



HAL
open science

Etudes phytochimique et pharmacologique de *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae), *Nitraria sibirica* (Nitrariaceae) et *Echinops integrifolius* (Asteraceae), plantes anti-hypertensives de la Pharmacopée ouïghoure

François Sénejoux

► **To cite this version:**

François Sénejoux. Etudes phytochimique et pharmacologique de *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae), *Nitraria sibirica* (Nitrariaceae) et *Echinops integrifolius* (Asteraceae), plantes anti-hypertensives de la Pharmacopée ouïghoure. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA3009 . tel-01617532

HAL Id: tel-01617532

<https://theses.hal.science/tel-01617532v1>

Submitted on 16 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

ÉCOLE DOCTORALE :

Homme, Environnement, Santé
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Études phytochimique et pharmacologique de
Ziziphora clinopodioides (Lamiaceae), *Nitraria sibirica* (Nitrariaceae)
et *Echinops integrifolius* (Asteraceae),
plantes anti-hypertensives de la Pharmacopée ouïghoure

THÈSE

en vue de l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Présentée et soutenue publiquement

Par

Monsieur François SENEJOUX

le 2 Décembre 2011

JURY

Madame le Professeur Céline DEMOUGEOT (Université de Franche-Comté)
Madame le Docteur Corine GIRARD-THERNIER (Université de Franche-Comté)
Monsieur le Professeur Erwan POUPON (Université Paris-Sud 11)
Madame le Professeur Joëlle QUETIN-LECLERCQ (Université catholique de Louvain)
Madame le Professeur Dominique VUITTON (Université de Franche-Comté)
Madame le Docteur Nathalie NIEDERHOFFER (Université de Strasbourg)

Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

ÉCOLE DOCTORALE :

Homme, Environnement, Santé
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Études phytochimique et pharmacologique de
Ziziphora clinopodioides (Lamiaceae), *Nitraria sibirica* (Nitrariaceae)
et *Echinops integrifolius* (Asteraceae),
plantes anti-hypertensives de la Pharmacopée ouïghoure

THÈSE

en vue de l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Présentée et soutenue publiquement

Par

Monsieur François SENEJOUX

le 2 Décembre 2011

JURY

Madame le Professeur Céline DEMOUGEOT (Université de Franche-Comté)
Madame le Docteur Corine GIRARD-THERNIER (Université de Franche-Comté)
Monsieur le Professeur Erwan POUPON (Université Paris-Sud 11)
Madame le Professeur Joëlle QUETIN-LECLERCQ (Université catholique de Louvain)
Madame le Professeur Dominique VUITTON (Université de Franche-Comté)
Madame le Docteur Nathalie NIEDERHOFFER (Université de Strasbourg)

Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques (2SBP, EA4267) dirigée par le Professeur Yves Guillaume. Les différents travaux ont été effectués à la Faculté de Pharmacie de Besançon, dans le laboratoire de Physiologie dirigé par le Professeur Alain Berthelot puis par le Professeur Céline Demougeot ainsi que dans le laboratoire de Pharmacognosie dirigé par le Professeur Françoise Bévalot.

Je dois tout d'abord remercier la région Franche-Comté qui a financé ce travail ainsi que le Ministère des affaires étrangères qui, par l'intermédiaire du programme BioAsie, a rendu possible une collaboration scientifique efficace avec nos partenaires chinois.

Ensuite, mes plus vifs sentiments de gratitude s'adressent au Professeur Céline Demougeot et au Docteur Corine Girard-Thernier pour la confiance qu'elles m'ont accordé et leur encadrement attentif au cours de ces trois années. Je leurs exprime mes sincères remerciements pour leurs précieux conseils, leur sympathie et leur permanente disponibilité.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Alain Berthelot et au Professeur Françoise Bévalot pour m'avoir aussi chaleureusement accueilli dans leurs laboratoires respectifs.

Je souhaite remercier les membres présents ou passés du laboratoire de Physiologie : Ingrid, Manu et Sonia et plus particulièrement le Docteur Sylvie Devaux ainsi que Maude Nappay qui m'ont transmis avec patience leur maîtrise des différentes techniques d'évaluations pharmacologiques.

Ma profonde gratitude s'adresse également aux membres du laboratoire de Pharmacognosie, au Docteur Frédéric Muyard pour son amabilité et ses conseils toujours avisés ainsi qu'à Caroline Amiot pour sa gentillesse et son aide précieuse.

Je remercie Aurélie Garillon pour sa disponibilité et sa contribution efficace à la réalisation des analyses de résonance magnétique nucléaire.

Je souhaite également remercier mes autres collègues, certains devenus amis, de la Faculté de Pharmacie qui m'auront accompagné durant cette thèse et grâce à qui cette période constituera un merveilleux souvenir.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur Erwan Poupon (Université de Paris XI) ainsi qu'au Professeur Joëlle Quetin-Leclercq (Université catholique de Louvain) qui m'ont fait l'honneur d'accepter la charge d'être rapporteurs de cette thèse. Je tiens aussi à remercier vivement le Professeur Dominique Vuitton (Université de Franche-Comté) ainsi que le Docteur Nathalie Niederhoffer (Université de Strasbourg) qui m'ont honoré en acceptant de juger ce travail.

Remerciements

J'exprime également ma reconnaissance envers nos différents collaborateurs chinois, au Professeur Parhat Keremu (Université médicale du Xinjiang) pour avoir permis à cette collaboration d'exister, au Docteur Mourboul Ablise (Université médicale du Xinjiang) pour ses informations précieuses concernant les pratiques médicinales ouïghoures, au Docteur Haji Akber Aisa (Xinjiang Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry) pour m'avoir reçu dans son laboratoire à deux reprises. Un grand merci aux différents chercheurs et étudiants de ce laboratoire pour leur accueil particulièrement bienveillant. Je tiens également à remercier de nouveau le Professeur Dominique Vuitton qui a été été l'un des éléments moteurs et instigateurs de cette collaboration.

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse à mes parents ainsi que toute ma famille pour leur aide, leur soutien et leur amour.

Résumé

Affectant près d'un milliard de personnes dans le monde, l'hypertension artérielle représente un facteur de risque majeur de pathologies cardiovasculaires et d'insuffisance rénale et constitue l'une des principales causes de mortalité. L'identification de traitements anti-hypertenseurs efficaces et tenant compte des particularités des différentes populations du globe présente ainsi un intérêt capital en termes de santé publique. Notre travail a été consacré à l'étude de plantes anti-hypertensives de la Pharmacopée ouïghoure, principale ethnie de la Région autonome du Xinjiang, vaste territoire montagneux et désertique situé au Nord-Ouest de la Chine. L'objectif de la thèse a été d'apporter des arguments scientifiques, phytochimiques et pharmacologiques, permettant de valider et valoriser l'utilisation traditionnelle de ces plantes.

La première partie du travail a démontré sur le modèle d'aortes isolées de rat l'effet vasodilatateur de *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae). L'étude des mécanismes impliqués a permis d'identifier une action indépendante de l'endothélium vasculaire et secondaire à une modification des conductances calciques et potassiques. La réalisation d'un fractionnement bioguidé a permis l'identification de 7 métabolites vasoactifs d'origine phénolique. Dans une deuxième partie, les propriétés vasodilatatrices et hypotensives des fruits *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae) ont été démontrées. L'endothélium vasculaire et la voie du monoxyde d'azote ont été identifiés comme les éléments fondamentaux de cette action vasodilatatrice. Dans une troisième partie, nos travaux ont étudié pour la première fois les effets vasorelaxants et la composition chimique d'*Echinops integrifolius* Kar. & Kir. (Asteraceae) et ont permis de caractériser 11 métabolites incluant des triterpènes, des flavonoïdes ainsi qu'une coumarine.

En conclusion, notre travail de thèse a permis d'apporter, pour la première fois, des arguments expérimentaux soutenant l'usage anti-hypertensif des espèces *Ziziphora clinopodioides* et *Nitraria sibirica*. L'étude phytochimique d'*Echinops integrifolius* a également offert des informations chimiotaxonomiques utiles concernant cette espèce et le genre *Echinops*.

Mots clés : Hypertension artérielle ; médecine traditionnelle ouïghoure ; vasodilatation ; *Ziziphora clinopodioides* ; *Nitraria sibirica* ; *Echinops integrifolius* ; rats ; anneaux aortiques.

Title

Phytochemical and pharmacological studies of *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae), *Nitraria sibirica* (Nitrariaceae) and *Echinops integrifolius* (Asteraceae), antihypertensive plants from the Uighur Pharmacopoeia

Summary

Affecting nearly one billion people worldwide, hypertension is the most important risk factor for cardiovascular disease and kidney failure and it is also one of the leading causes of death. The identification of efficient antihypertensive treatments taking into account the specificities of different populations of the world is an important public-health challenge. Our work has been dedicated to the study of anti-hypertensive plants from the Uighur Pharmacopoeia, one of the major ethnic groups in the Xinjiang Autonomous Region, a large desert and mountainous area from the northwestern China. The aim of this work was to provide phytochemical and pharmacological evidences to validate and to enhance the traditional use of these plants.

First, the vasodilating properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae) have been shown by using the *in vitro* model of isolated rat aortic rings. Our data reported an endothelium-independent effect related to changes in calcium and potassium conductances. In addition, a bioguided fractionation has been carried out and led to the identification of seven vasorelaxant phenolic compounds. Second, the vasodilating and the hypotensive effects of the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae) have been demonstrated and the contribution of vascular endothelium and nitric oxide pathway has been pointed out. Finally, the vasorelaxant properties and the chemical composition of *Echinops integrifolius* Kar. & Kir. have been investigated for the first time. Eleven secondary metabolites have been isolated including triterpenes, flavonoids and coumarins.

In conclusion, our results provide scientific evidences supporting the traditional use of *Ziziphora clinopodioides* and *Nitraria sibirica* as antihypertensive therapy. Additionally, the phytochemical study of *Echinops integrifolius* gives chemotaxonomical data about that species and *Echinops* genus.

Keywords : Arterial hypertension ; Uighur traditional medicine; vasodilation ; *Ziziphora clinopodioides* ; *Nitraria sibirica* ; *Echinops integrifolius*; rats ; aortic rings.

Table des matières

Introduction générale	9
Chapitre I. Données bibliographiques	11
Partie 1. Le Xinjiang et le peuple ouïghour	12
I. Géographie du Xinjiang	12
II. Histoire du Xinjiang et du peuple ouïghour	14
III. La médecine traditionnelle ouïghoure	16
Partie 2. L'hypertension artérielle	20
I. Définition et épidémiologie	20
II. Physiopathologie de l'hypertension artérielle	22
II.1. Généralités	22
II.2. L'hypertension artérielle essentielle	24
II.3. L'hypertension artérielle secondaire	26
II.4. Facteurs de risque	26
II.4.1. Facteurs de risque modifiables	27
II.4.2. Facteurs de risque non modifiables	28
III. Fonction vasculaire	28
III.1. Structure des vaisseaux sanguins	28
III.2. Contraction des CMLVs	29
III.2.1. Mécanisme moléculaire de la contraction	30
III.2.2. Activation des CMLVs dépendante du calcium	30
III.2.3. Activation des CMLVs indépendante du calcium	33
III.3. Relaxation des CMLVs	34
III.3.1. Mécanismes impliqués dans la baisse du Ca ²⁺ intracellulaire	34
III.3.2. Désensibilisation de l'appareil contractile	37
III.4. L'endothélium et les facteurs endothéliaux	37
III.4.1. Facteurs endothéliaux relaxants	38
III.4.2. Facteurs endothéliaux constrictifs	41
III.4.3. La dysfonction endothéliale	42
IV. Les traitements de l'HTA	43
IV.1. Traitements non pharmacologiques	44
IV.2. Traitements médicamenteux	44
IV.3. Phytothérapie	46
Chapitre II. Objectifs généraux	49

Chapitre III. Étude de <i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam.	51
I. Données bibliographiques	52
I.1. Données botaniques	52
I.2. Chimiotaxonomie du genre <i>Ziziphora</i>	54
I.2.1. Métabolites d'origine terpénique	54
I.2.2. Métabolites phénoliques	56
I.3. Usages traditionnels	59
I.4. Propriétés pharmacologiques	60
II. Résultats expérimentaux et discussion	62
II.1. Étude des mécanismes vasodilatateurs de <i>Ziziphora clinopodioides</i> et identification des métabolites actifs impliqués	62
<u>Publication 1</u> : Mécanismes de l'effet vasodilatateur d'un extrait de <i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam. (Lamiaceae) sur des aortes thoraciques de rats	63
<u>Publication 2</u> : Isolement bioguidé des composés vasodilatateurs de <i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam. (Lamiaceae)	71
II.2. Étude pharmacologique des mécanismes vasodilatateurs de l'apocynine	87
<u>Publication 3</u> : Nouvelles données concernant les effets vasodilatateurs de l'apocynine sur des aortes thoraciques de rats	89
Chapitre IV. Étude de <i>Nitraria sibirica</i> Pall.	111
I. Données bibliographiques	112
I.1. Données botaniques	112
I.2. Chimiotaxonomie du genre <i>Nitraria</i>	114
I.2.1. Métabolites alcaloïdiques	114
I.2.2. Métabolites flavonoïdiques	121
I.3. Usages traditionnels	123
I.4. Propriétés pharmacologiques	123
II. Résultats expérimentaux et discussion	125
II.1. Étude pharmacologique de <i>Nitraria sibirica</i> Pall.	125
<u>Publication 4</u> : Effets vasodilatateurs et hypotenseurs d'un extrait hydro-éthanolique de fruits de <i>Nitraria sibirica</i> Pall. (Nitrariaceae).	127
II.2. Résultats complémentaires :	134
Fractionnement bioguidé d'un extrait vasodilatateur de <i>Nitraria sibirica</i> Pall	

Chapitre V. Étude d'<i>Echinops integrifolius</i> Kar. & Kir.	137
I. Données bibliographiques	138
I.1. Données botaniques	138
I.2. Chimiotaxonomie du genre <i>Echinops</i>	141
I.2.1. Métabolites d'origine terpénique	141
I.2.2. Métabolites de la voie des polyacétates	143
I.2.3. Métabolites alcaloïdiques	146
I.2.4. Métabolites phénoliques	147
I.3. Usages traditionnels	150
I.4. Propriétés pharmacologiques	151
II. Résultats expérimentaux et discussion	153
II.1. Évaluation des effets vasodilatateurs d'extraits hydro-éthanoliques d' <i>Echinops integrifolius</i>	153
II.2. Étude phytochimique d' <i>Echinops integrifolius</i>	154
<u>Publication 5</u> : Étude phytochimique d' <i>Echinops integrifolius</i> Kar. & Kir. (Asteraceae)	155
Discussion générale et Conclusion	163
Discussion générale	164
Conclusion	175
Bibliographie	177
Annexes	191

Introduction générale

Introduction générale

La région autonome du Xinjiang, située au Nord-Ouest de la Chine, se caractérise par une diversité culturelle considérable. Ce territoire est en effet peuplé par un nombre conséquent d'ethnies différentes dont la plus importante numériquement est l'ethnie ouïghoure. Ce peuple, turcophone et de confession musulmane, se singularise également par la richesse et l'originalité d'une médecine traditionnelle distincte de la médecine chinoise. L'ethnie ouïghoure a notamment su parfaitement tirer profit de la biodiversité botanique spécifique du Xinjiang pour développer sa propre Pharmacopée et faire ainsi de la phytothérapie l'élément central de ses pratiques médicinales.

Nombre de ces plantes sont employées pour le traitement de pathologies cardiovasculaires et plus particulièrement de l'hypertension artérielle. Cette dernière représente un problème de santé publique considérable tant à l'échelle régionale que mondiale puisqu'elle est à la fois un facteur de risque principal de maladies cardiovasculaires et de l'insuffisance rénale mais également l'une des causes majeures de mortalité à travers le monde. Considérant le relatif échec de la médecine « occidentale » dans la prise en charge de cette affection, des solutions thérapeutiques alternatives telles que la médecine traditionnelle ouïghoure méritent d'être examinées avec une attention particulière.

Il est cependant nécessaire de constater que l'efficacité pharmacologique de la plupart des plantes antihypertensives ouïghoures n'a jamais été scientifiquement confirmée et que les principes actifs à l'origine de leurs effets restent à identifier. Il apparaît pourtant évident que l'usage médicinal d'espèces végétales ne saurait reposer sur un savoir uniquement empirique et que la valorisation de cette médecine traditionnelle nécessite une validation expérimentale. Le présent travail a donc eu pour objectif d'apporter des arguments, à la fois phytochimiques et pharmacologiques, soutenant l'utilisation de différentes plantes anti-hypertensives de la Pharmacopée ouïghoure.

Supporté par des financements de la région Franche-Comté et du ministère des affaires étrangères (programme BioAsie), ce travail s'est inscrit dans le cadre d'une collaboration scientifique avec le Dr Parhat Keremu, professeur de pharmacologie à l'Université médicale du Xinjiang, et le Dr Haji Akber Aisa, directeur du Xinjiang Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry. Ces deux collaborateurs sont à la fois directeurs d'équipe de recherche mais également acteurs du tissu économique du Xinjiang travaillant en étroite relation avec les entreprises pharmaceutiques fabriquant et commercialisant les produits de phytothérapie ouïghoure.

Chapitre I

Données bibliographiques

Xinjiang, 2002). La capitale Urumqi reste cependant la plus importante agglomération de la Chine occidentale avec une population de plus de 2,3 millions d'habitants. Cette ville est également considérée comme la plus continentale au monde, la mer la plus proche étant à 2500 km de distance.

La topographie de cette région est fortement contrastée, alternant importants massifs montagneux et larges bassins. La chaîne de montagne du Tian Shan sépare le pays en deux grands bassins, le bassin du Tarim et celui de la Dzungarie. Au sud, le bassin du Tarim est composé d'importantes zones désertiques dont le Taklamatan, l'un des plus vastes déserts au monde. Cette zone est véritablement entourée de montagnes. On trouve la chaîne du Tian Shan au nord, les Kunlun au sud, la chaîne des Pamirs à l'ouest et le massif du Karakoram au nord-ouest qui abrite le K2, second point le plus élevé du globe (8611 m). Au nord du territoire, le bassin de Dzungarie, bordé par les chaînes du Tian Shan et de l'Altai, s'ouvre sur le désert de Gobi à l'est et sur le Kazakhstan à l'ouest. Des climats de types semi-aride ou désertique prédominent. De faibles précipitations, une importante évaporation, un climat sec ainsi que de grandes variations de températures caractérisent ainsi le Xinjiang.

La végétation est faiblement dense dans cette région. Celle-ci ne couvre en effet que 2,1 % du territoire alors que la moyenne nationale atteint 14 %. Le nombre d'espèces de plantes vasculaires, estimé à 4000, est ainsi relativement modeste (Pan et Zhang, 2002). Néanmoins, les grandes disparités environnementales rencontrées confèrent à cette région une biodiversité importante associée à une richesse taxonomique réelle. Environ 800 genres repartis dans plus de 160 familles sont en effet recensés (Pan et Zhang, 2002). De nombreuses espèces endémiques ont été rapportées et 360 nouvelles espèces ont été identifiées au cours des cinquante dernières années (Xueyu et al., 1998). Les conditions climatiques particulières de cette région ont également permis le développement d'une diversité génétique conséquente. De nombreux gènes de résistance à la sécheresse, aux températures extrêmes ou à la salinisation ont ainsi été caractérisés.

La situation écologique du Xinjiang tend cependant à se dégrader. La pression humaine, la sécheresse, la désertification ainsi que la salinisation des sols sont ainsi responsables d'une régression de la biodiversité de cette région. Des mesures de protection ou de restauration des écosystèmes ont été prises et 21 réserves naturelles ont été aménagées. Des programmes de recensement des espèces ont également été engagés (Pan et Zhang, 2002).

II. Histoire du Xinjiang et du peuple ouïghour

La situation géographique du Xinjiang en a fait une zone importante de passage et d'échange, située à la confluence des itinéraires empruntés par la célèbre route de la soie. L'histoire complexe de cette région ainsi que les multiples vagues de colonisations qui se sont succédé expliquent également sa grande diversité culturelle et ethnique. En effet, pas moins de 20 ethnies, officiellement reconnues par la Chine, peuplent le Xinjiang. Si certains groupes sont largement minoritaires comme les Tadjiks, les Ouzbeks ou encore les Russes, les peuples kazakhs, kirghizes, huis ou mongols sont significativement représentés. Les deux ethnies majoritaires restent cependant les Ouïghours et les Hans représentant respectivement 46 et 39,2 % de la population en 2000 (Annuaire statistique du Xinjiang, 2002).

Le Xinjiang est depuis fort longtemps essentiellement peuplé de turcophones devenus musulmans au sein desquels les Ouïghours sont majoritaires. Ce peuple fait à l'origine partie d'une coalition de tribus nomades Turks : les Oghouz, et réside dans la région de l'Orkhon (Mongolie) (Mackerras, 1973) vers le milieu du VIII^e siècle. Suite à leur victoire face au Kökturks en 744, les Ouïghours prennent le contrôle de la région et constituent pendant un siècle le Khanat ouïghour, un empire qui s'étend jusqu'à l'extrême est de la Chine. Défaits par les Kirghizes en 844, ils émigrent vers le nord-ouest pour se sédentariser dans la région de Turfan et dans le nord du bassin du Tarim. Se mélangeant peu à peu aux populations indo-européennes locales, ils créent un état qui perdurera jusqu'à la fin du XIII^e siècle. Ils y développent une brillante civilisation et amorcent ainsi la turquisation de la région (Castets, 2004).

Sur le plan religieux, le manichéisme, le bouddhisme ou le christianisme nestorien sont alors pratiqués. L'islamisation de la région sera plus tardive. Cette religion se répand tout d'abord au X^e siècle sur les marches occidentales de la région avec la conversion des Karakhanides, première dynastie islamique turque, dont l'empire est situé entre l'Ouzbékistan actuel et la Kachgarie. Au XII^e siècle, les Karakhitays renversent les Kharakanides (Mackerras, 1973) et les Ouïghours se soumettent volontairement à ce peuple mongol, majoritairement bouddhiste. L'Islam continue cependant de progresser dans la région grâce à un processus de diffusion suivant les voies commerciales ainsi que par l'action prosélyte de certaines confréries centrasiatiques. En 1209, le Royaume ouïghour accepte la suzeraineté de Gengis Kahn qui domine l'Eurasie. En 1320, le Xinjiang, baptisé Turkestan oriental par les

auteurs arabes des XII^e et XIII^e, passe sous le contrôle total des Djaghataïdes, héritiers de Gengis Kahn. La conversion quasi-générale de la région à l'islam est ainsi achevée sous cette dynastie mongole de confession musulmane. La domination mongole du Turkestan dure plusieurs siècles et la dénomination ouïghoure disparaît. Les populations de la région se désignent alors comme faisant partie du « peuple musulman » ou bien comme ressortissant d'une oasis en particulier (Castets, 2004).

L'hégémonie mongole prend fin au milieu du XVIII^e siècle. Les mongols Oïrats, qui dominent la région, sont renversés par l'empire mandchou Qing. Cet empire chinois exerça dans un premier temps une mode d'administration indirect considérant le Xinjiang comme une colonie. Les révoltes musulmanes se succèdent jusqu'à la libération de la région en 1863 donnant ainsi naissance à un nouveau royaume indépendant. En 1884 la région est reconquise par la Chine et cette fois-ci intégrée en tant que province. C'est à cette époque que l'appellation Xinjiang apparaît, signifiant littéralement « nouvelle frontière » en chinois. Cependant, les populations locales peinent encore à accepter le contrôle chinois et sous l'influence d'un nationalisme grandissant, l'ethnonyme ouïghour réapparaît (Kellner, 2001). Le Xinjiang se soulève à nouveau et obtient à deux reprises l'indépendance fondant la République islamique du Turkestan oriental de 1933 à 1934 puis la seconde république du Turkestan oriental de 1944 à 1949. La République populaire de Chine reprend le contrôle de la région dès sa création en 1949 et engage un vaste processus de colonisation démographique. La proportion de Hans, ethnie chinoise « traditionnelle », dans la population du Xinjiang passe ainsi de 6 % en 1949 à plus de 40 % en 2000 (Annuaire statistique du Xinjiang, 2002).

Le Xinjiang a donc longtemps échappé au domaine impérial chinois et l'histoire de cette région a été largement découplée de celle de la Chine. Le peuple ouïghour entretient ainsi une communauté ethnique, linguistique, religieuse et culturelle avec l'Asie centrale et une partie du monde arabe plutôt qu'avec la Chine. Ce phénomène concerne également la médecine ouïghoure qui se singularise de la médecine traditionnelle chinoise pour présenter des analogies avec les pratiques arabo-persanes.

III. La médecine traditionnelle ouïghoure

L'OMS définit la médecine traditionnelle comme étant « la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales. » (OMS, 2000).

La médecine ouïghoure est directement inspirée de la théorie d'équilibre humoral popularisée par Hippocrate dans la Grèce antique. Elle considère que quatre éléments incluant l'air, l'eau, la terre et le feu coexistent dans la nature. Ces éléments correspondent à quatre fluides essentiels ou humeurs (*hilit* en ouïghour) : le sang, la lymphe, la bile noire et la bile jaune (Kan, Belghem, Savda et Sapra) (Fig. 2), tous produits au niveau du foie et ensuite distribués dans l'organisme (Upur et al., 2004). La santé est ainsi préservée par l'équilibre de ces fluides et tout excès ou carence d'un ou de plusieurs de ces fluides génère un déséquilibre qui affecte le métabolisme et provoque la maladie (Tableau I). Dans ce système, quatre qualités (chaud, froid, sec et humide) sont associées aux éléments et aux fluides essentiels. Les aliments et les remèdes sont classés en fonction de ces qualités, ce qui permet d'établir des mises en relation thérapeutiques.

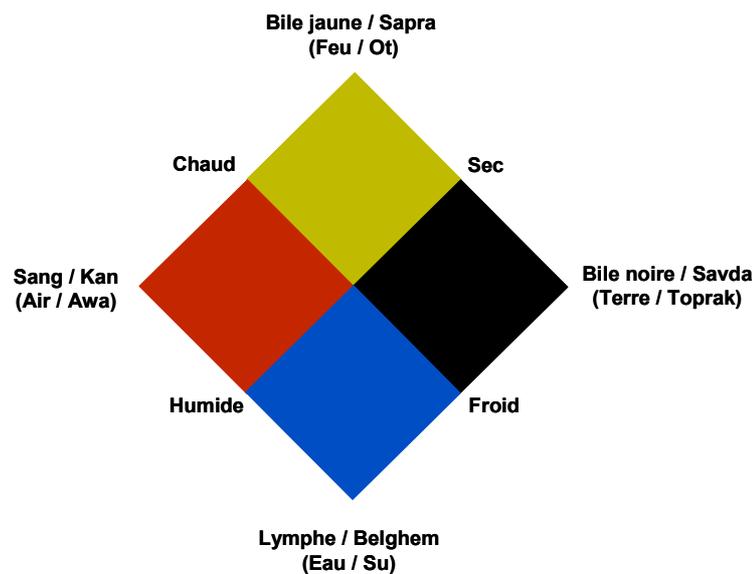


Figure 2. Théorie humorale de la médecine ouïghoure

Tableau I. Relations entre humeurs et physiologie
Adapté de Lapham, 2005

Eléments	Fluides	Caractères	Actions	Organes contrôlés
Ot/Feu	Sapra/Bile jaune	Sec et chaud	<ul style="list-style-type: none"> - Permet le péristaltisme intestinal et aide à la digestion des graisses. - Maintient la température corporelle en régulant le froid et l'humidité - Apporte la force et la croissance 	Cœur
Awa/Air	Kan/Sang	Chaud et humide	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilise le métabolisme, les reins et les poumons - Influence la lymphe et la bile noire - Responsable du métabolisme et de la croissance 	Foie, muscles, œsophage, duodénum, estomac
Su/Eau	Belghem/Lymphe	Humide et froid	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle la bile jaune et apporte le liquide au sang - Apporte la force et canalise l'énergie - Permet l'excrétion des métabolites 	Estomac, cerveau, reins, poumon, moëlle épinière
Toprak/Terre	Savda/Bile noire	Froid et sec	<ul style="list-style-type: none"> - Maintient la forme et l'activité des organes - Action sur la mémoire - Influence sang et lymphe - Régule la synthèse des substances 	Vessie, intestin, rate, téguments, os, tendons, ligaments

Selon la médecine ouïghoure, chaque individu possède son propre équilibre, hérité de sa généalogie. La nourriture, le climat ou encore la qualité d'éventuels traitements influenceront cependant cet équilibre durant l'existence de l'individu. Le diagnostic ouïghour aura pour but de mettre en évidence d'éventuels déséquilibres. Il s'agit d'un diagnostic clinique prenant en compte à la fois les symptômes et les antécédents du malade. Il fait intervenir la palpation du pouls ainsi que l'examen de la langue, de la peau, des urines et des selles (Upur et al., 2004). Le principe du traitement consistera ensuite à administrer des substances permettant de corriger les déséquilibres. Un mode de vie sain est également considéré comme prépondérant au bon équilibre de l'organisme. La médecine ouïghoure apporte ainsi six conseils essentiels : 1) Se battre pour vivre est nécessaire, 2) La nourriture doit être équilibrée, qualitativement et quantitativement. Une bonne alimentation peut ainsi garantir la santé, 3) Repos et activité doivent être correctement équilibrés, 4) La bonne humeur et l'optimisme sont importants, 5) Le corps doit rester pur. La consommation d'alcool ou de tabac est interdite, 6) Lorsque l'âge de soixante ans est atteint, les caractéristiques énergétiques des fluides essentiels sont modifiées. Ainsi, les systèmes respiratoires et digestifs ainsi que les fonctions cardiaques et rénales sont plus vulnérables (Lapham, 2005).

Les pratiques traditionnelles ouïghoures font partie des rares médecines alternatives officiellement reconnues à travers le monde. Ainsi, bien qu'ayant en partie adopté les pratiques occidentales, le Xinjiang est également pourvu d'hôpitaux de médecine traditionnelle ouïghoure où la phytothérapie est largement pratiquée (Fig. 3).



Figure 3. Préparatoire de l'hôpital de médecine traditionnelle ouïghoure d'Urumqi (collection personnelle).

Plus de 200 espèces végétales traditionnellement utilisées sont notamment répertoriées dans une Pharmacopée. Les différentes monographies décrivent la composition chimique, les propriétés biologiques ainsi que les caractères macroscopiques et microscopiques de chaque espèce. Les périodes de récoltes, les procédés de préparation ainsi que les indications sont également rapportés. Les modes de préparations décrits sont très majoritairement des infusions ou des décoctions administrées par voie orale.

Certaines prescriptions n'utilisent qu'une seule plante. Néanmoins, des recettes plus complexes correspondant à des mélanges de plusieurs drogues sont fréquemment rapportées. Des synergies d'action ou des potentialisations d'effets pourraient ainsi avoir lieu. Il est cependant important de remarquer qu'un nombre limité de composants cibleraient l'étiologie de la maladie. Les autres éléments auraient pour rôles de limiter les effets indésirables ou encore d'améliorer les qualités organoleptiques de la préparation (Dr Mourboul Ablise, communication personnelle).

De nombreuses préparations sont utilisées pour le traitement de troubles cardiovasculaires et en particulier de l'hypertension artérielle (HTA). Selon les principes ouïghours, de telles pathologies résultent d'une élévation anormale de la « *savda* » (bile noire). Le traitement se déroule en deux phases. Une première étape dénommée « *munziq* » a pour objectif d'entraîner la « maturation » de l'agent causant c'est-à-dire de l'humeur responsable. D'une durée d'environ une semaine, le « *munziq* » permettrait ainsi de sensibiliser l'organisme avant la mise en place de la deuxième phase du traitement : le « *mushil* ». Cette étape, plus longue, vise à rétablir l'équilibre humoral (Dr Mourboul Ablise, communication personnelle).

Partie 2. L'hypertension artérielle

I. Définition et épidémiologie

La pression sanguine est la pression exercée par le sang sur la paroi d'un vaisseau sanguin. Dans la pratique clinique, on considère généralement la pression artérielle (PA) qui correspond alors à la pression dans les artères systémiques. Chez l'adulte jeune au repos en position couchée, la pression artérielle systolique (PAS) est comprise entre 110 et 140 mmHg et la pression artérielle diastolique (PAD) entre 60 et 85 mmHg. L'HTA correspond à une élévation anormale et persistante de la PA. Selon les critères de l'OMS, un individu est considéré hypertendu lorsqu'il présente une PAS supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou une PAD supérieure ou égale à 90 mmHg (OMS, 1999). Différents niveaux de gravité ont également été définis (Tableau II).

Tableau II. Classification de l'HTA selon l'OMS (OMS, 1999).

Catégories d'HTA	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Optimale	< 120	< 80
Normale	120-129	80-84
Normale haute	130-139	85-89
Hypertension grade 1	140-159	90-99
Hypertension grade 2	160-179	100-109
Hypertension grade 3	> 180	> 110
Hypertension systolique isolée	> 140	< 90

L'HTA représente un problème de santé publique considérable au niveau mondial. Affectant aujourd'hui plus d'un quart de la population adulte soit près d'un milliard de personnes, les projections prévoient que la proportion d'hypertendus atteindra 29 % en 2025 soit 1,56 milliard d'individus (Kearney et al., 2005). Parce qu'elle représente le plus important facteur de risque de maladies cardiovasculaires (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde, décès d'origine coronarienne) et d'insuffisance rénale, l'HTA constitue l'une des principales causes de mortalité dans le monde. En 2001, elle a ainsi

provoqué la mort d'environ 7,6 millions d'individus soit 13,5 % de la totalité des décès (Lawes et al., 2008).

Des données épidémiologiques révèlent que la proportion d'hypertendus est plus élevée dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, avec des prévalences respectives de 37,3 % et 22,9 % en 2000 (Fig. 4, Kearney et al., 2005). Cependant, les nombres d'hypertendus et de décès d'origine cardiovasculaire sont en constante augmentation dans les pays émergents. En Chine, la prévalence de l'HTA a quadruplé entre 1959 et 2002, pour atteindre 19 % de la population adulte soit près de 153 millions d'individus (Gu et al., 2002 ; Wu et al., 2008). En l'absence de mesures sanitaires efficaces, cette valeur pourrait même dépasser 27 % en 2025 (Kearney et al., 2005) (Fig. 4). Le diagnostic, le traitement et le contrôle de l'HTA sont en effet très perfectibles dans ce pays. On estime ainsi que l'HTA n'est diagnostiquée que pour un quart des cas. De plus, bien que 80 % des hypertendus identifiés reçoivent un traitement, celui-ci n'est efficace que pour 25 % des patients. Ainsi, sur les 153 millions de chinois hypertendus, moins de 7 millions atteindraient les objectifs tensionnels (Wu et al., 2008).

