

Biologie et pathologies végétales / Plant biology and pathology

Effets de l'extrait méthanolique de *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab. sur la motricité duodénale de rat

Ahlem Ben Sassi^{a,*}, Fethia Harzallah-Skhiri^b, Wahida Borgi^c, Nabil Chouchène^c,
Mahjoub Aouni^a

^a Laboratoire des maladies transmissibles et substances biologiquement actives, faculté de pharmacie, rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisie

^b Laboratoire de biologie végétale et botanique, institut supérieur agronomique de Chott-Meriem, 4042 Sousse, Tunisie

^c Laboratoire de pharmacologie, faculté de pharmacie, rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisie

Reçu le 19 novembre 2006 ; accepté après révision le 16 janvier 2007

Disponible sur Internet le 8 février 2007

Présenté par Pierre Buser

Résumé

L'effet de l'extrait au méthanol des fleurs de *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab. Var. *macrocephalum* (viv.) Beg. sur l'activité contractile de fragments de duodénum de rat est examiné in vitro. Sur les contractions spontanées du muscle lisse duodénal, l'extrait exerce des effets stimulateurs dose-dépendants sur le tonus et l'amplitude. La stimulation maximale est observée à partir de 0,1 g/ml d'extrait, avec un taux significatif d'augmentation de la contraction (%) de 1050 ± 13 ($P < 0,001$) par rapport au témoin, et de $80 \pm 5,83\%$ ($P < 0,001$) de l'effet maximal donné par l'acétylcholine. L'atropine (2 µg/ml) réduit de $81 \pm 4\%$ ($P < 0,05$) l'effet spasmodogène de l'extrait de *C. trifurcatum* et de $92 \pm 3\%$ ($P < 0,05$) celui de l'acétylcholine. Par ailleurs, la papavérine (2 µg/ml) inhibe totalement l'action spasmodogène de cet extrait. Une dose submaximale fixe d'acétylcholine (20 µg/ml) additionnée à l'extrait provoque une augmentation de l'effet de l'extrait en fonction de la dose et une diminution de celui de l'acétylcholine. Ces résultats font penser que l'extrait au méthanol des fleurs de *C. trifurcatum* stimulerait les contractions du muscle lisse duodénal, ceci par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques, ce qui pourrait prouver l'utilisation traditionnelle de cette plante dans les problèmes gastro-intestinaux, spécialement la constipation. **Pour citer cet article : A. Ben Sassi et al., C. R. Biologies 330 (2007).**

© 2007 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Effects of the methanolic extract of *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. and Trab. on rat duodenal motility. The effect of the methanolic extract of flowers of *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. and Trab. Var. *macrocephalum* (viv.) Beg. on the rat duodenum smooth muscle motility was examined in vitro. The extract has shown dose-dependent stimulator effects on the amplitude of the spontaneous contractions. With 0.1 g/ml of extract, maximal stimulation was obtained. With that dose, the variation (%) was significantly 1050 ± 13 ($P < 0.001$) compared with control and represented $80 \pm 5.83\%$ ($P < 0.001$) of the maximum effect of acetylcholine. Atropine (2 µg/ml) reduced by $81 \pm 4\%$ ($P < 0.05$) the spasmogenic effects of *C. trifurcatum* and by $92 \pm 3\%$ ($P < 0.05$) the acetylcholine effects, while papaverine (2 µg/ml) completely inhibited the spasmogenic effects of extract. With a fixed dose of acetylcholine added (20 µg/ml), the extract increases its effect, but acetylcholine decreases its action.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : ahlem_ben_sassi@yahoo.fr (A. Ben Sassi).

These results suggested that the methanolic extract of *C. trifurcatum* could stimulate duodenal smooth muscle contractions through muscarinic receptors. They explain the respective traditional use of plant in gastrointestinal problems, especially constipation. **To cite this article:** A. Ben Sassi et al., *C. R. Biologies 330 (2007)*.

© 2007 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : *Chrysanthemum trifurcatum* ; Duodénum ; Rat ; Spasmodique

Keywords: *Chrysanthemum trifurcatum*; Duodenum; Rat; Spasmogenic

1. Introduction

Le genre *Chrysanthemum* appartient à la famille des astéracées. Pottier-Alapetite [1] considère que 13 espèces appartenant à ce genre sont distribuées en Tunisie : *C. clausonis* (Pomel) Batt., *C. coronarium* L., *C. corymbosum* L., *C. deserticum* (Murb.) Batt. et Trab., *C. Fontanesii* (Boiss. et Reut.) Q. et S., *C. fuscatum* Desf., *C. grandiflorum* (L.) Batt., *C. macrocarpum* Coss. et Kral., *C. macrotum* (D.R.) Ball., *C. Myconis* L., *C. paludosum* Poiret ssp. *glabrum* (Maire) Q. et S., *C. segetum* L. et *C. trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab. var. *macrocephalum* (viv.) Beg.

