.

Tableau 2 : Contrôle de la thermorégulation. Chaque chiffre représente la moyenne de la température de 3 prises journalières de 14 mâles. Le traitement avec RP 009 E.M. et l'aspirine a commencé au jour J₁.

	Eau distillée	Aspirine 100 mg/Kg	RP 9 E.M. 1,2 mg/Kg
	T° C ± s.e.m.	T° C ± s.e.m.	T° C ± s.e.m.
	37,8 ± 0,17	38,0 ± 0,11	37,7 ± 0,10
	38,1 ± 0,18	38,1 ± 0,16	37,8 ± 0,11
	38,2 ± 0,20	38,0 ± 0,17	38,0 ± 0,17
	37,9 ± 0,15	38,1 ± 0,14	37,7 ± 0,16
J ₁	37,9 ± 0,09	37,9 ± 0,08	37,7 ± 0,15
J ₃	37,8 ± 0,19	37,8 ± 0,12	37,7 ± 0,17
J ₅	37,7 ± 0,09	37,9 ± 0,08	37,7 ± 0,15
J ₇	37,7 ± 0,10	37,8 ± 0,16	37,6 ± 0,14
J ₉	37,7 ± 0,14	37,8 ± 0,13	37,6 ± 0,12
J ₁₁	37,2 ± 0,18	37,4 ± 0,12	37,3 ± 0,12
J ₁₃	37,3 ± 0,16	37,5 ± 0,08	37,2 ± 0,11
J ₁₅	37,4 ± 0,21	37,5 ± 0,10	37,9 ± 0,12

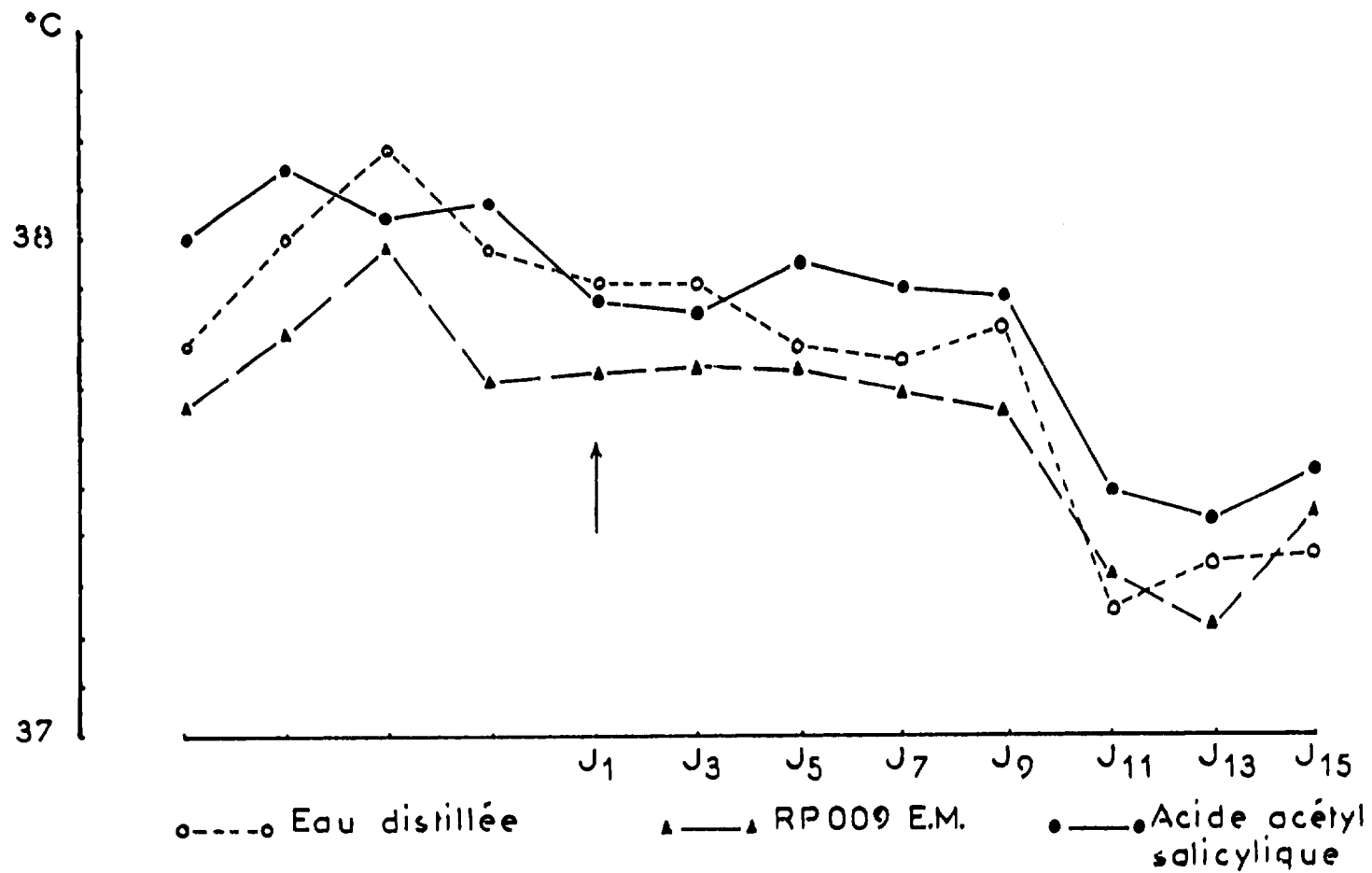


Figure 12 : Contrôle de l'influence de l'acide acétyl salicylique et d'un extrait végétal sur la thermorégulation.

- le lot I : reçoit l'eau distillée,
- le lot II : l'acide acétyl salicylique,
- le lot III : l'extrait végétal.

On choisit pour l'acide acétyl salicylique et l'extrait végétal les doses qui ont réduit de 80 % à 90 % l'hyperthermie provoquée par la levure de bière. Les produits sont administrés quotidiennement par voie buccale à raison de 1 ml/100 g pendant 15 jours. La température rectale est relevée 3 fois par jour, tous les 2 jours.

Le tableau 2 et la figure 12 reproduisent les résultats obtenus (au laboratoire) pour l'acide acétyl salicylique et un extrait végétal. Sur la figure 12 les courbes de température des trois lots ont la même allure et ne diffèrent pas entre elles (analyse de la variance, $\alpha = 0,05$).

IV - ANTI-ANAPHYLAXIE :

Principe :

L'anaphylaxie est l'augmentation de la sensibilité de l'organisme à une substance étrangère (antigène) après que celle-ci y a été introduite. Cet état n'apparaît qu'un certain temps après le premier contact avec l'antigène.

Le cobaye sensibilisé à l'ovalbumine réagit à une nouvelle injection de l'antigène par une bronchoconstriction. Le premier but est de déterminer le laps de temps pendant lequel la réponse à l'anaphylaxie est encore détectable 21 jours après la sensibilisation. En second lieu on teste les substances qui peuvent empêcher l'apparition de l'anaphylaxie dans l'intervalle de temps déterminé.

Matériel et méthode :

Préparation de l'animal :

- Sensibilisation des animaux :

Cinq Cobayes mâles ou femelles de 400 à 450 g sont sensibilisés le même jour par de l'ovalbumine à 50 mg/ml en solution saline et à raison de 1 ml par 100 g de poids de l'animal. L'injection est faite par voie intrapéritonéale et elle est répétée 3 jours et 5 jours plus tard.

L'appareil à bronchospasme (montage de Konzett-Rössler) permet de vérifier l'installation de la bronchoconstriction à partir du 21^e jour après la dernière injection d'ovalbumine et une nouvelle administration par la veine jugulaire de 200 µg d'ovalbumine dans 0,5 ml de solution saline.

- Canulation trachéale :

On prend des Cobayes mâles ou femelles de 400 g à 450 g sensibilisé à l'ovalbumine. L'animal est anesthésié par de l'uréthane 10 % en solution saline et injecté par voie intrapéritonéale à raison de 1 ml par 100 g de poids, ce

...

qui correspond à une dose de 0,5 g/kg. La région trachéale est ensuite rasée et la trachée est mise à nu. Une trachéotomie est faite et on met en place la canulation trachéale à relier à une pompe ventilatoire.

S'il est nécessaire de mettre l'animal sous l'effet d'un curarisant (FLAXEDIL[®]), il est primordial de relier l'animal à la pompe immédiatement après l'administration du curarisant (i.v.).

- Canulation veineuse :

La veine jugulaire est dégagée sur 1 cm environ des amas adipeux et tissus qui l'entourent. On ligature la veine du côté céphalique et on place un autre noeud en attente du côté cardiaque.

La veine est clampée du côté cardiaque et une incision est faite par laquelle on introduit la canule à mandrin, pointe dirigée vers le coeur, On enlève le clamp et la veine est ligaturée derrière le mandrin.

Appareillage :

Le dispositif de Konzett-Rössler de l'ensemble à bronchospasme Ugo Basile comprend, figure 13 :

- Une pompe ventilatoire (PALMER) pour assurer la respiration artificielle de l'animal. La capacité ventilatoire de notre pompe va jusqu'à 250 ml. Une manette permet de régler le volume débité suivant l'animal utilisé. Un système de poulie permet le réglage de la fréquence ventilatoire. On peut obtenir 27 à 63 pulsations par minute. Ce dernier chiffre convient à la fréquence respiratoire d'un Cobaye adulte anesthésié à l'urétane. Il faut veiller à ce que la fréquence et le débit de la pompe restent constants pendant toute la durée de la manipulation.

La pompe est reliée à l'animal par le tube trachéal.

- Le capteur de pression :

Il s'agit d'un manomètre à eau relié à un transducteur (Ugo basile) qui convertit la pression de l'air en signal électrique, au moyen d'un anémomètre électrique. Une dérivation, partant de la canulation trachéale est dirigée vers le manomètre à eau qui communique lui-même avec l'anémomètre.

Un agent spasmogène provoque une bronchoconstriction, une diminution du volume des bronches, de sorte qu'une quantité d'air envoyé par la pompe excède la capacité du volume du poumon de l'animal. Cet excès d'air prend le chemin de la dérivation. Il exerce une pression dans la partie creuse T du manomètre, ce qui fait augmenter le niveau d'eau de la chambre C. Le volume d'air qui se trouve au-dessus du niveau d'eau du manomètre diminue, l'air chassé arrive à l'anémomètre par N.

...