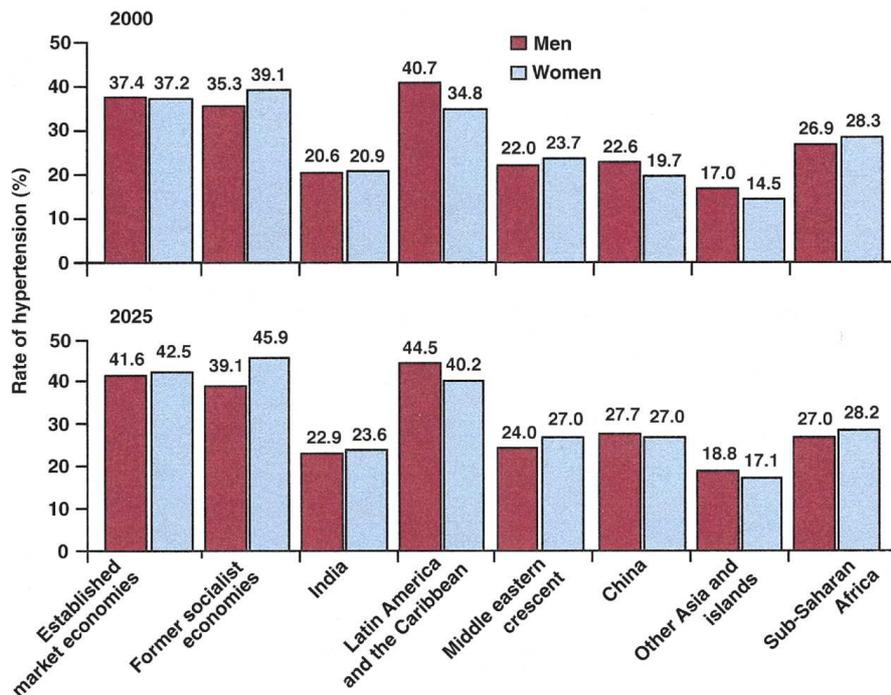


Figure 4. Prévalence de l'HTA par région du globe et par sexe en 2000 et 2025 (Kearney et al. 2005).

Peu de données sont disponibles concernant le Xinjiang ou la population ouïghoure. Une étude de 2010 (Liu et al., 2010) estime que la prévalence de l'HTA atteindrait 36,2 % dans ce territoire. Cette valeur conséquente, nettement supérieure à la moyenne nationale, symbolise l'impact important de l'HTA dans la région. Il faut cependant relativiser ces chiffres puisque l'enquête porte sur une population âgée de plus de 35 ans et non sur la population adulte totale. On remarque cependant une prévalence disproportionnée dans la population kazakh en comparaison avec l'ethnie han ou ouïghoure, avec des pourcentages respectifs de 48,7 %, 33,4 % et 28,5 %. Des facteurs génétiques ainsi que l'alimentation pourraient être incriminés.

Ces chiffres alarmants soulignent la gravité de la situation à l'échelle mondiale, nationale ou régionale. Ce phénomène est pourtant récent. En effet, au début du siècle précédent, hypertension et maladies cardiovasculaires ne représentaient qu'une cause mineure de mortalité. Le subit accroissement de l'impact de ces pathologies peut principalement être imputé à des modifications des facteurs de risques environnementaux tels que l'alimentation ou encore une baisse de l'activité physique. La réduction de la prévalence de l'HTA est ainsi devenue un objectif prioritaire de santé publique. Des améliorations du diagnostic, des traitements et du contrôle de cette condition mais aussi de la prévention par le biais de modifications du mode de vie doivent ainsi être envisagées.

II. Physiopathologie de l'hypertension artérielle

II.1. Généralités

La PA est définie comme le produit du débit cardiaque (DC, dépendant de la fréquence cardiaque (FC) et du volume d'éjection systolique (VES)) par les résistances vasculaires périphériques (RVP) : $PA = DC \times RVP = (FC \times VES) \times RVP$.

Par conséquent l'élévation de la PA peut résulter :

- d'une augmentation du DC, elle-même consécutive à une augmentation de la FC ou de la volémie.
- d'une augmentation des RVP, consécutive à un phénomène de vasoconstriction.

Plusieurs systèmes physiologiques interdépendants permettent la régulation de la PA (Fig. 5). On distingue globalement une régulation rapide d'origine nerveuse et une régulation à moyen ou long terme de type hormonale ou rénale. Les réactions nerveuses mettent en jeu les barorécepteurs, les chémorécepteurs et la réponse ischémique du système nerveux central. Elles permettent ainsi de compenser une modification de la PA en agissant sur la vasomotricité et le DC *via* les systèmes sympathique et parasympathique (Cowley et al., 1973). La régulation hormonale fait principalement intervenir le système rénine-angiotensine-aldostérone et l'hormone anti-diurétique. Le contrôle de la pression s'effectue alors par un ajustement de la vasomotricité et de la volémie. La régulation de la PA à long terme est déterminée par le rein. Celui-ci est capable d'induire une modification de la volémie par l'intermédiaire du mécanisme passif de « diurèse de pression ».

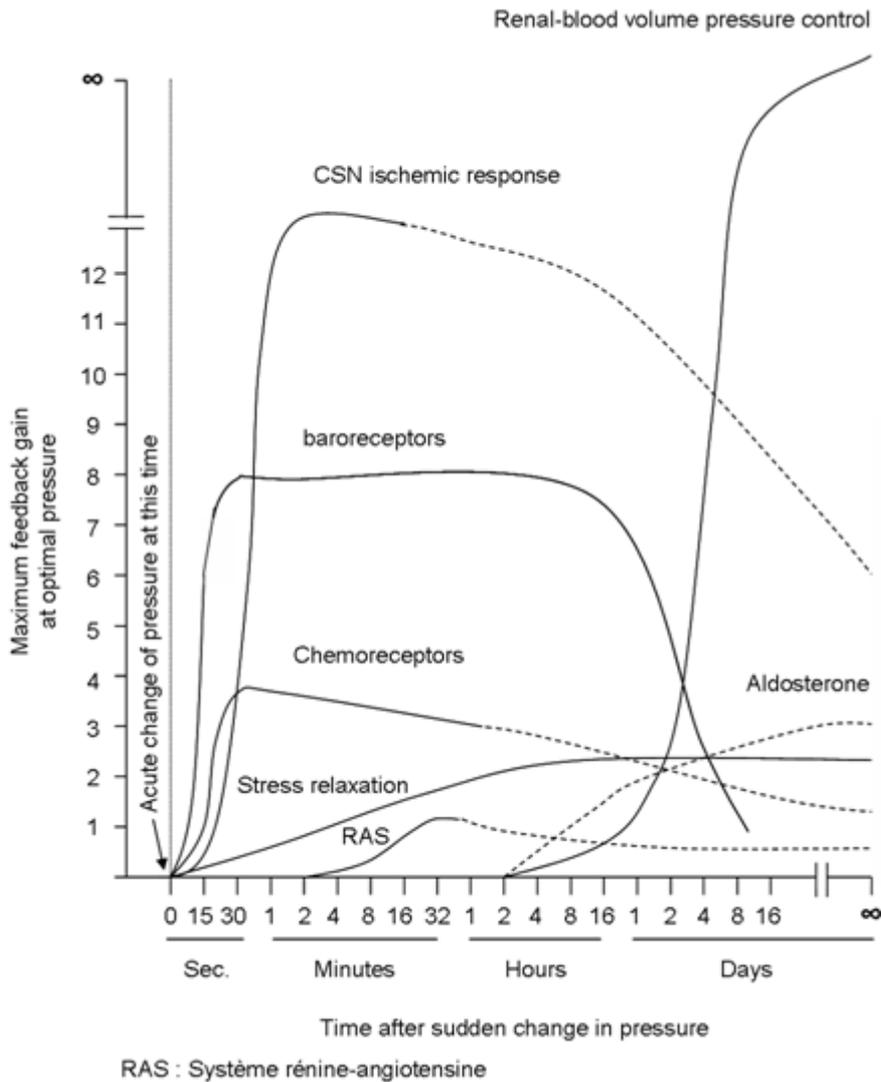


Figure 5. Mécanismes de contrôle de la pression artérielle (selon Guyton, 1986).

Le dérèglement de certains de ces systèmes régulateurs peut intervenir dans le développement de l'HTA. Néanmoins, chez la majorité des hypertendus, aucun facteur étiologique spécifique ne peut être mis en évidence, on parle alors d'HTA primaire ou essentielle. À l'inverse, on distingue l'HTA secondaire lorsqu'une étiologie a été clairement identifiée.

II.2. L'hypertension artérielle essentielle

L'HTA essentielle concerne 90 à 95 % des cas. Il existe cependant beaucoup d'incertitudes concernant la physiopathologie de ce type d'HTA. En effet, cette maladie ne relève pas d'un agent étiopathogénique unique et simple. Il est ainsi probable qu'un grand nombre de facteurs interdépendants soient impliqués et que leurs rôles diffèrent selon les individus. Néanmoins, plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer l'élévation de PA dans l'HTA essentielle. Celles-ci font intervenir des mécanismes neurologiques, hormonaux, rénaux ou vasculaires.

L'activation du système sympathique induit une tachycardie et une vasoconstriction via la production de catécholamines. Une hyperactivité sympathique pourrait ainsi expliquer certaines HTA essentielles. En effet, l'action hypotensive de nombreux médicaments inhibant le système nerveux sympathique, l'hypersensibilité aux catécholamines de certains hypertendus ou encore l'existence d'une augmentation des catécholamines plasmatiques dans certaines HTA essentielles tendent à souligner l'importance du système sympathique dans le développement de l'HTA (De Quatro et Chan, 1972).

En réponse à une élévation de la PA, l'activation des barorécepteurs conduit à une relaxation vasculaire et à un ralentissement de la fréquence cardiaque en réduisant l'activité du système sympathique et en stimulant le parasympathique. Certaines HTA pourraient être consécutives à une diminution de la sensibilité des barorécepteurs dont la réponse serait inadaptée au niveau tensionnel (Head, 1995).

L'HTA pourrait avoir une origine rénale (De Wardener, 1990). Des transplantations rénales croisées chez des rats hypertendus et normotendus ont permis de mettre en évidence l'importance de cet organe dans l'HTA (Kawabe et al., 1978). En effet, un rein prélevé sur un

rat de souche hypertendue et transplanté à un animal binéphrectomisé de souche normotendue élève la PA de ce dernier. À l'inverse, un rein de souche normotendue mis en place chez un animal de souche hypertendue prévient l'hypertension si le receveur est jeune et réduit la pression si le receveur est déjà hypertendu. Un dysfonctionnement du système rénine-angiotensine-aldostérone et une production excessive d'angiotensine II pourraient également induire l'HTA. Dans ce système, la rénine agit sur l'angiotensinogène pour libérer l'angiotensine I qui, grâce à une enzyme de conversion se transforme en angiotensine II. L'angiotensine II constitue un puissant agent vasoconstricteur. Elle induit de plus la sécrétion d'aldostérone augmentant ainsi la rétention hydrosodée et donc la volémie (Beever et al., 2001). Une incapacité du rein à excréter le sodium pourrait aussi être impliquée dans certains cas. L'excès de sel s'accompagne en effet d'une hypervolémie plasmatique et, de ce fait, d'une augmentation du DC. Il survient secondairement une vasoconstriction artériolaire réflexe, pérennisée par l'augmentation du tonus sympathique, et une hyper-réactivité vasculaire à l'angiotensine II. (Timmis et Nathan, 1997).

L'HTA peut également être la conséquence d'une altération de la distensibilité des artères de conductance, notamment de l'aorte. Ce trouble de la compliance explique l'élévation de la PAS fréquemment observée chez le sujet âgé.

II.3. L'hypertension artérielle secondaire

L'HTA secondaire concerne les 5 à 10 % de cas restants. Plusieurs causes curables ou non peuvent être responsables. Celles-ci sont rapportées dans le Tableau III, dans lequel on remarquera que les effets secondaires de certains traitements médicamenteux ou la consommation de substances hypertensives sont majoritairement impliqués. Ce type d'hypertension peut également être la conséquence de dysfonctions rénales ou endocriniennes ainsi que d'anomalies vasculaires (ANAES 2000).

Tableau III. Causes d'HTA secondaires par ordre décroissant de fréquence (selon ANAES, 2000).

1. Produits ou médicaments pouvant favoriser ou aggraver l'HTA ou déséquilibrer une HTA traitée	<ul style="list-style-type: none"> → Alcool → Oestrogènes de synthèse, en particulier les contraceptifs oraux → Sympathomimétiques comme les vasoconstricteurs nasaux → Réglisse → Anti-inflammatoires non stéroïdiens → Corticostéroïdes → Ciclosporine → Erythropoïétine → Cocaïne
2. Maladies rénales parenchymateuses	
3. Sténoses artérielles rénales	
4. Maladies endocriniennes	<ul style="list-style-type: none"> → Hyperaldostéronisme primaire → Hypo et hyperthyroïdie → Syndrome de Cushing → Phéochromocytome → Acromégalie
5. Coarctation de l'aorte	
6. Formes monogéniques rares d'HTA	<ul style="list-style-type: none"> → Syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïde → Syndrome de Liddle → Hyperaldostéronisme sensible aux glucocorticoïdes → Syndrome de Gordon

II.4. Facteurs de risque

Plusieurs circonstances statistiquement associées à la survenue d'HTA ont été identifiées et constituent des facteurs de risque. Certains facteurs, relatifs à l'environnement, aux habitudes alimentaires ou encore au mode de vie, peuvent être modifiés. D'autres sont associés à des conditions telles que l'âge, le sexe ou encore la génétique.

II.4.1. Facteurs de risque modifiables

- **L'alimentation** : l'hygiène alimentaire est un paramètre majeur dans le contrôle de la PA. Les effets bénéfiques ou délétères de nombreux nutriments et aliments ont ainsi été mis en évidence. Tout d'abord, une consommation sodée excessive constitue un facteur de risque important. Une étude chinoise a ainsi défini qu'une réduction de la consommation de sel sur 4 ans était suivie d'une diminution de la pression artérielle de 3 mmHg (Tian et al., 1995). Inversement, l'apport potassique présente des effets positifs. En effet, une analyse de Gu (Gu et al., 2001) a démontré que dans une population chinoise dont l'alimentation est habituellement riche en sodium et pauvre en potassium, une supplémentation potassique de 60 mM/jour pendant 12 semaines était associée à une baisse de la PAS de 5 mmHg. La consommation chronique d'alcool constitue également un facteur de risque. Une consommation supérieure à 2 verres par jour s'accompagne ainsi d'une élévation de la PAS (Klatsky, 2004). Enfin, une alimentation trop riche en acides gras saturés et pauvre en polyinsaturés augmente le risque de développer de l'HTA. Inversement, une augmentation de la consommation d'acides gras polyinsaturés prévient l'augmentation de la PA (Grynberg, 2005).

- **le surpoids** : la relation entre HTA et obésité ou surpoids a été établie. On peut d'ailleurs remarquer que l'élévation brutale de l'indice de masse corporelle moyen de la population chinoise est impliqué dans l'accroissement de la prévalence de l'hypertension en Chine (Ahn et al., 2011).

- **le diabète** : le pourcentage d'hypertendus est de 1,5 à 3 fois plus élevé en cas de diabète (Stévenin et al., 2002).

- **la sédentarité** : l'activité physique est associée à une diminution de la PA et cela indépendamment d'une quelconque perte de poids (Whelton et al., 2002).

- **le tabagisme** : fumer multiplie par 2 ou 3 le risque de développer une HTA. Cependant, cette augmentation du risque diminue rapidement après l'arrêt du tabagisme (retour à la normale en 2 à 3 ans) (Sleight, 1993).

II.4.2. Facteurs de risque non modifiables

- **l'âge** : la PA augmente avec l'âge.
- **le sexe** : à âge égal, la PA des hommes est en moyenne supérieure à celle des femmes. Cependant, ce rapport est inversé après la ménopause qui est associée à une augmentation conséquente du niveau tensionnel (Reckeloff, 2001).
- **l'hérédité** : l'existence d'une influence génétique du niveau de la PA a été confirmée par de nombreuses études. Il a ainsi été démontré que 30 % de la variation de la pression artérielle est génétiquement déterminée (Ward, 1995).

III. Fonction vasculaire

L'augmentation du DC peut parfois jouer un rôle précoce dans la pathogénie de l'HTA. Cependant, lorsque la maladie hypertensive est installée, le facteur principal de l'HTA est presque obligatoirement une résistance périphérique inadaptée (Timmis et Nathan, 1997). L'état de contraction de l'appareil vasculaire constitue ainsi la cible privilégiée de nombreuses thérapies antihypertensives. La compréhension des mécanismes intrinsèques régissant sa motricité est donc indispensable.

III.1. Structure des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins constituent un réseau fermé de conduits assurant le transport et la répartition du sang dans l'organisme. Les artères et artérioles acheminent ainsi le sang du cœur aux tissus. Les propriétés fonctionnelles diffèrent selon le calibre des artères : fonction de conduction du sang et d'amortissement de la pulsativité artérielle pour les artères de gros calibre, et fonction de distribution du débit sanguin et de résistance à l'écoulement pour les petites artères et artérioles. Les capillaires permettent ensuite les échanges de gaz et de nutriments au niveau des tissus. Enfin, veines et veinules garantissent le retour du sang vers le cœur et assurent des fonctions de stockage sanguin. Par opposition au système à haute pression constitué par le réseau artériel, le système veineux est un système à basse pression.

La constitution, le diamètre et l'épaisseur des vaisseaux sanguins diffèrent selon leurs fonctions. Cependant, ceux-ci présentent invariablement la même organisation en trois couches tissulaires concentriques ou tuniques superposées. L'**intima** correspond ainsi à la partie interne d'un vaisseau. Elle est constituée d'une couche de cellules endothéliales formant l'endothélium vasculaire qui repose sur une lame basale constituée de collagène et de mucopolysaccharides. L'intima est entourée par la **média**. Des fibres d'élastine ainsi que de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) entrent dans la composition de cette couche tissulaire. Enfin, l'**adventice** correspond à la tunique externe du vaisseau sanguin. Celle-ci est principalement constituée de collagène assurant un rôle protecteur. Des fibres nerveuses sympathiques ainsi qu'une vascularisation appelée *vaso vasorum* sont également présents (Fig. 6).

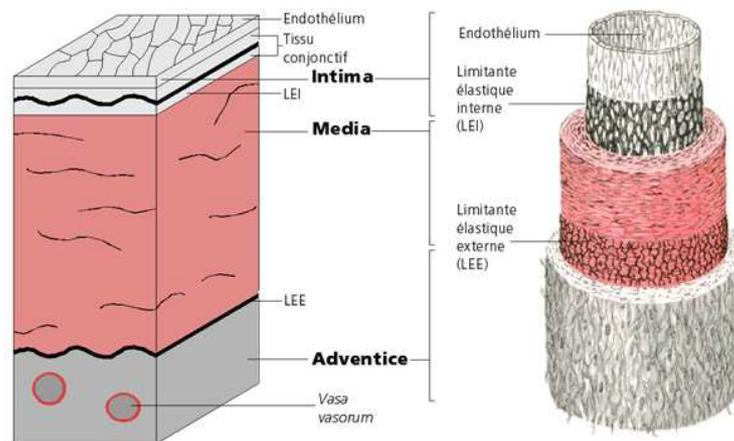


Figure 6. Structure de la paroi vasculaire d'après Histologie humaine, Stevens et Lowe (1997)

III.2. Contraction des CMLVs

Les fibres musculaires lisses présentes dans la média des différents vaisseaux contrôlent activement le tonus vasculaire. Elles modulent ainsi la perfusion des organes et des muscles en adaptant le diamètre des vaisseaux aux besoins l'organisme. L'état de contraction de ces myocytes est notamment déterminé par la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique ainsi que par la sensibilité de l'appareil contractile.

III.2.1. Mécanisme moléculaire de la contraction

La contraction musculaire, indépendamment du type de cellule impliqué, est la conséquence d'interactions entre des filaments d'actine et de myosine. Les CMVLs se singularisent cependant par l'absence de troponine C, protéine régulatrice essentielle des cellules musculaires squelettiques et cardiaques. Dans le cas du muscle lisse, la mise en place des ponts actine-myosine nécessaires à la contraction est induite par un changement de conformation de la myosine (Adelstein et Conti, 1975 ; Gallagher et al., 1997). Celui-ci implique la phosphorylation de cette protéine par la kinase des chaînes légères de la myosine (KCLM). Cette enzyme est directement influencée par la concentration cytosolique en Ca^{2+} , élément clef de la contraction musculaire. Cet ion est en effet capable d'activer la KCLM par l'intermédiaire d'un complexe qu'il forme avec la calmoduline. Une deuxième enzyme, la phosphatase des chaînes légères de la myosine (PCLM) entre en compétition avec la kinase (Fig. 7). Elle peut, par déphosphorylation, inactiver la myosine et ainsi s'opposer à la contraction. Contrairement à la KCLM, l'activation de cette enzyme est indépendante de la concentration calcique.

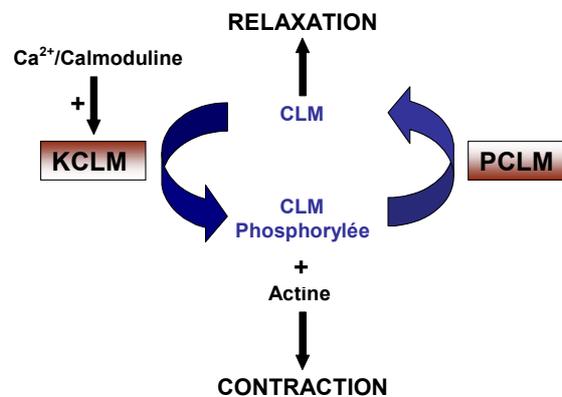


Figure 7. Mécanisme de la contraction des CMLVs
 CLM: chaînes légères de la myosine ; KCLM : kinase des chaînes légères de la myosine ;
 PCLM: phosphatase des chaînes légères de la myosine

III.2.2. Activation des CMLVs dépendante du calcium

Le Ca^{2+} d'origine extracellulaire ou sarcoplasmique peut être mobilisé par les CMLVs pour augmenter la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} et ainsi provoquer la contraction musculaire. À l'état basal, ces cellules présentent une concentration intracellulaire en Ca^{2+} de l'ordre de $0,1 \mu M$. Il existe ainsi un gradient de concentration favorable par rapport au

compartiment extracellulaire (1 à 2 mM) ou au réticulum sarcoplasmique (10 à 15 mM). Cependant, la diffusion passive du calcium à travers la bicouche lipidique est négligeable et différents mécanismes de transport permettent le maintien de ce gradient. Ainsi, la hausse du Ca^{2+} cytoplasmique implique l'activation de transporteurs membranaires. Elle peut résulter d'une initiation électro-mécanique ou pharmaco-mécanique (Fig. 8). Ces deux systèmes sont interdépendants et agissent de manière synergique (Webb, 2003).

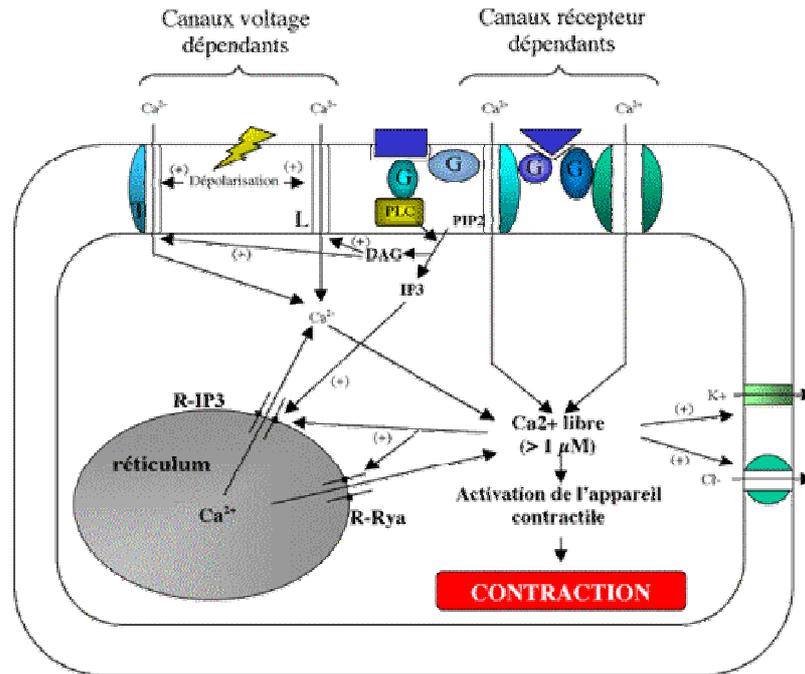


Figure 8. Mécanisme de la contraction Ca^{2+} -dépendante des CMLVs

PLC : phospholipase C ; PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; DAG : diacylglycérol ; IP3 : l'inositol 1,4,5-trisphosphate ; R-Rya : récepteurs canaux sensibles à la Ryanodine

□ Couplage électro-mécanique

L'initiation de type électro-mécanique est associée à une dépoliarisation du potentiel membranaire. Elle induit l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants (CCVDs) permettant ainsi l'influx du Ca^{2+} extracellulaire. Des CCVDs de type T (« transient ») et de type L (« long-lasting ») ont pu être identifiés dans les myocytes vasculaires. L'activation des canaux de type T nécessite une dépoliarisation modérée, cependant leur ouverture est éphémère (20 à 60 ms). Au contraire, les canaux de type L sont stimulés par de plus fortes dépoliarisations et sont inactivés moins rapidement (300 à 600 ms). L'initiation de type électro-mécanique est notamment largement impliquée dans le maintien du tonus myogénique

ainsi que dans la vasoconstriction artériolaire induite par une augmentation de pression (Webb, 2003).

Dépendant de la nature du vaisseau, le potentiel membranaire des CMLVs est fixé entre -45 et -70 mV. La modulation de celui-ci est assurée par des canaux perméables au Cl^- et au K^+ . L'activation des canaux Cl^- dépend du Ca^{2+} et permet la sortie de Cl^- . Il s'ensuit une dépolarisation de la membrane plasmique qui induit une augmentation du tonus vasculaire (Davis et al., 2001 ; Hill et al., 2001). Inversement, l'activation des canaux potassiques est associée à une sortie de K^+ , une hyperpolarisation et une relaxation vasculaire. Dans les CMLVs on distingue quatre principaux types de canaux K^+ incluant des canaux voltage-, ATP- et Ca^{2+} -dépendants ainsi que des canaux K^+ à rectification entrante (inward rectifier K channels) (Ko et al., 2008).

□ Couplage pharmaco-mécanique

L'initiation pharmaco-mécanique résulte de la liaison d'un agoniste à un récepteur spécifique. La contraction des vaisseaux de large diamètre est fortement dépendante de ce type d'initiation. Des ligands tels que la noradrénaline, l'angiotensine II, l'endothéline-1 ou le thromboxane A2 (TXA_2) peuvent ainsi activer différents récepteurs transmembranaires qui vont permettre la hausse du taux de Ca^{2+} cytosolique. Deux mécanismes distincts ont été identifiés.

Un premier processus résulte de la libération rapide et intense de Ca^{2+} d'origine sarcoplasmique (Webb, 2003) (Fig. 9). La stimulation de récepteurs couplés à une protéine hétérotrimérique $G\alpha/q$ permet l'activation d'une phospholipase C (PLC). Cette enzyme est alors capable d'utiliser le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) de la bicouche phospholipidique pour produire de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) (Nishizuka, 1995). L'IP3 formé va activer les récepteurs canaux de l'IP3 (R-IP3) présents au niveau du réticulum sarcoplasmique et ainsi libérer le Ca^{2+} selon son gradient de concentration (Chadwick et al., 1990). L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique permet dans un second temps l'activation de récepteurs canaux sensibles à la Ryanodine (R-Rya), également responsables de la libération du Ca^{2+} sarcoplasmique (Hisayama et al., 1990) (Fig. 8).

Un deuxième mécanisme est associé à une augmentation de Ca^{2+} cytosolique moins intense mais prolongée. Dans ce cas, un influx de Ca^{2+} d'origine extracellulaire est autorisé par l'ouverture de canaux calciques récepteurs dépendants (CCRDs). Ce concept de conductance calcique activée par la stimulation de récepteurs et indépendante de la dépolarisation membranaire fut développé il y a une quarantaine d'années (Somlyo et Somlyo 1968 ; Bolton 1979). Cependant, de nombreuses incertitudes subsistent encore quant à la nature ou au mécanisme de fonctionnement de ces canaux qui présenteraient de plus une importante variabilité selon le lit vasculaire. Il a été néanmoins déterminé que la plupart des agonistes stimulants la libération du Ca^{2+} intracellulaire (noradrénaline, endothéline-1, angiotensine II...) sont également capable d'activer des CCRDs. Il est également établi que le processus de transduction de ce type de réponse implique obligatoirement l'activation d'une protéine G (Komori et al., 1993 ; McFadzen et Gibson, 2002). Enfin, les CCRDs ne sont pas spécifiques de l'ion Ca^{2+} et présentent des degrés de sélectivité variables pour ce cation. L'abréviation CCRD pourrait ainsi, pour plus de précision, être redéfinie en canaux cationiques récepteurs dépendants (McFadzen et Gibson, 2002) (Fig. 8).

III.2.3. Activation des CMLVs indépendante du calcium

Indépendamment de la concentration calcique, différents mécanismes permettent une sensibilisation de l'appareil contractile. Ils provoquent ainsi l'apparition de la contraction musculaire pour de plus faibles taux de Ca^{2+} intracellulaire. L'inhibition de la PCLM et la phosphorylation de protéines régulatrices sont notamment impliquées.

La PCLM s'oppose, nous l'avons vu, à la contraction musculaire en inactivant la myosine par un processus de déphosphorylation (Fig. 7). Cette phosphatase peut cependant être inhibée par la protéine CPI-17 (Hilgers et Webb, 2005). Phosphorylée, cette petite protéine est en effet capable de se fixer sur le site actif de la PCLM entraînant son inactivation. Deux kinases, la kinase associée à Rho (Rho kinase) et la protéine kinase C (PKC), peuvent activer la protéine CPI-17. La Rho kinase est dépendante d'une petite protéine G : la RhoA qui peut être stimulée par différents agonistes tels que la noradrénaline ou l'angiotensine II. L'activation de la protéine kinase C nécessite quant à elle la présence de diacylglycerol ou d'acide arachidonique. Ainsi, qu'elle soit dépendante de la Rho-kinase ou de la PKC la phosphorylation de la protéine CPI-17 permet le maintien de l'état de

phosphorylation des CLM. Elle induit ainsi la prolongation de la contraction du muscle lisse (Hilgers et Webb, 2005).

III.3. Relaxation des CMLVs

La relaxation des cellules musculaires lisses peut résulter de l'arrêt du stimulus induisant la contraction ou de l'action directe d'un agent vasodilatateur. Dans les deux cas, ce processus est associé à une diminution de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire et/ou une baisse de la sensibilité de l'appareil contractile.

III.3.1. Mécanismes impliqués dans la baisse du Ca^{2+} intracellulaire

En aval de la cascade de transduction, la PCLM constitue l'effecteur final du processus de relaxation. L'activité de cette phosphatase n'est pas directement dépendante du Ca^{2+} . Cependant, la diminution de la concentration calcique intracellulaire induit un déplacement favorable de l'équilibre que cette phosphatase entretient avec la kinase des CLMs. La réaction de déphosphorylation de la myosine devient alors prédominante permettant ainsi la relaxation.

La modulation des échanges calciques avec le milieu extracellulaire est impliquée dans le processus de vasorelaxation. La Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique (Furukawa et al., 1988) induit l'efflux de Ca^{2+} vers l'extérieur de la cellule. Principale responsable de l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire, ce transporteur peut aussi provoquer la relaxation du muscle lisse. L'inhibition des CCVDs et des CCRDs, canaux essentiels au processus de contraction, est également associée à la dilatation vasculaire via une diminution de l'influx de Ca^{2+} extracellulaire.

Le recaptage du Ca^{2+} cytosolique dans le réticulum sarcoplasmique constitue un autre mécanisme important. Cette internalisation est accomplie par une pompe : la Ca^{2+} ATPase du réticulum sarco(endo)plasmique (SERCA). L'activation des SERCAs nécessite cependant la suppression de l'action inhibitrice exercée par une protéine : la phospholambane. Cette levée d'inhibition peut être accomplie par différentes protéines kinases incluant notamment la PKA et la PKG (MacLennan et al., 1985). Ces kinases sont activées par une

augmentation 3'-5'-adenosine monophosphate cyclique (AMPc) ou de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) intracellulaires, deux nucléotides cycliques respectivement produits par l'adényl cyclase (AC) et la guanylate cyclase (GC) soluble.