Chrysanthemum trifurcatum (Desf.) Batt. et Trab. var. *macrocephalum* (viv.) Beg. est une plante vivace à souche ligneuse, peu élevée (15–30 cm) et rameuse dès la base. Les feuilles sont pennatiséquées, à lanières courtes, lancéolées aiguës et mucronulées. Les capitules sont hétérogames, radiés, sur de longs pédoncules, atteignant 2 cm de diamètre sans les ligules. Les bractées sont orbiculaires, atténuées à la base et entièrement scarieuses vers l'extrémité. Les ligules sont jaunes. Les achaines sont tous semblables, à couronne membraneuse denticulée et plus ou moins auriculée. La plante pousse sur les sables et les terrains pierreux [1,2].

La plante *C. trifurcatum* est connue localement, au centre de la Tunisie, sous le nom vernaculaire « gue-redfa » ou « ouazouza ». Notre enquête ethnobotanique montre que cette plante est utilisée dans la médecine populaire tunisienne pour combattre la constipation. Elle est aussi réputée soulager des douleurs spécifiquement féminines (douleurs au cours des règles et après l'accouchement). Les fleurs séchées peuvent être additionnées à la soupe. Elles peuvent être encore moulues, mélangées avec de la farine et préparées en purée.

Afin d'étudier les effets pharmacologiques de nouveaux agents laxatifs, la motilité gastro-intestinale et l'activité spasmodique peuvent être étudiées sur des animaux [3] ou sur des préparations de tissus isolés [4]. En vue de l'utilisation traditionnelle de *C. trifurcatum* dans les phénomènes de constipation et les troubles du transit intestinal, nous examinons dans ce travail les effets de l'extrait au méthanol des fleurs de cette plante sur l'acti-

tivité contractile de fragments isolés de duodénum de rat. À notre connaissance, l'espèce est mal connue du point de vue de son activité pharmacologique et biologique, ainsi que de celui de sa composition chimique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal et extraction

Les fleurs fraîches de *C. trifurcatum* ont été récoltées dans le Centre de la Tunisie (Zeramdine) en avril 2005 et identifiées en se basant sur la flore de la Tunisie [1] par le Dr Fethia Harzallah-Skhiri, de l'institut supérieur agronomique de Chott-Meriem, Sousse, Tunisie. Le matériel végétal est séché, puis broyé en une poudre fine. 150 g de cette poudre sont mis à macérer dans 0,5 l de méthanol, à la température ambiante, pendant 48 h, cette procédure étant répétée trois fois (3 × 48 h). Filtré, le macérât est évaporé sous pression réduite à une température n'excédant pas 45 °C. Le pourcentage de rendement de l'extraction (masse de l'extrait obtenu divisé par la masse de matière végétale extraite) est de 7,11%. L'extrait au méthanol des fleurs de *C. trifurcatum* est conservé en aliquotes à –20 °C. Il sera dissous dans le liquide physiologique au moment de son utilisation.

2.2. Produits et animaux

L'acétylcholine, l'atropine sulfate, le BaCl₂ et la papavérine sont obtenus à partir de produits d'origine Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, États-Unis). Toutes les drogues sont dissoutes dans de l'eau distillée et les dilutions sont faites le jour de l'expérimentation dans une solution saline (chlorure de sodium à 0,9%).

Des rats Wistar mâles (200–250 g), obtenus auprès de l'institut Pasteur de Tunis, ont été utilisés pour cette étude. Les animaux sont maintenus en conditions normales ; ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. Au moment de l'expérimentation, les rats sont tués par dislocation cervicale et aucun agent anesthésiant n'est utilisé afin de ne pas influencer l'état de relâchement du muscle lisse [5].