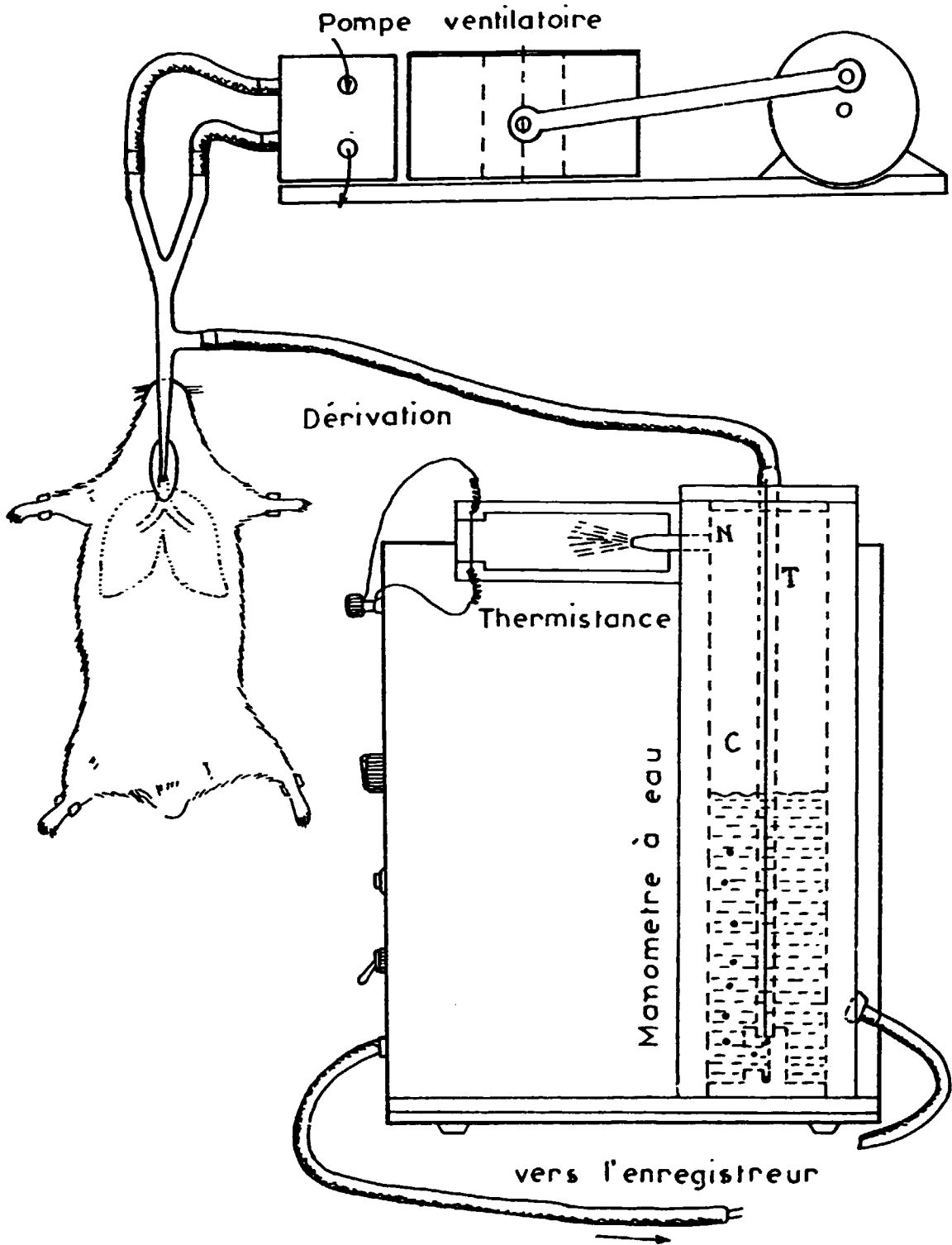


Figure 13 : Schéma du montage de Konzett-Rössler.

L'anémomètre est composé d'une thermistance qui fait partie d'un pont de Wheatstone. Le passage du déplacement d'air refroidit cet élément, modifie ses caractéristiques et entraîne une variation de la différence de potentiel (d.d.p.) du pont de Wheatstone. La phase expiratrice de la pompe entraîne l'arrêt de la pression sur le manomètre à eau qui revient à son niveau initial. Le courant d'air refroidissant la thermistance est supprimée : elle retrouve ses caractéristiques normales.

Si la constriction est encore présente lors d'une nouvelle phase inspiratrice de la pompe (insufflation d'air), la d.d.p. du pont est modifiée encore une fois.

Ces variations cycliques de la d.d.p. du pont de Wheatstone sont transmises à un galvanomètre, couplé au stylet inscripteur de l'appareil enregistreur (Ugo Basile).

L'excès d'air (la diminution de volume pulmonaire) est enregistré sous la forme d'une augmentation de l'amplitude de l'inscription graphique, qui revient à son niveau initial à chaque phase expiratrice.

Calibrage de l'ensemble à bronchospasme :

Ce calibrage est à faire tout au début de la mise en marche de l'ensemble. On cherche la sensibilité de l'enregistreur pour laquelle une dose d'histamine donne une réponse recouvrant toute la hauteur du papier enregistreur. Dans nos conditions expérimentales cette dose est de 2,5 mg/Kg d'histamine (i.v.) pour une sensibilité 3.

- Résultats :

Les figures 14, 15, 16 montrent les bronchospasmes enregistrés 21, 30 et 35 jours après la sensibilisation des Cobayes.

- Au 21e jour, le choc anaphylactique est intense et mortel.

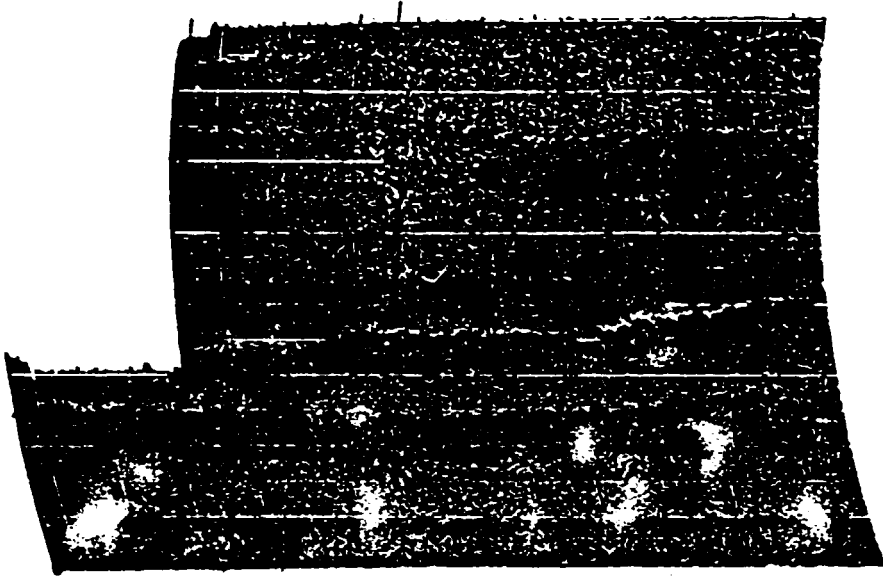
- Au 30e jour, la bronchoconstriction, bien qu'intense, n'est que passagère. Elle dure 25 minutes et disparaît d'elle-même.

- Au 35e jour, la réponse anaphylactique est de plus faible intensité et ne dure que 15 minutes.

Les résultats notés pour les jours 30 et 35 après la sensibilisation sont des résultats globaux. Dans nos essais avec des animaux sensibilisés depuis 30 jours, l'anaphylaxie est parfois mortelle et avec ceux sensibilisés depuis 35 jours, la réponse est quelquefois plus importante, parfois plus faible.

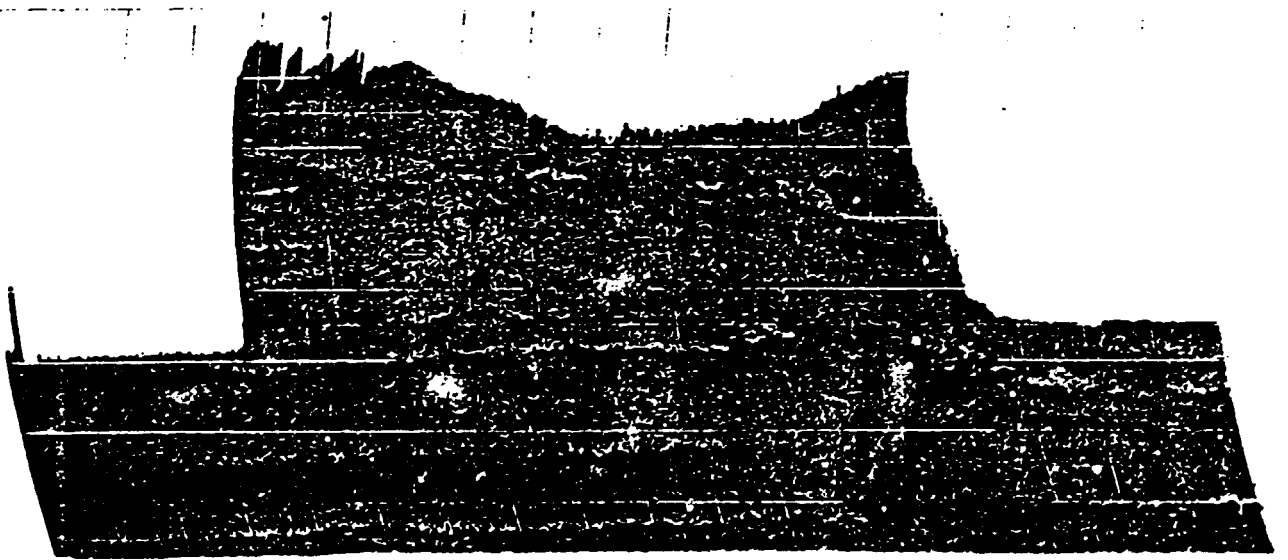
La meilleure période pour tester les substances ou les extraits végétaux supposés, actifs contre les phénomènes d'origine allergique devraient donc se faire entre 21 et 30 jours après la sensibilisation pour ne pas être induit en erreur par des faux-positifs.

...



UGO CASILE

Figure 14 : Enregistrement du bronchospasme anaphylactique chez le Cobaye, 21 jours après la sensibilisation.



JGO BASILE

Figure 15 : Enregistrement du bronchospasme anaphylactique chez le Cobaye, 30 jours après la sensibilisation.

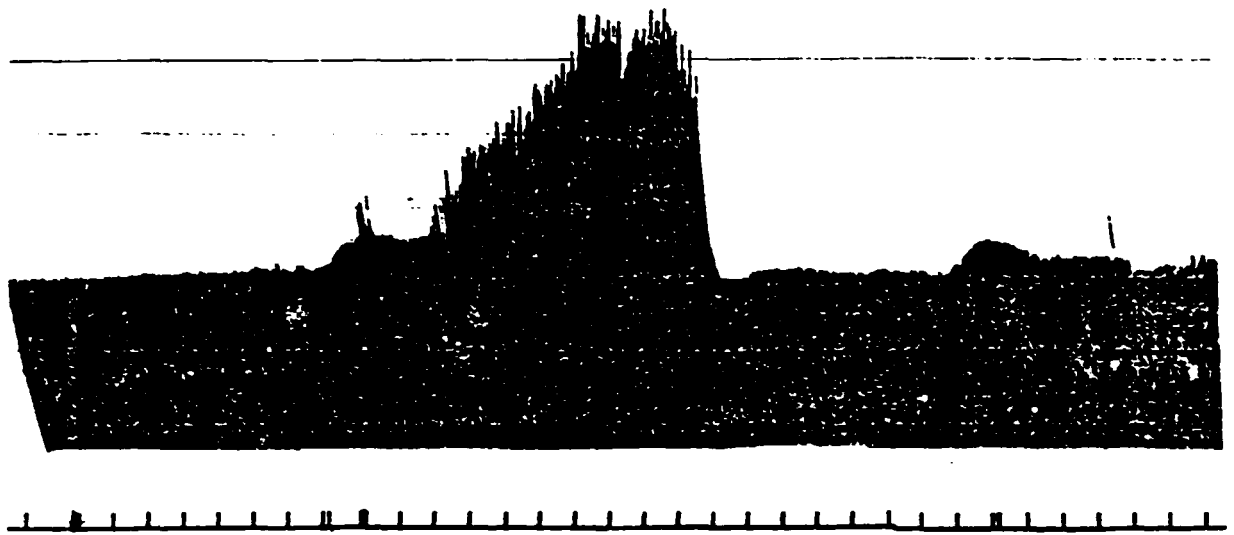


Figure 16 : Enregistrement du bronchospasme anaphylactique
chez le Cobaye, 35 jours après la sensibilisation.

La figure 17 représente l'inhibition de la bronchoconstriction d'origine anaphylactique par un extrait de plante (RP 009) et où l'on voit que la réponse à l'histamine n'est pas modifiée.

La figure 18 est celle d'une bronchoconstriction due à l'histamine chez un animal non traité par la plante.

L'avantage de cette méthode c'est qu'on peut étudier l'activité des extraits végétaux sur les phénomènes allergiques sur l'animal entier, qu'on peut traiter par l'extrait par exemple, par voie orale, avant le test.

On peut combiner les deux méthodes non spécifiques : la réaction anaphylactique et le choc qui en découle et une méthode spécifique : l'utilisation d'agonistes comme l'histamine, la bradykinine, prostaglandine, pour la recherche du mécanisme d'action de l'extrait.

Il faut faire remarquer que nombre de recherches, pour trouver des substances anti-allergiques pouvant s'ajouter au cromoglycate de sodium et qui peuvent être administrées par voie orale sont effectuées, mais jusqu'à présent on n'a pas trouvé un produit comparable au cromoglycate de sodium dans leur action prophylactique contre l'asthme. Ce modèle pourrait être donc un exemple de manipulation s'insérant dans ces tentatives de trouver des substances d'origine végétale actives par voie orale dans la prophylaxie de l'asthme.

V - ANTI-INFLAMMATOIRE :

Principe :

L'inflammation de la patte induite par une suspension de levure de bière peut être réduite par des anti-inflammatoires.