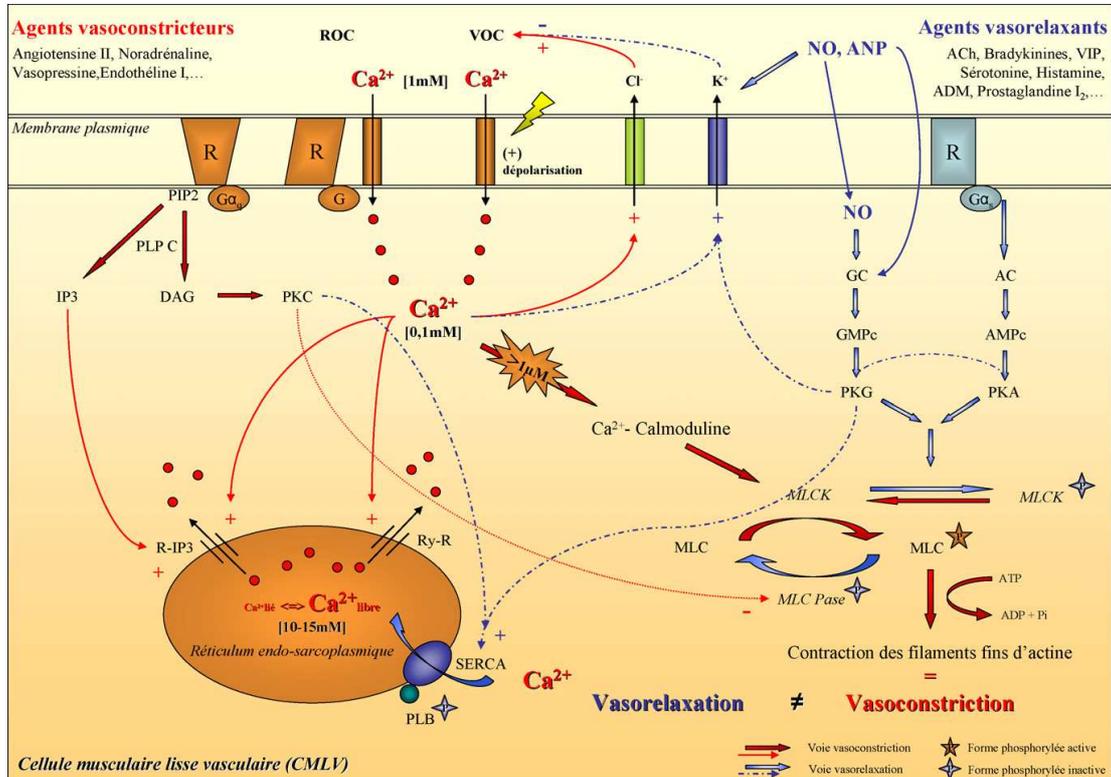


Figure 9. Mécanismes de la contraction de la CMLV (selon Collin et Levy, 2008)

VIP : peptide inhibiteur de la vasoconstriction (Vasoactive Inhibitor Peptide) ; ADM: adrénomédulline ; ANP : peptide natriurétique atrial ; Gαq : protéine G/sous-unité alpha de type q ; Gαs : protéine G/sous-unité alpha de type s ; PKC : protéine kinase C ; PKG : protéine kinase G ; PKA : protéine kinase A ; SERCA : Ca²⁺ ATPase du réticulum sarco(endo)plasmique ; PLB : phospholambane ; ROC : canaux récepteur-dépendants (Receptor Operated Channels) ; Ry-R : récepteur à la ryanodine ; VOC : canaux voltage-dépendants (Voltage Operated Channels)

Les enzymes régissant la production d'AMPc et de GMPc constituent une cible privilégiée pour de nombreux agents vasodilatateurs. Les protéines kinases dépendantes de ces nucléotides sont en effet impliquées dans de nombreux processus vasorelaxants. Outre leur action sur les SERCAs, elle peuvent inhiber les récepteurs à l'IP3 et activer les pompes calciques transmembranaires (Wu et al., 1998). La PKG pourrait également induire l'ouverture des canaux potassiques Ca²⁺-dépendants provoquant ainsi une hyperpolarisation inhibitrice des CCVDs (Komori et Suzuki, 1987) (Fig. 10).

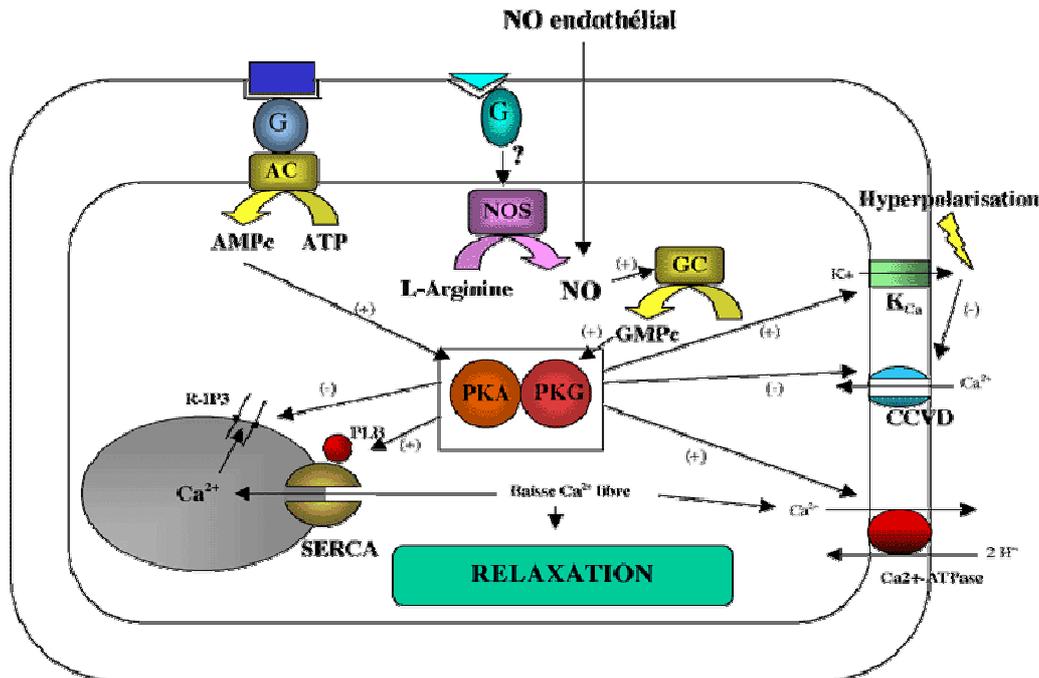


Figure 10. Mécanismes de la baisse du taux de Ca^{2+} cytosolique dans les CMLVs

AC : adényl cyclase ; NOS : NO synthase ; GC : guanylate cyclase ; PKG : protéine kinase G ; PKA : protéine kinase A ; SERCA : Ca^{2+} ATPase du réticulum sarco(endo)plasmique ; PLB : phospholambane , CCVD : canaux calciques voltage-dépendants

La stimulation de la conductance potassique répond à de nombreux agonistes vasodilatateurs ainsi qu'à certains stimuli physico-chimiques. S'opposant à l'influx calcique par les CCVDs, l'activation de chacun des quatre principaux types de canaux K^+ identifiés dans les CMLVs constitue un moyen efficace d'induire la relaxation du muscle lisse vasculaire. Cependant, les fonctions de ces canaux sont distinctes.

Les canaux $\text{K}^+ \text{Ca}^{2+}$ -dépendants de grande conductance (BKCa) sont activés par une modification de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire mais également par une dépolarisation membranaire. Ces canaux sont considérés comme des acteurs importants dans le maintien du potentiel membranaire des cellules de vaisseaux de faible calibre (Ko et al., 2008). Les canaux K^+ voltage-dépendants sont uniquement stimulés par la dépolarisation du potentiel membranaire. Leur rôle consiste principalement à limiter cette dépolarisation en permettant, par l'intermédiaire d'un efflux potassique, une repolarisation et un retour à la normale du potentiel (Nelson et Quayle, 1995). L'activation des canaux K^+ ATP-dépendants est consécutive à une diminution du rapport ATP/ADP. Ces canaux permettent ainsi de créer un lien entre le métabolisme cellulaire et l'excitabilité membranaire. Ils sont étroitement liés aux relaxations vasculaires induites par des stimuli tels que l'hypoxie ou l'acidose et sont impliqués dans l'hyporéactivité vasculaire induite par un choc septique (Ko et al., 2008).

Enfin, les canaux à K^+ à rectification entrante sont abondants dans les muscles lisses des vaisseaux de résistance et de faible diamètre. Moins étudiés que les trois autres, la fonction exacte de ces canaux au niveau vasculaire reste à définir. Certaines études suggèrent cependant qu'ils sont impliqués dans le maintien du potentiel membranaire de repos des CMLVs (Park et al., 2008).

III.3.2. Désensibilisation de l'appareil contractile

Tous les mécanismes précédemment décrits contribuent à la baisse de Ca^{2+} intracellulaire et à la relaxation. Cependant, plusieurs études démontrent que la relaxation des CMVLs peut également être induite sans modification de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Woodrum et Brophy, 2001). En effet, de même que certains agonistes constricteurs sensibilisent l'appareil contractile, la désensibilisation est un phénomène possible. La hausse du taux de nucléotides cycliques activateurs de la PKG serait ainsi associée à une augmentation de l'activité de la PCLM et pourrait inhiber l'effet constricteur de la Rho kinase (Surks et al., 1999). Enfin, la protéine kinase II dépendante du complexe Ca^{2+} /Calmoduline (CaMK II) est capable d'inactiver la KCLM via une réaction de phosphorylation. Cet effet pourrait constituer un rétro-contrôle négatif de la contraction musculaire dans le cas de fortes hausses de Ca^{2+} (Pfitzer, 2001).

III.4. L'endothélium et les facteurs endothéliaux

L'endothélium tapissant l'intérieur des vaisseaux constitue plus qu'une simple barrière anatomique entre le sang circulant et les CMLVs. Il peut être considéré comme un « organe endocrine » d'importance majeure puisqu'il participe à de multiples régulations physiologiques fondamentales. Les cellules endothéliales sont en particulier capables de contrôler le tonus vasculaire via la libération de plusieurs substances diffusibles induisant la contraction ou la relaxation des CMLVs de la média sous-jacente. La production de ces facteurs endothéliaux est majoritairement déterminée par des facteurs hémodynamiques (PA, débit sanguin). On distingue une stimulation mécanique directe principalement liée aux variations du flux sanguin ainsi qu'une stimulation chimique indirecte induite par des hormones ou des médiateurs locaux.

III.4.1. Facteurs endothéliaux relaxants

Les travaux menés par Furchgott et Zawadzki ont établi le rôle obligatoire joué par les cellules endothéliales dans la vasorelaxation induite par l'acétylcholine (Furchgott et Zawadzki, 1980). Ils ont ouvert la voie à de nombreuses études qui ont permis l'identification de trois facteurs endothéliaux de relaxation (Endothelium-derived relaxing factors ou EDRF), Fig. 11) : le monoxyde d'azote (NO) (Palmer et al., 1987 ; Ignarro, 1989), la prostacycline (Moncada et Vane, 1978) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (Endothelium-derived hyperpolarizing factor ou EDHF) (Cohen et Vanhoutte, 1995).

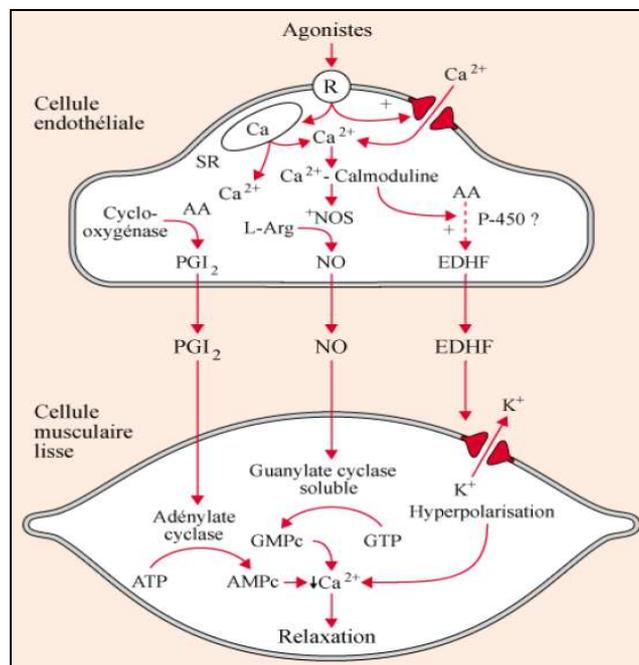


Figure 11. Libération des facteurs de relaxation d'origine endothéliale.
(selon Vanhoutte et Boulanger, 1995)

SR : réticulum sarcoplasmique ; AA : acide arachidonique ; L-Arg : L- Arginine ; NOS : NO synthase ; PGI₂ : prostacycline ; EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarizing factor)

□ Le NO

Le principal agent vaso-actif d'origine endothéliale est le NO. Ce gaz radicalaire est formé à partir de la terminaison guanidine nitrergique de la L-arginine par la NO synthase (NOS), dont l'isoenzyme de type III (eNOS) est constitutive dans les cellules endothéliales (Fig. 12). La NOS III est activée par une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. C'est en effet le complexe que cet ion forme avec la calmoduline qui permet la levée de l'inhibition exercée par la cavéoline-1 (Michel et Feron, 1997). La NOS nécessite également

un nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADPH) et une 5, 6, 7, 8-tétrahydrobioptérine (BH₄) réduits pour posséder une activité optimale. Cette enzyme peut être inhibée de façon compétitive par différents agents pharmacologiques tels que le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) ou encore le N^G-nitro-L-arginine ester méthylique (L-NAME).

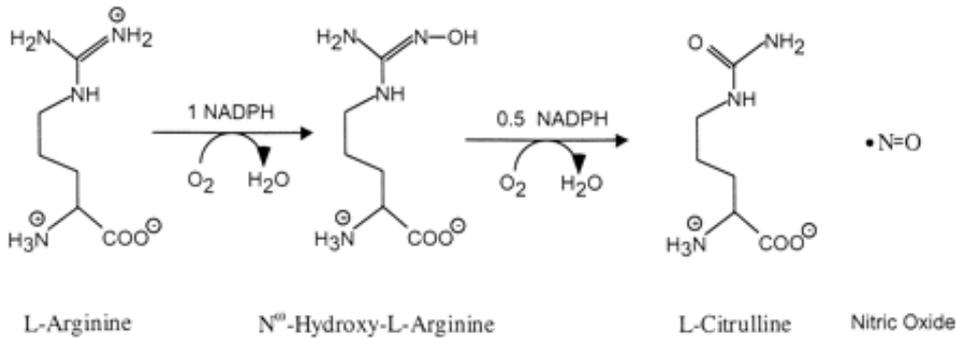


Figure 12. Réaction catalysée par les NO-synthases (selon Stuehr, 2004)

La très courte demi-vie du NO, de l'ordre de la milliseconde ou de la seconde, est toutefois suffisante pour que ce composé diffuse dans les CMLVs sous-jacentes. L'inhibition de l'appareil contractile est alors induite par l'augmentation de GMPc consécutive à l'activation de la guanylate cyclase soluble. Le NO est également secrété dans la lumière vasculaire où il inhibe l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur l'endothélium. De plus, le NO s'oppose à la prolifération des CMVLs et réduit la production des protéines de la matrice extracellulaire et de l'endothéline.

La libération du NO est déterminée par des stimuli physiques et humoraux. Les contraintes de cisaillement exercées par le sang sur la paroi artérielle constituent le principal facteur physique régulant la production locale de NO (Vanhoutte, 2002). L'activation de récepteurs endothéliaux spécifiques par différents médiateurs neuro-humoraux peut également induire la libération de NO. Ces médiateurs incluent l'acétylcholine, certaines hormones circulantes (par exemple, les catécholamines et la vasopressine) ainsi que des autacoïdes (médiateurs produits localement tels que la bradykinine ou l'histamine). Des médiateurs relargués par les plaquettes comme la sérotonine ou l'ADP ainsi que la thrombine qui se forme lors de la coagulation peuvent aussi être impliqués.

□ **La prostacycline**

Une des autres substances vasodilatatrices produite par l'endothélium est la prostacycline (PGI_2) qui a été découverte en 1976 par Moncada et Vane (Moncada et al., 1976). Elle est issue du métabolisme de l'acide arachidonique après intervention de trois enzymes (Fig. 13). Une phospholipase A_2 assure la production d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires, une cyclo-oxygénase convertit ensuite l'acide arachidonique en prostaglandine H_2 (PGH_2), enfin la PGI_2 synthase transforme la PGH_2 en PGI_2 . Il faut remarquer que la PGH_2 est également substrat de la thromboxane A_2 synthase qui induit la production d'un facteur vasoconstricteur. La production de PGI_2 est stimulée en réaction aux contraintes de cisaillement, à l'hypoxie et à plusieurs médiateurs libérant également du NO (Vanhoutte, 2002). Ce facteur endothélial provoque la relaxation musculaire par stimulation de l'adénylate cyclase induisant ainsi l'augmentation de la production d'AMPc. Dans la plupart des vaisseaux sanguins la contribution de la PGI_2 à la relaxation vasculaire reste cependant mineure, son effet venant surtout s'ajouter à celui du NO.

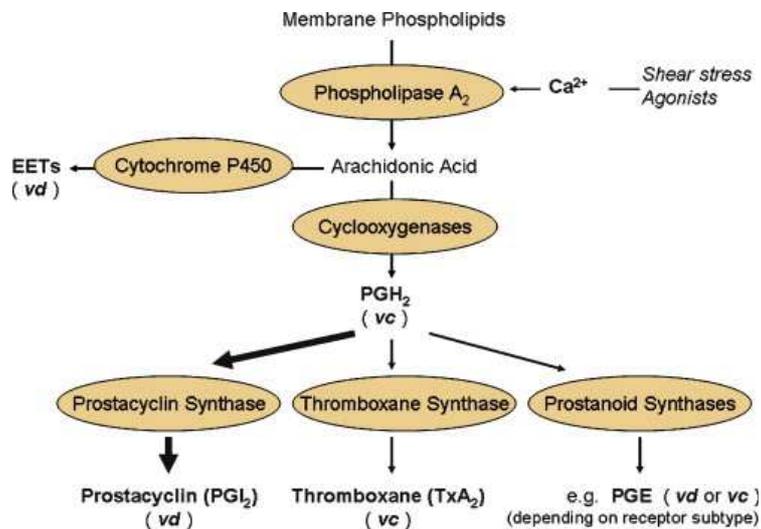


Figure 13. Formation des métabolites de l'acide arachidonique (selon Mas, 2009)

vd : vasodilatateur ; vc : vasoconstricteur ; EETs : acides époxyeicosatriénoïques ; PGH_2 : prostaglandine H_2 , PGE : prostaglandine E

□ **L'EDHF**

Des études électrophysiologiques sur diverses artères isolées ont démontré que certaines relaxations vasculaires dépendantes de l'endothélium étaient associées à une hyperpolarisation des CMLVs sous jacentes. Ce mécanisme vasodilatateur persiste en présence d'inhibiteurs de cyclo-oxygénase et de NOS, indiquant ainsi l'existence d'un

troisième EDRF (Félétou et al., 2003). Le composé responsable de ce phénomène reste à identifier. Nommé par convention EDHF, la nature de ce facteur pourrait varier selon le lit vasculaire. Les processus exacts d'induction et de transduction de la relaxation induite par l'EDHF ne sont qu'imparfaitement caractérisés. Cependant, il est établi que l'EDHF provoque une hyperpolarisation de la cellule endothéliale grâce à l'activation de canaux potassiques dépendants du calcium. Cette hyperpolarisation est alors transmise aux CMLVs pour induire la relaxation (Félétou et al., 2003). Au niveau de l'aorte, les réponses attribuées à l'EDHF sont bloquées de façon spécifique par la combinaison de deux toxines : la charybdotoxine (inhibiteur des canaux K^+ de grande conductance (BKCa) et de conductance intermédiaire (IKCa)) et l'apamine (inhibiteur des canaux K^+ de faible conductance (SKCa)) (Félétou et al., 2003). La contribution de l'EDHF à la relaxation des grosses artères de conductance telle que l'aorte reste cependant mineure. Ce facteur constitue en revanche un déterminant essentiel du tonus vasculaire dans la circulation coronaire et dans les lits artériolaires périphériques (Busse et al., 2002).

III.4.2. Facteurs endothéliaux constrictifs

Pour contrebalancer l'action de ces substances vasodilatatrices les cellules endothéliales produisent également des facteurs endothéliaux vasoconstricteurs (endothelium derived contracting factors (EDCF)). On distingue notamment, l'endothéline-1 (Yanagisawa et al., 1988), l'angiotensine II (Dzau, 1988) ou encore le thromboxane A2 (Svensson et Hamberg, 1976).

□ L'endothéline-1

Ce peptide de 21 acides aminés constitue le plus puissant vasoconstricteur endogène connu. Il est synthétisé à partir d'un peptide précurseur inactif, la préproendothéline qui va être clivée en proendothéline par des endopeptidases. La proendothéline est ensuite transformée en endothéline active par l'enzyme de conversion de l'endothéline. L'hydrolyse de l'endothéline-1 s'effectue principalement par l'endopeptidase neutre.

L'action de l'endothéline nécessite la stimulation de récepteurs spécifiques dont deux sous-types, ET-A et ET-B, ont été identifiés. Ces deux récepteurs provoquent cependant des effets opposés. En effet, au niveau vasculaire, l'endothéline induit une vasoconstriction *via* les

récepteurs ET-A exprimés sur les CMLVs tandis que sa liaison aux récepteurs ET-B, endothéliaux, est à l'origine d'un effet dilatateur transitoire par libération de NO et de prostacycline (Schiffrin et Touyz, 1998). L'effet vasoconstricteur reste cependant physiologiquement dominant.

La libération de l'endothéline-1 par les cellules endothéliales est stimulée par des agents vasoconstricteurs (angiotensine II, vasopressine), la thrombine, certaines cytokines ainsi que par des facteurs physico-chimiques comme les forces de cisaillement ou l'hypoxie.

□ L'angiotensine II

L'angiotensine II est un autre puissant vasoconstricteur. Elle est synthétisée à partir de l'angiotensinogène, une protéine inactive produite par le foie. Cette dernière est clivée par la rénine pour produire un décapeptide également inactif, l'angiotensine I. L'angiotensine I peut ensuite être transformée en angiotensine II par une carboxypeptidase, l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Cette enzyme est exprimée au niveau des cellules endothéliales leur permettant ainsi la production locale d'angiotensine II. Ce peptide provoque la vasoconstriction en se fixant sur son récepteur AT-1 exprimé sur les CMLVs. Cependant cet effet est atténué par l'activation de récepteurs AT-2 présents au niveau des cellules endothéliales. En effet, cette stimulation induit la relaxation par le biais d'une augmentation de la production de NO et de prostacycline (Gigante et al., 1998).

□ Le thromboxane A₂

Comme la PGI₂, le le thromboxane A₂ (TXA₂) est également produit par les cyclo-oxygénases (Fig. 13). Majoritairement d'origine plaquettaire, il existe cependant une production endothéliale de TXA₂ (Ramadan et al., 1990). Au niveau des CMVLs, ce composé est l'agoniste de récepteurs TP (Narumiya et FitzGerald, 2001) dont la stimulation induit une diminution du taux AMPc et une vasoconstriction (Norel, 2007). Le TXA₂ possède cependant un effet constricteur limité qui en conditions normales est masqué par les effets des EDRFs (Webb et Vallance, 1997).

III.4.3. La dysfonction endothéliale

Le terme de « dysfonction endothéliale » est défini par une perte complète ou partielle de l'équilibre endothélial entre les facteurs vasodilatateurs et constricteurs, pro- et anti-

inflammatoires, pro- et anti-agrégants plaquettaires, pro-et anti-prolifératifs. Cependant, sur le plan clinique, la dysfonction endothéliale est le plus souvent assimilée à une détérioration de la relaxation dépendante de l'endothélium.

Les différentes données expérimentales existantes sont en faveur d'un rôle causal de la dysfonction endothéliale dans le développement de l'HTA. Cependant, la dysfonction endothéliale pourrait également constituer une conséquence de l'HTA. Il est en effet avéré qu'une réduction du niveau de PA est associée à une diminution de cette dysfonction (Nigro et al., 1989).

La majorité des études menées chez l'homme suggère un rôle prépondérant du NO (Lee et al., 1995 ; Cordellini, 1999 ; Zhou et al., 1999). Une diminution de la production ou de la biodisponibilité de ce facteur pourrait intervenir. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène :

- une diminution de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS
- une inactivation du NO par combinaison avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) pour former des peroxynitrites ($ONOO^-$)
- une augmentation de la synthèse d'inhibiteurs endogènes de la eNOS, tels que l'ADMA (assymetric dimethylarginine)
- une diminution de la disponibilité du BH_4 (cofacteur de la eNOS)
- une diminution de la disponibilité de la L-arginine (substrat de la eNOS)

Chez l'animal, l'existence d'une dysfonction endothéliale a été démontrée dans différents modèles animaux d'HTA incluant notamment le rat spontanément hypertendu (SHR).

IV. Les traitements de l'HTA

Le traitement de l'HTA et la réduction du risque cardiovasculaire associé impliquent nécessairement une baisse de la PA. Différentes solutions pharmacologiques existent. Néanmoins, la prise en charge de l'HTA requiert également des changements au niveau des habitudes alimentaires et du mode de vie.

IV.1. Traitements non pharmacologiques

Des mesures hygiéno-diététiques sont ainsi recommandées chez tous les patients hypertendus quel que soit le niveau tensionnel, avec ou sans traitement pharmacologique associé. L'objectif est de limiter certains facteurs de risques associés au développement de l'HTA (HAS, 2005).

Ces mesures comprennent :

- une limitation de la consommation en sel jusqu'à 6g/jour.
- une réduction du poids en cas de surcharge pondérale afin de maintenir l'indice de masse corporelle en dessous de 25 kg/m².
- la pratique d'une activité physique régulière, adaptée à l'état clinique de patient, d'au moins 30 minutes, 3 fois par semaine.
- la limitation de la consommation d'alcool à moins de trois verres par jour chez l'homme et 2 verres par jour chez la femme.
- l'arrêt du tabac, associé si besoin à un accompagnement du sevrage tabagique.
- un régime alimentaire riche en légumes, en fruits et pauvre en graisses saturées.

La mise en œuvre de ces mesures ne doit cependant pas retarder l'initiation d'un traitement pharmacologique s'il est nécessaire, en particulier chez les patients dont le risque cardio-vasculaire est élevé.

IV.2. Traitements médicamenteux

Associée à une réduction du risque cardio-vasculaire, la baisse de la PA constitue l'objectif commun de toute thérapie anti-hypertensive. La prise en charge de l'HTA par la médecine moderne fait ainsi intervenir cinq classes d'antihypertenseurs majeurs. Des diurétiques thiazidiques, des bêta-bloquants, des inhibiteurs calciques, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ainsi que des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA-II) peuvent en effet être proposés en première intention dans la prise en charge d'un hypertendu essentiel (HAS, 2005).

Ces différentes thérapies induisent l'abaissement de la PA par l'intermédiaire d'une réduction de résistances périphériques ou d'une diminution du débit cardiaque. Les IEC et les ARA-II atténuent ainsi l'effet constricteur de l'angiotensine II. Les bêta-bloquants s'opposent à la stimulation noradrénergique du système cardiovasculaire. Les inhibiteurs calciques empêchent quant à eux la mobilisation du calcium au niveau des CMLVs et induisent de ce fait la vasodilatation. Les inhibiteurs calciques à tropisme cardiaque sont également capables d'entraîner une réduction du débit cardiaque par l'intermédiaire d'effets inotrope et chronotrope négatifs. Pour les diurétiques thiazidiques, on remarquera une action sur la volémie limitée. Leurs propriétés anti-hypertensives seraient en effet principalement relatives à un effet dilatateur directement exercé sur l'appareil vasculaire (Hughes, 2004).

Le choix d'un traitement médicamenteux sera adapté à chaque patient en fonction :

- des indications préférentielles de certaines classes dans des situations cliniques particulières.
- de l'efficacité et de la tolérance des médicaments déjà pris par le patient.
- de l'existence de comorbidités pouvant justifier ou contre-indiquer certains traitements.
- du coût du traitement (les diurétiques thiazidiques font parties des classes dont le coût journalier est le plus faible).

Il est recommandé de débiter le traitement par une monothérapie. Cependant une bithérapie sera instaurée dans un délai d'au moins 4 semaines en cas de réponse insuffisante. Lors de l'instauration d'une association médicamenteuse, il est recommandé de choisir des associations qui se sont révélées efficaces (effet additif ou synergique), bien tolérées d'un point de vue pharmacologique et qui ont été validées par des études cliniques. La figure 14 résume les associations recommandées.

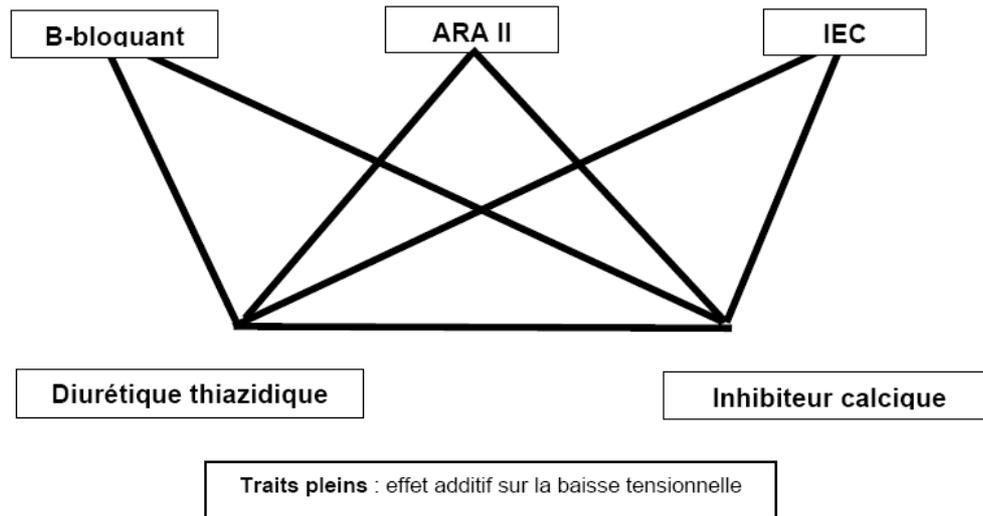


Figure 14. Association des classes thérapeutiques favorisant la baisse tensionnelle (selon l'HAS, 2005)

IV.3. Phytothérapie

La prise en charge de l'HTA par la médecine dite « occidentale » est encore perfectible. À titre d'exemple, en France seul 30 à 50 % des hypertendus traités atteindraient les objectifs tensionnels. De plus, les effets indésirables des médications employées sont conséquents et les coûts élevés pour certaines classes thérapeutiques. Ainsi, des solutions thérapeutiques alternatives incluant la phytothérapie sont parfois privilégiées par certaines populations.

L'approche ethnopharmacologique a contribué à répertorier plusieurs centaines de plantes médicinales traditionnellement employées dans le traitement de l'HTA. Une forte densité d'études expérimentales a parallèlement mis en évidence des propriétés pharmacologiques permettant de justifier certains usages traditionnels.

Des effets diurétiques (Wright et al., 2007) ou inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Barbosa-Filho et al., 2006) ont ainsi été caractérisés pour plusieurs dizaines de plantes anti-hypertensives. Ces espèces proviennent de genres ou de familles très variées. Une grande diversité structurale caractérise également les métabolites secondaires identifiés comme responsables de ces activités et les principales classes chimiques sont ainsi toutes représentées. Il est cependant intéressant de constater que des propriétés inhibitrices de

l'enzyme de conversion ont été abondamment rapportées pour des séco-iridoïdes ainsi que pour différents métabolites de nature flavonoïdique (Barbosa-Filho et al., 2006).

Des actions vasorelaxantes directes ont également été très fréquemment mises en évidence. Une revue de 2006 (McNeill et Jurgens, 2006) recense ainsi plus de 200 plantes médicinales vasodilatatrices parmi lesquelles une cinquantaine est utilisée comme thérapie anti-hypertensive (voir annexe). Les mécanismes dilatateurs majoritairement caractérisés sont relatifs à une augmentation de la production d'EDRFs et/ou à des actions directes sur les fibres musculaires lisses. Des modifications des conductances calciques ou potassiques sont fréquemment rapportées. Celles-ci appartiennent également à des genres et des familles très variés et il est de ce fait délicat de dégager une correspondance taxonomique. D'un point de vue chimique, les métabolites vasoactifs se caractérisent aussi par une importante diversité structurale. Différents dérivés terpéniques ainsi que des alcaloïdes d'origines variées ont notamment été caractérisés. On remarquera également la forte propension de certains métabolites phénoliques, incluant des dérivés cinnamiques ainsi que la plupart des structures flavonoïdiques, à induire la relaxation vasculaire.

Chapitre II

Objectifs généraux

Chapitre II | Objectifs généraux

Le présent travail de thèse a eu pour objectif d'apporter des arguments scientifiques soutenant l'utilisation traditionnelle de différentes plantes anti-hypertensives de la médecine ouïghoure. D'une part, nos études se sont intéressées à démontrer les propriétés pharmacologiques de différents extraits de plantes médicinales ouïghoures et à en déterminer les mécanismes d'actions. Compte-tenu du rôle fondamental de la modulation du tonus vasculaire dans l'efficacité des thérapies anti-hypertensives, nous avons choisi d'étudier l'effet vasodilatateur des extraits sur le modèle d'anneaux aortiques isolés de rats. Ce modèle est en effet largement employé en pharmacologie expérimentale du fait de sa relative facilité et rapidité de mise en œuvre, de l'abondante littérature s'y rapportant ainsi que de l'intérêt des informations obtenues sur la *fonction* vasculaire tant au niveau endothélial que de la musculature lisse. D'autre part, nos études se sont consacrées à l'identification des composés chimiques à l'origine des effets pharmacologiques observés. Cette partie du travail présente plusieurs intérêts. Tout d'abord, sur le plan fondamental, la recherche des métabolites pharmaco-actifs peut permettre de caractériser de nouvelles structures chimiques à activité vasodilatatrice, sources potentielles de nouveaux médicaments. Ensuite, sur un plan plus appliqué, la détermination des composés à l'origine de l'effet cardiovasculaire peut permettre d'intégrer leur dosage dans une démarche de qualité et de standardisation des extraits de plantes anti-hypertensives avant une éventuelle commercialisation.

Un travail préliminaire a consisté en un screening de l'effet vasodilatateur d'extraits hydro-éthanoliques de différentes plantes anti-hypertensives proposées par nos collaborateurs chinois incluant les espèces *Ziziphora clinopodioides* Lam., *Cichorium glandulosum* Boiss. & Huet., *Pleurospermum lindleyanum* Lipsky, *Nitraria sibirica* Pall., *Echinops sphaerocephalus* L. et *Echinops integrifolius* Kar. & Kir.

Des extraits de parties aériennes de *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae), de fruits de *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae) et de plantes entières d'*Echinops integrifolius* Kar. & Kir. (Asteraceae) ont ainsi été retenus au regard de leurs actions vasodilatatrices. Ces trois extraits ont constitué les matières premières pour notre travail de thèse et ont été soumis à des investigations pharmacologiques et phytochimiques. Les trois prochains chapitres de ce manuscrit consisteront en une analyse de la littérature relative à chacune des espèces sélectionnées qui introduira les différentes études présentées sous la forme d'article. Les résultats expérimentaux obtenus seront enfin analysés de manière globale dans une discussion générale et une conclusion qui ponctueront cette thèse.

Chapitre III

Étude de *Ziziphora clinopodioides* Lam.

唇香草

I. Données bibliographiques

I.1. Données botaniques

Selon la dernière classification de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG, 2009), l'espèce *Ziziphora clinopodioides* Lam. peut être classée comme suit :

Division : Spermatophytes
Subdivision : Angiospermes
Classe : Dicotylédones à pollen triaperturé
Super-ordre : Euasterids I
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae
Genre : *Ziziphora*
Espèce : *clinopodioides*

□ La famille des Lamiaceae Martinov (1820)

Comprenant plus de 250 genres et environ 7000 espèces, la large famille des Lamiaceae est cosmopolite. La dénomination de Lamiaceae provient du genre *Lamium* et correspond au nom latin des lamiers. Cette famille fut également connue sous le nom de Labiées, du latin *labium* signifiant lèvre, en référence à la forme caractéristique de ses fleurs.