2.3. Évaluation de l'activité contractile du muscle lisse duodénal

L'effet spasmogène de l'extrait au méthanol des fleurs de *C. trifurcatum* est testé sur des fragments de duodénum isolés à partir d'organes de rats. La cavité abdominale des animaux est ouverte et des portions de duodénum, d'environ 1,5 cm de long chacun, sont prélevés et débarrassés du tissu conjonctif. Ces fragments sont conservés pendant les essais à 37 °C dans le liquide physiologique de Tyrode oxygéné à 95% d'O₂ et 5% de CO₂, de composition (mM) : CaCl₂ (2), KCl (2), NaCl (80), MgCl₂ (1), NaHCO₃ (5) et glucose (5). Chaque fragment de duodénum est monté dans une cuve à organe isolé, reliée à un transducteur isotonique ; les contractions spontanées sont enregistrées sur oscillographe Bioscience. Nous avons testé les effets de *C. trifurcatum* et de l'acétylcholine sur des fragments de duodénum traités ou non au préalable avec de l'atropine ou de la papavérine. Après un temps de stabilisation de 30 min, l'effet d'une dose submaximale d'acétylcholine (20 µg/ml) est testé : le fragment de duodénum n'est supposé stable qu'après la reproductibilité de la réponse obtenue. Par la suite et après le lavage de l'organe au Tyrode, un volume de l'extrait au méthanol de *C. trifurcatum* (1 mg/ml) est ajouté au milieu d'incubation et les effets sont observés. Après deux à trois lavages au Tyrode et stabilisation, une dose supérieure d'extrait est ajoutée dans la chambre à organes. Ainsi, les effets de différentes concentrations d'extrait sont évalués sur l'activité contractile du muscle lisse duodénal par comparaison avec l'effet spasmogène provoqué par l'acétylcholine et par le BaCl₂.

2.4. Traitement statistique des résultats

Les résultats sont exprimés en moyennes affectées de l'erreur standard sur la moyenne (M ± ESM). La signification de la différence entre le contrôle et l'échantillon traité est analysée par le test-*t* de Student, avec $P < 0,05$ pour une différence significative.

3. Résultats

L'extrait au méthanol des fleurs de *Chrysanthemum trifurcatum* modifie aussi bien le tonus de base que l'amplitude des contractions du muscle lisse duodénal du rat. Cet extrait brut provoque, aux concentrations comprises entre 1 et 200 mg/ml, des stimulations dose-dépendantes de la contraction duodénale variant,

Tableau 1

Effet de l'extrait au méthanol de *Chrysanthemum trifurcatum* sur la contraction spontanée du muscle lisse de duodénum de rat

Traitement	Dose (mg/ml)	% d'augmentation de la contraction par rapport au témoin
Contrôle	–	–
extrait	1	53 ± 4*
	2	56 ± 5*
	3	68 ± 5*
	10	225 ± 10**
	20	537 ± 10***
	50	968 ± 27,4***
	100	1050 ± 13***
	200	1050 ± 12,1***

Les résultats sont donnés en moyenne affectée de l'erreur standard à la moyenne, M ± SEM, et exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

* $P < 0,05$;

** $P < 0,01$;

*** $P < 0,001$ pour une différence significative selon le test *t* de Student.

en pourcentage d'augmentation de la contraction spontanée sans produits, de 53 ± 4 (M ± ESM ; $n = 5$; $P < 0,05$) à 1050 ± 13 ($P < 0,001$) (Tableau 1). La concentration qui induit une contraction musculaire de 50% de l'effet maximum (CE₅₀) est de 18 mg/ml. Cette réponse est facilement inversée par lavage. L'acétylcholine, qui est un spasmogène neurotrope, induit également, aux doses de 5 à 400 µg/ml, des augmentations de la contraction du duodénum allant de 356 ± 21% ($P < 0,001$) à 1312 ± 22% ($P < 0,001$) avec une CE₅₀ de 14 µg/ml. L'extrait provoque une contraction maximale du muscle qui représente 80 ± 5,8% ($P < 0,001$) de l'effet maximal induit par l'acétylcholine (Fig. 1). Néanmoins, le BaCl₂, qui est un spasmogène musculotrope, induit une stimulation de la contraction du muscle lisse duodénal de l'ordre de 107 ± 10% par rapport au maximum de contraction induit par l'acétylcholine (Fig. 1).