Matériel et méthode :

- Appareil :

Le pléthysmomètre (Ugo Basile) est constitué d'électrodes sensibles à la variation de volume. Il est équipé d'un transducteur qui donne directement en ml le volume de liquide déplacé par la patte du Rat.

- Préparation des animaux :

Le problème rencontré dans nos locaux dans l'étude de l'inflammation expérimentale est la reproductibilité des résultats. Cet écueil a été résolu en travaillant dans une enceinte maintenue à température constante sur des animaux préalablement hydratés.

...

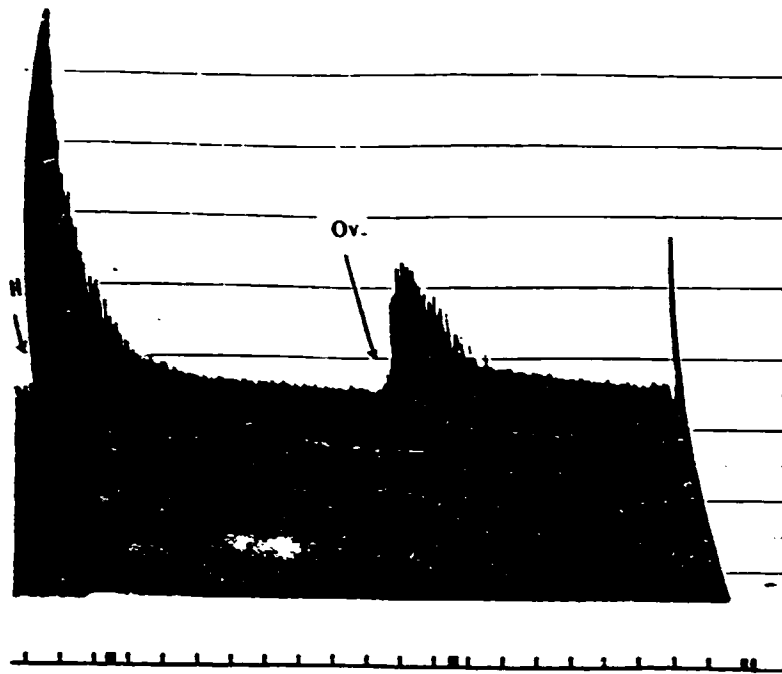


Figure 17 : Enregistrement de la bronchoconstriction par la technique de Konzett-Rössler, chez un Cobaye sensibilisé par l'ovalbumine et traité par 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (p.o.) de l'extrait de la plante, 2 H avant l'induction de la réaction anaphylactique. L'Histamine (H) par voie intraveineuse, entraîne une bronchospasme, l'ovalbumine (Ov.) par la même voie ne provoque qu'un bref bronchospasme. Le traitement quotidien d'un animal sensibilisé par 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (p.o.) de l'extrait de la plante pendant 4 jours avant le test :

- empêche l'apparition de la bronchoconstriction
- mais ne modifie pas la bronchoconstriction provoquée par l'histamine.

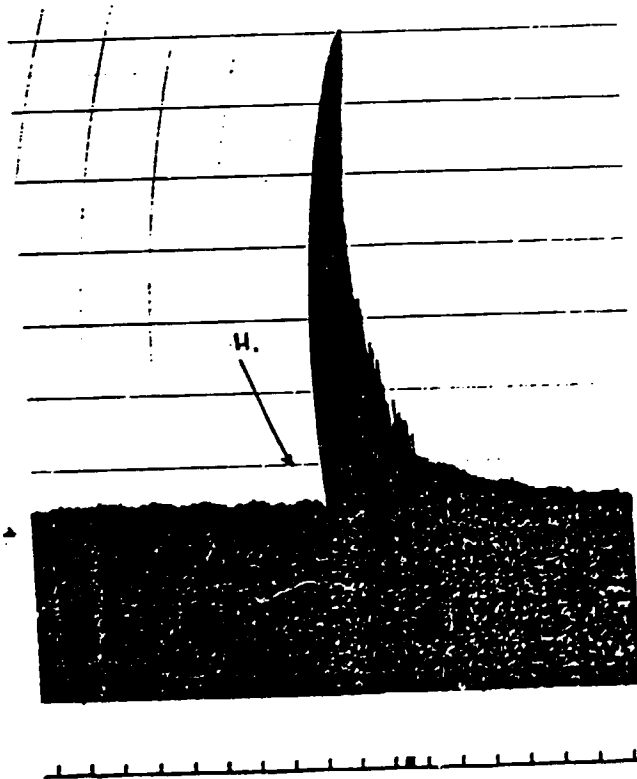


Figure 18 : Enregistrement de la bronchoconstriction induite par l'histamine (i.v.) chez un Cobaye non sensibilisé par l'ovalbumine et non traité par la plante.

Pour l'hydratation des rats mâles de 140-190 g sont mis à jeûn de nourriture la veille du test. Le jour de l'expérience, les animaux reçoivent p.o. aux temps T_0 , 2,5 ml d'eau distillée par 100 g de poids. Ils sont ensuite introduits dans des cages à métabolisme. L'urine recueillie au temps $T_0 + 2$ H est mesurée. Seuls sont retenus pour le test d'inflammation, les animaux qui ont éliminé au moins 30 p. 100 du volume d'eau administrée.

Après la sélection par hydratation, on mesure le volume V_0 de la patte arrière droite des animaux à l'aide du pléthysmomètre. Quatre lots de 6 animaux sont ensuite constitués. Ils reçoivent par voie orale :

- de l'eau distillée pour les témoins,
- l'extrait végétal, ou les substances de référence à concentration croissante en progression géométrique pour les autres.

Immédiatement après le gavage, 0,1 ml de suspension de levure de bière à 15 p. 100 dans l'eau distillée est injectée dans le coussinet sous-plantaire. L'évolution de l'oedème est appréciée 1 H 30, 2 H 30 et 4 H 30 après sa provocation, en mesurant le volume de la patte.

INTERPRETATION DES RESULTATS ;

— Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'inflammation.

On calcule ce pourcentage d'inhibition par la différence entre l'augmentation de l'oedème des animaux témoins (V_T), 1 H 30, 2 H 30 et 4 H 30 après l'induction de l'inflammation et l'augmentation de l'oedème des animaux traités (V_I) pour les mêmes durées, divisée par V_I et le tout multiplié par 100.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{V_I - V_T}{V_I} \times 100$$

Une valeur négative correspond à une augmentation de l'oedème par rapport aux animaux témoins.

La figure 19 montre l'action du phénylbutazone sur cette inflammation provoquée.

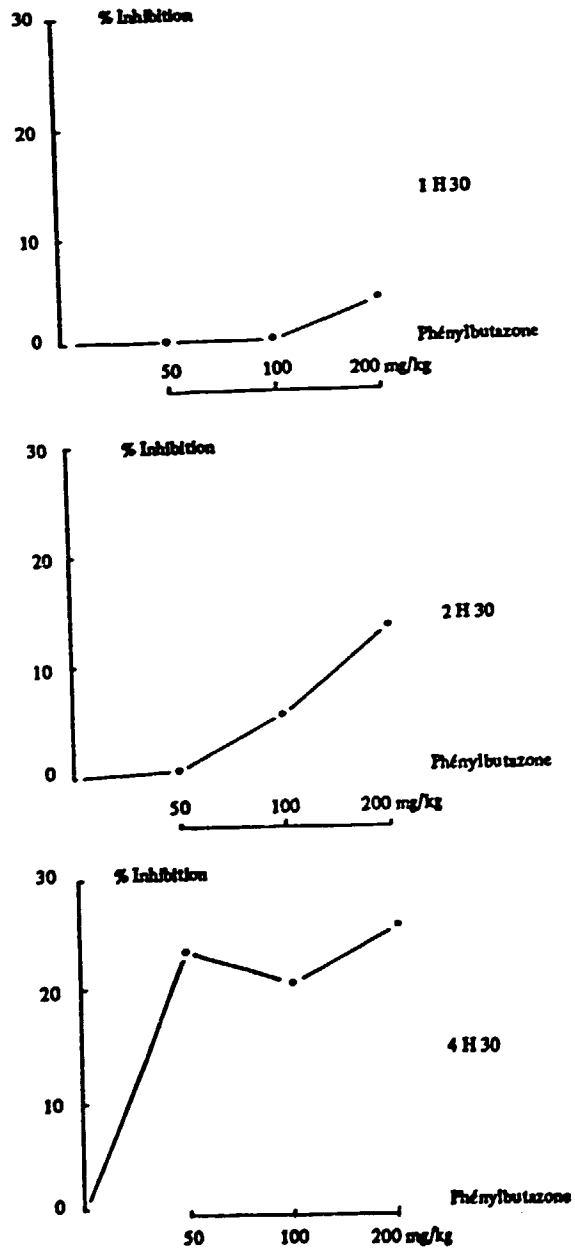


Figure 19 : Action du phénylbutazone sur l'inflammation de la patte de Rat.

VI - TEST ANTISECRETOIRE :

INTRODUCTION :

La déshydratation aiguë provoquée par la diarrhée de toutes étiologies figure aujourd'hui encore parmi les grandes causes de mortalité infantile dans les pays en voie de développement. Il est vrai que l'efficacité de la réhydratation par voie orale n'est plus à démontrer, mais parallèlement, l'utilisation d'un agent pharmacologique capable de limiter ou reverser la sécrétion anormale elle-même ne serait que bénéfique.

Dans de nombreux pays à faible revenu, les extraits de plantes sont encore très utilisés à cet effet. La technique des anses ligaturées avec une induction de la sécrétion par la toxine cholérique pourrait être un outil très utile pour le screening d'extrait d'origine végétale à activité antiscrétoire.

PRINCIPE DU MODELE :

On isole, in situ, chez le lapin ou le rat, un segment d'intestin grêle, entre deux ligatures. Dans l'anse ainsi préparée, viendrait s'accumuler le fluide sécrété lorsqu'on provoque expérimentalement un déséquilibre du transport actif d'eau et d'électrolytes à travers la paroi intestinale, par un agent sécrétagogue.

Le volume du fluide accumulé peut être estimé par une simple pesée ou par l'utilisation d'un marqueur de mouvement d'eau.

MATERIELS NECESSAIRES :

Animaux :

- rats des 2 sexes pesant environ 230 g
- lapin des 2 sexes pesant environ 1 500 g

Produits consommables :

- Agent sécrétagogue :

La toxine cholérique purifiée produite par "SIGMA".

- Anesthésie :

- Pour le lapin, le pentobarbital sodique peut être utilisé par voie intraveineuse à la dose de 30 mg par kilogramme de poids corporel ;
- Pour les rats, l'utilisation de l'inhalation de vapeur d'ether diéthylique est préférable.

...

- Produits chimiques nécessaires pour la préparation de la solution de RINGER :

(cf. formule à l'annexe).

- Produits nécessaires pour la mesure du mouvement de l'eau par la méthode du PEG :

. Chlorure de baryum.....	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$
. Sulfate de zinc.....	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
. Hydroxyde de baryum.....	$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$
. Acide trichloracétique.....	$CCl_3 \cdot COOH$

Petits matériels :

- Tondeuse,
- Nécessaire pour la dissection,
- Thermomètre rectal,
- Cage,
- Planche de maintien d'animaux,
- Seringues de 5 ml, 2 ml, 100 µl + aiguilles,
- Coupelle de pesée,
- Papier filtre,
- Fil à coudre.

Autres matériels :

- Enceinte thermostatée,
- Balance précise,
- Spectrophotomètre UV/visible.

MISE EN OEUVRE DE L'EXPERIENCE :

Avec mesure du mouvement de l'eau par la méthode des pesées :

- Utiliser un rat des 2 sexes pesant environ 230 g.
- Le laisser s'acclimater au laboratoire pendant au moins 1 semaine et s'assurer qu'il n'a pas la diarrhée.
- Mettre à jeun l'animal la veille de l'expérimentation. Pendant toute l'expérimentation, installer l'animal dans une enceinte thermostatée de manière à maintenir sa température rectale à 37° C.

...

- Induire l'anesthésie en laissant l'animal pendant quelques minutes dans un cristalliseur saturé par une vapeur d'éther diéthylique.