Les Lamiaceae sont des plantes herbacées présentant une tige généralement quadrangulaire en coupe transversale. Des espèces ligneuses peuvent également être rencontrées. Ces plantes sont souvent couvertes de poils à glandes aromatiques les rendant très odorantes. Les feuilles sont opposées, parfois verticillées, simples ou composées. Les inflorescences sont terminales ou axillaires, à axe principal indéterminé et à rameaux latéraux déterminés. Les fleurs sont hermaphrodites et généralement zygomorphes. Elles présentent la plupart du temps 5 sépales soudés en une corolle bilabée. Les étamines sont au nombre de 4, parfois réduites à deux. On distingue deux carpelles soudés de façon à former 2 loges uniovulées. L'ovaire est supère à placentation axile ; le style bifide est terminal ou gynobasique. Deux stigmates sont situés à l'extrémité des branches du style. Les grains de pollen sont tricolpés voire hexacolpés¹. Le mode de fécondation est de type entomogame. Enfin, les fruits sont le plus souvent des

¹ tricolpé ou hexacolpé : organe doté de trois ou six sillons.

tetrakènes, formant un schizocarpe à maturité, mais on note quelquefois des drupes, en particulier dans le genre *Prasium*.

La famille des Lamiaceae est divisée en sept sous-familles. La sous-famille des *Nepetoideae* constitue la plus importante par le nombre (Thorne, 1992). Elle se distingue généralement par la présence d'un style gynobasique. Des huiles essentielles à teneur élevée en terpènes volatils ainsi que l'absence d'iridoïdes caractérisent également cette sous-famille. Elle comprend notamment la tribu des *Menthae* où l'on distingue de nombreuses espèces condimentaires appartenant entre autre aux genres *Mentha*, *Thymus*, *Origanum*, *Salvia* ou encore *Ziziphora* (Judd et al., 2002).

□ Le genre *Ziziphora* L.

Le genre *Ziziphora* comprend 25 à 30 espèces majoritairement distribuées en Asie, mais également rencontrées en Afrique et en Europe. Ce sont des plantes herbacées ou des sous-arbrisseaux buissonnants fortement aromatiques pouvant être vivaces ou annuels. Les feuilles sont simples, entières, de formes ovales ou oblongues ; la face intérieure est glandulaire. Les inflorescences sont terminales ou axillaires. Nommées verticillasters, ces inflorescences cymeuses et opposées sont contractées de telle sorte que les fleurs semblent disposées en verticille. Les fleurs sont zygomorphes et possèdent un calice cylindrique, étroit, velu, à treize nervures bien visibles et légèrement bilabié. La lèvre supérieure du calice est tridentée tandis que la lèvre inférieure est bidentée. La corolle, également bilabiée, est formée d'une lèvre supérieure droite, presque entière, tandis que la lèvre inférieure est trilobée avec un lobe central plus étroit que les latéraux. Deux étamines antérieures fertiles sont insérées sous la lèvre supérieure de la corolle. Les deux étamines postérieures sont rudimentaires voire absentes. Chaque étamine est terminée par une ou deux anthères. Le style est bifide avec un lobe postérieur plus court. Les akènes sont ovoïdes et lisses (Flore du Pakistan).

□ L'espèce *Ziziphora clinopodioides* Lam.

L'espèce *Z. clinopodioides* se présente sous forme de sous-arbrisseaux vivaces, lignifiés seulement à la base et fortement ramifiés. Les tiges sont ascendantes ou dressées, d'une longueur de 5 à 30 cm. Les feuilles sont de formes elliptiques à lancéolées, d'une longueur de 10 à 15 mm pour une largeur de 2 à 5 mm. Elles peuvent être glabres ou velues. Les feuilles caulinaires se transforment progressivement en bractées. Les inflorescences,

terminales, sont ovales ou globuleuses et peuvent être glabres à velues. Elles atteignent 15 à 20 mm de longueur et de largeur. Le calice est tubulaire et étroit, il mesure de 5 à 6 mm et possède de petites dents linéaires ou lancéolées plus ou moins conniventes. Celui-ci peut être glabre ou densément velu. La corolle en tube est de couleur blanche, rose ou mauve et mesure de 8 à 11 mm. Le tube des fleurs mâles stériles, est inclus dans le calice tandis que celui des fleurs hermaphrodites en dépasse légèrement. Les fruits sont des akènes de couleur brun pâle (Flore du Pakistan).



Figure 16. *Ziziphora clinopodioides*

I.2. Chimiotaxonomie du genre *Ziziphora*

I.2.1. Métabolites d'origine terpénique

Les études phytochimiques réalisées sur le genre *Ziziphora* se sont surtout concentrées sur l'analyse des huiles essentielles. La composition de celles-ci varie, qualitativement et quantitativement, selon les espèces et les conditions environnementales. Néanmoins, la plupart des études décrivent des huiles essentielles très majoritairement constituées de monoterpènes, le plus souvent oxygénés et de type para-menthane (1). La pulégone (2) constitue généralement le composé le plus abondant des huiles essentielles des espèces du genre *Ziziphora*. D'autres monoterpènes, tels que le la pipéritone (3), l'eucalyptol (4), le menthol (5), la menthone (6), l'isomenthone (7), le thymol (8) ou encore le limonène (9), sont également fréquemment rencontrés en proportions conséquentes (Sezik et al., 1991 ; Meral et al., 2002 ; Konyalioglu et al., 2006 ; Aghajani et al., 2008). À l'exception d'un travail présentant le germacrène D (10) comme majoritaire dans l'espèce *Z. capitata* (Ebrahimi et al., 2009), la production de composés de nature sesquiterpénique est limitée. La composition

des huiles essentielles de l'espèce *Z. clinopodioides* est proche de celles des autres espèces. On remarquera cependant la description d'un chimiotype singulier, majoritairement constitué de thymol et dépourvu de pulégone (Aghajani et al., 2008). Dans les autres cas, la pulégone est constamment majoritaire, représentant entre 31,9 % et 80,7 % des huiles essentielles étudiées (Belyaev et Demeubaeva, 1999 ; Salehi et al., 2005 ; Ozturk et Ercisli, 2007 ; Amiri, 2009 ; Xing et al., 2010).

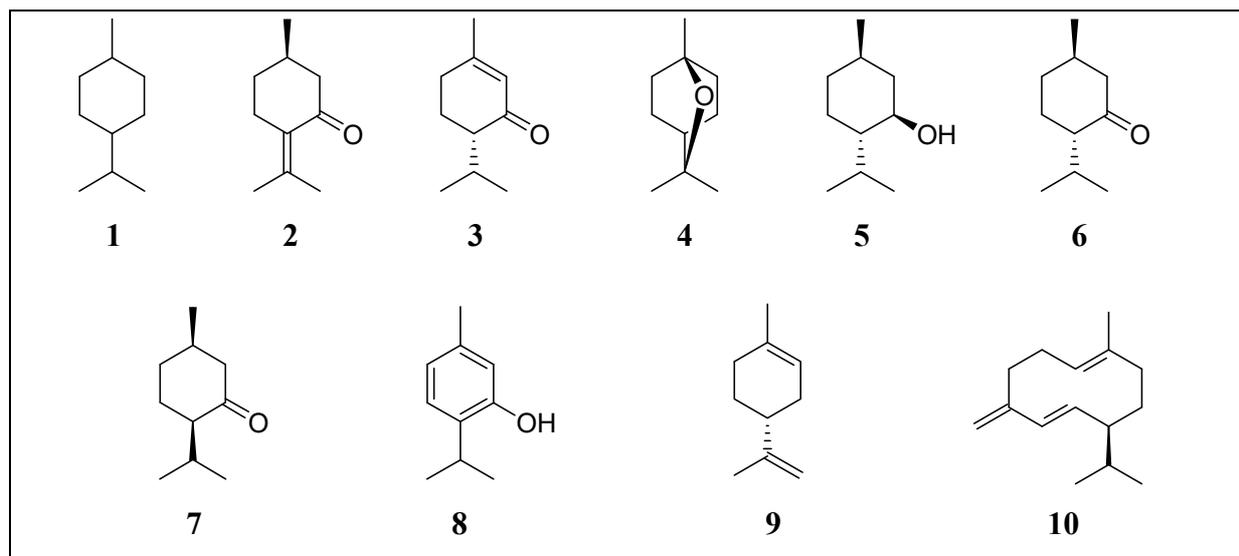


Figure 17. Monoterpènes et sesquiterpènes du genre *Ziziphora*

Les données concernant les autres types de composés sont plus restreintes. Des métabolites terpéniques non volatils ont été identifiés. La présence de triterpènes ubiquitaires comme l'acide ursolique ou l'acide oléanique est décrite dans les espèces *Z. tenuior*, *Z. pamiroalaica* et *Z. clinopodioides* (Isamukhamedova et al., 1987 ; Yang et al., 2008 ; Mehmood et al., 2010). La présence de stérols, tels que le β -sitostérol ou l' α -spinastérol, ainsi que leurs glycosides, le daucostérol et le 3-*O*-glucosyl- α -spinastérol, est également rapportée pour *Z. clinopodioides* (Yang et al., 2008). Une étude révèle la présence d'un dérivé de type iridoïde dans l'espèce *Z. bungeana* (Bimurzaev et Nikonov, 1988). Cette information doit cependant être considérée avec prudence. En effet, la structure exacte de ce composé n'a pas été définie. De plus, la production d'iridoïdes est considérée comme un caractère archaïque chez les Lamiaceae. La sous-famille des Nepetoïdeae, l'une des plus évoluée de la famille, se caractérise ordinairement par l'absence de ce type de métabolite.

I.2.2. Métabolites phénoliques

Plusieurs métabolites secondaires de nature phénolique sont également décrits dans le genre *Ziziphora*. On distingue tout d'abord des composés d'origine shikimique. Des études chimiques de l'espèce *Z. clinopodioides* ont ainsi permis l'identification des dérivés hydroxybenzoïques incluant le 4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle (**11**), l'acide protocatéchique (**12**) ou encore l'acide salicylique (**13**) (Oganesyan et al., 1991 ; Yang et al., 2008 ; Li et al., 2009). Des composés hydroxycinnamiques ont également été identifiés. Les acides caféique (**14**) et férulique (**15**) ont été respectivement isolés des espèces *Z. clinopodioides* et *Z. bungeana* (Oganesyan et al., 1991) La présence des acides 3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxypropanoïque (**16**) et rosmarinique (**17**), ainsi que du rosmarinatate de méthyle (**18**), est aussi rapportée pour l'espèce *Z. clinopodioides* (Yang et al., 2008 ; Li et al., 2009).

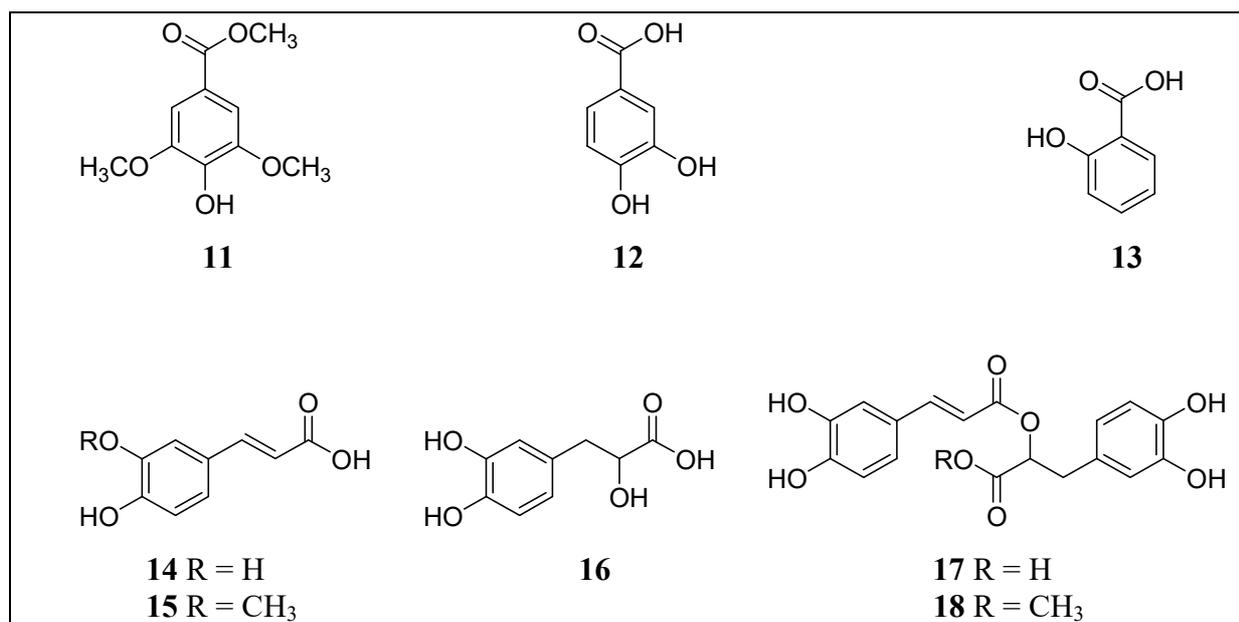


Figure 18. Structures phénoliques rencontrées dans le genre *Ziziphora*

Des composés flavonoïdiques, issus de la condensation d'un tricétate et d'un acide cinnamique, ont également été identifiés dans le genre *Ziziphora* (Fig. 19).

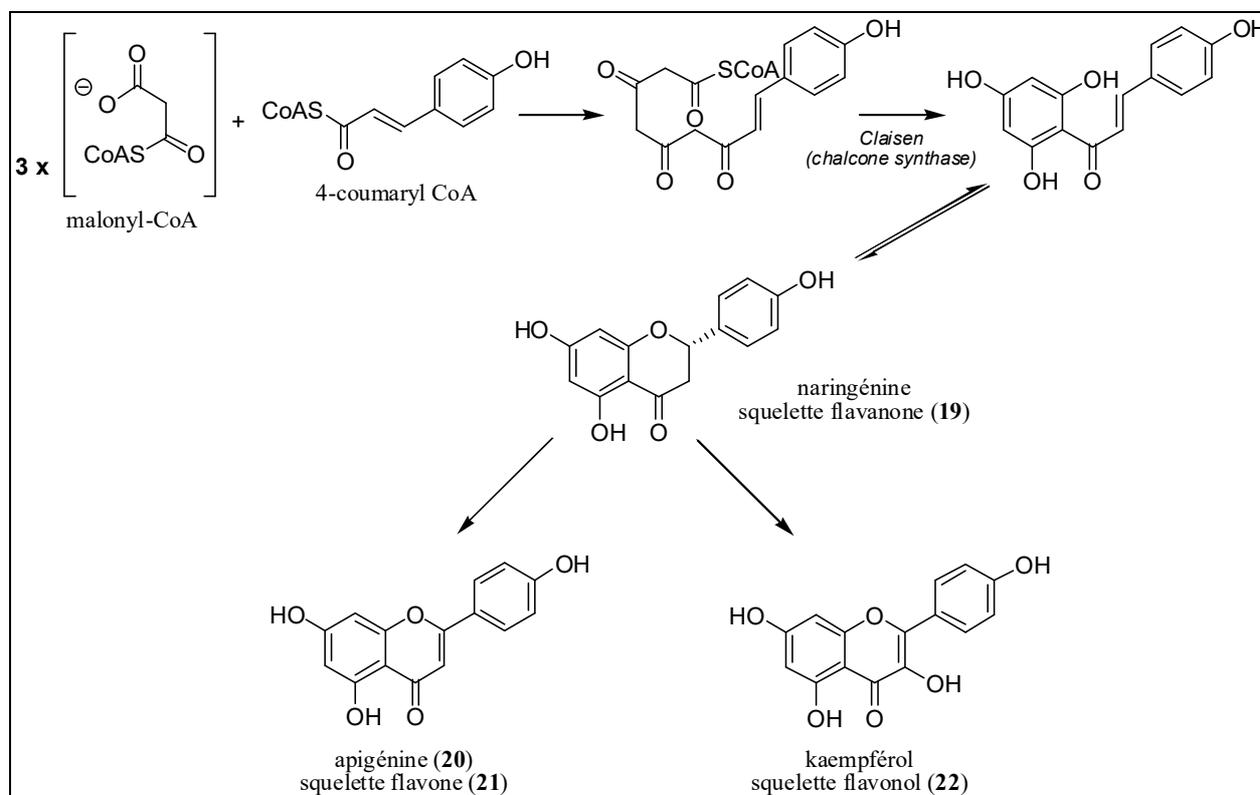
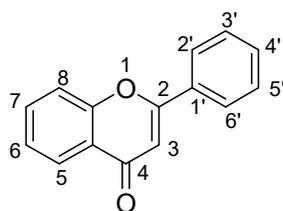


Figure 19. Biogenèse des structures flavonoïdiques rencontrées dans le genre *Ziziphora*

Des structures de type flavone (21) sont majoritairement décrites. Des études menées sur les espèces *Z. tenuior*, *Z. taurica* et *Z. clinopodioides* ont ainsi abouti à l'isolement de génines flavoniques, telles que l'apigénine (20), la thymonine (23), la lutéoline (24), la 7-*O*-méthylsudachitine (25) et l'acacétine (26). Des hétérosides sont également décrits tels que le cynaroside (7-*O*-glucosyllutéoline, 27), la cosmosiine (7-*O*-glucosylapigénine, 28), la tilianine (7-*O*-glucosylacacétine, 29), l'aéquinétine (7-*O*-glucosylchryssine, 30), la diosmine (7-*O*-rutinosyldiosmétine, 31), la linarine (7-*O*-rutinosylacacétine, 32), la 7-*O*-glucosyldiosmétine (33) et la 7-*O*-rutinosylchryssine (34) (Kapetanidis et Kokkalou, 1988 ; Oganessian et al., 1990 ; Li et al., 2009 ; Mehmood et al., 2010). Les ziziphorines A et B (35, 36), des flavones originales estérifiées par des acides gras ont de plus été décrites chez *Z. tenuior* (Mehmood et al., 2010).

Tableau IV. Structures de flavones du genre *Ziziphora*



Composé	Position					
	5	6	7	8	3'	4'
20	OH	H	OH	H	H	OH
23	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
24	OH	H	OH	H	OH	OH
25	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
26	OH	H	OH	H	H	OCH ₃
27	OH	H	O-Glc	H	OH	OH
28	OH	H	O-Glc	H	H	OH
29	OH	H	O-Glc	H	H	OCH ₃
30	OH	H	O-Glc	H	H	H
31	OH	H	O-Rut	H	OH	OCH ₃
32	OH	H	O-Rut	H	H	OCH ₃
33	OH	H	O-Glc	H	OH	OCH ₃
34	OH	H	O-Rut	H	H	H

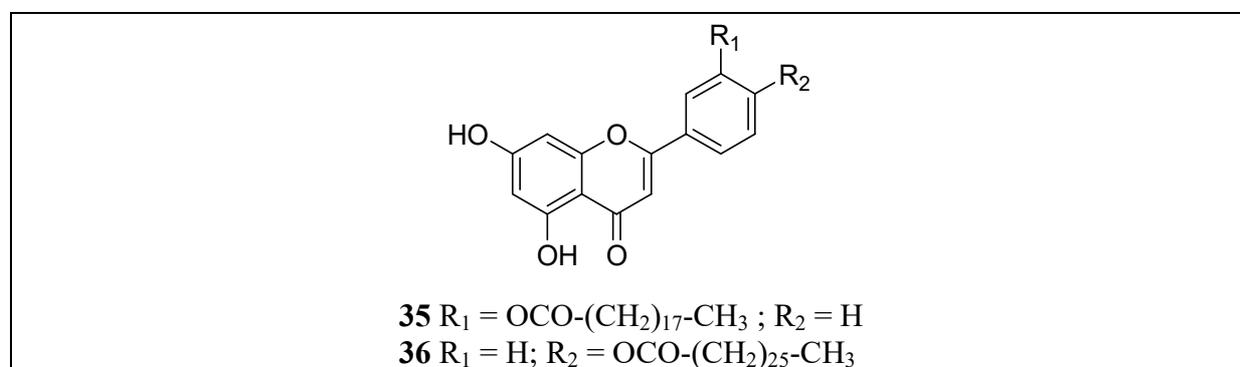


Figure 20. Structures des ziziphorines A (35) et B (36)

La quercétine (**37**) constitue le seul aglycone de type flavonol (**22**) rapporté dans le genre. On retrouve ce composé sous forme libre ou conjuguée (3-*O*-glucosylquercétine, 7-*O*-glucosylquercétine) dans les espèces *Z. taurica* et *Z. clinopodioides* (Kapetanidis et Kokkalou, 1988 ; Li et al., 2009). Enfin un hétéroside de flavanone (**19**), la 7-*O*-rutinosylpinocembrine (**38**), a également été isolé de *Z. taurica* (Kapetanidis et Kokkalou, 1988).

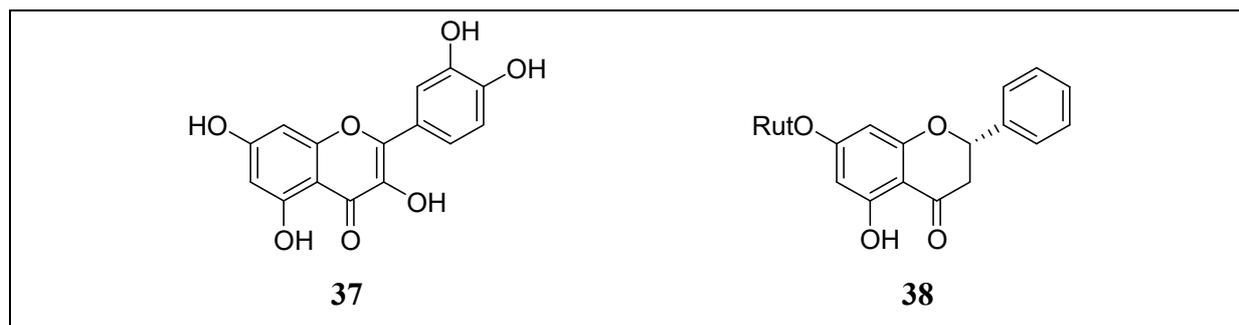


Figure 21. Flavonol et flavanone du genre *Ziziphora*

I.3. Usages traditionnels

En médecine traditionnelle ouïghoure, l'espèce *Z. clinopodioides*, nommée également « Suzai », est indiquée en cas de fièvre, d'insomnie, de trachéite, d'œdème ou encore d'hémorroïdes. Des décoctions des parties aériennes de cette plante sont également utilisées pour traiter l'HTA et certains troubles cardiaques. Il faut remarquer que la phase d'huile essentielle produite lors de ce procédé est retirée de la préparation et employée pour le traitement de certains troubles gastriques (Dr Haji Akber Aisa, communication personnelle). L'indication antihypertensive du genre *Ziziphora* est également rapportée en Ouzbekistan où les parties aériennes des espèces *Z. tenuior*, *Z. pedicellata* et *Z. pamiroalaica* sont consommées sous forme d'infusion (Sezik et al., 2004).

De nombreuses utilisations thérapeutiques de *Ziziphora* sont aussi recensées en médecine traditionnelle turque ou iranienne. En Turquie, l'espèce *Z. clinopodioides*, portant le nom vernaculaire de « Kirnanesi », est employée pour la préparation d'un thé aromatique indiqué en cas troubles gastro-intestinaux. Elle est aussi utilisée comme sédatif, carminatif, antiseptique ou cicatrisant (Ozturk et Ercisli, 2007). Des indications semblables sont rapportées en médecine traditionnelle iranienne pour les espèces *Z. clinopodioides*, *Z.*

capitata, *Z. persica* et *Z. tenuior*. Les parties aériennes séchées de l'espèce *Z. clinopodioides* y sont également employées comme anti-inflammatoire, antitussif ou pour le traitement de rhumes (Naghbi et al., 2005).

Il est enfin important de remarquer que les plantes de ce genre sont comestibles. L'espèce *Z. clinopodioides* est essentiellement consommée, notamment en Turquie et en Iran. Les parties aériennes peuvent ainsi être utilisées comme condiment ou comme additif pour certains yaourts ou fromages. Cette plante est employée pour la confection d'un fromage turque nommée « herby cheese ». Son huile essentielle sert également d'aromatisant ou de conservateur naturel (Ozturk et Ercisli, 2007).

I.4. Propriétés pharmacologiques

Certaines utilisations traditionnelles ont pu être validées expérimentalement. Les démonstrations de propriétés antibactériennes ou sédatives des huiles essentielles des parties aériennes du genre *Ziziphora* justifient en effet certains usages (Öztürk et al., 1995 ; Verdian-Rivi, 2008). La plupart des investigations ont été menées sur l'espèce *Z. clinopodioides*, majoritairement utilisée. Son spectre d'action antibactérien cible particulièrement des bactéries à Gram positif incluant notamment de nombreuses bactéries présentes dans l'alimentation (Ozturk et Ercisli, 2007). Des activités antifongiques et insecticides sont aussi rapportées (Khosravi et al., 2011).

Les propriétés digestives de différentes espèces de *Ziziphora* pourraient également être attribuées à leur huile essentielle. On remarquera de plus que l'administration d'un extrait hydro-éthanolique de *Z. clinopodioides* induit une réduction des sécrétions gastriques acides chez le rat (Niazmand et al., 2010).

L'activité anti-inflammatoire de *Z. clinopodioides* a été démontrée chez la souris dans un modèle d'inflammation intestinale induite par l'acide acétique. Le mécanisme d'action est associé à une diminution du stress oxydant par l'intermédiaire d'une réduction de l'activité myéloperoxydasique et de la peroxydation lipidique (Ghafari et al., 2006). Ce même modèle expérimental a également permis de mettre en évidence l'effet antinociceptif viscéral d'un extrait hydro-éthanolique de *Z. tenuior* (Ghahhari et al., 2009).

Des propriétés antioxydantes ont été observées pour les huiles essentielles de *Z. taurica*, *Z. clinopodioides* ou encore *Z. pamiroalaica* (Konyalioglu et al., 2006 ; Salehi et al., 2005 ; Xing et al, 2010). Des activités plus conséquentes sont cependant décrites pour des extraits alcooliques de *Z. clinopodioides*. La CE₅₀ de l'activité antiradicalaire d'un extrait méthanolique de cette espèce a ainsi été estimée à 30,7 µg/ml (test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)) (Salehi et al., 2005 ; Tian et al., 2011).

Il existe peu de données expérimentales relatives aux actions cardiovasculaires du genre *Ziziphora*. Une étude datant de 1969 rapporte néanmoins l'effet hypotensif de *Z. bungeana* chez le chien (Dzhumagalieva et Kul'zhanov, 1969). Il est nécessaire de remarquer qu'une caractérisation de l'extrait évalué aurait révélé une nature alcaloïdique. L'absence de mise en évidence de tels métabolites dans ce genre interroge et une caractérisation erronée ne peut être exclue.

II. Résultats expérimentaux et discussion

Des investigations pharmacologiques et chimiques ont donc été entreprises au cours de ce travail dans le but de combler l'absence de données scientifiques relatives à l'usage anti-hypertensif de *Ziziphora clinopodioides*. Nos collaborateurs chinois nous ont ainsi transmis 2 kg de parties aériennes de cette plante qui ont été pulvérisées puis extraites par un procédé de lixiviation hydro-éthanolique (20/80).

II.1. Étude des mécanismes vasodilatateurs de *Ziziphora clinopodioides* et identification des métabolites actifs impliqués

Les propriétés vasodilatrices de *Ziziphora clinopodioides* ont été mises en lumière au cours d'une **première étude**. Les effets vasorelaxants de trois fractions (hexanique, chlorométhylénique et aqueuse), obtenues à partir l'extrait hydro-éthanolique, ont été évalués. Les mécanismes sous-tendant l'action vasodilatatrice de la fraction chlorométhylénique, significativement plus efficace, ont été caractérisés. Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans *Journal of Ethnopharmacology* en 2010.

Le fractionnement bioguidé de ce même extrait a été réalisé au cours d'une **deuxième étude**. Les métabolites responsables de l'effet vasodilatateur de *Ziziphora clinopodioides* ont été mis en évidence et leurs actions vasodilatrices ont été évaluées. Ce travail a fait l'objet d'une publication actuellement en révision dans *Fitoterapia*.

Publication 1 : Mécanismes de l'effet vasodilatateur d'un
extrait de *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae)
sur des aortes thoraciques de rats

Mechanisms of vasorelaxation induced by *Ziziphora
clinopodioides* Lam. (Lamiaceae) extract in rat thoracic aorta

François Senejoux, Corinne Girard, Parhat Kerram, Haji Akber Aisa,
Alain Berthelot, Françoise Bévalot, Céline Demougeot

Journal of Ethnopharmacology, 132 : 268–273 (2010)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Mechanisms of vasorelaxation induced by *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae) extract in rat thoracic aorta

François Senejoux^a, Corinne Girard^a, Parhat Kerram^b, Haji Akber Aisa^c,
Alain Berthelot^a, Françoise Bévalot^a, Céline Demougeot^{a,*}

^a EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon, France

^b Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, PR China

^c Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, PR China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2010

Received in revised form 6 July 2010

Accepted 8 August 2010

Available online 18 August 2010

Key-words:

Ziziphora clinopodioides Lam.

Uyghur

Traditional medicine

Hypertension

Mechanisms

Vasorelaxant

ABSTRACT

Aim of the study: *Ziziphora clinopodioides* Lam. (ZC) is widely used in Uyghur folk medicine for the treatment of hypertension diseases in Xinjiang, an autonomous region of China. To provide pharmacological basis for this traditional use, we explored the vasodilating effects of ZC and investigated the underlying mechanisms.

Materials and methods: Activity of hexane (ZCHE), dichloromethane (ZCDE) and aqueous (ZCAE) extracts of ZC were evaluated on isolated rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine (PE) or high KCl. The mechanisms were evaluated on ZCDE, the most potent extract.

Results: ZCDE-induced relaxation in endothelium-intact aortic rings pre-contracted with phenylephrine (PE, 10^{-6} M) or high KCl (6×10^{-2} M), with respective EC_{50} values of 0.27 ± 0.03 and 0.34 ± 0.04 g/l. Mechanic removal of the endothelium did not significantly modify ZCDE-induced relaxation. In endothelium-denuded aorta pre-contracted with PE (10^{-6} M), the vasorelaxant effect of ZCDE was significantly decreased by 4-amino-pyridine (10^{-3} M), but not by glibenclamide (10^{-4} M), iberiotoxin (3×10^{-8} M) and thapsigargin (10^{-7} M). In Ca^{2+} free solution, ZCDE significantly inhibited extracellular Ca^{2+} -induced contraction in high KCl and PE pre-contracted rings. Additionally ZCDE inhibited the intracellular Ca^{2+} release sensitive to PE (10^{-6} M).

Conclusions: The results demonstrate that ZCDE exhibits endothelium-independent vasodilating properties that are mediated by inhibition of extracellular Ca^{2+} influx through voltage- and receptor-operated Ca^{2+} channels (VDDCs and ROCCs), by inhibition of Ca^{2+} release from intracellular stores, and also by the opening of voltage-dependent K^+ channels.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the principal cause of death in all developed countries accounting for 50% of all deaths (Chockalingam, 2008). The majority of those deaths arised in economically developing countries, and China is dramatically affected. The morbidity and mortality of CVD in China is projected to increase, both in absolute terms and as a proportion of total disease burden, over the next 20 years. The emergence of CVD as a leading cause of death in China, in large part, is a result of the rapid economic growth and associated sociodemographic change that has occurred over the past few decades. Over this period, although the burden of infectious disease has fallen, changes in lifestyle,

diet and an increase in life expectancy have resulted in a greatly increased burden of CVD and other chronic diseases (Gu et al., 2002; Mathers et al., 2006; Lawes et al., 2008). Arterial hypertension is the most common cardiovascular disease as well as an independent but modifiable risk factor for cardiovascular and cerebrovascular diseases (Law et al., 2009). It is estimated that approximately 153 million Chinese adults had hypertension in 2002 and a cohort study has also estimated that, in 2005, around 2.33 million cardiovascular deaths and 1.27 million premature cardiovascular deaths were attributable to high blood pressure (He et al., 2009; Chen, 2010). Then, hypertension appears to be the leading preventable risk factor for premature mortality in the Chinese general population. These data underscore the urgent need to develop rationale strategies to improve prevention and treatment of hypertension in China.

The treatment of hypertension can be achieved by means of pharmacological and non-pharmacological therapies such as body

* Corresponding author Tel.: +33 3 81 66 56 68; fax: +33 3 81 66 56 91.
E-mail address: cdemouge@univ-fcomte.fr (C. Demougeot).

weight reduction, alcohol intake reduction, moderation of dietary sodium intake, increasing physical activity and by means of medicinal plants. Because the use of non-pharmacological therapies including herbal medicine is very current for the treatment of hypertension in China (Gu et al., 2002), the pharmacological validation of traditional herbs presents a great public-health interest. Uyghur people from Xinjiang, an autonomous region of China, have developed their own traditional medicine which slightly differs from the Chinese one. *Ziziphora clinopodioides* Lam., one of their medicinal plants, is traditionally used for the treatment of hypertension, fever, edema, heart disease, neurasthenic, insomnia, tracheitis, lung abscess and hemorrhoids (Liu et al., 1999; Editorial board of Flora et al., 2007). Other ethnobotanical uses of *Ziziphora* species have been recorded in Iranian and Turkish folk medicines as stomachic, aperitive, carminative and wound healing material (Meral et al., 2002; Ozturk and Ercisli, 2007). Phytochemical investigations of this genus described it as a source of essential oils, flavonoids, caffeoyl derivatives, fatty acids and sterols (Kapetanidis and Kokkalou, 1988; Oganasyan et al., 1991; Ozturk and Ercisli, 2007; Yang et al., 2008). Menthol, (+)-pulegone, 1,8-cineole and limonene were found to be the main components of the essential oils of *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Ozturk and Ercisli, 2007). Moreover, the species is able to produce some phenolic compounds such as caffeic acid or flavonoid derivatives including luteolin, 7-methylsudachitin or thymonin (Oganasyan et al., 1991; Yang et al., 2008). Previous pharmacological investigations have determined antimicrobial, antifungal, antioxidant and sedative activities due to the essential oils (Ozturk et al., 1995; Meral et al., 2002; Behravan et al., 2007). To the best of our knowledge, there is no scientific report on a vascular or cardiac activity of any plant from the genus.

In the present study, to provide pharmacological basis for the traditional use of *Ziziphora clinopodioides* Lam. as antihypertensive therapy and to discover novel vasodilators from traditional Uyghur medicine, we used the organ bath technique to explore the vasodilating effects of hexane, dichloromethane and aqueous fractions of a crude hydroalcoholic extract of the whole plant of *Ziziphora clinopodioides* Lam. on isolated rat thoracic aortas and investigated the underlying mechanisms of the most potent extract.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Ziziphora clinopodioides Lam. was collected in Altay region, Xinjiang, China, in August 2008. The plant was identified by Pr. G.M. Shen, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, where a voucher specimen (No. XJBI 580) has been deposited.