Pour savoir si l'effet stimulant de l'extrait sur la contraction du muscle lisse intervient selon un mécanisme similaire à celui rencontré dans le cas de l'acétylcholine, on procède à un prétraitement du fragment de l'organe à l'atropine (2 µg/ml), spasmolytique neurotrope agoniste de l'acétylcholine [6,7]. Après un temps de stabilisation de 20 min, on détermine l'effet de l'extrait aux différentes doses (1 à 200 mg/ml) et celui de l'acétylcholine sur la contraction musculaire. Les résultats obtenus montrent que l'atropine inhibe 81 ± 4% ($P < 0,05$) de l'action stimulante de contraction, de l'extrait de *C. trifurcatum* (200 mg/ml) et 92 ± 3%

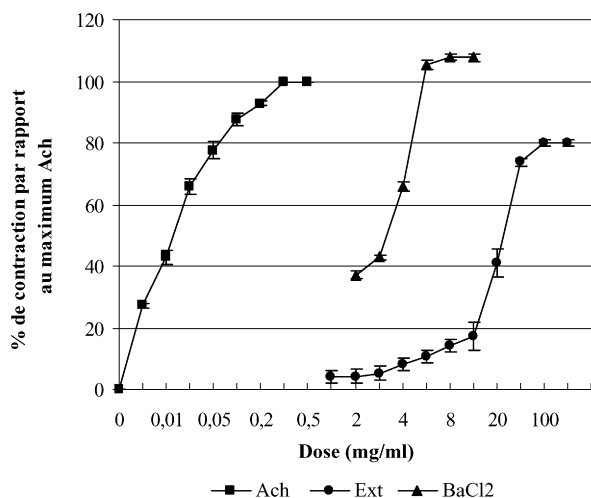


Fig. 1. Effet de l'extrait au méthanol de *Chrysanthemum trifurcatum* (Ext) et du BaCl₂ sur la contraction des fragments de duodénum isolés de rat, comparé à la réponse maximale (100%) de l'acétylcholine (Ach), obtenue à 400 µg/ml. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM, $n = 5$, $P < 0,05$.

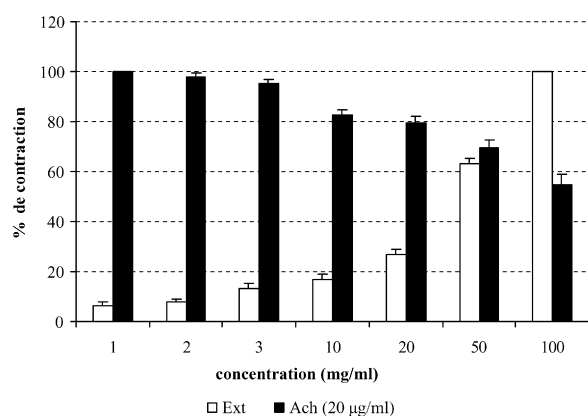


Fig. 2. Effet des doses croissantes de l'extrait au méthanol de *Chrysanthemum trifurcatum* (Ext) en présence d'une dose fixe d'acétylcholine (20 µg/ml) (Ach) sur la contraction des fragments de duodénum isolés. L'ajout de l'acétylcholine se fait à chaque addition d'extrait et après le retour de la contraction à l'état normal. L'effet de l'extrait sur la contraction musculaire augmente en fonction de la concentration, alors que l'effet de l'acétylcholine diminue s'il est précédé par l'ajout d'une forte dose d'extrait. Les résultats sont exprimés en M ± ESM, $n = 5$, $P < 0,05$.

($P < 0,05$) de celle de l'acétylcholine (20 µg/ml). En outre, on traite au préalable le fragment de duodénum par l'extrait à doses croissantes suivi par le traitement avec l'acétylcholine à la dose submaximale (20 µg/ml). En effet, à chaque addition d'extrait et après le retour de la contraction à l'état normal, on ajoute l'acétylcholine à une dose fixe de 20 µg/ml. Les résultats obtenus

montrent bien que l'effet de l'extrait sur la contraction musculaire augmente en fonction de la concentration, alors que l'effet de l'acétylcholine diminue s'il est précédé par l'ajout d'une forte dose d'extrait (Fig. 2). Ceci nous laisse suggérer que l'action de l'extrait de *C. trifurcatum* sur le muscle lisse duodénal se fait par un mécanisme cholinergique similaire à celui de l'acétylcholine.

En milieu physiologique normal, le traitement préalable du duodénum de rat avec un spasmolytique musculotrope, la papavérine (2 µg/ml), inhibe totalement l'activité spasmodique de l'extrait et provoque un relâchement des muscles lisses du duodénum par action directe sur la fibre musculaire.