- Pratiquer sur la face abdominale préalablement tordue une ouverture selon la ligne médiane :

- . isoler 5 anses iléales de 7 cm de longueur et séparées les unes des autres de 1 cm,
- . nettoyer préalablement la face luminale avec du RINGER préchauffé à 37° C ; la dernière ligature se situe au niveau de la pointe de l'appendice.

Remarques :

- L'opération doit être propre mais non stérile.
- Veiller à ce que les vaisseaux sanguins ne soient pas ligaturés.
- Arroser les organes de temps à autre avec du RINGER tiède.

L'essai proprement dit comporte trois étapes.

1ère étape :

- Chaque anse est stimulée par 5 µg de toxine cholérique sous un volume de 0,5 ml.

- On remet l'intestin en place et on referme l'abdomen par quelques points de suture pendant la durée de la réaction.

2e étape :

Après 3 heures, ouvrir à nouveau l'abdomen :

- vider les anses de leur contenu et après rinçage, injecter à la place, le produit à tester (substance de références : chlorpromazine ou l'extrait végétale brut) véhiculé par le RINGER sous un volume n'exédant pas 1 ml et préchauffé à 37° C ;

- remettre l'intestin en place et refermer l'abdomen.

3e étape :

Après 1 heure, ouvrir l'abdomen :

- prélever l'ensemble de 5 anses et l'étendre sur la paillasse ;
- mesurer la longueur réelle de chaque anse et en noter la valeur L_1 ;
- découper chaque segment au niveau des espaces intermédiaires ;

...

- éliminer le liquide se trouvant à l'extérieur avec un morceau de papier filtre ;
- peser chaque anse isolée et en noter la valeur P_{1i} ;
- vider le contenu en ouvrant chaque anse le long de la ligne mésentérique ;
- sécher au papier filtre les deux faces ;
- peser à nouveau et noter sa valeur P_{2i} . La différence entre P_{1i} et P_{2i} sera noté Δ_1
- étaler le morceau de tissu bien à plat et en mesurer la largeur qui sera notée l_i
- sacrifier l'animal.

Consignation et traitement des résultats :

- Calcul du flux net de fluide :

En résumé, les valeurs suivantes sont nécessaires pour le calcul du flux net d'eau :

! Anse	: P _{1i}	: P _{2i}	: L _i	: l _i	: Δ _t	: V _i	!
! n°	: (g)	: (g)	: (cm)	: (cm)	: (min)	: (ml)	!
!-----	:-----	:-----	:-----	:-----	:-----	:-----	!-----

Δ_t représente la durée de la deuxième étape

V_i représente le volume d'injection du produit à tester

Le flux net d'eau a pour formule générale

$$J_{\text{net}}^{\text{H}_2\text{O}} = \frac{V_i - [P_{1i} - P_{2i}]}{L_i \times l_i \times \Delta_t} \quad \text{exprimé en ml. cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$$

Si $P_{1i} - P_{2i} < V_i$

On assiste à un mouvement du fluide de la lumière intestinale vers le côté sanguin ; il s'agit d'une absorption et par convention on assigne à la valeur du flux un "+".

...

$$\text{Si } P_{1i} - P_{2i} > V_i$$

On assiste à une sécrétion nette et on assigne à la valeur du flux un "-"

- Calcul de la charge :

Nous appelons charge la quantité du produit à tester véhiculé dans une anse et exprimée en milligramme, rapportée à la valeur $(L_i \times l_i)$ exprimée en centimètre carré.

APPLICATION DE LA TECHNIQUE A LA MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTISECRETTOIRE :
DE L'EXTRAIT VEGETAL NOTE A1 :

Introduction :

Nous avons testé par la technique des anses ligaturées, l'éventuelle aptitude de l'extrait végétal noté A1 à reverser une sécrétion nette de fluide induite expérimentalement par la toxine cholérique au niveau de l'iléon de rat. L'activité observée a été comparée à celle de la chlorpromazine.

Matériels :

- produit de référence :

Largactil (chlorpromazine) - Solution injectable à 0.5 pour cent.

- produit à tester :

Extrait végétal hydrosoluble noté A1 et préparé sous la forme lyophilisée.

Résultats :

Notre expérimentation a été faite sur cinq groupes de rats dont les anses ont été préparées selon les caractéristiques suivants :

Groupe 1 : Anses non stimulées et non traitées.

Groupe 2 : Anses stimulées et traitées avec A1 à la concentration C1 et C2.

Groupe 3 : Anses stimulées non traitées.

Groupe 4 : Anses stimulées traitées avec le produit de référence.

Groupe 5 : Anses stimulées et traités avec l'extrait A1 à différentes concentrations.

Nous avons consigné les résultats obtenus dans le tableau 3.

...

Tableau 3 : Activité antiseécrétoire de l'extrait A1 comparée à celle de la chlorpromazine sur l'iléon de rat par la technique des anses ligaturées.

Groupe:	Caractéristiques	Charge ₂ mg/cm	J _{H₂O} not ml/cm ² /min	n
1	Anses non stimulées non traitées	-	+ 2.490 · 10 ⁻³ ; ± 0.648 10 ⁻³	5
2	Anses non stimulées traitées avec A1	0.020	+ 1.8382 10 ⁻³ ; ± 1.389 10 ⁻³	5
	"	0.040	+ 1.8231 10 ⁻³ ; ± 1.233 10 ⁻³	5
3	Anses stimulées non traitées	-	- 11.968 10 ⁻³ ; ± 2.205 10 ⁻³	5
4	Anses stimulées traitées à la CPZ*	0.127	- 0.332 10 ⁻³ ; ± 2.205 10 ⁻³	4
	"	0.077	+ 2.049 10 ⁻³ ; ± 0.354 10 ⁻³	5
	"	0.052	+ 3.333 10 ⁻³ ; -	2
5	Anses stimulées traitées avec A1	0.062	- 4.379 10 ⁻³ ; ± 2.207 10 ⁻³	6
	"	0.029	- 0.941 10 ⁻³ ; -	1
	"	0.018	+ 0.282 10 ⁻³ ; ± 0.733 10 ⁻³	3
	"	0.013	+ 0.452 10 ⁻³ ; ± 0.771 10 ⁻³	3

* CPZ : chlorpromazine

DISCUSSION :

Les résultats obtenus montraient que :

- l'extrait A1 peut reverser une sécrétion pathologique déjà établie (cf. figure 20) ;
- une charge épithéliale en A1 supérieure à environ $0,018 \text{ mg/cm}^2$ atténue la sécrétion mais ne le transforme pas en absorption.

Par ailleurs, la charge efficace de A1 n'affecte pas significativement le flux basal d'eau sur l'intestin non stimulé.

Ces résultats sont préliminaires mais nous apportent la preuve que l'extrait A1 mériterait d'être étudié davantage pour son activité antisécrétoire.

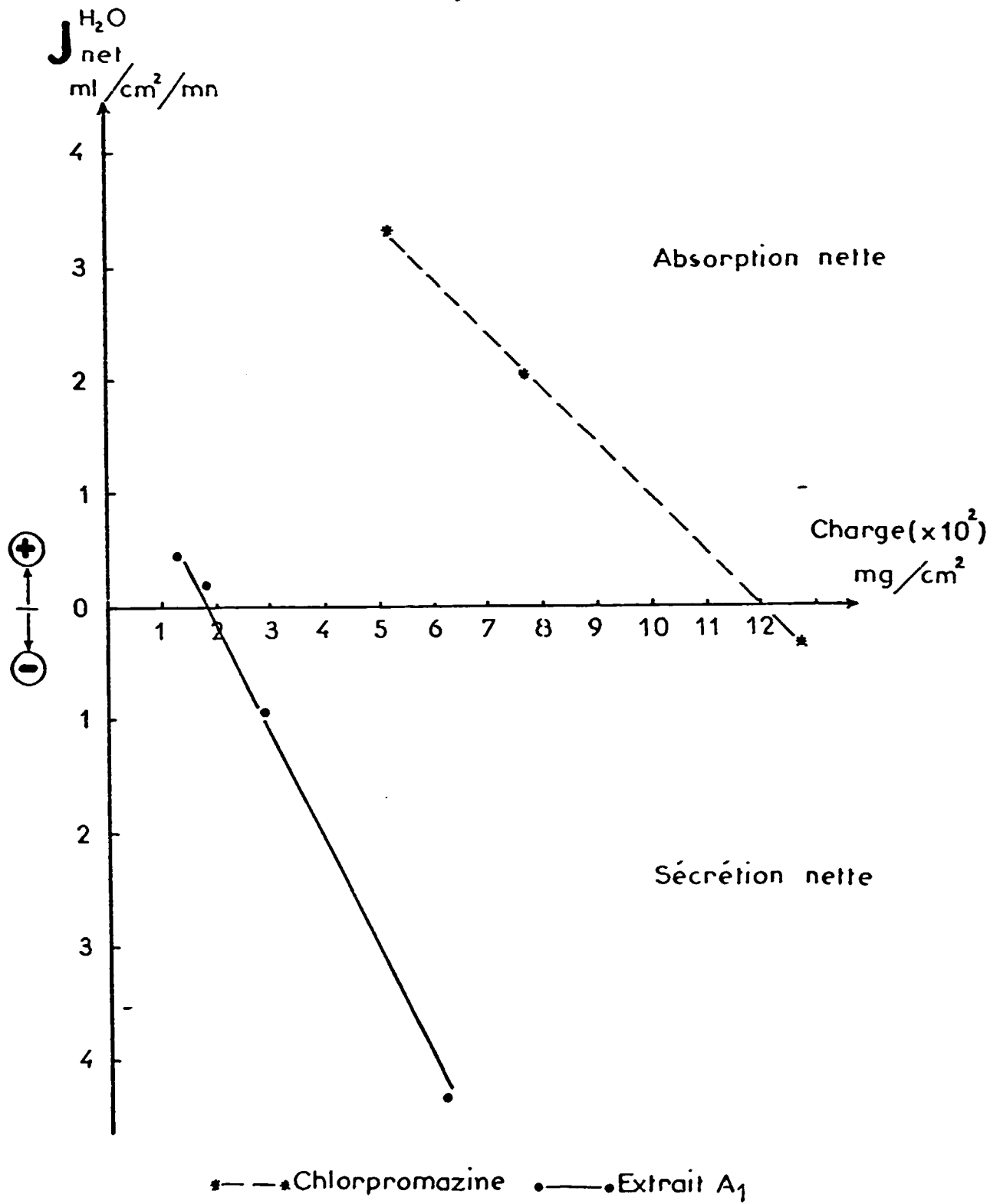


Figure 20 : Représentation graphique de l'activité antisécrétoire

VII - TEST ANTIPALUDEEN :

PRINCIPE :

Des souris inoculées de PLASMODIUM berghei et présentant un frottis sanguin positif, ayant des hématies parasitées par le P. berghei, sont traitées par l'extrait de plante ou les produits à l'étude. Après 4 jours successif de traitement, la parasitémie est évaluée sur un frottis sanguin (Test de quatre jours de Peters).

MATERIEL ET METHODE :

- Entretien de la souche de P. berghei :

L'entretien et le maintien de la souche se font par passage successif du P. berghei d'une souris parasitée à une souris saine. On vérifie la présence du parasite chez la souris en réalisant un frottis sanguin sur lame. Si l'examen est positif, la souris est anesthésiée à l'éther ou immobilisée par contention et une prise de sang est faite sur elle par une ponction cardiaque.

Pour que le sang ne coagule pas, 0,02 ml d'héparine à 5 mg/ml en solution saline est ajoutée au prélèvement. Le sang prélevé est placé dans un flacon en verre plongé dans la glace.

Le sang prélevé est ensuite inoculé à des souris saines par voie intraveineuse (veine de la queue) ou par voie intrapéritonéale. On inocule ainsi 0,05 ml de sang.

Lors de ce travail, l'aseptie doit être rigoureusement respectée.

Les souris servant à la conservation de la souche et aux tests sont placées dans un local protégé des moustiques par la pose de grillage fin (moustiquaire) aux ouvertures et voies d'accès et la pulvérisation régulière d'insecticide.

- Frottis sanguin :

Le sang pour le frottis est prélevé en coupant l'extrémité de la queue. Une goutte de sang est déposée et étalée sur une lame mince.

Après séchage, le frottis est fixé en plongeant la lame dans de l'alcool pendant deux minutes. La lame est séchée et on verse le colorant de Giemsa sur le frottis. Après dix minutes, le colorant est enlevé par lavage à l'eau de robinet. Lorsque la lame est sèche, on passe à l'examen du frottis au microscope (objectif X 100).