2.2. Preparation of the plant extract

Dried and powdered whole plant of *Ziziphora clinopodioides* Lam. (1.9 kg) was extracted with 6 l of a hydroalcoholic solution (80% ethanol, 20% water) by maceration at room temperature for 3 days. The extraction process was repeated three times. The extract was concentrated under reduced pressure at 40 °C, yielding 2 l of an aqueous extract, successively partitioned with hexane (8 × 200 ml) and CH₂Cl₂ (9 × 200 ml) leading to three extracts: hexane (ZCHE, 38 g), dichloromethane (ZCDE, 22 g) and aqueous (ZCAE, 95 g) extracts.

2.3. Animals

The study was conducted on male Wistar rats weighting 250–350 g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12 h–12 h light: dark cycle and allowed free access to food

and water. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85–23, revised 1996).

2.4. Vascular reactivity

After anaesthesia with pentobarbital (60 mg/kg, ip), the thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue, and cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in organ baths containing standard Krebs solution (NaCl 118 mM, KCl 4.65 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 24.9 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucose 12 mM, pH 7.4), maintained at 37 °C and continuously aerated with 95% O₂, 5% CO₂, for isometric tension recording, as previously described (Demougeot et al., 2005). After a 90 min equilibration period under a resting tension of 2 g, the presence of functional endothelium was verified by the ability of acetylcholine (ACh, 10⁻⁶ M) to induce more than 80% relaxation in rings pre-constricted with PE (10⁻⁶ M). In some rings, endothelium was mechanically removed. The completeness of endothelial denudation was confirmed by a >90% obliteration of the vasorelaxant response to the endothelial-dependent agonist ACh (10⁻⁶ M).

2.5. Experimental protocols

2.5.1. Effect of ZCHE, ZCDE and ZCAE on contraction induced by PE and KCl

The contraction of aortic rings was achieved by PE (10⁻⁶ M) or KCl (6 × 10⁻² M) (Jiang et al., 2005; Xu et al., 2010). When the contraction reached a plateau, ZCHE, ZCDE or ZCAE was added cumulatively (10⁻³ to 1 g/l) to rings with intact endothelium and to endothelium-denuded rings. The relaxation effect was calculated as the percentage of the contraction in response to PE or KCl. The effect of the solvent alone was evaluated in the same conditions.

2.5.2. Determination of the role of potassium channels in ZCDE-induced relaxation

To determine the involvement of K⁺ channels in the effects of ZCDE, the voltage-dependent K⁺ channel blocker 4-aminopyridine (4-AP, 10⁻³ M), the non-specific ATP-sensitive K⁺ channel blocker glibenclamide (10⁻⁴ M), and the large conductance calcium-activated K⁺ channel blocker iberiotoxin (3 × 10⁻⁸ M) were applied to endothelium-denuded rings 30 min prior to pre-contraction by PE (10⁻⁶ M). The cumulative concentration–response curves of ZCDE were then constructed and compared with those obtained in rings that had not been treated with these inhibitors.

2.5.3. Effect of ZCDE on extracellular calcium-induced contraction

To assess the effects of the extract on Ca²⁺-induced contractions, endothelium-denuded rings were first contracted with PE (10⁻⁶ M) to deplete intracellular Ca²⁺ stores in a Ca²⁺-free Krebs solution (containing 10⁻³ M ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetra-acetic acid (EGTA)) and then rinsed in a Ca²⁺-free solution (without EGTA). Rings were contracted with PE (10⁻⁶ M) or KCl (6 × 10⁻² M) to induce a stable contraction and CaCl₂ was added cumulatively (10⁻⁵ to 3 × 10⁻³ M) to obtain a concentration–response curve. In some rings, the EC₅₀ of the extract was applied for 10 min before the addition of PE or KCl. The contractile response to CaCl₂ was expressed as the percentage of the maximal contraction induced by PE (10⁻⁶ M) or KCl (6 × 10⁻² M) in a standard Krebs solution. The effect of the solvent alone was evaluated in the same conditions.

2.5.4. Effect of ZCDE on intracellular calcium release and re-uptake

In a first set of experiments, to determine whether the effect of ZCDE involves the modulation of the ATP-dependent Ca²⁺

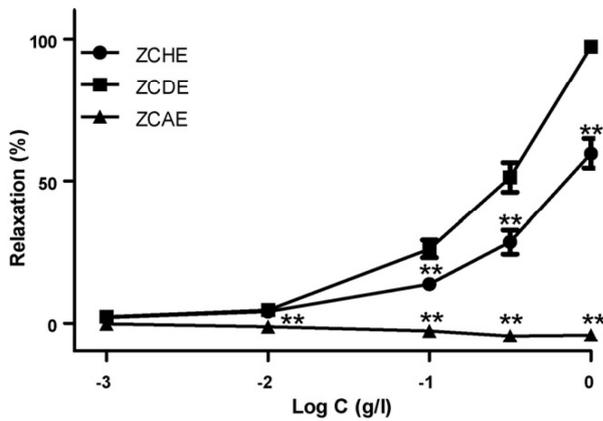


Fig. 1. Cumulative concentration–response curves of hexane (ZCHE), dichloromethane (ZCDE) and aqueous (ZCAE) extracts of *Ziziphora clinopodioides* Lam. on intact aortic rings pre-contracted with PE (10^{-6} M). Values are means \pm S.E.M. ($n=6-8$ rings), $**p < 0.001$ vs ZCDE.

pumps of the sarcoplasmic reticulum (SERCA), the SERCA inhibitor thapsigargin (10^{-7} M) was applied to endothelium-denuded rings 30 min prior to contraction with PE (10^{-6} M). Then, the cumulative concentration–response curves of ZCDE were constructed and compared with those obtained in rings that had not been treated with this inhibitor.

In a second set of experiments, to investigate whether the extract interferes with Ca^{2+} release from intracellular stores, endothelium-denuded rings were equilibrated in a Ca^{2+} -free solution (containing 10^{-3} M EGTA) and then stimulated with PE (10^{-6} M) to induce a first transient contraction (T_1). Thereafter aortic rings were washed twice for 60 min with a standard Krebs solution (for refilling of the intracellular Ca^{2+} stores) followed by twice washing with a Ca^{2+} -free solution (containing 10^{-3} M EGTA). The rings were then pre-incubated with ZCDE at the EC_{50} for 10 min before PE (10^{-6} M) was added to evoke the second transient contraction (T_2). The ratio of the second contraction to the first (T_2/T_1) was calculated. The effect of the solvent alone was evaluated in the same conditions.

2.6. Data and statistical analysis

Values are given as means \pm SEM. The extract-induced relaxation of aortic rings (%) was calculated as the percentage of contraction to PE (10^{-6} M) or KCl (6×10^{-2} M). The EC_{50} values (defined as the concentration of extract that induced 50% of the maximal relaxation) and E_{max} values (values of maximal relaxation) were determined by fitting the original dose–response curves using GraphPad Prism software (version 5.0) and compared using unpaired Student's *t*-test. Dose–response relationships were analysed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of ZCHE, ZCDE and ZCAE on contraction induced by PE and KCl

Fig. 1 represents the effects of the three extracts of *Ziziphora clinopodioides* on the contraction evoked by PE (10^{-6} mol/l). The effect of ZCDE was significantly higher than that of ZCHE and ZCAE. The cumulative addition of ZCDE (10^{-3} to 1 g/l) induced a dose-dependent relaxation in aortic rings pre-contracted by PE (Fig. 2A) and KCl (Fig. 2B), with E_{max} values reaching $95.5 \pm 2.0\%$ and

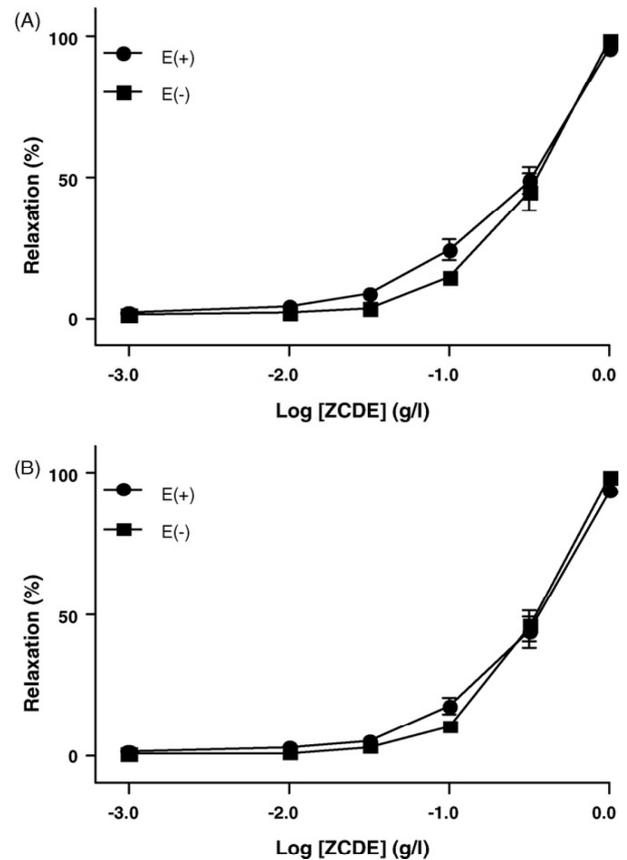


Fig. 2. Cumulative concentration–response curves of *Ziziphora clinopodioides* Lam. dichloromethane extract (ZDCE) on aortic rings with [E(+)] or without [E(-)] endothelium pre-contracted with (A) phenylephrine (PE, 10^{-6} M) and (B) KCl (6×10^{-2} M). Values are means \pm S.E.M. ($n=8-9$ rings).

$93.7 \pm 2.1\%$, respectively (data not shown). In order to precise the mechanisms involved in the vasodilating effect of ZDCE, the experiments were carried out in endothelium-denuded preparations. The mechanical removal of the endothelium did not modify the effect of ZDCE neither on PE-pre-contracted rings (Fig. 2A) nor on KCl-pre-contracted rings (Fig. 2B). The solvent used (dimethyl sulfoxide) did not affect the vasodilatory responses in the aortic rings (data not shown). Given the endothelium-independent effect of ZDCE, the following experiments were carried out on endothelium-denuded aortas.

3.2. Role of K^+ channels in ZDCE-induced relaxation

To assess the role of K^+ channels in the relaxing effect of ZDCE, aortic rings were incubated with different K^+ channels inhibitors prior to contraction with PE. As shown in Fig. 2 and Table 1, glibenclamide and iberiotoxin did not affect the relaxant effect of ZDCE. By contrast, the voltage-dependent K^+ channel blocker 4-AP significantly reduced ZDCE-induced relaxation ($p < 0.001$, Fig. 3), with E_{max} values (%) of 81.5 ± 3.5 vs control 98.7 ± 0.5 ($p < 0.001$) and EC_{50} values (g/l) of 0.45 ± 0.02 vs control 0.28 ± 0.03 ($p < 0.001$, Table 1).

3.3. Effect of ZCDE on extracellular Ca^{2+} -induced contraction

To clarify further the mechanisms underlying the endothelium-independent effect of ZDCE, we investigated the role of extracellular Ca^{2+} influx in endothelium-denuded rings. As shown in Fig. 3,

Table 1

Effect of various treatments on EC₅₀ values and maximal relaxation (*E*_{max} values) of ZCDE in endothelium-denuded rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine (10⁻⁶ M).

	EC ₅₀ (g/l)	<i>E</i> _{max} (%)
Control E(-)	0.28 ± 0.03	98.7 ± 0.5
44-Aminopyridine (4-AP, 10 ⁻³ M)	0.45 ± 0.02**	81.5 ± 3.5**
Glibenclamide (10 ⁻⁴ M)	0.28 ± 0.04	99.5 ± 0.5
Iberiotoxin (3 × 10 ⁻⁸ M)	0.31 ± 0.02	96.7 ± 1.8
Thapsigargin (10 ⁻⁷ M)	0.27 ± 0.03	98.7 ± 0.9

Data are expressed as mean ± SEM (n = 8–9 rings).

** p < 0.001 vs control E(-).

the cumulative addition of Ca²⁺ in a Ca²⁺-free medium containing PE or KCl-induced a concentration-dependent contraction of aortic rings. Pre-incubation of rings with ZCDE at the EC₅₀ (0.27 g/l for PE-induced contraction and 0.34 g/l for KCl-induced contraction) significantly inhibited the Ca²⁺-induced contraction in both PE- (p < 0.001, Fig. 4A) and KCl-constricted rings (p < 0.001, Fig. 4B).

3.4. Effect of ZCDE on intracellular Ca²⁺

The SERCA inhibitor thapsigargin did not modify ZCDE-induced relaxation on PE-pre-contracted rings (Table 1, Fig. 5A). By contrast, as shown in Fig. 5B, ZCDE (0.27 g/l) dramatically reduced the PE-induced contraction in a Ca²⁺-free solution (p < 0.001).

4. Discussion

Decoction of the whole plant of *Ziziphora clinopodioides* Lam. is used in Uyghur's folk medicine as antihypertensive therapy. The aim of the present study was to investigate the vasorelaxant effect of hexane, dichloromethane and aqueous fraction of crude hydroalcoholic extract of the whole plant of *Ziziphora clinopodioides* Lam. and to understand the underlying mechanisms.

Vascular tone and hence blood pressure are determined by the contractile state of vascular smooth muscle cells within the blood vessel wall, which is regulated by intracellular calcium concentration. The role of endothelium is of particular importance since it regulates the vascular smooth muscle tone in conduit and resistance vessels by releasing endothelium-derived relaxing factors (EDRF) (Török, 2000), including nitric oxide (NO), prostacyclin and an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Luksha et al., 2009). In the present study, our data report that ZCDE, the most

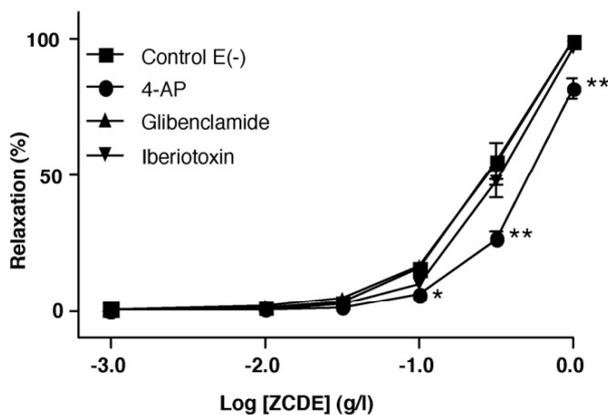


Fig. 3. Effects of the K⁺ channels inhibitors 4-aminopyridine (4-AP, 10⁻³ M), glibenclamide (10⁻⁴ M) and iberiotoxin (3 × 10⁻⁸ M) on ZCDE-induced relaxation endothelium-denuded aortic rings pre-contracted with phenylephrine (PE, 10⁻⁶ M). Values are means ± S.E.M. (n = 8–9 rings). *p < 0.05 vs Control E(-), **p < 0.001 vs Control E(-).

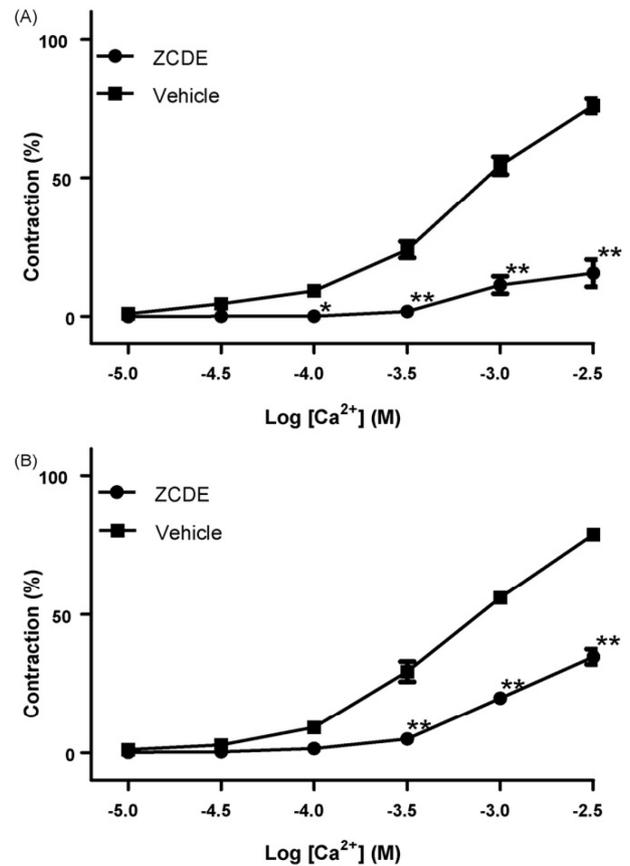


Fig. 4. Effect of ZCDE on calcium-induced vasoconstriction. Endothelium-denuded rings were incubated in a Ca²⁺-free Krebs solution and contracted with PE 10⁻⁶ M (A) or KCl 6 × 10⁻² M (B) before addition of cumulative concentration of Ca²⁺ (10⁻⁵–3 × 10⁻³ M). In some rings, before addition of PE or KCl, rings were incubated with ZCDE at 0.27 g/l and 0.34 g/l, respectively. Values are means ± SEM (n = 9 rings). *p < 0.05, **p < 0.001 vs vehicle.

potent extract, induces a dose-dependent vasodilating effect in aortic rings pre-contracted with both PE and high KCl. Of note, the results show that ZCDE-induced relaxation was not affected by the removal of the endothelium thus indicating that the vasoactive compounds of ZCDE act directly on vascular smooth muscle cells (VSMCs).

Because Ca²⁺ is a critical factor in excitation-contraction coupling in VSMCs (Lohn et al., 2000; Wellman and Nelson, 2003), we investigated the effect of ZCDE on Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release in VSMCs. Influx of extracellular calcium occurs through receptor-operated Ca²⁺ channels (ROCCs) and voltage-dependent Ca²⁺ channels (VDCCs) (Nelson and Quayle, 1995) whereas the release of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum results in the opening of inositol tri-phosphate (IP₃) receptors and ryanodine receptors (Nelson and Quayle, 1995; Thorneloe and Nelson, 2005; Imtiaz et al., 2006). Our results showed that the relaxing activity of ZCDE is evident after both PE- and KCl-induced contraction. PE is an alpha-adrenergic agonist that induces VSMCs contractions by a Ca²⁺ influx through ROCCs and by the release of intracellular Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum after activation of IP₃ receptors (Thorneloe and Nelson, 2005). By contrast, the contraction elicited by KCl mainly results from the influx of extracellular Ca²⁺ induced by depolarization of cell membrane and subsequent opening of VDCCs (Nelson and Quayle, 1995). To determine whether ZCDE modified the extracellular Ca²⁺ influx, experiments were conducted on rings contracted with PE or KCl in a Ca²⁺-free Krebs solution in which Ca²⁺

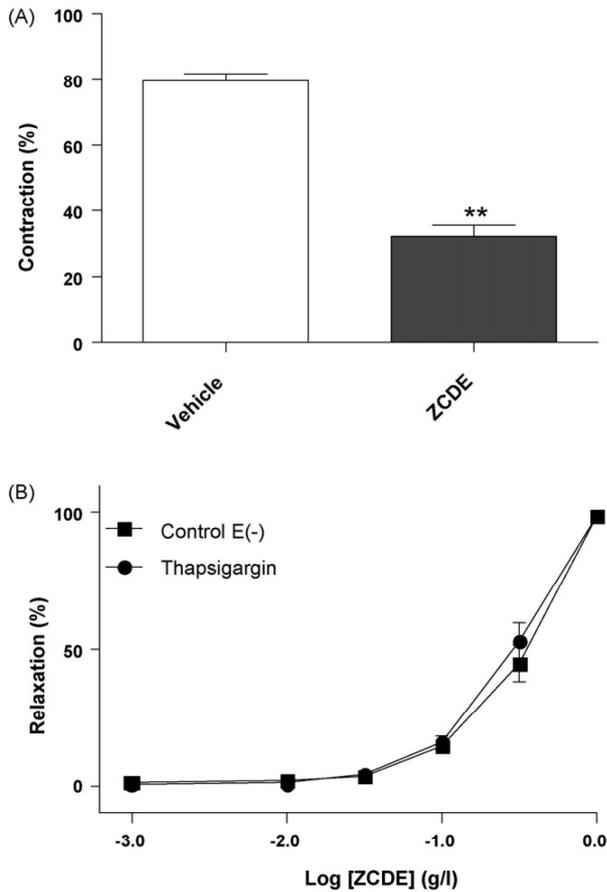


Fig. 5. Effect of ZDCE on intracellular calcium release and SERCA. (A) Effect of ZDCE (0.27 g/l) on PE (10^{-6} M)-induced contraction in endothelium-denuded aortic rings in Ca^{2+} free solution. Values are means \pm S.E.M. ($n=7$ rings), ** $p < 0.001$ vs vehicle. (B) Effect of the SERCA inhibitor thapsigargin (10^{-7} M) on ZDCE-induced relaxation on endothelium-denuded aortic rings pre-contracted with PE (10^{-6} M). Values are means \pm S.E.M ($n=8$ rings).

was added subsequently. Our data reporting that ZDCE decreased Ca^{2+} -induced contractions after both PE- and KCl-induced contraction argue for the blockade of both ROCCs and VDCCs as part of the vasodilating effects of ZDCE. At the intracellular level, the regulation of cytosolic Ca^{2+} homeostasis depends not only on Ca^{2+} release but also on Ca^{2+} re-uptake by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (Marín et al., 1999). In order to investigate whether the vasorelaxation induced by ZDCE is partly mediated by the uptake of cytosolic Ca^{2+} into the intracellular storage sites, we used thapsigargin, a selective inhibitor of the SERCA (Thastrup et al., 1990). The lack of impact of thapsigargin on ZDCE-induced relaxation indicates that the SERCA activation does not account for the vasoactivity of the extract. On contrary, our data demonstrate that ZDCE inhibited the intracellular Ca^{2+} release sensitive to PE suggesting that the extract inhibits IP_3 receptors in the sarcoplasmic reticulum.

Besides Ca^{2+} channels, K^+ channels contribute to the regulation of the membrane potential in electrically excitable cells including VSMCs (Ko et al., 2008). Membrane hyperpolarization due to an efflux of K^+ results from the opening of K^+ channels in VSMCs. This effect is followed by the closure of voltage-dependent Ca^{2+} channels, leading to the reduction in Ca^{2+} entry, and vasodilation (Nelson and Quayle, 1995). In large vessels such as aortas, three distinct K^+ channels have been identified in smooth muscle cells:

voltage-dependent (Kv) channels, Ca^{2+} -activated (BKCa) K^+ channels, ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels (Ko et al., 2008). In our study, glibenclamide, a selective K_{ATP} blocker, and iberiotoxin, a selective BKCa inhibitor did not affect the relaxing properties of ZDCE. Conversely, the Kv blocker 4-aminopyridine significantly decreased the ZDCE-induced relaxation, indicating that the activation of Kv also plays a role in the vascular effects of ZDCE. This effect on Kv, although moderate, is very interesting since Kv channels are postulated to be a major determinant of vascular tone and resting membrane potential (Ko et al., 2008) and because previous studies have reported reduced Kv channel function in vessels from hypertensive animals (Ko et al., 2008). In addition, because opening of Kv channels causes membrane hyperpolarization leading to the closure of voltage-dependent Ca^{2+} channels, this effect of ZDCE on Kv likely contributes to the inhibitory effect of the extract on voltage-dependent Ca^{2+} channels.

Further experiments are required to determine the *in vivo* anti-hypertensive properties of the plant. Although the vasorelaxation afforded by *Ziziphora clinopodioides* is likely involved in the potential antihypertensive properties of the plant, the contribution of a cardiac effect cannot be excluded. Indeed, arterial blood pressure also depends on the cardiac output which is determined by heart rate (HR), systolic volume (SV) and venous return (VR). Calcium channel blockers can reduce HR by acting on voltage-dependent T and L calcium channels in cardiac pacemaker cells and may also affect SV by reducing cardiac contractility. Moreover, cardiac cell excitability is also affected by membrane potential. Thus, an increase in potassium channel conductance decreases HR, atrio-ventricular conduction velocity and contractility. Because our study indicates that *Ziziphora clinopodioides* Lam. inhibits voltage-dependent calcium channels as well as increases the opening of voltage-dependent potassium channels, further studies investigating the *in vivo* effects of the plant should investigate its impact on cardiac function.

5. Conclusions

This study demonstrates that *Ziziphora clinopodioides* Lam. exhibits vasodilating activity. The relaxant effect does not depend on the presence of the endothelium thus indicating that endothelium-derived relaxing factors such as NO, prostacyclin or EDHF are not involved. The extract acts directly on vascular smooth muscle cells and relaxation is mainly related to the inhibition of both extracellular and intracellular Ca^{2+} mobilization. Additionally, the studied extract also acts through the opening of voltage-dependent K^+ channels. Our data demonstrate for the first time that *Ziziphora clinopodioides* Lam. is a source of vasoactive compounds that might account for its use as antihypertensive therapy in Uyghur traditional medicine. Further phytochemical and pharmacological experiments are from now required to isolate and identify the active principle(s) and to determine the effects of *Ziziphora clinopodioides* Lam. on clinically relevant animal models of hypertension.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Région of Franche-Comté and the French Ministry of Foreign and European Affairs.

References

- Behravan, J., Ramezani, M., Hassanzadeh, M.K., Eskandari, M., Kasaian, J., Sabeti, Z., 2007. Composition, antimycotic and antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants 10, 339–345.
- Chen, J., 2010. Epidemiology of hypertension and chronic kidney disease in China. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 19, 278–282.

- Chockalingam, A., 2008. World Hypertension Day end global awareness. Canadian Journal of Cardiology 24, 441–444.
- Demougeot, C., Prigent-Tessier, A., Marie, C., Berthelot, A., 2005. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension 23, 971–978.
- Editorial board of Flora, et al., 2007. Flora Xinjiangensis. Xinjiang Science & Technology Publishing House, Urumchi, 4, p. 327.
- Gu, D., Reynolds, K., Wu, X., Chen, J., Duan, X., Muntner, P., Huang, G., Reynolds, R.F., Su, S., Whelton, P.K., He, J., 2002. Prevalence, awareness treatment, and control of hypertension in China. Hypertension 40, 920–927.
- He, J., Gu, D., Chen, J., Wu, X., Kelly, T.N., Huang, J.F., Chen, J.C., Chen, C.S., Bazzano, L.A., Reynolds, K., Whelton, P.K., Klag, M.J., 2009. Premature deaths attributable to blood pressure in China: a prospective cohort study. The Lancet 374, 1765–1772.
- Imtiaz, M.S., Katnik, C.P., Smith, D.W., van Helden, D.F., 2006. Role of voltage-dependent modulation of store Ca^{2+} release in synchronization of Ca^{2+} oscillations. Biophysical Journal 90, 1–23.
- Jiang, H.D., Cai, J., Xu, J.H., Zhou, X.M., Xia, Q., 2005. Endothelium-dependent and direct relaxation induced by ethyl acetate extract from *Flos Chrysanthemi* in rat thoracic aorta. Journal of Ethnopharmacology 101, 221–226.
- Kapetanidis, J., Kokkalou, E., 1988. Flavonoids from the aerial parts of *Ziziphora taurica* Marsch Bieb. ssp. *cleonoides* (Boiss.) P.H. Davis (Lamiaceae). Pharmaceutica Acta Helvetiae 63, 206–208.
- Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D., Park, W.S., 2008. Physiological role of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. Journal of Smooth Muscle Research 44, 65–81.
- Law, M.R., Morris, J.K., Wald, N.J., 2009. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. British Medical Journal 339, 1665.
- Lawes, C.M.M., Vander Hoorn, S., Rodgers, A., 2008. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. The Lancet 371, 1513–1518.
- Liu, Y.M., Liu, W.X., Shawuti, Y., Zou, Y., 1999. Pharmacography of Uighur, vol. 1. Xinjiang Science & Technology & Hygiene Publishing House, Urumqi, pp. 446–449.
- Lohn, M., Furstenuau, M., Sagach, V., Elger, M., Schulze, W., Luft, F.C., Haller, H., Gollasch, M., 2000. Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. Circulation Research 87, 1034–1039.
- Luksha, L., Agewall, S., Kublickiene, K., 2009. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. Atherosclerosis 202, 330–344.
- Marín, J., Encabo, A., Briones, A., García-Cohen, E.C., Alonso, M.J., 1999. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. Life Sciences 64, 279–303.
- Mathers, C.D., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., 2006. The burden of disease and mortality by condition: data, methods and results for 2001. In: Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T., Murray, C.J.L. (Eds.), Global Burden of Disease and Risk Factors. Oxford University Press, New York, pp. 45–240.
- Meral, G.E., Konyalioglu, S., Ozturk, B., 2002. Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Ziziphora taurica* subsp. *cleonoides*. Fitoterapia 73, 716–718.
- Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. American Journal of Physiology 268, 799–822.
- Oganesyan, G.B., Galstyan, A.M., Mnatsakanyan, V.A., Paronikyan, R.V., Ter-Zakharyan, Y.Z., 1991. Phenolic and flavonoid compounds of *Ziziphora clinopodioides*. Chemistry of Natural Compounds 27, 247.
- Ozturk, Y., Aydm, S., Tecik, B., Baser, K.H.C., 1995. Effects of essential oils from certain *Ziziphora* species on swimming performance in mice. Phytotherapy Research 9, 225–227.
- Ozturk, S., Ercisli, S., 2007. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. Food Control 18, 535–540.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., Dawson, A.P., 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 2466–2470.
- Thorneloe, K.S., Nelson, M.T., 2005. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 83, 215–242.
- Török, J., 2000. Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. Physiological Research 49, 107–114.
- Wellman, G.C., Nelson, M.T., 2003. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca^{2+} -sensitive ion channels. Cell Calcium 34, 211–229.
- Xu, Z., Wang, X., Dai, Y., Kong, L., Wang, F., Xu, H., Lu, D., Song, J., Hou, Z., 2010. (\pm)-Praeruptorin A enantiomers exert distinct relaxant effects on isolated rat aorta rings dependent on endothelium and nitric oxide synthesis. Chemico-Biological Interactions 186, 239–246.
- Yang, X.J., Li, N., Meng, D.-L., Li, W., Li, X., 2008. Isolation and identification of chemical constituents from *Ziziphora clinopodioides* Lam. Journal of Shenyang Pharmacy University 25, 456–458.

Publication 2 : Isolement bioguidé des composés vasodilatateurs de *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae)

Bioassay-guided isolation of vasorelaxant compounds from *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae)

François Senejoux, Céline Demougeot, Parhat Kerram, Haji Akber Aisa,
Alain Berthelot, Françoise Bévalot, Corinne Girard

En révision dans **Fitoterapia**

**Bioassay-guided isolation of vasorelaxant compounds from *Ziziphora
clinopodioides* Lam. (Lamiaceae)**

François Senejoux ^a, Céline Demougeot ^a, Parhat Kerram ^b, Haji Akber Aisa ^c,
Alain Berthelot ^a, Françoise Bévalot ^a, Corinne Girard ^{a*}

Affiliation

^a EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon, France

^b Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, PR China

^c Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, PR China.

Corresponding author:

Dr Corinne GIRARD

EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 BESANCON, France

Phone number: (33) 3 81 66 55 59

Fax number: (33) 3 81 66 55 68

E-mail address: corinne.girard@univ-fcomte.fr

ABSTRACT

Ziziphora clinopodioides Lam. (Lamiaceae) is traditionally used in Uyghur's medicine for the treatment of hypertension. Our study determined and evaluated the bioactive compounds by performing an activity-guided fractionation of a hydroalcoholic extract of the whole plant, using *in vitro* model of rat isolated thoracic aortic rings. Seven compounds were identified as active principles: acacetin, apigenin, chrysin, thymonin, acetovanillone, 4-hydroxyacetophenone and ethyl 4-hydroxycinnamate. Apigenin, chrysin and ethyl 4-hydroxycinnamate were found to be the most effective. Our results provide the first evidence that the vasodilation induced by *Ziziphora clinopodioides* Lam. is mediated, at least in part, by phenolic components.

Key words: Uyghur traditional medicine; *Ziziphora clinopodioides* Lam.; bioassay-guided fractionation; rat aortic rings; vasorelaxant; phenolic compounds.

1. Introduction

Hypertension is a major risk factor for stroke, myocardial infarction, heart and kidney failure. Worldwide hypertension is estimated to cause 7.1 million premature deaths and 4.5 % of the disease burden. [1] Because phytomedicine is extensively used to prevent and heal various cardiovascular problems including hypertension, the pharmacological validation of the use of folk medicinal plants is of great interest for public health. Moreover, the identification of bioactive components from traditional antihypertensive plants may constitute a good way for the discovery of new antihypertensive agents.

Uyghur traditional medicine is one of the four major Chinese medicine systems, along with Chinese, Tibetan, and Mongolian traditional medicines. Uyghur people from Xinjiang autonomous region of westernmost China have developed an extensive knowledge of medicine and traditional medical practice. They traditionally use the whole plant of *Ziziphora clinopodioides* Lam. for the treatment of fever, edema, neurasthenic, insomnia, tracheitis, lung abscess, hemorrhoids, heart disease and hypertension. [2,3] *Ziziphora clinopodioides* Lam. is also used in Turkish folk medicine as stomachic, aperitive, carminative and wound healing material. The species is an edible plant and is frequently consume in Turkey as wild vegetable or additive in foods to offer aroma and flavor. [4]

Phytochemical investigations on *Ziziphora* genus mainly focussed on its essential oil composition. [4,5,6] A few studies described it as a source of flavonoids, caffeoyl derivatives, fatty acids and sterols. [7,8,9,10] Recent pharmacological investigations from our laboratory demonstrated the vasorelaxant properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam. and led to the characterization of an endothelium-independent effect due to changes in potassium and calcium channels conductances. [11] However, the compounds responsible for the vasorelaxant properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam. have never been identified.

To provide further scientific basis for the traditional use of *Ziziphora clinopodioides* Lam. as antihypertensive therapy and to discover novel vasodilators from natural resources, the present study was designed to identify its bioactive components by using a bioassay-guided fractionation on isolated rat aortas.

2. Experimental

2.1. Plant material

Ziziphora clinopodioides Lam. was collected in Altay region, Xinjiang, China, in August 2008. The plant was identified by Pr. G. M. Shen, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, where a voucher specimen (No. XJBI 580) has been deposited.