4. Discussion

L'extrait au méthanol des fleurs de *Chrysanthemum trifurcatum* en milieu physiologique normal provoque, au niveau du fragment de duodénum de rat, une augmentation de l'amplitude des contractions. La contraction est augmentée à environ 1050% de la valeur initiale. Cet effet stimulateur de l'extrait sur l'activité motrice du muscle lisse duodénal pourrait expliquer en partie l'utilisation traditionnelle de *C. trifurcatum* dans le traitement de certains troubles digestifs, en l'occurrence, la constipation. Les effets spasmodiques de l'extrait de *C. trifurcatum* et de l'acétylcholine sont inhibés respectivement de 81% et 92% par l'atropine. Ces résultats suggèrent une action de l'extrait de la plante par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques similaire à celle de l'acétylcholine. L'activation de ces récepteurs par l'acétylcholine provoque une entrée d'ions Ca²⁺ et une dépolarisation membranaire, qui est à l'origine de la contraction [8]. L'acétylcholine, neurotransmetteur du système nerveux parasympathique, agit par stimulation des récepteurs muscariniques du sous-type M₃ et l'atropine bloque tous les sites de ces récepteurs muscariniques. Ce mécanisme d'action de l'acétylcholine joue un rôle physiologique important dans la régulation de la sécrétion salivaire et des mouvements péristaltiques intestinaux [9,10].

En outre, le traitement du fragment de duodénum par l'extrait à doses croissantes, suivi d'un traitement par une dose submaximale fixe d'acétylcholine (20 µg/ml) à chaque addition d'extrait, montre que l'effet spasmodique de l'extrait sur la contraction musculaire augmente en fonction de la concentration, alors que l'effet de l'acétylcholine diminue. Ceci nous laisse affirmer qu'il pourrait exister une sorte de compétition au niveau des

récepteurs muscariniques, qui paraissent être communs pour l'extrait et l'acétylcholine. De ce fait, l'effet observé par l'extrait de *C. trifurcatum* apparaît similaire à celui de l'acétylcholine et pourrait expliquer l'utilisation populaire de cette plante en Tunisie.

La composition chimique de la plante n'est pas encore élucidée. Néanmoins, notre étude phytochimique préliminaire a révélé la présence des flavonoïdes, mais aussi des tanins et des alcaloïdes qui pourraient induire des effets parasymphicomimétiques [11].

En conclusion, nos résultats montrent que l'extrait au méthanol des fleurs de *C. trifurcatum* contient des constituants qui peuvent stimuler la contraction du muscle lisse duodénal de rat par un mécanisme qui apparaît similaire à celui de l'acétylcholine, ce qui expliquerait en partie l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle tunisienne contre la constipation et pour la facilitation du transit intestinal. Néanmoins, il sera important de cibler le principe actif responsable de cet effet spasmodogène de la plante.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier M^{lle} Dalila Haouas (Institut supérieur agronomique de Chott-Meriem, Sousse, Tunisie) pour l'aide qu'elle nous a apportée dans la récolte et l'extraction du matériel végétal.

Références

- [1] G. Pottier-Alapetite, Flore de la Tunisie. Angiospermes–Dicotylédones–Gamopétales, Publications scientifiques tunisiennes, Tunisie, 1981, pp. 1003–1004.
- [2] P. Ozenda, Flore du Sahara, 2^e ed., Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1977 (437 p.).
- [3] P.A. Akah, C.N. Aguwa, R.U. Agu, Studies on the antidiarrhoeal properties of *Pentaclethra macrophylla* leaf extracts, *Phytother. Res.* 13 (1999) 292–295.
- [4] V. Hajhashemi, H. Sadraei, A.R. Ghannadi, Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 187–192.
- [5] C. Karamenderes, S. Apaydin, Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *Sipylea* (O. Schwarz) assler on the rat isolated duodenum, *J. Ethnopharmacol.* 84 (2003) 175–179.
- [6] O. Arunlakshana, H.O. Schild, Some quantitative uses of drug antagonists, *Br. J. Pharmacol.* 14 (1959) 48–58.
- [7] A.H. Gilani, L.B. Cobbin, Cardiselectivity of himbacine: a muscarin receptor antagonist, *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 332 (1986) 16–20.
- [8] D. Cloarec, S. Bruley des Varannes, J.-P. Galmiche, Modification de la motricité digestive, in: *Pharmacologie : Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*, Éd. Frison Roche, Paris, 1989, pp. 581–589.
- [9] R.M. Eglen, N. Watson, Selective muscarinic receptor agonists and antagonists, *Pharmacol. Toxicol.* 78 (1996) 59–68.
- [10] J.H. Brown, P. Taylor, Muscarinic receptor agonists and antagonists, in: J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff (Eds.), Goodman and Gilman: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 141–159.
- [11] E.R. Farnsworth, Betel nut – its composition, chemistry and uses, *Sci. N. Guinea* 4 (1976) 85–90.