...

- Préparation du colorant de Giemsa :

La solution mère de Giemsa est préparée en solubilisant 2,80 g de Giemsa dans 125 ml de glycérine pure et 37,5 ml d'éthanol absolu (ou à la rigueur de l'alcool bidistillé).

Pour la coloration, on prépare extemporanément, une solution du colorant, en diluant la solution mère par de l'eau neutre dans les proportions : 2 ml de la solution mère pour 5 ml d'eau neutre.

L'eau neutre ou eau tamponnée est composée de 3,54 g de KH_2PO_4 et de 7,54 g de Na_2HPO_4 pour 1 litre d'eau bidistillée. On vérifie que le pH est égal à 7.

- Détermination de la parasitémie :

Sur un frottis les observations se font sur 10 champs de l'objectif 10X du microscope. Pour chaque champ, on compte le nombre total des hématies et des hématies parasitées par P. berghei.

Le pourcentage de parasitémie est calculé de la manière suivante :

$$\frac{\text{Somme des hématies parasitées dans 10 champs}}{\text{Somme des hématies des 10 champs}} \times 100$$

- Test de 4 jours :

Trois jours avant le test, on inocule à des souris adultes pesant entre 25 g et 30 g, 0,5 ml de sang prélevé par ponction cardiaque sur des souris présentant un frottis positif.

Trois jours après, la parasitémie des souris inoculées est déterminée. On sélectionne les animaux ayant un taux parasitaire compris entre 0,1 et 1 %. Ils sont ensuite répartis en 4 lots dont 5 souris composent le lot témoin ne recevant que le véhicule et 3 lots de 4 souris recevant des doses différentes de l'extrait ou de la substance étudiée, par voie orale.

- - Le traitement peut commencer le même jour, ou le lendemain, et dure quatre jours.

Le lendemain du quatrième jour de traitement, la parasitémie est à nouveau évaluée.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du taux de croissance du P. berghei. Pour chaque lot, on calcule la moyenne initiale (M_i) de la parasitémie déterminée 3 jours après l'inoculation et la moyenne finale (M_f), 24 h après le dernier traitement du quatrième jour.

...

On détermine ensuite un indice de croissance (I_{cr}) qui est égal au quotient :

$$I_{cr} = \frac{M_f}{M_i}$$

Le taux de croissance pour chaque lot est donné par :

$$C_r = \frac{I_{cr} \text{ du lot traité}}{I_{cr} \text{ du lot témoin}} \times 100$$

En prenant l' I_{cr} du lot témoin comme l'équivalent à 100 % de croissance, le pourcentage d'inhibition est égal à la différence :

$$\% \text{ Inh} = 100 - C_r \text{ du taux de croissance pour chaque lot.}$$

Un taux d'inhibition de 100 % est obtenu à la dose de 10 mg/Kg pour la chloroquine et l'ampidiazine (Figure 21).

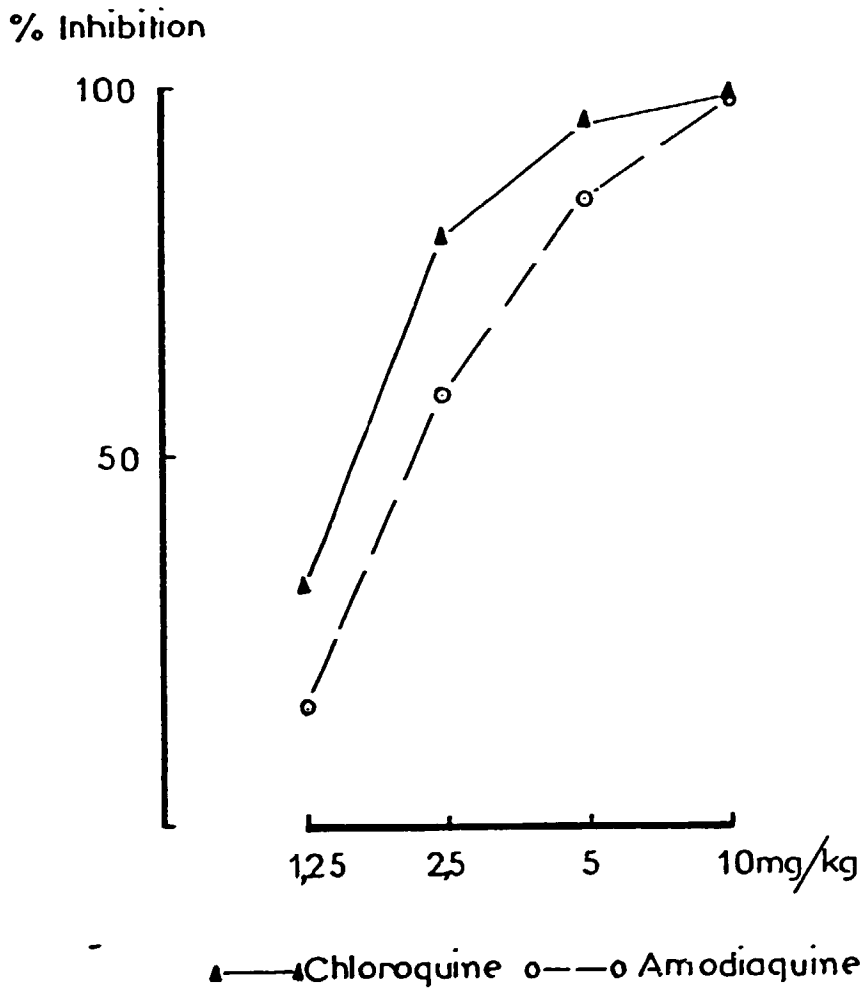


Figure 21 : Courbe d'inhibition de la croissance du *P. berghei* chez la souris par la chloroquine et l'amodiaquine.

CHAPITRE 4

LES TESTS *in vitro*

=====

GENERALITES :

Ces tests reprennent en général certains tests *in vivo* sur des modèles simplifiés puisqu'on met directement en contact les substances et l'organe cible. Le choix des organes dépend des réponses et des activités étudiées.

Les tests peuvent être non spécifiques permettant alors un screening pharmacologique ou spécifique pour l'étude d'une activité bien précise. Les montages proposés décrivent quelques expériences qui peuvent servir de tests biologiques pour aider à la recherche d'une fraction active à partir d'un extrait végétal ou d'études préliminaires. à l'élucidation du mécanisme d'action de l'extrait ou de la fraction active.

La critique majeure dans l'utilisation d'un extrait brut ou purifié réside dans le nombre de substances, parfois élevé, encore présent dans l'extrait car la réponse observée peut être la somme des effets possibles, sur cet organe, de toutes ces substances.

Néanmoins, avec l'arsenal chimique actuellement disponible, et qui ne cesse de se développer, il est possible par un choix judicieux d'agoniste ou d'antagoniste de cerner un domaine d'activité précis de l'extrait, qui peut orienter les travaux dans la recherche du mécanisme d'action et servir de sonde biologique à l'isolement de(s) substance(s) active(s).

Le matériel de base comprend :

- un bain thermostaté pour maintenir l'organe à une température de travail constante pendant toute la durée de la manipulation,
- un cuve à organe isolé de 10 ml,
- des transducteurs, isotoniques ou isométriques, pour capter respectivement les variations de longueur ou de force et les transformer en signal électrique,
- l'enregistreur pour amplifier le signal électrique et l'inscription graphique sur papier du signal,
- un stimulateur électrique, pour certaines expériences.

TEST SUR L'ILEON ISOLE DE COBAYE :

La présence dans le système d'innervation entérique de plusieurs types de nerfs avec différents neuromédiateurs et différents types de récepteurs permet de considérer l'iléon isolé comme étant un excellent outil de travail pour étudier les effets d'un extrait végétal. En plus, les contractions de l'iléon isolé sont assez simples à enregistrer et de petites quantités d'extrait seulement sont nécessaires pour observer des effets sur l'iléon.

L'iléon isolé de Cobaye convient parfaitement pour l'étude des extraits végétaux. La présence d'une activité pharmacologique sert de guide pour la purification des substances actives présentes dans l'extrait.

La complexité des mécanismes d'action par laquelle un extrait ou une substance pure provoque une contraction ou le relâchement de l'iléon contracté artificiellement constitue la difficulté majeure dans l'élucidation du mécanisme d'action de ces extraits.

Deux approches expérimentales sont possibles pour la mise en évidence d'effets pharmacologiques d'extrait brut ou purifié avec l'iléon isolé de Cobaye.

1° L'extrait est testé pour sa capacité à contracter l'iléon.

2° La capacité de l'extrait à relâcher l'iléon contracté par une stimulation électrique (ou chimique).

Pour la stimulation électrique la technique utilisant une stimulation par effet de champ selon Sperelakis est conseillée. Le seuil de stimulation des nerfs de l'iléon étant plus bas, d'une manière significative, que celui des muscles lisses, cette technique de stimulation permet une stimulation des nerfs seulement de l'iléon. Tous les nerfs sont stimulés en même temps par cette méthode.

APPAREILLAGE :

- Bain à organe isolé :

Il est préférable de prendre un système de bain pour 2 cuves à organe isolé. Nous conseillons des bains à organe isolé proposés par Ugo Basile avec des cuves de 10 ml. La figure 22 représente le schéma du montage d'un organe isolé dans la cuve.

- Enregistreur :

L'enregistreur GEMINI 7070 (Ugo Basile) à deux canaux convient très bien à ce montage. Les transducteurs de force isométriques (Ugo Basile - 7004) peuvent travailler dans un intervalle de tension de 0 à 10 g et sont adaptés pour des études de screening pharmacologique et des études de mécanisme d'action.

- Stimulateur :

Pour la stimulation électrique, le stimulateur Ugo Basile 7801 est conseillé, avec les électrodes adaptées à une stimulation par effet de champ.

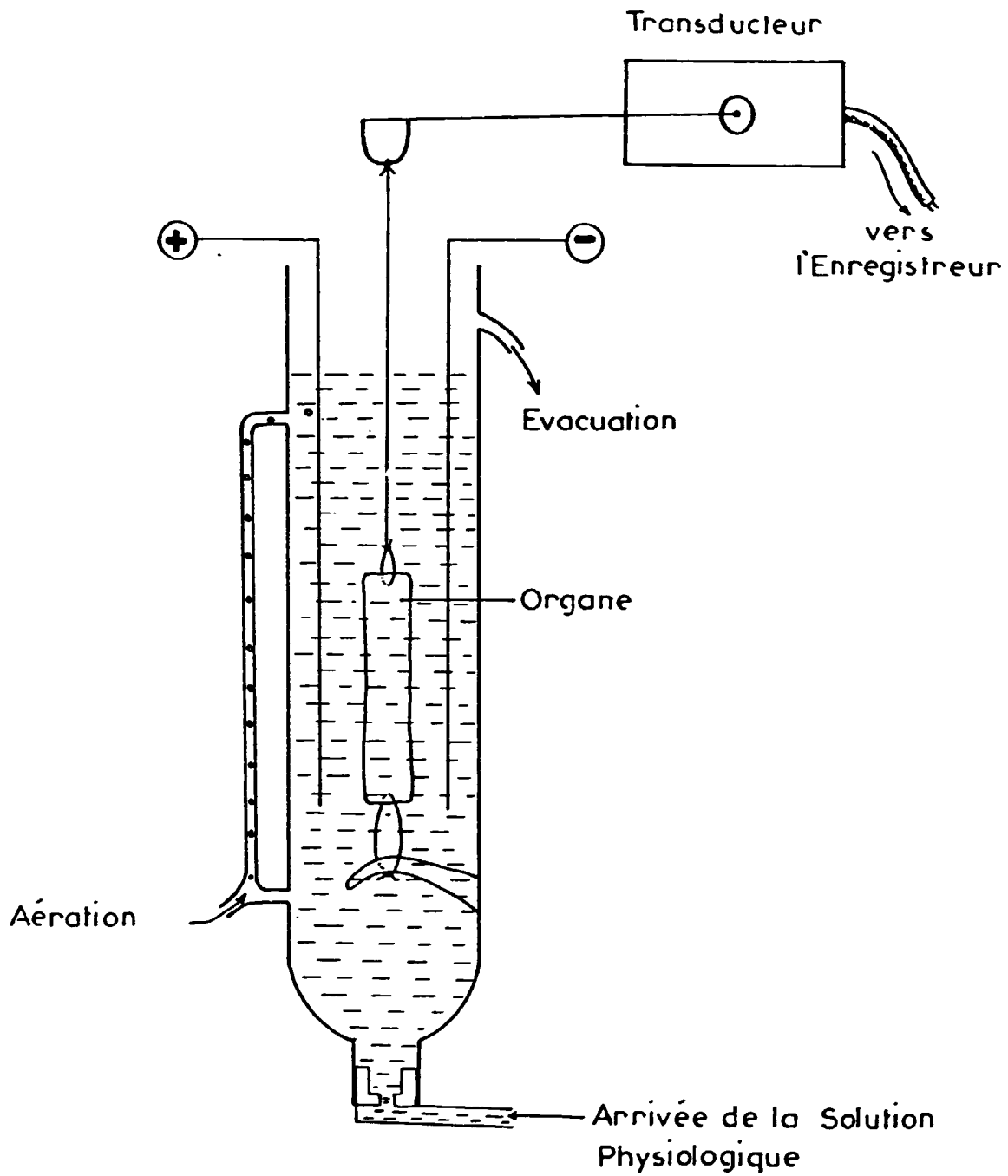


Figure 22 : Schéma du montage d'un organe isolé.