2.2. Extraction, Fractionation and Isolation

Dried and powdered whole plant of *Ziziphora clinopodioides* Lam. (1.9 kg) was extracted with 6 l of a hydroalcoholic solution (80% ethanol, 20% water) by maceration at room temperature for three days. The extraction process was repeated three times. The extract was concentrated under reduced pressure at 40 °C, yielding 2 l of an aqueous extract. This extract was successively partitioned with hexane (8x200 ml) and dichloromethane (CH₂Cl₂) (9x200 ml). The obtained extracts were dried to give three fractions: a hexane fraction (38 g), a CH₂Cl₂ fraction (22 g) and an aqueous fraction (95 g). A portion of 18 g of the CH₂Cl₂ fraction was subjected to a column chromatography (CC) (Sephadex[®] LH 20) with CH₂Cl₂:Methanol (MeOH) (1:1) as eluant, yielding six fractions (A-F) combined according to TLC detection. Fraction D was chromatographed using flash CC (Armen instrument Spot II ultimate[®]) over silica gel (Si60 40-63 μm) (CH₂Cl₂:MeOH of increasing polarity 0-20%) to obtain five fractions (D1-D5). D2 (380 mg) was submitted to a second flash CC over silica gel (CH₂Cl₂:MeOH of increasing polarity 0-7%) to give **1** (12 mg), **2** (30 mg) and **4** (20 mg).

D3 (750 mg) was purified by crystallization in a mixture CH₂Cl₂:MeOH (1:1) to afford **3** (300 mg). Fraction E was fractionated by flash CC over silica gel with gradient system of increasing polarity CH₂Cl₂:MeOH (0-15%), yielding thirteen fractions (E1-E13). E4 (100 mg) was purified by crystallization in a mixture CH₂Cl₂:MeOH (1:1) to afford 25 mg of a mixture of **5** (40%) and **6** (60%), **2** (75 mg) was identified in this fraction after **5** and **6** crystallization. E8 (110 mg) was submitted to a second flash CC over silica gel (CH₂Cl₂:MeOH of increasing polarity 0-10%) to afford **7** (20 mg). The structures of the compounds were determined using spectroscopic techniques including UV, ¹H and ¹³C NMR spectrometry. The RMN spectra were compared with those of authentic samples and with published data. [12,13,14]

2.3. Total polyphenol content

Total phenolic compounds were assayed according to the Folin–Ciocalteu method [15] modified by Dewanto et al. [16] An aliquot of diluted crude hydroalcoholic extract was added to 0.5 ml of distilled water and 0.125 ml of the Folin–Ciocalteu's reagent. The mixture was shaken and allowed to stand for 6 min, before addition of 1.25 ml of 7% Na₂CO₃. The solution was then adjusted with distilled water to a final volume of 3 ml and mixed thoroughly. After a 30 min-incubation period in the dark, the absorbance was read at 760 nm. The total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry extract calculated from a standard curve of gallic acid. All samples were analysed in triplicate.

2.4. Chemicals and solutions

Acacetin, acetovanillone, acetylcholine, apigenin, Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid and phenylephrine were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), chrysin and 4-hydroxyacetophenone were purchased from Acros organics (Noisy-le-Grand, France). Excepted the water fraction which had been dissolved in water, all the tested samples were dissolved in a mixture of dimethylsulphoxide (VWR International SAS – Strasbourg, France)

and water. All solutions were prepared just before their uses and protected from the light. Their concentrations (referred in the text) are the final concentrations of the chamber solutions.

2.5. *Animals*

The study was conducted on male Wistar rats weighting 250-350 g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12 h-12 h light:dark cycle and allowed free access to food and water. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

2.6. *Vascular reactivity*

After anaesthesia with pentobarbital (60 mg/kg, ip), the thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue, and cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in organ baths containing Krebs solution (NaCl 118 mM, KCl 4.65 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 24.9 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucose 12 mM, pH 7.4), maintained at 37°C and continuously aerated with 95% O₂, 5% CO₂, for isometric tension recording, as previously described. [17] After a 90-min-equilibration period under a resting tension of 2 g, the presence of functional endothelium was verified by the ability of acetylcholine (ACh, 1 µM) to induce more than 80% relaxation in rings precontracted with phenylephrine (PE, 0.1 µM). The several extracts, fractions and pure compounds of *Ziziphora clinopodioides* Lam. were cumulatively added to the organ bath after PE (1 µM) response reached a plateau. The effect of the solvent alone was evaluated in the same conditions and relaxation experiments showed that it did not produce any significant vasodilation (data not shown).

2.7. Data and Statistical analysis

Values are given as means \pm SEM. The extract-induced relaxation of aortic rings (%) was calculated as the percentage of contraction to PE (1 μ M). The EC₅₀ values (defined as the concentration of extract that induced 50% of the maximal relaxation) and E_{max} values (values of maximal relaxation) were determined by fitting the original dose-response curves using the Prism version 5.0, Graphpad Software (U.S.A.). Dose-response relationships were analysed using two-way ANOVA. Comparison between groups was assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Bioassay-guided fractionation

As summarized in Table 1, we demonstrated that the hydroalcoholic extract of *Ziziphora clinopodioides* induced a relaxant effect on isolated aortic rings. We previously reported that, after liquid-liquid partition of this extract, both the hexane and CH₂Cl₂ fractions induced vasorelaxant effects whereas the aqueous fraction did not produce any effect. [11]

Table 1. Half-maximum effective concentration (EC₅₀) and maximal vasorelaxation (E_{max}) of hydroalcoholic extract, hexane fraction, dichloromethane fraction and aqueous fraction of *Ziziphora clinopodioides* in endothelium-intact rat aortic rings precontracted with phenylephrine (1 μ M). Adapted from Senejoux et al. (2010).

	EC ₅₀ (g/l)	E _{max} (%)
Hydroalcoholic extract	<i>N.C.</i>	50.3 \pm 4.9*
Hexane fraction	<i>N.C.</i>	59.7 \pm 4.2*
Dichloromethane fraction	0.27 \pm 0.03	95.5 \pm 2.0
Aqueous fraction	<i>N.C.</i>	-4.2 \pm 2.0*

Values are means \pm S.E.M (n=6-8 rings). *N.C.*: not calculated because of the low efficacy.

* $p < 0.001$ vs dichloromethane fraction.

Since the CH₂Cl₂ fraction was clearly the most effective, a column chromatography (Sephadex[®] LH20) was performed and six fractions were obtained (A-F). Each one was tested

for relaxing activities. The results reported that only the fractions D and E exhibited vasodilating properties. As shown in Fig. 1, the vasorelaxant effect of the fraction E was significantly greater than that of the fraction D ($p < 0.001$).

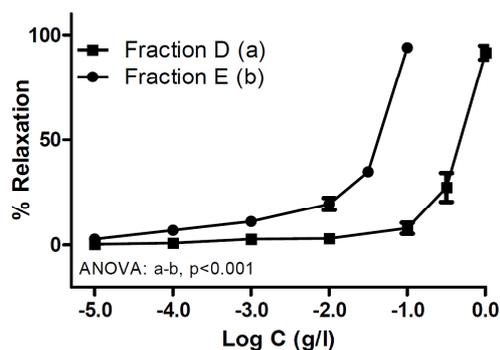


Fig. 1. Concentration-dependent effects of fractions D (a) and E (b) on intact rat aorta rings pre-contracted with PE 1 μ M. Values are means \pm S.E.M (n=6-8 rings).

In order to identify the pure compounds responsible for the activities of these two fractions, a phytochemical study was carried out and led to the isolation and the identification of seven major constituents presented in Fig. 2. Two acetophenones, acetovanillone (1) and 4-hydroxyacetophenone (2), the cinnamic acid derivative ethyl 4-hydroxycinnamate (4) and the flavone thymonin (3) were obtained from fraction D. In the fraction E, the three known flavones chrysin (5), acacetin (6) and apigenin (7) were identified together with 4-hydroxyacetophenone (2).

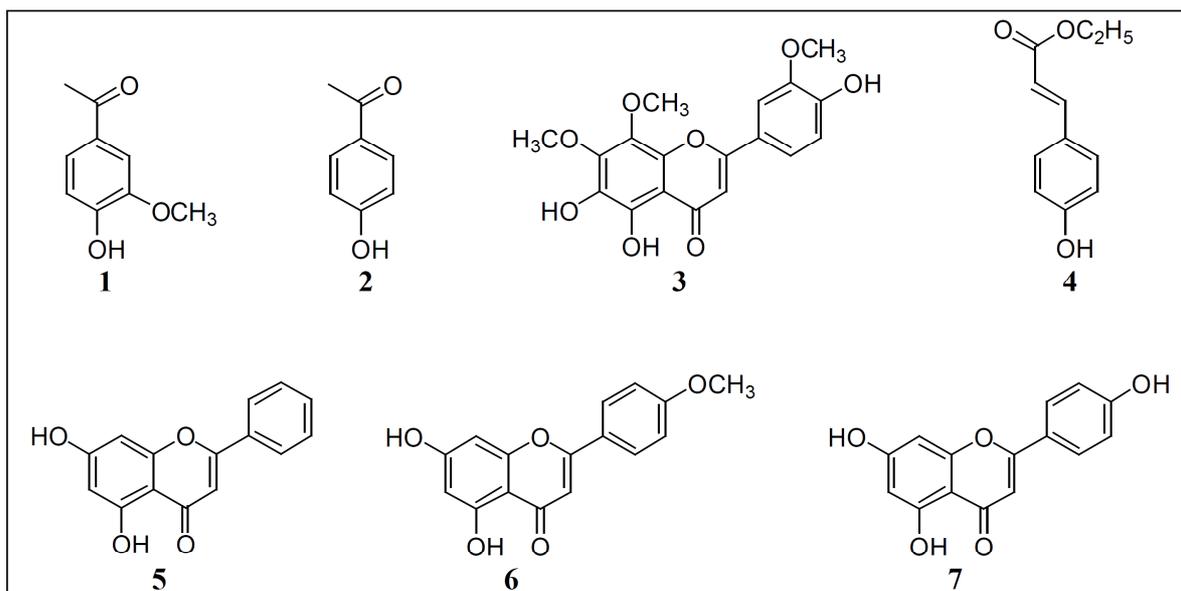


Fig. 2. Molecular structures of the seven isolated compounds.

3.2. Vasorelaxant effects of the isolated compounds from *Ziziphora clinopodioides* Lam.

As shown in Fig. 3, all the isolated compounds exhibited vasodilating properties. In the flavones group (Fig. 3A), the data showed that the four isolated compounds exhibited significant differences in their vasoactive properties, as follows: Apigenin > Chrysin > Thymonin > Acacetin. By contrast, as shown in Fig 3B, no difference was observed for the relaxation induced by the two isolated acetophenones. Table 2 represents the E_{max} and EC_{50} of the seven vasoactive compounds. The results demonstrated that ethyl 4-hydroxycinnamate (4), apigenin (7) and chrysin (5) exhibited the highest efficacy (E_{max}) as compared to the other compounds with E_{max} being $92.2 \pm 0.9\%$, $88.5 \pm 1.1\%$ and $82.7 \pm 4.3\%$, respectively. Data showed that apigenin ($EC_{50} = 189.4 \pm 12.4 \mu M$) is significantly more potent than ethyl 4-hydroxycinnamate ($EC_{50} = 421.4 \pm 13.2 \mu M$) and chrysin ($347.8 \pm 23.9 \mu M$) ($p < 0.001$).

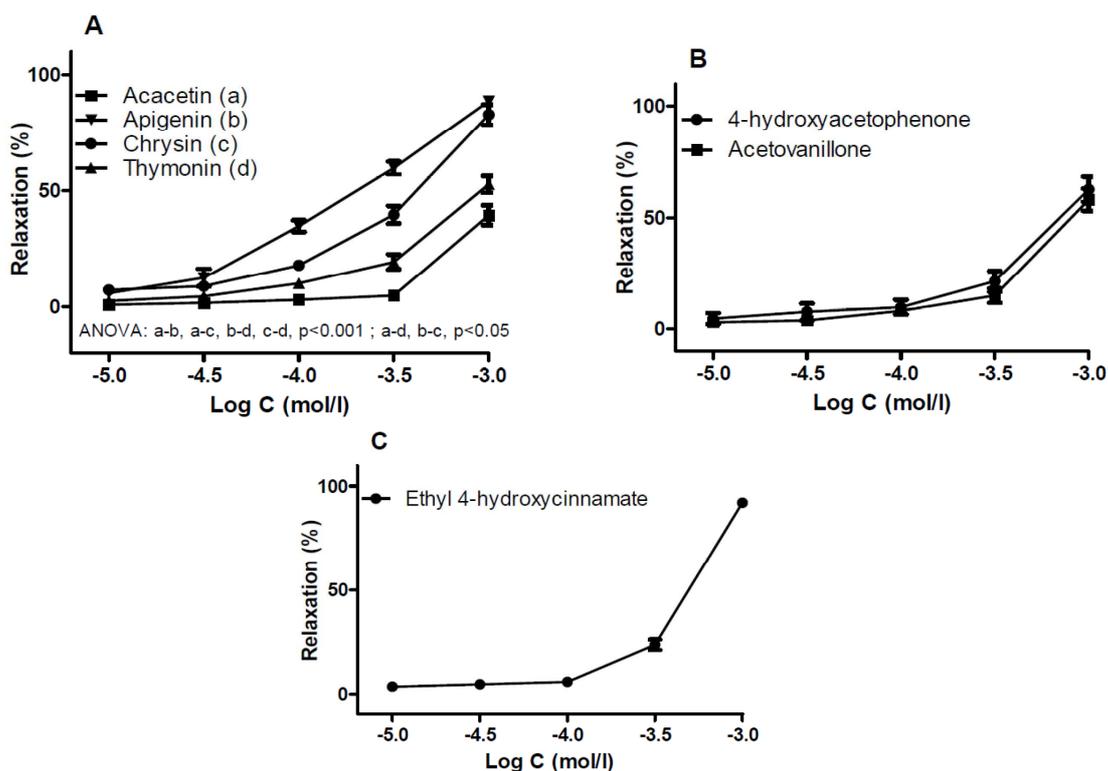


Fig. 3. Concentration-dependent effects of flavones (A), acetophenones (B), and cinnamic acid derivative (C) isolated from *Ziziphora clinopodioides* Lam. on intact rat aorta rings pre-contracted with PE (1 μ M). Values are means \pm S.E.M (n=6-8 rings).

Table 2. Half-maximum effective concentration (EC_{50}) and maximal vasorelaxation (E_{max}) of flavones, acetophenones, and cinnamic acid derivative isolated from *Ziziphora clinopodioides* Lam in endothelium-intact rat aortic rings precontracted with PE (1 μ M).

	EC_{50} (μ M)	E_{max} (%)
Flavones		
Apigenin (7)	189.4 \pm 12.4 ^{c,d}	88.5 \pm 1.1 ^{a,b,c,e,f}
Chrysin (5)	347.8 \pm 23.9 ^c	82.7 \pm 4.3 ^{a,b,c,e,f}
Thymonin (3)	N.C.	52.7 \pm 3.6 ^c
Acacetin (6)	N.C.	39.5 \pm 4.2 ^{a,b,c}
Cinnamic acid derivative		
Ethyl 4-hydroxycinnamate (4)	421.4 \pm 13.2	92.2 \pm 0.9 ^{a,b}
Acetophenones		
4-hydroxyacetophenone (2)	N.C.	62.7 \pm 5.7
Acetovanillone (1)	N.C.	58.0 \pm 5.0

Values are means \pm S.E.M (n=6-7 rings). N.C: not calculated because of the low efficacy. a (p<0.05) different from acetovanillone, b (p<0.05) different from 4-hydroxyacetophenone, c (p<0.05) different from ethyl 4-hydroxycinnamate, d (p<0.05) different from chrysin, e (p<0.05) different from acacetin, f (p<0.05) different from thymonin.

3.3. Total phenol content

The total phenol amount in the crude hydroalcoholic extract was 64 ± 2 mg of gallic acid equivalents per g of dry extract (data not shown).

4. Discussion

Although *Ziziphora clinopodioides* Lam. is widely used in traditional Uyghur's medicine for the treatment of hypertension, the compounds responsible for its cardiovascular activity have never been identified. Our data demonstrate that seven phenolic compounds contribute to the vasorelaxant properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam.

An activity-guided fractionation process led us to identify seven phenolic compounds in the two bioactive subfractions of the CH₂Cl₂ part: four flavones (thymonin (3), chrysin (5), acacetin (6) and apigenin (7)), two acetophenones (acetovanillone (1) and 4-hydroxyacetophenone (2)) and one cinnamic acid derivative (ethyl 4-hydroxycinnamate (4)). From a chemotaxonomic point of view, the presence of thymonin (3) has been previously reported in *Ziziphora* genus in this same species [9] whereas all other compounds isolated are described for the first time in the genus. Consistent with our findings, a glycoside of chrysin was previously isolated in *Ziziphora clinopodioides* Lam. [8]

To determine the contribution of these compounds in the vasoactivity of *Ziziphora clinopodioides* Lam., the vasorelaxant effect of each pure compound was evaluated. Our results demonstrated that all the compounds elicited vasorelaxation and consequently should be regarded as involved in the vasorelaxant effect of the whole extract. Whereas the vasodilating effects of acetovanillone (1), chrysin (5), acacetin (6) and apigenin (7) on rat isolated aortic rings have been previously reported, [18,19,20] our study provides the first evidence that 4-hydroxyacetophenone (2), ethyl 4-hydroxycinnamate (4) and thymonin (3)

elicit a vasodilating effect on rat aorta. Moreover, our results demonstrated that ethyl 4-hydroxycinnamate (4), chrysin (5) and apigenin (7) exhibited the highest efficacy.

The comparison of the vasodilating effects of the four flavones isolated from *Ziziphora clinopodioides* Lam. gives insights in the structure-activity relationship for the vasoactivity of flavonoids compounds. On one hand, the fact that the relaxant effect of apigenin (7) is significantly higher than that of chrysin (5) suggests that the hydroxyl group in position C-4' increases the activity of flavone compounds. On the other hand, the presence of a methoxyl group in this position strongly decreased the relaxant effect of acacetin (6) which is significantly less active than chrysin (5) or apigenin (7). Finally, the moderate effect of thymonin (3) compared to chrysin (5) and apigenin (7) is consistent with previous studies which described that a hydroxyl group in position C-6 or the presence of three continuous groups at C-5, C-6 and C-7 decreased the vasorelaxant activity of the flavonoids. [21,22,23]

Phenolic compounds are known to exhibit antioxidant and radical scavenging properties. [24,25] In our study, the amount of the total phenolics was found to be ~64 mg/g. This data is consistent with recent results reporting that the phenol content of a methanol extract of *Ziziphora clinopodioides* Lam. was ~130 mg/g, and was associated to an *in vitro* antioxidant effect. [26] At the vascular level, antioxidant activity is expected to increase the bioavailability of nitric oxide, the main endothelium-derived relaxing factor, at least in pathological conditions associated to increased oxidative stress. [27] Although this mechanism might contribute to the beneficial effect of *Ziziphora clinopodioides* Lam. in hypertension, we hypothesize that this mechanism is of minor contribution in our study because the experiments were conducted on isolated aortas from normal rats and the vasodilating effects were reported to be endothelium-independent and mainly due to changes in calcium channel conductances. [11] Of interest, those data are in accordance with several

studies which described the flavones- and the cinnamic derivatives-induced vasodilations as being mainly endothelium-independent and calcium-dependent. [28,29]

In conclusion, our study demonstrates for the first time that the vasodilating properties of *Ziziphora clinopodioides* Lam are, at least in part, due to phenolic components. The phytochemical analysis identified seven phenolic compounds responsible for its activity. These data provide a rationale for the empirical use of *Ziziphora clinopodioides* Lam. as antihypertensive therapy in Uyghur's medicine.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Région Franche-Comté and by the French Ministry of Foreign and European Affairs.

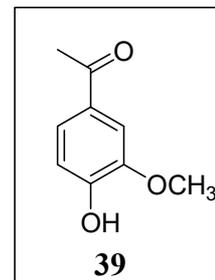
References

- [1] World Health Organization. "The World Health Report: Risks to Health", World Health Organization, Geneva, 2002.
- [2] Liu YM, Liu WX, Shawuti Y, Zou Y, "Pharmacography of Uighur," Vol I, Xinjiang Science & Technology & Hygiene Publishing House, Urumqi, 1999, pp. 446-449.
- [3] Editorial board of Flora Xinjiangensis., "Flora Xinjiangensis", Xinjiang Science & Technology Publishing House, Urumqi, 2004, pp. 327.
- [4] Ozturk S, Ercisli S, Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. Food Cont 2007; 18: 535-540.
- [5] Meral GE, Konyalioglu S, Ozturk B, Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides*. Fitoterapia 2002; 73: 716-718.
- [6] Aghajani Z, Assadian F, Masoudi S, Chalabian F, Esmaeili A, Tabatabaei-Anaraki M, Rustaiyan A, Chemical composition and *in vitro* antibacterial activities of the oil of *Ziziphora clinopodioides* and *Z. capitata* subsp. *capitata* from Iran. Chem Nat Comp 2008; 44: 387-389.
- [7] Kapetanidis J, Kokkalou E, Flavonoids from the aerial parts of *Ziziphora taurica* Marsch. Bieb. ssp. *cleonioides* (Boiss.) P. H. Davis (Lamiaceae). Pharm Acta Helv 1988; 63: 206-208.
- [8] Oganessian GB, Galstyan AM, Gach-Baits E, Mnatsakanyan VA, Oleanolic acid and flavonoid glycosides from *Ziziphora clinopodioides*. Arm Khim Zhurn 1990; 43: 210-211.
- [9] Oganessian GB, Galstyan AM, Mnatsakanyan VA, Paronikyan RV, Ter-Zakharyan YZ, Phenolic and flavonoid compounds of *Ziziphora clinopodioides*. Chem Nat Comp 1991; 27: 247.
- [10] Yang XJ, Li N, Meng DL, Li W, Li X, Isolation and identification of chemical constituents from *Ziziphora clinopodioides* Lam. J Shenyang Pharm University 2008; 25: 456-458.
- [11] Senejoux F, Girard C, Kerram P, Aisa HA, Berthelot A, Bévalot F, Demougeot C, Mechanisms of vasorelaxation induced by *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae) extract in rat thoracic aorta. J Ethnopharmacol 2010;132: 268-273.
- [12] Park Y, Moon BH, Lee E, Lee Y, Yoon Y, Ahn JH, Lim Y, Magn Reson Chem 2007; 45: 674-679.
- [13] Dias C, Dias M, Borges C, Almoester Ferreira MA, Paulo A, Nascimento J, J Mass Spectrom 2003; 38: 1240-1244.
- [14] Morimitsu Y, Yoshida K, Esaki S, Hirota A, Biosci Biotechnol Biochem 1995; 59: 2018-2021.
- [15] Singleton VL, Rossi JA, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Oenol Vitic 1965; 16: 144-158.
- [16] Dewanto V, Wu XK, Adom KK, Liu RH, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J Agric Food Chem 2002; 50: 3010-3014.

- [17] Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A, Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005; 23: 971-978.
- [18] Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, Breschi MC, Martinotti E, *Arch Pharmacol* 2004; 370: 290-298.
- [19] Hamilton CA, Brosnan J, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF, NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension* 2002; 40: 755-762.
- [20] Zhang YH, Park YS, Kim TJ, Fang LH, Ahn HY, Hong J, Kim Y, Lee CK, Yun YP, Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen Pharmacol* 2002; 35: 341-347.
- [21] Ajay M, Gilani AH, Mustafa MR, Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2003; 74: 603-612.
- [22] Dong X, Liu T, Yan J, Wu P, Chen J, Yongzhou H, Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activities relationship of flavonoids as vasorelaxant agents. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 716-726.
- [23] Ko WC, Liu PY, Chen JL, Leu IJ, Shih CM, Relaxant effects of flavonoids in isolated guinea pig trachea and their structure-activity relationships. *Planta Med* 2003; 69:1086-1090.
- [24] Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK, Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *Int J Biol Macromol* 2007; 41: 42-48.
- [25] Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB, The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995; 22: 375-383.
- [26] Gursoy N, Sihoglu-Epe A, Tepe B, Determination of *in vitro* antioxidative and antimicrobial properties and total phenolic contents of *Ziziphora clinopodioides*, *Cyclotrichium niveum*, and *Mentha longifolia* ssp. *thyphoides* var. *thyphoides*. *J Med Food* 2009; 12: 684-689.
- [27] Carr A, Frei B, The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1806-1814.
- [28] Chan ECH, Pannangpetch P, Woodman OL, Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J Cardiovas Pharmacol* 2000; 35: 326-333.
- [29] Chen GP, Ye Y, Li L, Qian AB, Hu SJ, Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. *Life Sci* 2009; 84:81-88.

II.2. Étude pharmacologique des mécanismes vasodilatateurs de l'apocynine

Parmi les sept métabolites vasoactifs identifiés lors du précédent bioguidage, l'apocynine (**39**) a particulièrement attiré notre attention. Cette acétophénone, que l'on peut également nommer acétovanillone, est en effet un réactif bien connu en pharmacologie expérimentale car largement utilisée pour ses propriétés inhibitrices de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH) oxydase.



Principale pourvoyeuse des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), cette enzyme est fortement impliquée dans la production du stress oxydant dont les effets délétères sont à l'origine de nombreuses pathologies. Au niveau vasculaire, une génération excessive d' $O_2^{\cdot-}$ est capable d'inactiver le NO et pourrait exercer un rôle causal dans le développement et le maintien de la dysfonction endothéliale (Cai et Harrison, 2000). De nombreuses études menées dans des conditions de stress oxydant pathologique ont ainsi démontré l'action vasculaire bénéfique de l'apocynine, classiquement considérée comme étant secondaire d'une réduction de la production d' $O_2^{\cdot-}$.

Cependant, les résultats de notre précédente étude, réalisée sur des vaisseaux de rats normotendus et par conséquent dénués de production excessive d' $O_2^{\cdot-}$, révèlent des propriétés vasodilatatrices directes et indépendantes du stress oxydant. Cette découverte originale nous a donc conduit à étudier de façon détaillée les mécanismes responsables de l'action vasodilatatrice de l'apocynine. Ce travail a fait l'objet d'une publication en révision dans *Fundamental and Clinical Pharmacology*.

Publication 3 : Nouvelles données concernant les effets
vasodilatateurs de l'apocynine
sur des aortes thoraciques de rats

New insights in the mechanisms of the vasorelaxant effects
of apocynin in rat thoracic aorta

François Senejoux, Corinne Girard,
Alain Berthelot, Françoise Bévalot, Céline Demougeot

Travail en révision dans **Fundamental & Clinical Pharmacology**

**New insights in the mechanisms of the vasorelaxant effects
of apocynin in rat thoracic aorta**

Running title : Mechanisms of apocynin-induced vasorelaxation

Senejoux François^a, Girard Corinne^a, Berthelot Alain^a, Bévalot Françoise^a, Demougeot
Céline^{a,*} (✉)

^aEA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences
Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon, France

*** Corresponding author:**

Céline DEMOUGEOT

Pôle "Dysfonction endothéliale", EA 4267

UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques

4 Place Saint-Jacques

25030 BESANCON cedex, FRANCE.

Tel: (33) 3 81 66 56 68

Fax: (33) 3 81 66 56 91

E-mail address: cdemouge@univ-fcomte.fr

Abstract

Apocynin is a naturally occurring acetophenone widely used as an inhibitor of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. Recent data suggested that apocynin might exert NADPH oxidase-independent pharmacological properties. Among them, vasorelaxant properties have been described but the mechanisms are still a matter of debate. The present study investigated the mechanisms involved in the vasorelaxant effect of apocynin on the *in vitro* model of rat isolated thoracic aortic rings. Apocynin (30 μ M to 10 mM) induced a dose-dependent relaxation in both endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings with respective EC₅₀ values of 0.78 ± 0.08 mM and 1.52 ± 0.16 mM. Endothelium removal or inhibition of nitric oxide (NO) synthase with *N*^ω-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) significantly decreased but did not abolish the effect of apocynin. By contrast, apocynin-induced relaxation was unchanged after incubation with indomethacin or charybdotoxin plus apamin. In endothelium-denuded aortas, the vasorelaxant effect of apocynin was significantly reduced by glibenclamide but not by 4-Aminopyridine nor by iberiotoxin. Apocynin significantly decreased Ca²⁺-induced contraction and inhibited intracellular Ca²⁺ mobilization after contraction with phenylephrine. Finally, the acute intravenous injection of apocynin led to an immediate and transient hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats (SHR). In conclusion, our data demonstrated that apocynin induces both endothelium-independent relaxant effects involving inhibition of Ca²⁺ mobilization and activation of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle cells and endothelium-dependent effects mediated by NO. These results incite to be cautious during the interpretation of the results on the vascular effects of apocynin.

Key-words: Apocynin; Rat aorta; NADPH oxidase; Vasodilation; Mechanisms

Introduction

Apocynin (acetovanillone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone or 4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) is a naturally occurring methoxy-substituted catechol extracted from the root of *Picrorhiza kurroa*, a medicinal herb largely used as a traditional medicine in South Asia [1]. In the early 1980s apocynin has been characterized as an inhibitor of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase of activated neutrophils, a multisubunit enzymatic complex that produces superoxide anion, a precursor of reactive oxygen species necessary for antimicrobial defenses [2]. In phagocyte cells, apocynin acts as a prodrug that is metabolically activated by myeloperoxidase (abundant in neutrophils) in the presence of H₂O₂ to produce bioactive dimers and oligomers [3].

In the 1990s, accumulating evidences indicated that reactive oxygen species play major roles in the origin and progression of cardiovascular diseases including atherosclerosis, hypertension, diabetes or chronic kidney disease [4]. The discovery that vascular cells possess functionally active NADPH oxidase initiated a large number of researches aiming to understand the role of this enzyme in cardiovascular diseases and led to the search of substances capable of inhibiting it for experimental and therapeutics aims. Two compounds have been widely used experimentally as NADPH oxidase inhibitors in vascular cells: apocynin and diphenylene iodonium (DPI). However, many reports showed that DPI is not selective and acts as an unspecific flavin oxidant [5]. For this reason apocynin appeared as the most effective agent to determine the potentiality of NADPH oxidase as a new drug target for cardiovascular diseases.

Consistent with the deleterious role of NADPH oxidase in vascular disease, many studies demonstrated that apocynin reduced superoxide anion generation [6], reversed endothelial dysfunction [7] and exerted protective effects after *in vivo* administration in experimental vascular injury models associated with reactive oxygen species overproduction [8]. However, because vascular or others non-phagocytic cells do not possess myeloperoxidase making in theory impossible the apocynin's activation, the question of the precise mode of action of apocynin was raised and the hypothesis of NADPH oxidase-independent effects of apocynin was formulated. In agreement with this hypothesis, Heumüller et al. [9] reported that apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidase but a potent antioxidant in HEK293 cells whereas on contrary Riganti et al. [10] demonstrated that apocynin elicits oxidative stress in mouse glial cells. More recently, a few data suggested that apocynin exerts direct vasorelaxing properties independently on its action on NADPH oxidase [11, 12, 13], but the mechanisms involved in these effects are still uncompletely elucidated and the data are controversial. The apocynin-induced vasorelaxation was found to be independent on NO production but related to Rho kinase inhibition in rat renal interlobar arteries [12], dependent on the activation of both NO synthase and voltage-dependent K^+ channels in rat aorta [11], dependent on the opening of ATP-sensitive K^+ channels but weakly dependent on NO production in rat pulmonary arteries [13]. However, because apocynin is widely used as a pharmacological tool to inhibit NADPH oxidase in vascular studies, the understanding of its mode of action at the vascular level is of particular importance.

The aim of the present study was to determine the mechanisms involved in the direct vasorelaxant properties of apocynin on the widely used *in vitro* model of rat isolated thoracic aortic rings. The contributions of endothelium-derived relaxing factors, calcium and

potassium channels in the endothelium-dependent and endothelium-independent apocynin-induced vasorelaxations were investigated. Furthermore, to determine whether these *in vitro* vasorelaxant properties are translated into an *in vivo* effect, the acute hypotensive action of apocynin was examined in spontaneously hypertensive rats (SHR).

Materials and methods

Animals

Vascular reactivity experiments were conducted on 7-to 8-week-old male Wistar rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). *In vivo* experiments were conducted on 12-week-old SHR (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12h-12h light: dark cycle and allowed free access to food and water. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

Vascular reactivity

After anaesthesia with pentobarbital (60 mg/kg, ip), the thoracic aorta of male Wistar rats was removed, cleaned of connective tissue, and cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in organ baths containing standard Krebs solution (NaCl 118 mM, KCl 4.65 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 24.9 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucose 12 mM, pH 7.4), maintained at 37°C and continuously aerated with 95% O₂ / 5% CO₂, for isometric tension recording, as previously described [14]. After a 90-min-equilibration period under a resting tension of 2g, the presence of functional endothelium was verified by the ability of acetylcholine (10 µM) to induce more than 80% relaxation in rings precontracted with phenylephrine (1 µM). In some rings, endothelium was mechanically

removed. The completeness of endothelial denudation was confirmed by absence of relaxation in response to acetylcholine (10 μ M).

Experimental protocols on isolated vessels

Effect of apocynin on contraction induced by phenylephrine in rat isolated aortic rings

The contraction of aortic rings was achieved by phenylephrine (1 μ M). When the contraction reached a plateau, apocynin was added cumulatively (30 μ M to 10 mM) to rings with intact endothelium as well as to endothelium-denuded rings. The relaxant effect of apocynin was calculated as the percentage reduction of phenylephrine-induced tone.

Role of endothelium-derived relaxing factors (EDRFs) in apocynin-induced vasorelaxation

To determine the role of the EDRFs, charybdotoxin plus apamin (inhibitors of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) production, 30 nM), indomethacin (a cyclooxygenase (COX) inhibitor, 10 μ M) or N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME, a NO synthase inhibitor, 100 μ M) were applied to endothelium-intact rings 30-min prior to pre-contraction with phenylephrine (1 μ M). The cumulative concentration-response curves of apocynin were then constructed and compared with those obtained in rings treated with vehicle.

Role of K⁺ channels in apocynin-induced vasorelaxation

To determine the involvement of K⁺ channels, 4-Aminopyridine (4-AP, a voltage-dependent K⁺ channel blocker, 1 mM), glibenclamide (a non-specific ATP-sensitive K⁺ channel blocker, 10 μ M), or iberiotoxin (a large conductance calcium-activated K⁺ channel blocker, 30 nM) were applied to endothelium-denuded rings 30-min prior to pre-contraction with

phenylephrine (1 μM). The cumulative concentration-response curves of apocynin were then constructed and compared with those obtained in rings treated with vehicle.