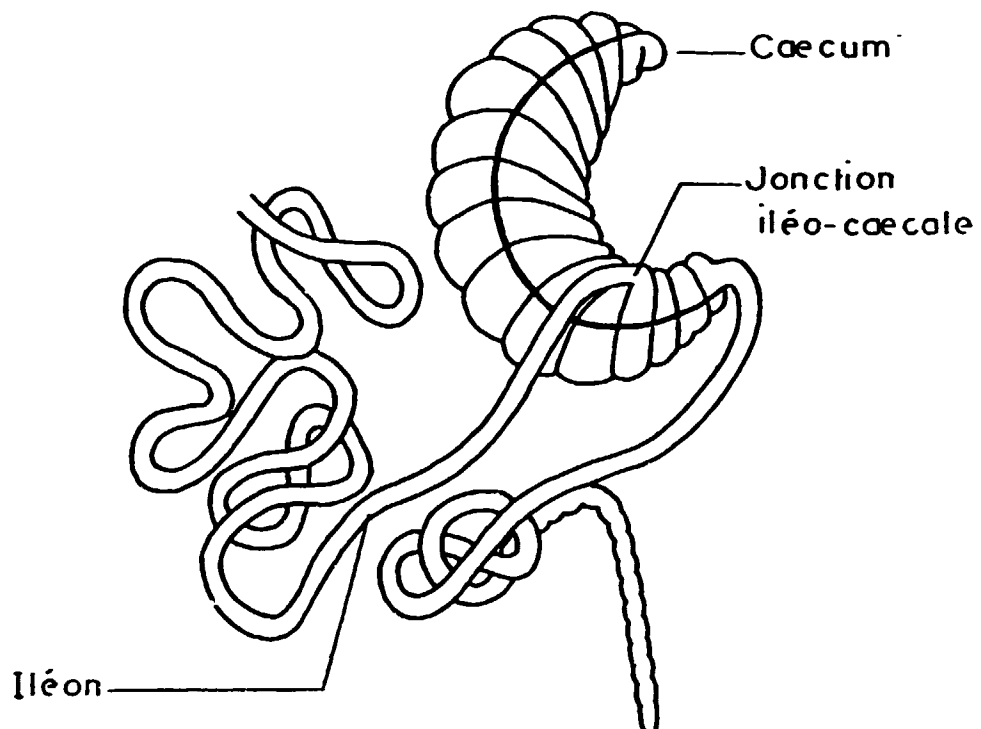


Figure 23 : Schéma pour la localisation de l'iléon.

PREPARATION DE L'ILEON DE COBAYE :

Le cobaye est tué par un coup sur la tête. La gorge est ouverte et l'animal est saigné. On ouvre l'abdomen et le caecum est localisé. On coupe l'iléon à environ 10 cm de la jonction ileo-caecale. On repère l'extrémité coupée en lui attachant une ficelle, et on sectionne l'iléon de manière à avoir 15 cm de longueur (figure 23).

L'iléon est traité avec le plus grand soin et tout tiraillement est à éviter pour ne pas endommager les muscles. Les doigts propres au lieu de pinces doivent être utilisés. L'iléon est placé dans une boîte de Pétri remplie de solution de Krebs aérée par un mélange d'oxygène et de dioxyde de carbone (O_2 : 93,5 % - CO_2 : 6,5 %). L'intérieur de l'iléon ne doit pas être rincé. On enlève délicatement la mésentère et des sections de 2 cm d'iléon sont coupées, en repérant le bout orienté vers le caecum.

Une ficelle est introduite à chaque extrémité en faisant attention de ne pas fermer les extrémités de l'iléon qui doivent rester constamment ouvertes.

L'extrémité jugénale de l'iléon est attachée à la base de la cuve à organe isolé et le côté caecal est relié au transducteur.

La cuve à organe isolé est remplie de solution de Krebs aérée par le mélange O_2 - CO_2 . Une tension de 1 g est appliquée à l'iléon.

Le reste de l'iléon est gardé dans la solution de Krebs, constamment aérée si on l'utilise dans la journée.

Pour l'étude des effets contracturants des produits, il est préférable d'utiliser les morceaux d'iléon ayant séjourné au réfrigérateur pendant une nuit et gardés dans la solution de Krebs (sans être barbotée). Le lendemain on barbote l'iléon par le mélange carbogène et au bout d'une demi heure, on peut effectuer le montage. Les réponses contractiles sont meilleures.

Pour l'étude de la capacité des produits à relâcher l'iléon contracté par une stimulation électrique, il vaut mieux utiliser un iléon n'ayant pas passé une nuit au réfrigérateur.

PROTOCOL EXPERIMENTAL :

La substance et l'extrait végétal à tester doivent préalablement être solubilisés dans l'eau. Le volume injecté dans la cuve ne doit pas dépasser 400 μ l. Pour les produits non-solubles dans l'eau, l'alcool ou le diméthylsulfoxyde peuvent être utilisés comme solvants. Cependant un contrôle est à exécuter avec la même quantité de solvant pur : 60 μ l d'alcool ou 100 μ l de diméthylsulfoxyde ont très peu d'effet.

La dose standard d'un extrait brut est de 2 mg pour tester sa capacité à contracter l'iléon et 20 mg pour tester sa capacité à relâcher l'iléon contracté par une stimulation électrique. Ces doses correspondent à une concentration dans la cuve de 0,2 et 2 mg/ml, respectivement.

...

1° Enregistrement d'une action contracturante :

Après le transfert de l'iléon dans la cuve, les tests peuvent commencer et dès qu'une ligne de base stable est obtenue, une dose standard d'histamine, 20 $\mu\text{g/ml}$, est ajoutée. L'organe est rincé lorsque la contraction maximale est atteinte. La solution de Krebs dans la cuve est changée plusieurs fois jusqu'à ce qu'on retrouve la ligne de base. On peut alors introduire l'extrait. L'enregistrement doit continuer pour voir si l'effet est transitoire ou persistant.

Le résultat est généralement exprimé en pourcentage de la contraction provoquée par la dose standard d'histamine. Si la contraction de l'histamine a provoqué par exemple une contraction de 30 mm et l'extrait 10 mm : l'extrait a 33 % d'activité par rapport à la dose standard d'histamine.

On choisit la dose d'extrait de telle manière que la contraction obtenue soit la même ou inférieure à la contraction de la dose standard de l'histamine.

Après plusieurs rinçages et le retour de la ligne de base, une seconde dose d'extrait peut être testée.

Plusieurs doses peuvent être testées avec le même tronçon d'iléon, mais la réactivité doit être contrôlée plusieurs fois. Quand la réponse est affaiblie ou est anulée, on accroche un nouveau morceau d'iléon.

2° Enregistrement d'une action relaxante :

La stimulation électrique peut commencer lorsque l'iléon est monté dans la cuve. Quand la réponse est uniforme, c'est-à-dire, quand chaque impulsion électrique provoque approximativement la même amplitude de réponse, l'extrait peut être testé. Si l'extrait a des propriétés relaxantes, l'amplitude de la réponse à la stimulation est diminuée.

On exprime le résultat en pourcentage de l'amplitude de la réponse de référence, avant l'introduction de l'extrait. Exemple : si l'amplitude maximale de 30 mm est ramenée à 20 mm après l'addition de l'extrait, l'inhibition de la contraction est $30-20 = 10$ mm, ce qui correspond à 33 %.

Si l'extrait a provoqué une inhibition totale des contractions, le test doit être répété avec une dose plus faible.

L'enregistrement terminé, la cuve est rincée sans arrêter la stimulation pendant le rinçage. Un autre extrait peut être testé lorsque la réponse est revenue à son amplitude initiale. On remplace l'organe si cette dernière a diminué.

INTERPRETATION DES RESULTATS :

La figure 24 représente des exemples de réponse des extraits végétaux contenant respectivement des substances contracturantes et relaxantes. Un extrait brut peut cependant contenir ces deux types de substance. Le résultat dépend des proportions de leur concentration respective.

Sur l'enregistrement d'action relaxante, on peut suspecter la présence de substance contracturante par une augmentation de la ligne de base (figure 25). Dans ce cas il est nécessaire d'enlever la substance contracturante, car sa présence rend difficile la détection de l'action relaxante.

Dans le test où l'iléon est contracté par une stimulation électrique, on peut parfois observer qu'une substance ou un extrait provoque une augmentation d'amplitude des contractions sans qu'il y ait un changement de la ligne de base.

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette potentialisation ; par exemple une augmentation de la quantité des transmetteurs libérés, une action sur les sites récepteurs, interférence avec les seconds messagers, etc...

Cette réponse donne évidemment une indication sur le mécanisme d'action de l'extrait testé.

AVANTAGE ET LIMITE DE LA METHODE :

L'avantage d'utiliser une méthode non spécifique pour mettre en évidence l'activité pharmacologique d'un extrait végétal est que par un seul test on peut détecter plusieurs types d'activité, et si ce test est assez simple, plusieurs extraits peuvent être testés rapidement.

Ce genre de test est idéal pour guider la purification d'un extrait végétal pour l'isolement d'une fraction ou de(s) substance(s) active(s). Un technicien habile peut tester au moins 20 échantillons par jour, avec des quantités de l'ordre de 50 mg pour un extrait et 100 µg pour une substance pure.

L'inconvénient majeur de cette méthode est la difficulté d'obtenir une information sur le mécanisme d'action de la réponse observée sur l'iléon. La substance active de l'extrait peut contracter ou relâcher le muscle lisse par plusieurs mécanismes.

Quelque information peut être obtenue en recourant à des agonistes ou des antagonistes connus, aussi n'est-il pas nécessaire, du point de vue pratique, d'attendre l'isolement d'une substance pure pour commencer à aborder l'élucidation du mécanisme d'action de l'extrait.

En conclusion : l'iléon isolé de Cobaye est utile pour un screening non spécifique des activités d'une extrait végétal. Mais pour une étude du mécanisme d'action pharmacologique et l'utilisation médicale, il faut travailler avec la (les) substance(s) active(s).

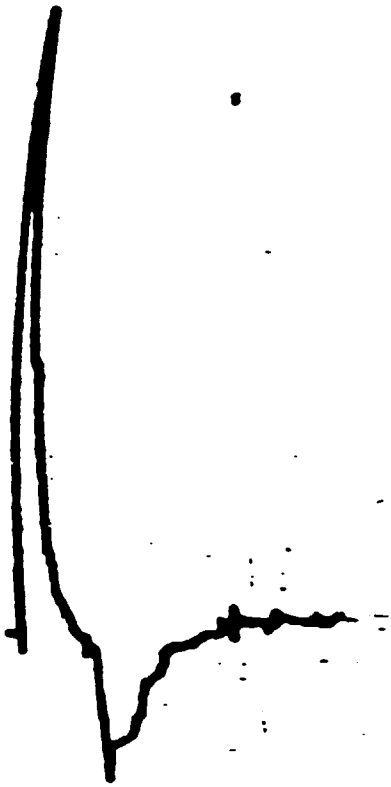


Figure 24 : Réponse d'un extrait végétal contenant des substances contracturantes et relaxantes. Le résultat dépend des proportions de leur concentration respective.



Figure 25 : Sur l'enregistrement d'action relaxante, on peut suspecter la présence de substance contracturante par augmentation de la ligne de base.

Le désavantage d'un screening non-spécifique est que les informations recueillies auprès des guérisseurs sur les maladies ou symptômes pour lesquels la plante est préconisée ne peuvent être utilisées. Des méthodes spécifiques pour l'action préconisée sont préférables dans ce but.

Pour l'isolement de substances actives, les tests spécifiques sont souvent trop encombrants, font perdre du temps ou demandent trop de substance. Si on peut trouver une corrélation entre une méthode spécifique et le test sur l'iléon isolé de Cobaye, alors la dernière méthode est bien adaptée pour guider l'isolement d'une substance active.

II - UTERUS ISOLE DE RAT :

Cette manipulation est utilisée pour sa sensibilité à l'adrénaline et sa relative insensibilité à la noradrénaline. La présence en grand nombre de récepteurs β -adrénergiques expliquerait cette discrimination.

Le montage est fort intéressant pour les essais d'extrait pouvant contenir des propriétés de ces deux catécholamines. L'utilisation du propranolol permet de déceler la présence d'une substance activant les récepteurs B-adrénergiques dans l'extrait. Il est aussi sensible aux agonistes cholinergiques.

PREPARATION DE L'ORGANE :

Pour avoir de bonnes réponses, il faut prélever l'utérus sur des femelles jeunes de 140 g à 160 g et en oestrus. On induit l'oestrus en injectant par voie sous cutanée, à l'animal, 24 H avant la manipulation, 0,2 ml/100 g d'une solution alcoolique d'oestradiol à la concentration de 1×10^{-4} M.

Le jour de l'expérience, l'animal est sacrifié et saigné. L'abdomen est ouvert et les intestins sont enlevés et mis de côté. Les deux cornes de l'utérus sont sectionnées et transférées dans une boîte de Pétri contenant la solution de Locke.

Les deux cornes sont séparées et débarrassées des tissus adipeux. Chaque corne est ouverte longitudinalement et coupée vers le milieu du muscle. On obtient ainsi 4 morceaux de muscles.

De la ficelle est attachée à chaque extrémité d'une bande de muscle et la préparation est montée dans la cuve. La solution de Locke est aérée par du carbogène ($O_2 = 95 \%$, $CO_2 = 5 \%$) ou à l'aide d'un aérateur, et maintenue à 37°

On attend que les contractions spontanées se régularisent sous une tension de 0,05 g (transducteur isotonique Ugo Basile) avant de commencer les essais.

Dans la figure 26 est donnée l'action inhibitrice d'un extrait végétal à la concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$ sur ces contractions spontanées. Un lavage (L) de l'organe lui permet de retrouver les contractions.

La présence du propranolol à 1×10^{-8} M, avant une nouvelle introduction de l'extrait, empêche l'apparition de l'activité inhibitrice de l'extrait sur les contractions de l'organe. Non seulement les contractions ne sont pas inhibées; mais la ligne de base, donc le tonus du muscle, est affectée par le produit.

Cette augmentation du tonus en présence du propranolol pourrait être due à l'effet composite de l'extrait sur l'organe.

Il s'agit ici d'un test qualitatif qui permet de déterminer un site d'action, parmi d'autres, de l'extrait végétal.

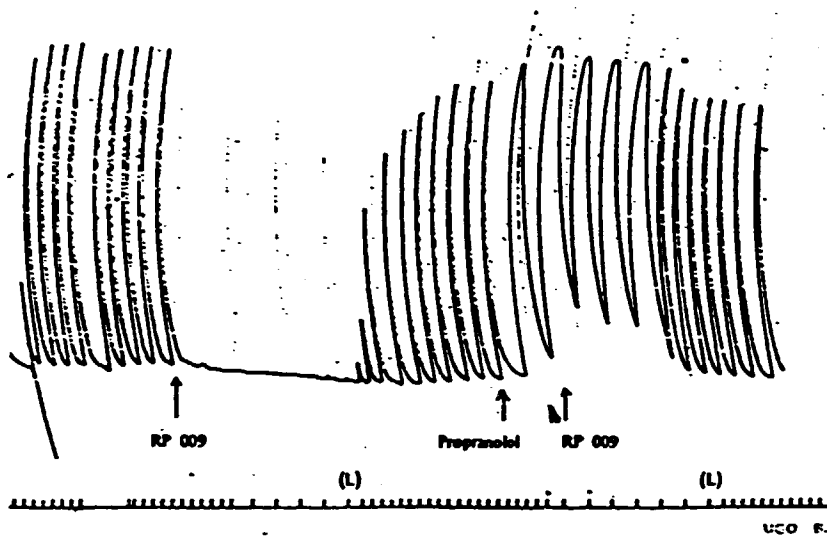


Figure 26 : L'extrait de la plante (250 $\mu\text{g/ml}$) inhibe les contractions spontanées de l'utérus isolé de Rat. La présence du propranolol (1×10^{-3} M) entrave cette action de la plante. (L = lavage).

III - AORTE ISOLEE DE RAT :

L'aorte isolée est un exemple de tissu contenant des récepteurs adrénergiques.

PREPARATION DE L'ORGANE :

Un rat de 170-200 g est sacrifié et saigné. On ouvre le thorax, on dégage ensuite l'aorte descendante. L'aorte est sectionnée et transférée dans une boîte de Pétri contenant une solution de Krebs. La solution est constamment aérée par le mélange O_2-CO_2 (95-5).

L'organe est découpé en spirale d'environ 4 mm de large et une longueur de 2 cm est montée dans la cuve, maintenue à 37° C et aérée par le carbogène. On soumet l'organe à une tension de 0,5 g. On laisse le tout s'équilibrer une heure avant de commencer le test. Un rinçage est effectué toutes les 20 minutes pendant l'équilibration.

La figure 27 regroupe les courbes effets/dose de la contraction de l'aorte provoquée par l'isoprénaline, l'adrénaline et la noradrénaline, en présence de propranolol à 1×10^{-6} M (pour bloquer les récepteurs B-adrénergiques). On trouve dans le tableau 4 la CE_{50} pour les 3 catécholamines.

Tableau 4 : CE_{50} de l'isoprénaline, l'adrénaline et la noradrénaline sur les récepteurs alpha-adrénergiques de l'aorte isolée de Rat.

Substance	CE_{50}
- Isoprénaline..	$1.9.10^{-5}$ M
- Adrénaline....	$5 .10^{-8}$ M
- Noradrénaline.	$3.2.10^{-8}$ M

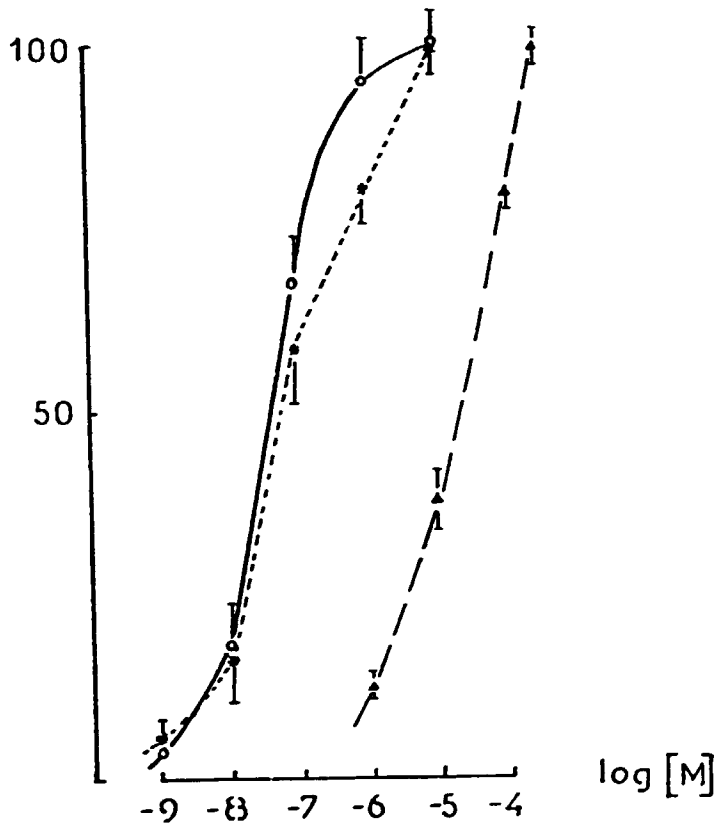
IV - TRACHEE ISOLEE DE COBAYE :

Cet organe est un matériel intéressant pour une première approche des études des substances ou d'extrait végétal ayant une activité bronchodilatatrice ou antianaphylactique.

Pour le test antianaphylactique, l'organe est prélevé sur un animal sensibilisé à l'ovalbumine (voir antianaphylaxie de ce manuel).

...

% Amplitude de la
Contraction de l'Aorte



▲---▲ Isopréraline ○—○ Adréraline
■-----■ Noradréraline

Figure 27 : Courbe effet/dose de l'isopréral. adréraline et la noradréraline sur l'aorte isolée de Rat en présence de propranolol 1×10^{-6} M.

PREPARATION DE L'ORGANE :

Un Cobaye de 400 g est tué, il est saigné à la gorge en faisant attention de ne pas endommager la trachée.

La trachée est dégagée, sectionnée et transférée dans une boîte de Pétri contenant la solution de Krebs.

Elle est débarrassée de ses tissus annexes. Quatre tronçons de 5 mm de longueur sont découpés dans la trachée, chaque tronçon est découpé longitudinalement du côté opposé au muscle lisse. Les bandelettes sont ensuite accolées deux par deux, comme indiqué dans la figure 28 et un fil est passé à chaque extrémité des bandelettes. On obtient deux bandelettes qu'on monte dans les cuves à organe isolé, où la solution de Krebs est aérée par du carbogène ($O_2 = 95\%$; $CO_2 = 5\%$). Cette technique est une variante de la chaîne et de la trachée découpée en spirale.

Suivant les effets étudiés, on enlèvera l'endothélium avant le montage ou non, car il est prouvé que ce tapis cellulaire de revêtement, peut libérer sous l'action de certaines substances, comme l'acétylcholine, un facteur relaxant, tout comme l'endothélium de l'aorte. On vérifie que l'endothélium a été bien enlevé par l'absence d'effet relaxant de l'acétylcholine sur l'organe contracté par la noradrénaline.

La figure 29 représente des contractions induites par l'histamine, en utilisant un transducteur isométrique (Ugo Basile).

La trachée est contractée par la méthode cumulative : on ajoute des concentrations croissantes d'histamine dans la cuve : 10^{-7} M, $2 \cdot 10^{-7}$ M et $6 \cdot 10^{-7}$ M ; elle a été ensuite relâchée par l'isoprénaline par la même méthode avec : $1 \cdot 10^{-9}$ M, $2 \cdot 10^{-9}$ M, $2 \cdot 10^{-6}$ M, $6 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-5} M d'isoprénaline.

V - OREILLETES ISOLEES DE COBAYE :

On s'est servi des oreillettes isolées de Cobaye pour le test d'extrait ou de substances supposés actifs sur les récepteurs B-adrénergiques.

PREPARATION DE L'ORGANE :

Un Cobaye de 400-500 g est sacrifié et saigné, la cage thoracique est ouverte et le coeur est rapidement prélevé et placé dans une boîte de Pétri contenant la solution de Ringer. On le débarrasse de tous les tissus annexes, et le ventricule est séparé des oreillettes en le sectionnant aussi près que possible des oreillettes. Une ficelle est nouée à chaque extrémité des oreillettes qu'on transfère ensuite dans la cuve où la solution de Ringer, maintenue à $37^\circ C$ est aérée par de l'oxygène pur (à défaut se servir du mélange carbogène ($O_2 = 95\%$, $CO_2 = 5\%$). Le test tel qu'il est présenté ici est un test qualitatif.