Effect of apocynin on extracellular Ca^{2+} flux

To determine whether the apocynin-induced relaxation involved extracellular Ca^{2+} influx, endothelium-denuded rings, in a Ca^{2+} -free Krebs solution, were first constricted with phenylephrine (1 μM) for 15 min to deplete intracellular Ca^{2+} stores. After 4 washes with a Ca^{2+} -free Krebs solution, rings were exposed to a Ca^{2+} -free Krebs solution. Then rings were pre-incubated with apocynin at the EC_{50} for 10 min before phenylephrine (1 μM) or KCl (60 mM) was applied to induce a stable contraction. Thereafter, CaCl_2 was added cumulatively (10 μM to 3 mM). The contractile response to CaCl_2 was expressed as the percentage of the maximal contraction induced by phenylephrine (1 μM) in a standard Krebs solution. The effect of the solvent alone was evaluated in the same conditions.

Effect of apocynin on intracellular Ca^{2+} flux

Two sets of experiments were achieved to determine the effect of apocynin on intracellular Ca^{2+} release. First, to determine the involvement of the ATP-dependent Ca^{2+} pumps of the sarcoplasmic reticulum (SERCA), thapsigargin (a SERCA inhibitor, 100 nM) was applied to endothelium-denuded rings 30-min prior to pre-contraction with phenylephrine (1 μM). The cumulative concentration-response curves of apocynin were then constructed and compared with those obtained in rings treated with vehicle. Second, endothelium-denuded rings were washed twice with a standard Krebs solution and twice with a Ca^{2+} -free Krebs solution. Then, phenylephrine (1 μM) was applied to induce a first transient contraction (T_1). Thereafter aortic rings were washed twice with a standard Krebs solution (in order to refill

the intracellular Ca^{2+} stores) and twice with a Ca^{2+} -free Krebs solution. The rings were then pre-incubated with apocynin at the EC_{50} for 10 min before phenylephrine (1 μM) was added to evoke the second transient contraction (T_2). The ratio of the second contraction to the first (T_2/T_1) was then calculated. The effect of the vehicle was evaluated in the same conditions.

Acute effect of apocynin on blood pressure and heart rate in anesthetized SHR

To investigate whether the direct *in vitro* vascular effect of apocynin is translated into an *in vivo* effect, we studied the acute hypotensive effect of apocynin in SHR. After anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg, ip), the right carotid artery was cannulated with a small polyethylene catheter connected to a pressure transducer (Becton Dickinson, Sandy, Utah, USA), the output of which was connected to a Gould TA 240 physiograph (Gould Instrument Systems, Courtaboeuf, France). The penile vein was also cannulated for the administration of apocynin (dissolved in a saline solution containing 4% of dimethyl sulfoxide). The rat's body temperature was maintained at 37 °C with a heating pad. After a 20-min stabilization period, systemic arterial blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) were recorded before and after the administration of successive doses of apocynin (4, 8, 12 mg/kg, iv) or of the vehicle (1mL/kg). Each subsequent injection was administered when baseline values were fully recovered after the previous injection.

Data and Statistical analysis

Values are given as mean \pm SEM. The EC_{50} values (defined as the concentration of apocynin that induced 50% of the maximal relaxation) and Emax values (values of maximal relaxation) were determined by fitting the original dose-response curves using GraphPad Prism software (version 5.00, GraphPad Software, San Diego, USA) and compared by using

the Student's *t* test. Dose-response relationships were analyzed using two-way analysis of variance followed by the Bonferroni's test. The apocynin-induced hypotension was calculated as the percentage of decrease in SBP and DBP from baseline values, and data were compared by using the paired Student's *t* test. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of apocynin on contraction induced by phenylephrine

As shown in Figure 1, cumulative addition of apocynin (30 μ M to 10 mM) to intact aortic rings induced a dose-dependent relaxation after pre-constriction with phenylephrine (Fig. 1, Table I). Apocynin-induced relaxation on rings pre-challenged with phenylephrine was significantly decreased but not abolished by the mechanical removal of the endothelium ($p < 0.001$, Figure 1, Table 1).

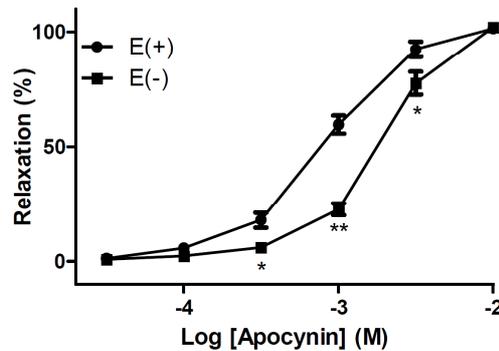


Fig. 1. Cumulative concentration-response curves of apocynin on aortic rings with [E(+)] or without [E(-)] endothelium pre-contracted with phenylephrine (1 μ M). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs control E(+).

Table I. Half-maximum effective concentration (EC₅₀) and maximal vasorelaxation (E_{max}) of apocynin in endothelium-intact and endothelium-denuded rat aortic rings precontracted with phenylephrine (1 μM).

	n	EC ₅₀ (mM)	E _{max} (%)
<i>endothelium-intact</i>	9	0.78 ± 0.08	101.5 ± 0.6
<i>endothelium-denuded</i>	7	1.91 ± 0.21**	102.0 ± 0.4

Data are expressed as means ± SEM of n rings. ** p<0.001 vs endothelium-intact rings.

Role of endothelium-derived factors in apocynin-induced relaxation

In order to dissect the mechanisms involved in the effect of apocynin, the dose-response curves of apocynin were studied in the presence of L-NAME, indomethacin, and apamin plus charybdotoxin. L-NAME significantly decreased apocynin-induced relaxation (p<0.001, Fig. 2), leading to a significant increase in the EC₅₀ value of apocynin (2.92 ± 0.24 mM vs 0.78 ± 0.08 mM, p<0.001) without any change in the E_{max} value (96.7 ± 1.8% vs 101.5 ± 0.6%). Conversely, neither indomethacin nor the combination of charybdotoxin plus apamin modified the relaxant effect of apocynin (Fig. 2).

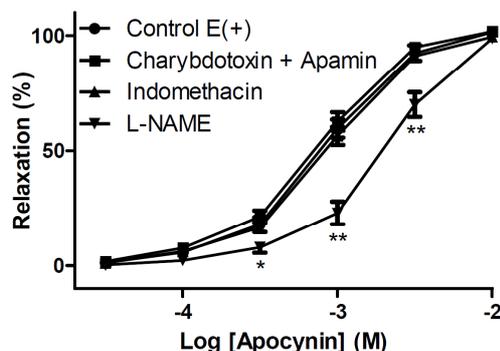


Fig. 2. Effects of charybdotoxin (30 nM) plus apamin (30 nM), indomethacin (10 μM) and L-NAME (100 μM) on apocynin-induced relaxation (Control E(+)) on intact rat aortic rings precontracted with phenylephrine (1 μM). Values are means ± S.E.M (n=8-9 rings). * p<0.05; ** p<0.001 vs control E(+).

Role of K⁺ channels in apocynin-induced relaxation

Results are presented in Figure 3. Glibenclamide (a blocker of K_{ATP} channels) significantly reduced the apocynin-induced relaxation (p<0.05) whereas others K⁺ channel blockers such as 4-AP (a blocker of K_v channels) or iberiotoxin (a blocker of large conductance calcium-activated K⁺ channel) did not alter the relaxant effect of apocynin.

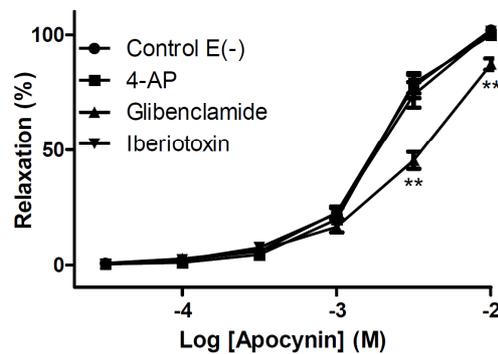


Fig. 3. Effects of 4-Aminopyridine (4-AP, 1 mM), glibenclamide (10 μ M) and iberiotoxin (30 nM) on apocynin-induced relaxation (Control E(-)) on endothelium-denuded rat aortic rings pre-contracted with phenylephrine (1 μ M). Values are means \pm S.E.M (n=7-8 rings). ** p<0.001 vs control E(-).

Effect of apocynin on extracellular Ca²⁺-induced contraction

To clarify further the mechanisms underlying the endothelium-independent effect of apocynin, we investigated the role of extracellular Ca²⁺ influx in endothelium-denuded rings. The cumulative addition of CaCl₂ in a Ca²⁺-free medium to rings pre-challenged with phenylephrine or with high KCl induced a concentration-dependent contraction of aortic rings. Pre-incubation with apocynin at the EC₅₀ (1.9 mM) significantly inhibited the Ca²⁺-induced contraction in both phenylephrine- (p<0.001, Figure 4A) and KCl-constricted rings (p<0.001, Figure 4B).

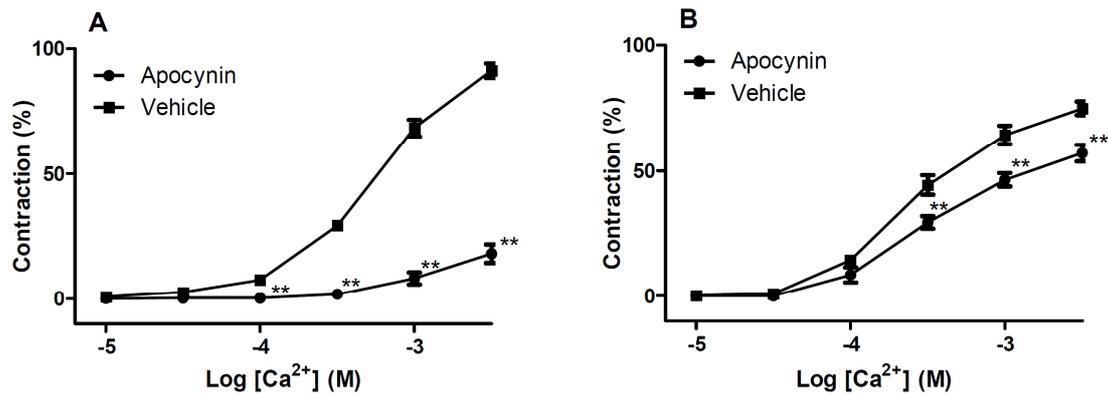


Fig. 4. Effect of apocynin (1.9 mM) on the contraction induced by extracellular Ca²⁺ on endothelium-denuded aortic rings pre-contracted with (A) phenylephrine (1 μM) and (B) KCl (60 mM). ** p<0.001 vs vehicle. Data are reported as means ± S.E.M (n=7 rings).

Effect of apocynin on intracellular Ca²⁺

As shown in Figure 5A, in a Ca²⁺-free Krebs solution, apocynin significantly reduced the phenylephrine-induced transient contraction ratio (T_2/T_1) in endothelium-denuded aortic rings as compared to vehicle ($20.6 \pm 3.4\%$ vs $89.3 \pm 1.1\%$, p<0.001). By contrast, the SERCA inhibitor thapsigargin did not modify apocynin-induced relaxation on rings pre-challenged with phenylephrine (Figure 5B).

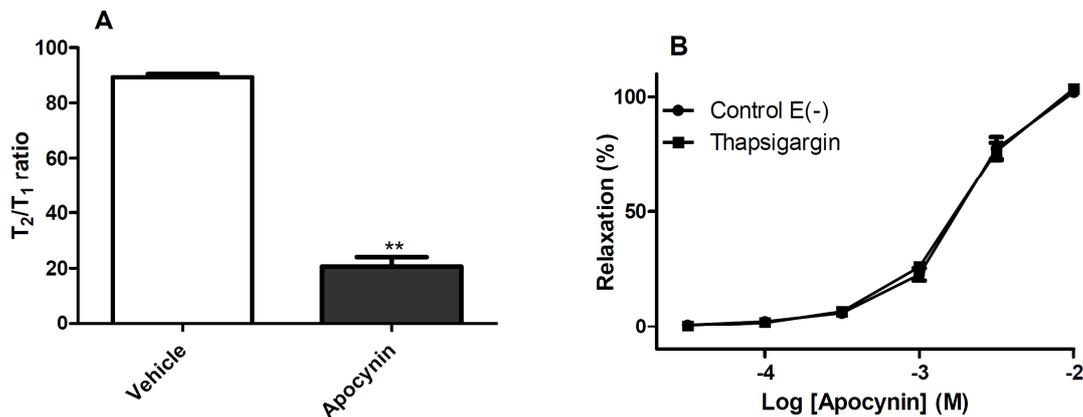


Fig. 5. (A) Inhibitory effect of apocynin (1.9 mM) on phenylephrine-induced transient contractions in a Ca²⁺-free solution on endothelium-denuded rings. Values are means ± SEM (n=6-8 rings). ** p<0.001 vs vehicle. (B) Effect of thapsigargin (10⁻⁷ M) on apocynin-induced relaxation (Control E(-)) on endothelium-denuded aortic rings pre-contracted with phenylephrine (1 μM). Values are means ± S.E.M (n=7-8 rings).

Effect of apocynin on SBP, DBP and HR in anesthetized SHR

In SHR, the baseline values of SBP, DBP and HR were 194 ± 16 mmHg, 151 ± 12 mmHg and 383 ± 9 beats/min, respectively (data not shown). Intravenous injection of apocynin (4, 8, 12 mg/kg) induced a significant dose-dependent and transitory decrease in SBP (Figure 6A) and DBP (Figure 6B). The effect of each dose began immediately after injection of apocynin and was fully recovered after 1 min. By contrast HR was not affected by any of the injected doses of apocynin (data not shown).

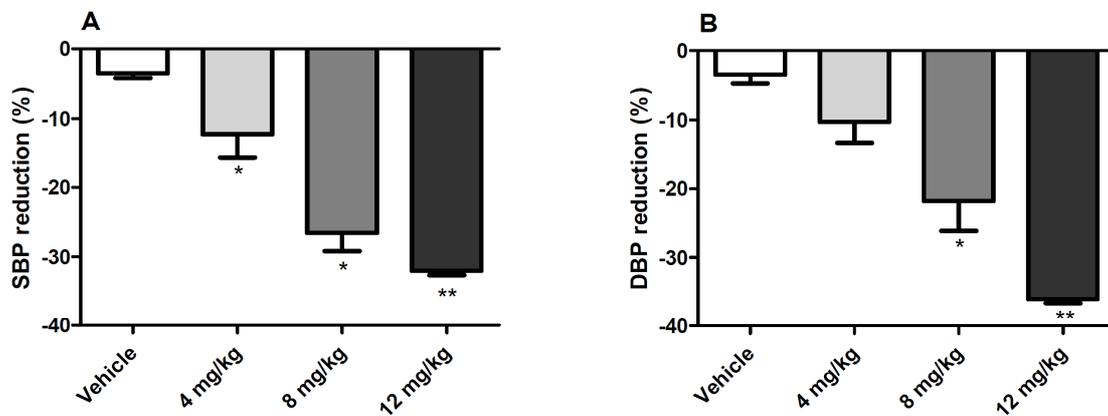


Fig. 6. Acute effect of apocynin (4, 8, 12 mg/kg, iv) on (A) systolic and (B) diastolic blood pressure in anesthetized SHR. Values are means \pm S.E.M (n=3 rats). * $p<0.05$; ** $p<0.001$ vs vehicle.

Discussion

This study investigated the mechanisms responsible for the direct vasorelaxant properties of apocynin in rat thoracic aorta. The new findings are that apocynin-induced vasorelaxation is mainly due to a) an endothelium-independent effect due to changes in Ca^{2+} channels conductances in vascular smooth muscle cells, b) an endothelium-dependent effect due to NOS activation but not to the production of EDHF or COX-derived metabolites, c) an

endothelium-independent effect due to the opening of K_{ATP} channels but only at high concentration.

In the last decades, growing evidence indicates that apocynin could be a new therapeutic agent in many diseases characterized by excessive NADPH oxidase activity. However, its mode of action is still elusive and seems to extend beyond the sole inhibition of the enzyme. In the present study, apocynin induces a dose-dependent vasorelaxing effect in aortic rings that was significantly affected by the removal of the endothelium, as previously demonstrated [11]. Vascular endothelium plays a fundamental role in the control of vascular tone by releasing endothelium-derived relaxing factors (EDRFs), including nitric oxide (NO), prostacyclin and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) [15, 16]. To identify the involvement of EDRF in the endothelium-dependent effects of apocynin, rings preparations were first incubated with the inhibitor of NO synthase L-NAME. Our results showed that endothelial NO production contributes to the vasorelaxant effect of apocynin, in agreement with previous data obtained on rat aorta [11] or in cultured human venous endothelial cells [17]. However, as a reflection of a weak contribution of NO in the apocynin's effects, L-NAME did not fully abolished but only slightly reduced the sensitivity of aortic rings to apocynin as attested by the shift of the concentration-response curve to the right without a reduction of the E_{max} value. Since NO is the main EDRF contributing to vasorelaxation in large vessels such as aorta [18], this result led us to investigate the role of others EDRFs in the apocynin-induced vasorelaxation. The lack of effect of the non-selective COX-inhibitor indomethacin on apocynin-induced vasorelaxation indicates that the production of prostanoids did not contribute to its endothelium-dependent effect, as previously suggested [11, 12]. Furthermore, our data showing that the combination of apamin

and charybdotoxin did not modify the relaxation to apocynin demonstrates for the first time that its effect is also independent on EDHF production.

Overall findings suggest that endothelium-independent mechanisms are mainly involved in the apocynin-induced vasorelaxation. First, we focussed on the role of the calcium channels of vascular smooth muscle cells (VSMCs). Surprisingly, although Ca^{2+} is a fundamental factor in excitation-contraction coupling in VSMCs [19, 20], the effect of apocynin on calcium channel conductances had never been studied. Influx of extracellular calcium in VSMCs occurs primarily through receptor-operated Ca^{2+} channels (ROCCs) and voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) [20]. The use of phenylephrine as a contractile agent induces smooth muscle cells contractions by Ca^{2+} influx through ROCCs whereas the contraction elicited by high KCl mainly results from the influx of extracellular Ca^{2+} induced by depolarization of cell membrane and subsequent opening of VDCCs [21]. Our results demonstrated that apocynin significantly decreased extracellular Ca^{2+} -influx after both phenylephrine- and high K^+ challenges supporting that its vasorelaxant properties are, in part, due to the blockade of both ROCCs and VDCCs. Notably, the effect is greater after phenylephrine than KCl suggesting a higher inhibitory effect on ROCCs. At the intracellular level, phenylephrine induces calcium release by activating calcium stores via inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). In addition, the regulation of cytosolic Ca^{2+} homeostasis is also related to Ca^{2+} reuptake by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) [22]. To assess whether the vasoactive properties of apocynin depends on cytosolic Ca^{2+} reuptake into the intracellular storage sites, we used thapsigargin, a selective inhibitor of the SERCA [23]. Our results showed that the effect of apocynin was not related to an activation of the SERCA. By

contrast, apocynin significantly decreased the intracellular Ca^{2+} release induced by phenylephrine suggesting that it inhibits IP_3 receptors of the sarcoplasmic reticulum.

Besides Ca^{2+} channels, K^+ channels contribute to the regulation of the membrane potential in electrically excitable cells including VSMCs [24]. Membrane hyperpolarization due to an efflux of K^+ results from the opening of K^+ channels in VSMCs. This effect is followed by the closure of voltage-dependent Ca^{2+} channels, leading to the reduction of Ca^{2+} entry, and vasorelaxation [21]. In large vessels such as aortas, three distinct K^+ channels have been identified in smooth muscle cells: voltage-dependent (K_v) channels, Ca^{2+} -activated (BKCa) K^+ channels, ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels [24]. In our study, iberiotoxin, a selective BKCa inhibitor and 4-aminopyridine (4-AP), a K_v blocker, did not affect the relaxing properties of apocynin. Conversely, glibenclamide, a selective K_{ATP} blocker, significantly decreased the apocynin-induced relaxation, indicating that the opening of K_{ATP} is involved in the vascular effects of apocynin. This result is in agreement with previous data obtained on rat isolated pulmonary arteries [13] but are not in accordance with a recent study in which glibenclamide did not modify apocynin-induced relaxation on rat isolated aortic rings [11]. However, in this latter study, the highest concentration of apocynin tested was 1 mM whereas in our study the maximal concentration used was 10 mM, and our data showed that the effect of glibenclamide was significant only for apocynin's concentrations above 1 mM (Figure 3). Therefore, it appears that the activation of K_{ATP} channels by apocynin is only possible at very high concentrations, i.e. at concentrations not relevant for *in vitro* pharmacological studies. Likewise, our results obtained with the K_v blocker 4-AP are not in accordance with those of Han et al. [11] that showed a significant decrease in the apocynin-induced vasorelaxation along with a reduction of K_v currents in cultured VSMCs after 4-AP

incubation. However, the concentrations of 4-AP used in their study (2.5 mM in aortas and 10 mM in VSMCs) are higher than that we used in our aortic preparations (1 mM) and might explain the discrepancy between the two results. We chose this concentration because 4-AP at 1 mM does not cause constriction of aortic rings whereas higher doses induce contractions [25]. Overall data suggest that the contribution of K^+ channels is likely of minor importance in the endothelium-independent effects of apocynin.

In the present study, the fact that the NO pathway is weakly involved in the relaxing effects of apocynin and that aortic rings used in the experiments were from non-pathologic rats, i.e. not characterized by an excessive O_2^- production by NADPH oxidase, makes unlikely a role of NADPH oxidase inhibition in the acute vasorelaxant effects of apocynin. This hypothesis has been recently confirmed by a study demonstrating that apocynin is capable of relaxing isolated aortic rings from NADPH oxidase-subunits knock-out mice [12]. Our results showing an immediate and transient hypotensive effect in SHR are consistent with a NADPH-oxidase independent effect of apocynin. Indeed, previous report indicates that there is a lag time of ~ 2 min before apocynin exerts an inhibitory effect on NADPH-oxidase, at least in stimulated endothelial cells [26, 27]. In addition, this result indicates that apocynin is able to acutely vasodilate resistance vessels. This finding is in agreement with a previous study in which the infusion of apocynin at 4 mg/kg in renal artery from normal rats produced an acute and transient vasodilator effect [28]. Although speculative, our results might also explain the unresolved data of a recent study showing that the intravenous infusion of apocynin in a mouse model of stroke was protective at 2.5 mg/kg, ineffective at 3.5 mg/kg and deleterious at 5 mg/kg, since it is well established that the hypotension-induced decrease in cerebral blood flow is deleterious for stroke recovery [29].

In conclusion, the present study gives new insights on the mode of action of apocynin in vessels. Our data demonstrated that apocynin induces both endothelium-independent relaxant effects involving inhibition of Ca^{2+} mobilization and activation of K_{ATP} channels in VSMCs and endothelium-dependent effects mediated by NOS but not by EDHF or COX. These results give further arguments in favor of “pleiotropic” effects of this compound at the vascular level. Data from the literature indicate that apocynin is used under a wide variety of experimental conditions at a concentration range of 10 μM - 1 mM and in some cases at even higher doses [30]. Our results suggest that, within this range, the compound may exert direct vascular effects independent on NADPH oxidase inhibition that must be taken into account.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the French Région of Franche-Comté.

References

- [1] Basu K., Dasgupta B., Bhattacharya S.K., Debnath P.K. Chemistry and pharmacology of apocynin, isolated from *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. *Curr. Sci.* (1971) **40**, 603-604.
- [2] Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlak C., DeLeo F.R. Neutrophils in the innate immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* (2005) **53**, 505-517.
- [3] Ximenes V.F., Kanegae M.P., Rissato S.R., Galhiane M.S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* (2007) **457**, 134-141.
- [4] Paravicini T.M., Touyz R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diab. Care* (2008) **31** Suppl. 2, S170-S180.
- [5] Riganti C., Gazzano E., Polimeni M., Costamagna C., Bosia A., Ghigo D. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J. Biol. Chem.* (2004) **279**, 47726-47731.
- [6] Muijsers R.B.R., Van den Worm E., Folkerts G., Beukelman C.J., Koster A.S., Postma D.S., Nijkamp F.P. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.* (2000) **130**, 932-936.
- [7] Unger B.S., Patil B.M. Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. *Ind. J. Pharmacol.* (2009) **41**, 208-212.
- [8] Costa C.A., Amaral T.A., Carvalho L.C., Ognibene D.T., da Silva A.F., Moss M.B., Valença S.S., de Moura R.S., Resende A.C. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. *Am. J. Hypertens.* (2009) **22**, 1242-1249.
- [9] Heumüller S., Wind S., Barbosa-Sicard E., Schmidt H.H.H.W., Busse R., Schröder K., Brandes R.P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertens.* (2008) **51**, 211-217.
- [10] Riganti C., Costamagna C., Bosia A., Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2006) **212**, 179-187.
- [11] Han W.Q., Wong W.T., Tian X.Y., Huang Y., Wu L.Y., Zhu D.L., Gao P.J. Contributory role of endothelium and voltage-gated potassium channels in apocynin-induced vasorelaxations. *J. Hypertens.* (2010) **28**, 2102-2110.
- [12] Schlüter T., Steinbach A.C., Steffen A., Rettig R., Grisk O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. *Cardiovasc. Res.* (2008) **80**, 271-279.
- [13] Seto S.W., Ho Y.Y., Hui H.N., Au A.L., Kwan Y.W. Contribution of glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel activation to acetophenone analogues-mediated *in vitro* pulmonary artery relaxation of rat. *Life Sci.* (2006) **78**, 631-639.
- [14] Demougeot C., Prigent-Tessier A., Marie C., Berthelot A. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* (2005) **23**, 971-978.
- [15] Luksha L., Agewall S., Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* (2009) **202**, 330-344.

- [16] Török J. Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Physiol. Res.* (2000) **49**, 107-114.
- [17] Hamilton C.A., Brosnan M.J., Al-Benna S., Berg G., Dominiczak A.F. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertens.* (2002) **40**, 755-762.
- [18] Pohl U., De Wit C., Gloe T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium dependent dilation. *Acta Physiol. Scand.* (2000) **168**, 505-510.
- [19] Wellman G.C., Nelson M.T. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels. *Cell Calc.* (2003) **34**, 211-229.
- [20] Lohn M., Furstenu M., Sagach V., Elger M., Schulze W., Luft F.C., Haller H., Gollasch M. Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ. Res.* (2000) **87**, 1034-1039.
- [21] Nelson M.T., Quayle J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* (1995) **268**, 799-822.
- [22] Marín J., Encabo A., Briones A., García-Cohen E.C., Alonso M.J. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci.* (1999) **64**, 279-303.
- [23] Thastrup O., Cullen P.J., Drøbak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) **87**, 2466-2470.
- [24] Ko E.A., Han J., Jung I.D., Park W.S. Physiological role of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.* (2008) **44**, 65-81.
- [25] Tammaro P., Smith A.L., Hutchings S.R., Smirnov S.V. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* (2004) **143**, 303-317.
- [26] Holland J.A., Johnson D.K. Prevention of atherosclerosis using NADPH oxidase inhibitors. US Patent 5,902,831 (1999).
- [27] Yu J., Weiver M., Linhardt R.J., Dordick J.S. The role of the methoxyphenol apocynin, a vascular NADPH oxidase inhibitor, as a chemoprotective agent in the potential treatment of cardiovascular diseases. *Curr. Vasc. Pharmacol.* (2008) **6**, 204-217.
- [28] Just A., Olson A.J.M., Whitten C.L., Ahrendshorst W.J. Superoxide mediates acute renal vasoconstriction produced by angiotensin II and catecholamines by a mechanism independent of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2007) **292**, H83-H91.
- [29] Tang X.N., Cairns B., Cairns N., Yenari M.A. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. *Neuroscience* (2008) **154**, 556-562.
- [30] Wind S., Beuerlein K., Eucker T., Müller H., Scheurer P., Armitage M.E., Ho H., Schmidt H.H., Winkler K. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* (2010) **161**, 885-898.

Chapitre IV
***Étude de Nitraria sibirica* Pall.**

小果白刺

I. Données bibliographiques

I.1. Données botaniques

Selon la dernière classification de l'APG (APG, 2009), l'espèce *Nitraria sibirica* Pall. peut être classée comme suit :

Division : Spermatophytes
Subdivision : Angiospermes
Classe : Dicotylédones à pollen triaperturé
Super-ordre : Rosidées
Ordre : Sapindales
Famille : Nitrariaceae
Genre : *Nitraria*
Espèce : *sibirica*

□ **La famille des Nitrariaceae Lindl. (1835)**

La position systématique du genre *Nitraria*, préalablement inclus dans la famille des Zygophyllaceae, a récemment été révisée (APG, 2009 ; Sheahan et Chase, 1996). L'APG III sépare ainsi ce genre des Zygophyllaceae pour le placer dans la famille des Nitrariaceae en compagnie des genres *Tetradiclis*, *Malacocarpus* et *Peganum*. D'importantes divergences morphologiques, anatomiques ou encore chimiques singularisent cependant ces quatre genres et les caractères généraux de la famille des Nitrariaceae restent ainsi difficiles à définir.

□ **Le genre *Nitraria* Pall.**

Le genre *Nitraria* comprend une dizaine d'espèces toutes rencontrées dans des zones arides ou semi-arides. On retrouve des espèces de *Nitraria* en Afrique du Nord, en Asie, en Australie ou encore dans le Sud de l'Europe. Ces espèces se caractérisent par une résistance particulièrement importante aux conditions de sécheresse et de salinité extrêmes (Zhao et al., 2002).

Les espèces du genre *Nitraria* sont des arbustes de 0,5 à 2 m de hauteur. Couchés ou ascendants, ils sont succulents et parfois épineux. Les stipules sont intrapétiolaires et distinctes, caduques ou persistantes. Les feuilles sont alternes, simples et caduques. Pétiolées ou sessiles, elles peuvent être charnues ou succulentes. Les limbes sont à nervation palmée, la marge est généralement entière mais peut être bi- ou tri-dentée au sommet. Les

inflorescences sont dites scorpioïdes. Les ramifications successives se produisent en effet toutes du même côté de l'axe pour donner aux inflorescences une forme de queue de scorpion. Les fleurs sont petites et pourvues d'une bractée. Elles sont constituées de cinq sépales charnus, imbriqués et persistants. Les pétales, de couleur blanche ou vert jaunâtre sont également au nombre de 5. Il y a 15 étamines à anthères dorsifixes². L'ovaire est infère et bi- ou hexa-loculaire. Les fruits sont comestibles, ils correspondent à des drupes charnues de couleur violette, rouge ou jaune. Le mésocarpe est succulent et ne contient qu'une seule graine (Flore de Chine).



Figure 21. Fruits de *Nitraria billardieri* (Goth, 2008)

□ **L'espèce *Nitraria sibirica* Pall.**

L'espèce *Nitraria sibirica* correspond à des arbustes de 0,5 à 1,5 m de hauteur. Couchés ou arqués, ils peuvent également être érigés. Les jeunes branches sont blanches et épineuses. Les feuilles, glabres ou pubescentes, sont regroupées en fascicules. Leur taille varie entre 6 et 15 mm de long pour 2 à 5 mm de large. Elles possèdent une base cunéiforme et un apex qui peut être aigu ou obtus. Les sépales sont verts et les pétales vert-jaunâtre voire blancs. Les fruits sont rouge foncé, de forme ellipsoïde à sphérique et mesurent de 6 à 8 mm de diamètre. Leur mésocarpe est bleu foncé voire violacé. Comestibles, leur qualité gustative reste cependant modeste en comparaison avec d'autres espèces du genre. La période de floraison intervient en Mai ou en Juin et les fruits apparaissent en Juillet ou en Août. Cette espèce est rencontrée dans plusieurs régions de la Chine dont le Xinjiang ainsi qu'en Mongolie et en

² Dorsifixe : le filet est fixé sur le dos de l'anthère.

Russie (Flore de Chine). Les espèces *Nitraria schoberi* var. *sibirica* DC. et *Nitraria sinensis* Kitag. sont considérées comme synonymes (Tropicos, 2011).



Figure 22. *Nitraria sibirica* Pall. (collection personnelle).

Les espèces *N. sibirica* et *N. tangutorum* présentent un intérêt écologique important en Chine et notamment dans le Xinjiang. Résistantes à des conditions environnementales et climatiques extrêmes, ces plantes constituent en effet des barrières naturelles particulièrement efficaces pour lutter contre l'extension des zones désertiques (Zhao et al., 2002).

I.2. Chimiotaxonomie du genre *Nitraria*

Les investigations chimiotaxonomiques menées sur le genre *Nitraria* ont mis en évidence deux groupes principaux de métabolites secondaires. Divers composés alcaloïdiques ainsi que des dérivés phénoliques de nature flavonoïdiques ont ainsi été majoritairement caractérisés dans ce genre. On remarquera également la caractérisation d'acide gras ou de stéroïdes ubiquitaires (Jiang et al., 1989 ; Suo et Wang, 2010).

I.2.1. Métabolites alcaloïdiques

Une variété importante de composés alcaloïdiques a été caractérisée dans le genre *Nitraria*. Des alcaloïdes dérivant de la L-lysine ainsi que des structures de nature quinazoliniques ont été rapportés. Il est important de constater que les différentes investigations chimiques ont été presque exclusivement menées sur des extraits des parties

aériennes. Les rares analyses concernant la composition alcaloïdique des fruits seront commentées à la fin de ce chapitre.

I.2.1.1. Alcaloïdes issus du métabolisme de la L-lysine

La majorité des études phytochimiques entreprises a été motivée par l'occurrence d'alcaloïdes originaux issus, au moins partiellement, d'un métabolisme inhabituel de la L-lysine. Ces métabolites, le plus souvent spécifiques, confèrent en effet un intérêt chimiotaxonomique particulier au genre *Nitraria*. Caractérisés par une importante diversité structurale, ils peuvent être séparés en trois groupes incluant des alcaloïdes spiraniques, tripipéridiniques et indoliques (Gravel et Poupon, 2010).