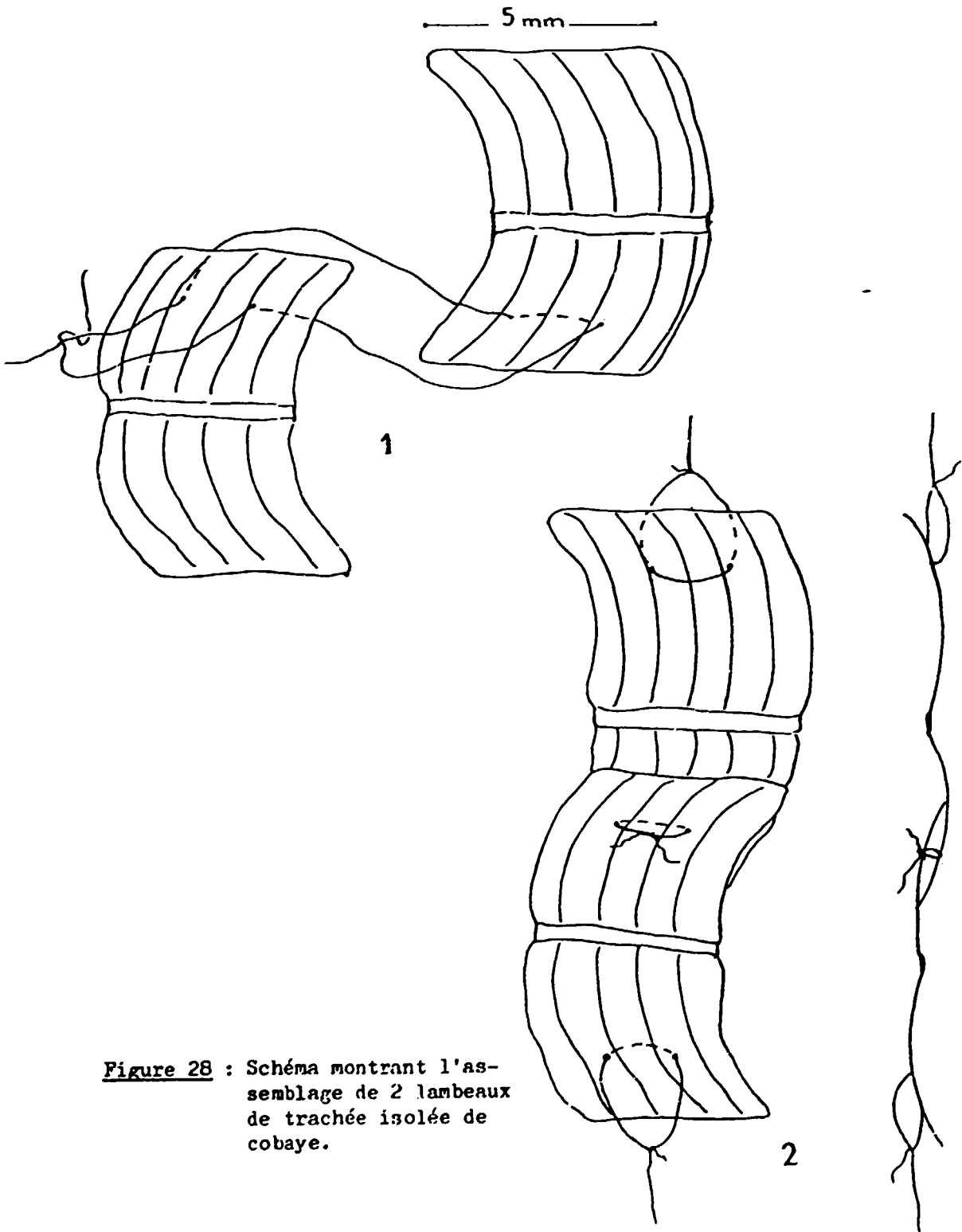


Figure 28 : Schéma montrant l'as-
semblage de 2 lambeaux
de trachée isolée de
cobaye.

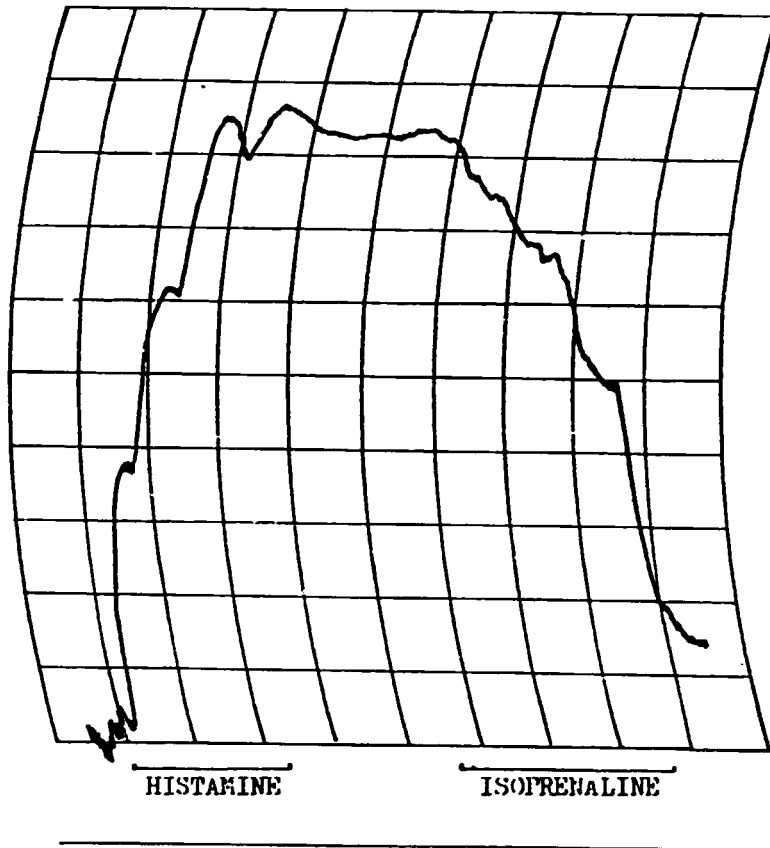


Figure 29 : Réponse à l'histamine et à l'isoprénaline après la contraction par l'histamine de la trachée isolée de cobaye.

La figure 30 a est un exemple d'enregistrement obtenu avec des oreillettes isolées activées par l'isoprénaline, en se servant d'un transducteur isotonique (Ugo Basile). En dessous on peut observer l'effet d'un extrait végétal qui sans modifier l'amplitude des contractions a diminué la fréquence des contractions.

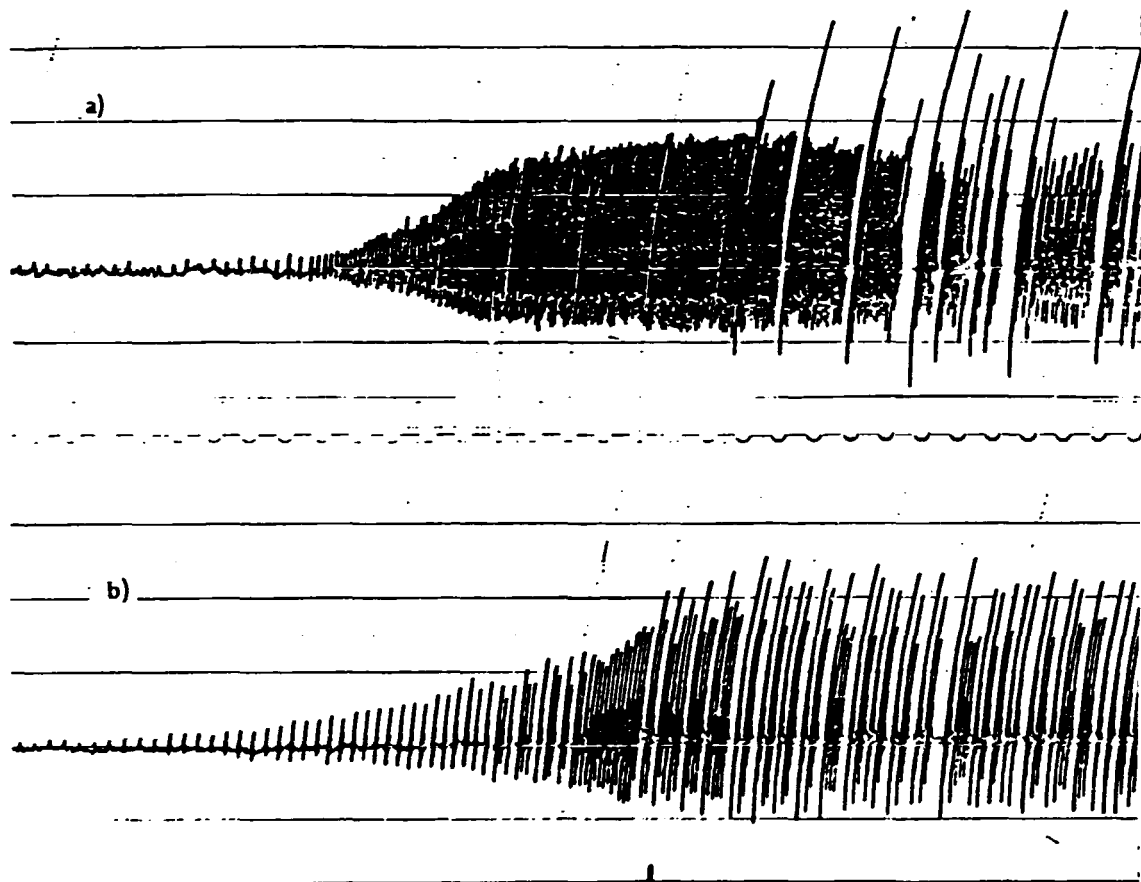


Figure 30 : Comparaison de l'effet de l'isoprénaline seule à $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ a) et en présence de l'extrait de la plante à 250 ug/ml b), sur les oreillettes isolées de Cobaye. En présence de l'extrait de la plante, l'amplitude de la contraction induite par l'isoprénaline est inchangée, mais on observe une diminution de la fréquence des contractions.

LISTE DES APPAREILS

=====

UGO BASILE
 Biological research apparatus
 21025 COMERIO-VARESE
 ITALY

! Désignation	: référence	: Prix U. S. \$!
! - Plethysmomètre.....	: 7150	: 2,220.00	!
! - Analgésimètre (Randall et Selitto)...	: 7200	: 1,000.00	!
! + Pédale et câble.....	: 7203	: 22.00	!
! - Transducteur de bronchospasme.....	: 7020	: 1,450.00	!
! - Pompe ventilatoire pour rongeurs.....	: 7025	: 2,500.00	!
! - Bain à organe isolé (pour 2 cuves à organe isolé).....	: 4050	: 1,600.00	!
! - Cuve à organe isolé (10 ml).....	: 4100	: 44.00	!
! - Transducteur isométrique DY2.....	: 7004	: 420.00	!
! - Transducteur isotonique.....	: 7006	: 870.00	!
! - Enregistreur GEMINI (2 canaux).....	: 7070	: 3,940.00	!
! - Papier enregistreur.....	: 7075	: 8.00	!
! - Pulse generator.....	: 7801	: 2,365.00	!
! - Electrodes pour une stimulation par effet de champs (selon Sperelakis)	:	:	!
!	:	:	!

A N N E X E 1

FORMULE DE RINGER (140 mM) :

NaCl.....	6.72	grammes
NaHCO ₃	2.10	g
Solution 1.....	50	ml
Solution 2.....	100	ml
Eau qsp.....	1 000	ml

Solution 1 :

HgCl ₂ , 6H ₂ O.....	4.86	g
CaCl ₂ anhydre.....	2.66	g
Eau.....	1 000	ml

Solution 2 :

K ₂ HPO ₄	4.16	g
KH ₂ PO ₄	0.54	g
Eau.....	1 000	ml

FORMULE DE KREBS :

Solution de stockage.....	200	ml
Glucose.....	4	g
CaCl ₂ anhydre.....	0.56	g
Eau.....	1 800	ml

Solution de stockage :

NaCl.....	69	g
KCl.....	3.54	g
KH ₂ PO ₄	1.61	g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	2.97	g
NaHCO ₃	21.0	g
Eau q.s.p.....	1 000	ml

La solution de Krebs doit être préparée tous les jours. Un mélange de O₂ (93.5 %) et CO₂ (6.5 %) est barbotée constamment à travers la solution.

SOLUTION DE LOCKE :

NaCl.....	9	g
KCl.....	0,42	g
CaCl ₂	0,24	g
NaHCO ₃	0,15	g
Glucose.....	1	g
Eau qsp.....	1 000	ml