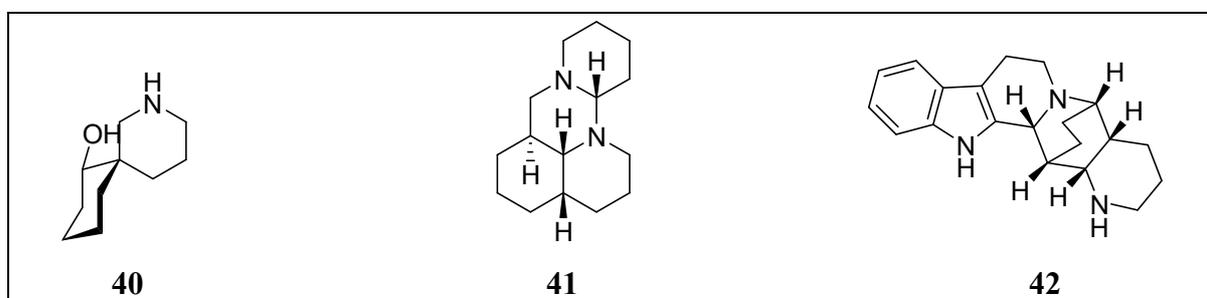


Figure 23. La nitramine (**40**), la schobérine (**41**) et la nitrarine (**42**), représentants respectifs des alcaloïdes spiraniques, tripipéridiniques et indoliques du genre *Nitraria*

La biogenèse de tels alcaloïdes fait intervenir des unités dérivant de la L-lysine (Fig. 24). La cadavérine issue de la décarboxylation de cet acide aminé permettrait en effet la formation de pipéridéine dont les formes tautomères énamine (Δ^2 -pipéridéine) et iminium (Δ^1 -pipéridéine) sont capables de se condenser entre elles. Les plus récentes hypothèses biogénétiques suggèrent que cette dimérisation aboutit à la formation d'un intermédiaire réactionnel particulièrement important dans le métabolisme du genre. Celui-ci pourrait en effet constituer un dénominateur commun intervenant dans la biosynthèse de la plupart des alcaloïdes décrits. L'assemblage d'unités en C₅ dérivant de la L-lysine expliquerait ainsi à lui seul la biosynthèse des alcaloïdes spiraniques et tripipéridiniques rencontrés. La formation des alcaloïdes indoliques du genre *Nitraria* nécessite quant à elle une molécule supplémentaire de tryptamine issue de la décarboxylation du L-tryptophane (Gravel et Poupon, 2010).

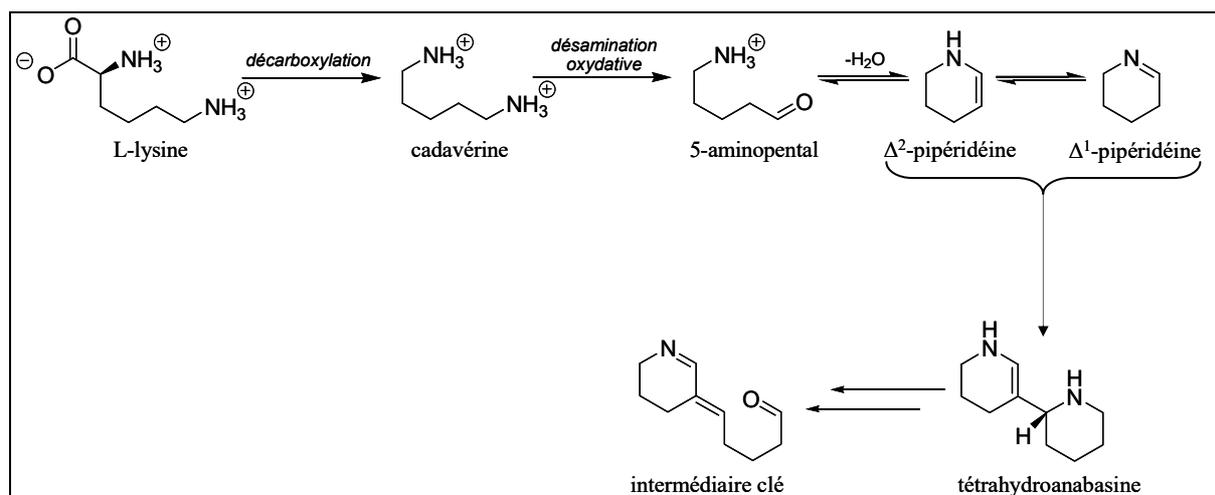


Figure 24. Métabolisme de la L-lysine dans le genre *Nitraria*
Selon Gravel et Poupon (2011).

□ Alcaloïdes spiraniques

Les alcaloïdes spiraniques caractérisés dans le genre *Nitraria* présentent des degrés de complexité variables. Les métabolites les plus simples d'un point de vue structural sont dits « dipipéridiniques » du fait de leur possible biogénèse à partir de deux unités de ce type. Ils ont été presque exclusivement identifiés dans l'espèce *N. sibirica*. La nitramine (40), l'isonitramine (43), la sibirine (44), la nitrabirine (45), la nitrabirine *N*-oxyde (46) ainsi que la sibirinine (47) ont notamment été isolées des parties aériennes de cette espèce (Ibragimov et al., 1983 ; Shakirov et al., 1996 ; Tulyaganov et Allaberdiev, 2001 ; 2002). La nitramine (40) a également été mise en évidence dans l'espèce *N. schoberi* (Shakirov et al., 1996).

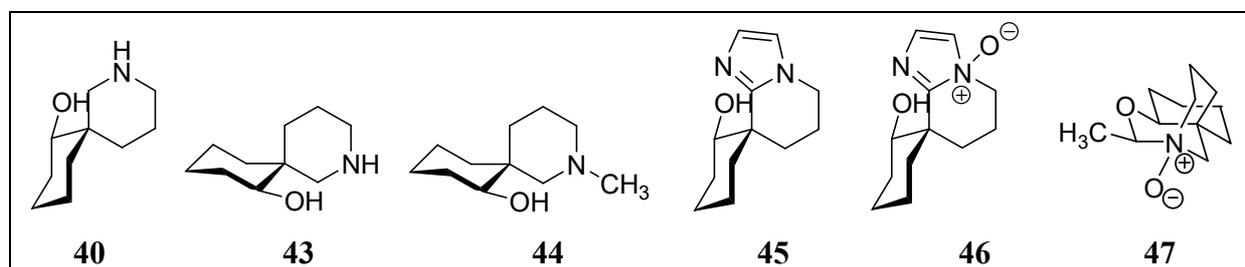


Figure 25. Alcaloïdes spiraniques simples du genre *Nitraria*

La biogénèse de certains alcaloïdes spiraniques du genre fait intervenir une unité pipéridinique supplémentaire et donne ainsi naissance à des édifices polycycliques plus complexes. La nitramine (48), la nitroxine (49), la nitramine *N*-oxyde (50) et la

nitramidine (**51**) ont été isolées de *N. sibirica* (Shakirov et al., 1996 ; Tulyaganov et Allaberdiev, 2002). De telles structures sont également rapportées dans les espèces *N. schoberi* ou *N. komarovii* (Ibragimov et Yunusov, 1986 ; Tulyaganov, 1993). On remarquera enfin que l'épi-nitramine (**52**) a été mise en évidence au cours d'une étude chimique de *N. billardieri* (Shen et al., 1995).

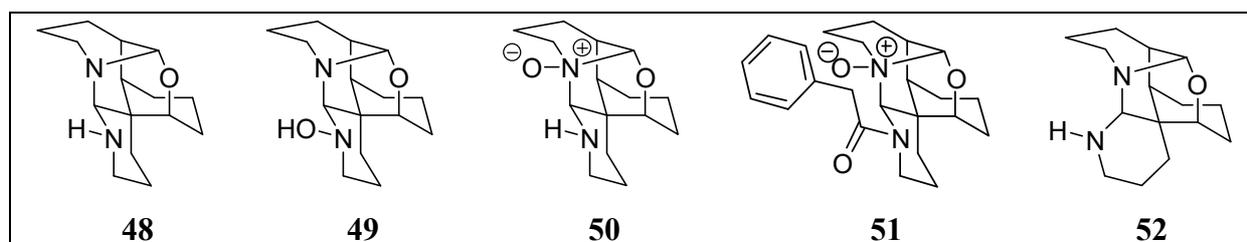


Figure 26. Alcaloïdes spiraniques complexes du genre *Nitraria*

□ Alcaloïdes tripipéridiniques

Nommés ainsi parce qu'ils sont issus de la condensation de trois unités pipéridiniques, ces alcaloïdes présentent néanmoins des structures moins complexes que le précédent groupe. Isolée pour la première fois de l'espèce *N. schoberi*, la schobérine (**41**) constitue le premier métabolite de ce type à avoir été rapporté (Tashkhodzhaev et al., 1989). Ce composé ainsi que la déhydroschobérine (**53**), la dihydroschobérine (**54**) et la sibiridine (**55**) ont été identifiées par la suite dans l'espèce *N. sibirica* (Tulyaganov et Allaberdiev, 2001 ; 2003).

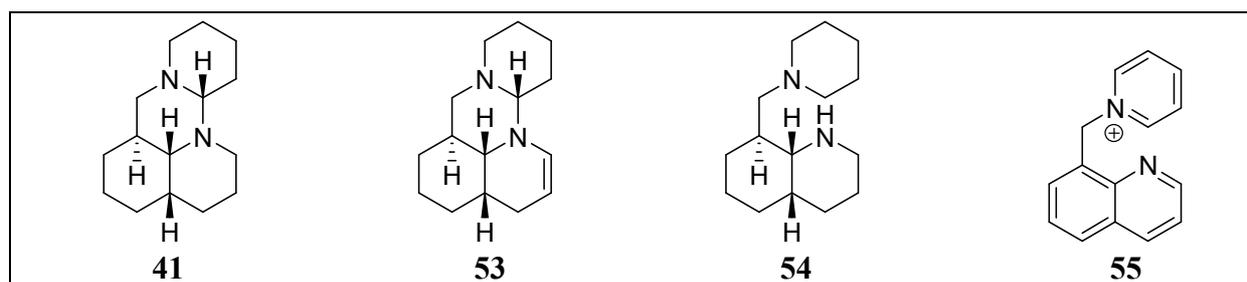


Figure 27. Alcaloïdes tripipéridiniques du genre *Nitraria*

□ Alcaloïdes indoliques

Les plantes du genre *Nitraria* sont également capables de produire des alcaloïdes indoliques. La condensation d'une ou plusieurs unités dérivant de la L-lysine avec une molécule de tryptamine permettrait d'expliquer la biogenèse de la totalité des composés

indoliques rencontrés dans le genre. Une cinquantaine de β -carbolines présentant des structures variées ont ainsi été recensées.

Des β -carbolines monopipéridiniques ou dipipéridiniques ont notamment été mises en évidence. De telles structures ont été, à notre connaissance, exclusivement identifiées dans les espèces *N. schoberi* et *N. komarovii*. La nazlinine (**56**) (Üstünes et Ozer, 1991) et la komaroïdine (**57**) (Tulyaganov et al., 2006) constituent des exemples de β -carbolines monopipéridiniques tandis que la nitrarine (**42**) (Nasirov et al., 1977) ou la schobéridine (**58**) (Ibragimov et al., 1976) représentent des dérivés de nature dipipéridinique.

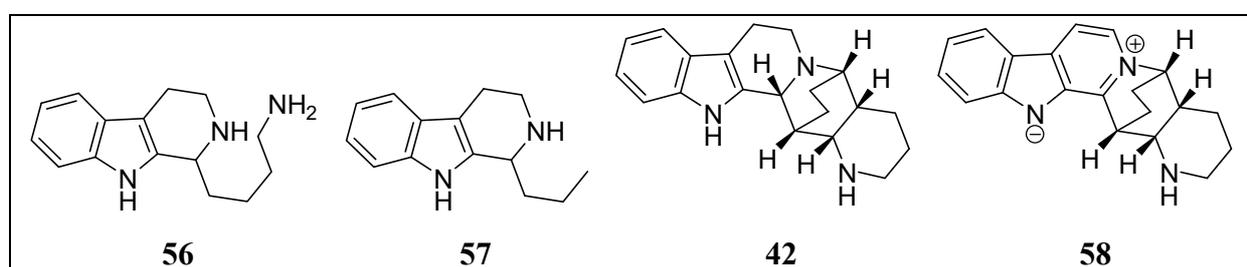


Figure 28. β -carbolines monopipéridiniques et dipipéridiniques du genre *Nitraria*

Des réarrangements plus complexes de deux unités dérivant de la L-lysine seraient à l'origine de la formation de structures telles que la nitraraïne (**59**) (Ibragimov et Yunusov, 1986) ou la nitraraïdine (**60**) (Tulyaganov et Allaberdiev, 2002), isolées respectivement de *N. schoberi* et de *N. sibirica*.

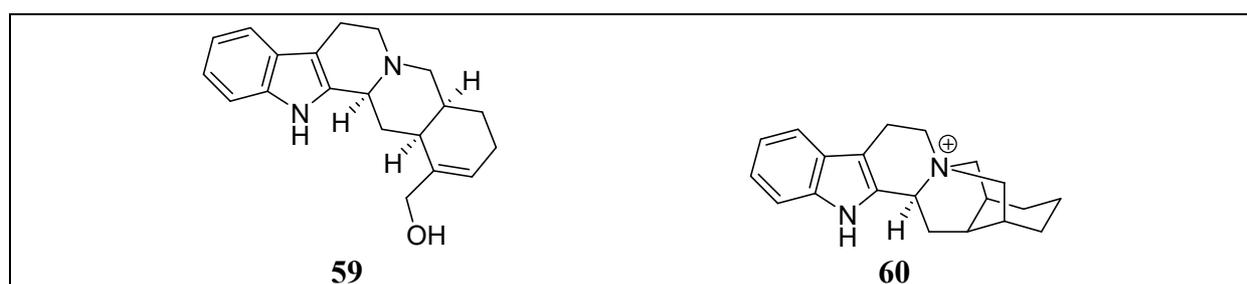


Figure 29. Structure de la nitraraïne et de la nitraraïdine

Le métabolisme particulier de la L-lysine rencontré dans ce genre permettrait également la formation de β -carbolines aromatiques substituées par un noyau quinoléique (**61**). La diversité structurale de tels métabolites est associée à la position de substitution de la partie quinoléique ainsi qu'au degré d'oxydation des différents composés. À l'image de la

komarovine (**62**), de la komarovinine (**63**), de la komarovidinine (**64**) une quinzaine de métabolites présentant des noyaux quinoléiques monosubstitués en position 2, 5 ou 8, voire bisubstitués en positions 4 et 5 ont été recensés dans l'espèce *N. komarovii* (Tulyaganov et al., 1981 ; 1983). Dans cette même espèce, quatre métabolites incluant la nitraridine (**65**) ont été décrits avec un noyau quinoléique substitué en position 4 (Tulyaganov, 2006). Notons qu'il n'existe actuellement aucune hypothèse biogénétique concernant la formation de ces derniers.

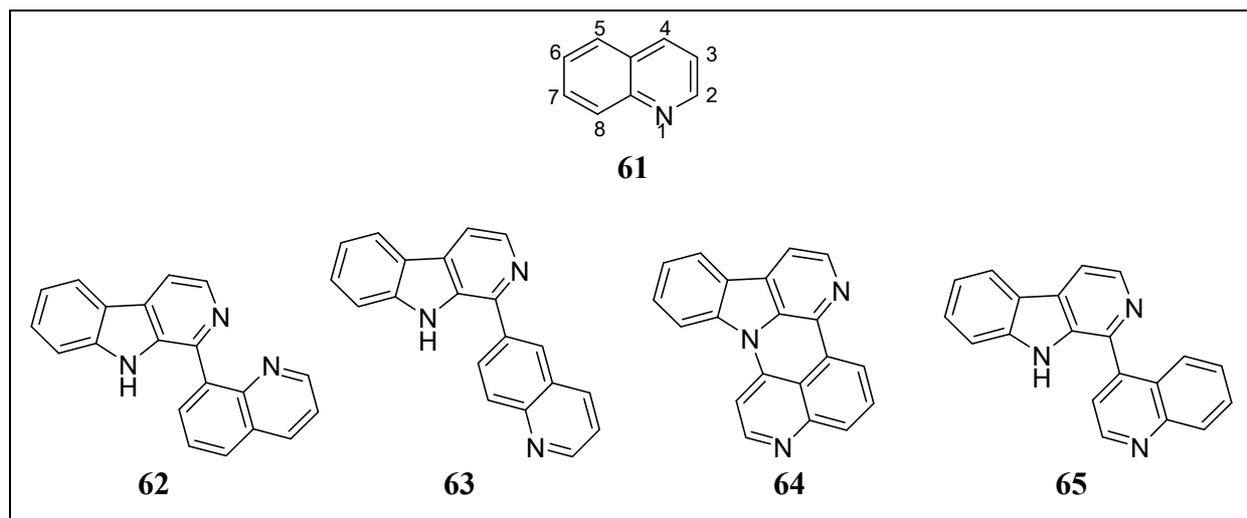


Figure 30. β-carbolines aromatiques substituées par un noyau quinoléique du genre *Nitraria*

Il est enfin important de remarquer qu'une part importante des métabolites alcaloïdiques présentés lors de ce chapitre a été caractérisée sur la base de données spectrales parfois limitées et insuffisantes au vu de la complexité de certains d'entre eux. Plusieurs structures initialement proposées se sont ainsi révélées erronées (e.g. nitraramine ou nitraraïne) et n'ont pu être corrigées qu'à la suite de synthèses totales ou grâce à des analyses spectrales plus performantes (Gravel et Poupon, 2010).

I.2.1.2. Alcaloïdes quinazoliniques

Des alcaloïdes de type quinazolinique ont également été mis en évidence. Ces métabolites ne sont cependant pas spécifiques du genre *Nitraria*. Notamment rencontrés dans le genre *Peganum* ou chez certaines Acanthaceae et Rutaceae (Michael, 1994, 2007), nous verrons ultérieurement que de telles structures sont aussi rapportées dans le genre *Echinops* de la famille des Asteraceae.

Les alcaloïdes quinazoliniques ont pour origine biogénétique l'acide anthranilique (**66**) ainsi qu'une seconde entité pourvoyeuse d'azote correspondant le plus souvent à un acide aminé. Les métabolites rapportés dans le genre *Nitraria* dérivent du péganol (**67**). La formation de tels composés peut être associée à la condensation d'une unité dérivant de la L-ornithine (**68**) et d'acide anthranilique (Dewick, 2002).

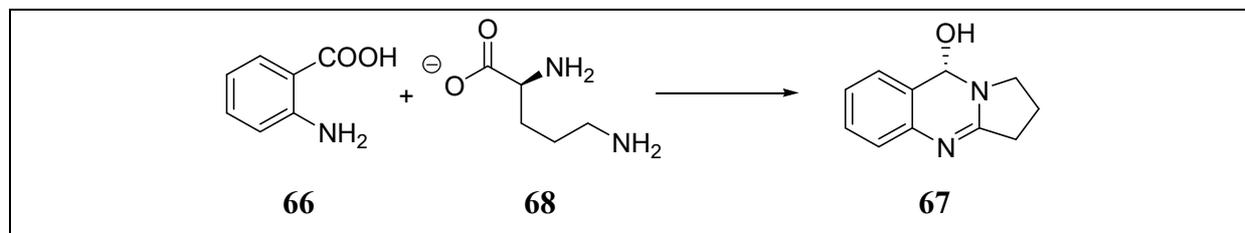


Figure 31. Biosynthèse du péganol

La vasicinone (**69**) et la déoxyvasicinone (**70**) ont ainsi été identifiées dans l'espèce *N. sibirica* (Tulyaganov et Allaberdiev, 2001 ; 2002). Ces composés ainsi que la péganine (**71**) et la déoxypéganine (**72**) ont également été isolées de *N. komarovii* (Tulyaganov, 1993). Pour cette dernière espèce, on remarquera la mise en évidence des formes *N*-oxydes correspondantes (Tulyaganov et al., 1993).

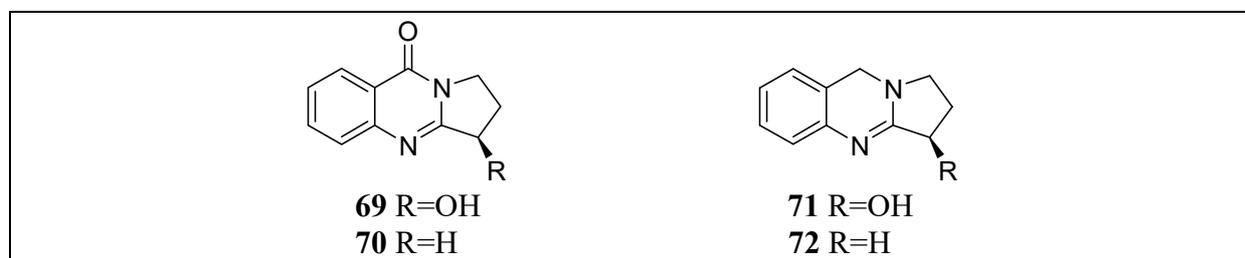


Figure 32. Alcaloïdes quinazoliniques du genre *Nitraria*

I.2.1.3. Composition alcaloïdique des fruits

Les différentes études phytochimiques s'intéressant à la composition alcaloïdique du genre *Nitraria* ont été très majoritairement menées sur des extraits des parties aériennes. La totalité des métabolites précédemment décrits a ainsi été caractérisée dans ce type d'organe. Les feuilles contiendraient en effet la plus grande proportion d'alcaloïdes avec des teneurs de l'ordre de 0,5 % fréquemment rapportées (Osmanov et al., 1982 ; Tulyaganov et Yunusov, 1990 ; Li et al., 2007). Les données concernant la composition alcaloïdique des fruits sont très limitées. On remarquera néanmoins que deux études phytochimiques menées sur des extraits

de fruits de *N. komarovii* ont permis la caractérisation d'une dizaine d'alcaloïdes de natures spiranique, tripipéridinique ou indolique (Tulyaganov et Yunusov, 1990 ; Tulyaganov, 1993). Concernant l'espèce *N. sibirica*, le contenu alcaloïdique des fruits a été quantitativement évalué à deux reprises. Les résultats sont pour le moins hétérogènes puisque l'une des études rapporte une teneur de 0,29 % tandis que la seconde décrit des valeurs oscillant entre 0,004 et 0,022 % selon la maturité des fruits (Osmanov et al., 1982 ; Li et al., 2007). La teneur en alcaloïdes des fruits de cette espèce semble ainsi être particulièrement variable. Le lieu et la période de récolte pourraient exercer une forte influence sur la production de tels métabolites.

I.2.2. Métabolites flavonoïdiques

Plusieurs métabolites de nature flavonoïdique ont également été mis en évidence. Les structures décrites correspondent majoritairement à des flavonols le plus souvent présents sous la forme d'hétérosides. Des flavones ainsi que des anthocyanes ont également été caractérisés.

Différents flavonols ont donc été rapportés dans le genre *Nitraria*. Un hétéroside de kaempférol (**73**) correspondant au 3-*O*-xylopyranosyl-(1→2)-*O*-rhamnopyranosyl-(1→6)-*O*-galactopyranosylkaempférol (**74**), une dizaine d'hétérosides de l'isorhamnétine, glycosylés en position 3, ainsi que l'isorhamnétine (**75**) sous forme libre ont été identifiés dans les feuilles de *N. retusa* (Halim et al., 1995 ; Hussein et al., 2009 ; Hadj Salem et al., 2011). La narcissine (**76**, ou 3-*O*-rutinosylisorhamnétine) a également été mise en évidence au cours de l'étude chimique d'un extrait de feuilles *N. komarovii* (Tulyaganov et al., 2001).

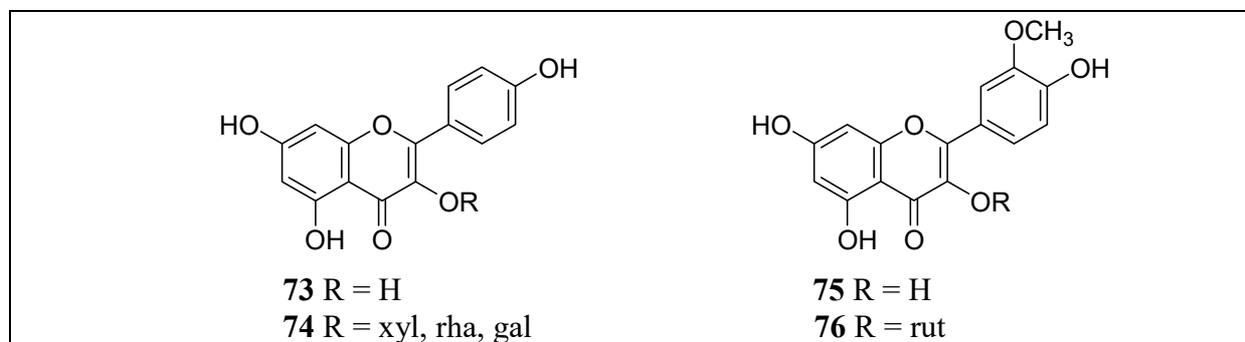


Figure 33. Structures de type flavonol rencontrés dans le genre *Nitraria*

Des métabolites de type flavone ont également été identifiés. Des hétérosides de lutéoline (**24**) incluant la 7-*O*-glucopyranosyllutéoline (**77**) et la 7-*O*-xylopyranosylglucopyranosyllutéoline (**78**) ont été isolés des feuilles de *N. retusa* (Hussein et al., 2009). Deux hétérosides d'apigénine glycosylés au niveau des carbones 6 et 8 correspondant à la 6,8-di-*C*-glucopyranosylapigénine (**79**) et à la 6-*C*-arabinopyranosyl-8-*C*-glucopyranosylapigénine (**80**) ont été mis en évidence dans cette même espèce (Hussein et al., 2009).

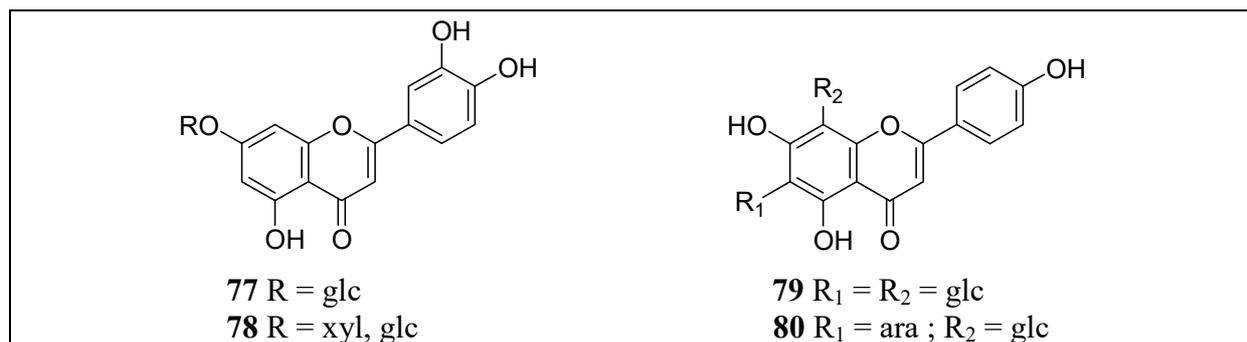


Figure 34. Flavones rencontrées dans le genre *Nitraria*

L'investigation chimique de différents extraits de fruits de *N. tangutorum* a enfin permis la caractérisation d'anthocyanes (Zheng et al., 2011). Neufs hétérosides glycosylés en position 3 et parfois acylés par des des acides coumariques ou caféiques ont été rapportés. Des aglycones tels que la cyanidine (**81**), la pélagonidine (**82**), la delphinidine (**83**) ou la péonidine (**84**) ont été mises en évidence. Caractérisées au moyen d'analyses faisant intervenir la chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse, les structures exactes des différentes parties osidiques n'ont toutefois pas pu être élucidées. On notera que la présence d'anthocyanes a été également caractérisée dans les fruits de *N. sibirica* (Li et al., 2005).

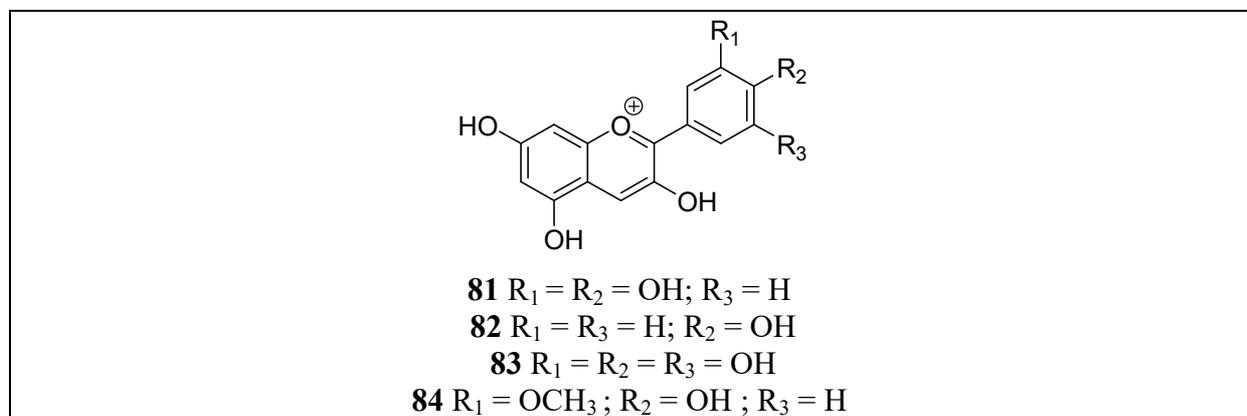


Figure 35. Aglycones des anthocyanes rencontrés dans le genre *Nitraria*

I.3. Usages traditionnels

Comestibles, les fruits du genre *Nitraria* peuvent être consommés crus ou après cuisson. Des usages alimentaires de ces fruits sont ainsi recensés en Australie (*N. billardiei* (Goth, 2008)), en Égypte (*N. retusa* (Halim et al., 1995)) ainsi que dans le Nord-Est de la Chine et dans la région du Xinjiang (*N. sibirica* et *N. tangutorum* (Li et al., 2006)). Les feuilles séchées de l'espèce *N. retusa* sont également utilisées comme succédané de thé dans certains pays d'Afrique du Nord (Hadj Salem et al., 2011).

Des utilisations médicinales sont également rapportées. En médecine traditionnelle ouïghoure, les fruits secs des espèces *N. sibirica* et *N. tangutorum* sont employés comme thérapie anti-hypertensive (Liu, 1999). Les fruits de *N. tangutorum* permettraient aussi le traitement de certaines indigestions et pourraient exercer des effets positifs sur la lactation (Zheng et al., 2011). Il est cependant nécessaire de remarquer que les tradipraticiens ouïghours pourraient ne pas faire de distinction entre les espèces *N. sibirica* et *N. tangutorum* et que celles-ci seraient parfois indifféremment employées (Dr Haji Akber Aisa, communication personnelle).

On notera également l'emploi des feuilles de *N. tangutorum* par la médecine traditionnelle chinoise comme antispasmodique ou anti-arythmique (Duan et al., 1991). En Tunisie et en Égypte, les feuilles séchées de *N. retusa* seraient également utilisées pour la confection de cataplasmes et pour traiter certaines plaies infectées (Shaltout et al., 2003).

I.4. Propriétés pharmacologiques

Les données pharmacologiques disponibles concernant le genre *Nitraria* sont relativement peu abondantes.

On constatera néanmoins la mise en évidence de propriétés antioxydantes et antiprolifératives (lignée cellulaire Caco2) pour différents extraits des parties aériennes de *N. retusa*. Les activités décrites sont relativement modestes et sont respectivement associées à des CE_{50} de l'ordre de 10^{-1} g/L et 1 g/L. Une relation a été établie entre ces différentes activités et la présence de composés phénoliques de type flavonol (Hadj Salem et al., 2011).

Les différents métabolites anthocyaniques produits par les fruits de *N. tangutorum* ont également été identifiés comme responsables de propriétés antioxydantes (Zheng et al., 2011). On remarquera enfin la démonstration de propriétés antiagrégantes pour un extrait éthanolique de *N. schoberi* (Sener, 1994).

À notre connaissance, aucune étude n'avait jusqu'alors rapporté l'existence de propriétés vasodilatatrices ou anti-hypertensives pour une espèce du genre *Nitraria*. Cependant, des alcaloïdes tels que la nazlinine (Üstünes et Ozer, 1991) et la vasicinone (Astulla et al., 2008) ainsi que des composés flavonoïdiques incluant l'isorhamnétine (Ibarra et al., 2002) et certains anthocyanes (Sarr et al., 2009) ont démontré des effets vasoactifs. De plus, des propriétés hypotensives ont été mises en évidence pour certains métabolites alcaloïdiques spécifiques du genre dont la nitramine, la nitrarine, la komarovine ou encore la komarovinine (Gravel et Poupon, 2010).

II. Résultats expérimentaux et discussion

Dans le but d'apporter des arguments favorables à l'utilisation anti-hypertensive de *Nitraria sibirica* Pall., la mise en place d'investigations pharmacologiques et chimiques de cette espèce nous est apparue digne d'intérêt. Le Dr Haji Akber Aisa nous a ainsi transmis un extrait hydro-éthanolique de fruits qui a été réalisé par Mahinur Bakri, doctorante dans le Xinjiang Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry.

II.1. Étude pharmacologique de *Nitraria sibirica* Pall.

Une première étude a permis la démonstration des propriétés vasoactives de cet extrait. Les mécanismes impliqués dans cette action ont été caractérisés et un effet hypotenseur a pu être mis en évidence *in vivo* chez le rat spontanément hypertendu (SHR) et son contrôle normotendu Wistar Kyoto (WKY). Ce travail a été accepté pour publication et paraîtra prochainement dans un volume de *Journal of Ethnopharmacology* (2011) spécialement consacré à la médecine traditionnelle chinoise.

Publication 4 : Effets vasodilatateurs et hypotenseurs d'un
extrait hydro-éthanolique de fruits de
Nitraria sibirica Pall. (Nitrariaceae)

Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic
extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae)

François Senejoux, Corinne Girard, Haji Akber Aisa, Mahinur Bakri, Parhat Kerram,
Alain Berthelot, Françoise Bévalot, Céline Demougeot

Journal of Ethnopharmacology, in press



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae)

François Senejoux^a, Corinne Girard^a, Haji Akber Aisa^b, Mahinur Bakri^b, Parhat Kerram^c, Alain Berthelot^a, Françoise Bévalot^a, Céline Demougeot^{a,*}

^a EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon, France

^b Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, Xinjiang, Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, PR China

^c Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, PR China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2011

Received in revised form 13 July 2011

Accepted 3 August 2011

Available online xxx

Keywords:

Nitraria sibirica

Traditional medicine

Aorta

Mechanisms

Vasorelaxant

Hypotensive

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Fruits of *Nitraria sibirica* Pall. are traditionally used in Uighur medicine to treat hypertension. This study aimed to support that folk use by defining their vasoactive and hypotensive properties.

Materials and methods: The vasorelaxant activity and the underlying mechanisms of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (NSHE) were evaluated on thoracic aortic rings isolated from Wistar rats. In addition, the acute hypotensive effect of NSHE was assessed in anesthetized spontaneously hypertensive rats (SHR) and in their normotensive control Wistar Kyoto (WKY) rats.

Results: NSHE (0.1–10 g/l) was clearly more effective to induce vasodilation of phenylephrine- (PE, 1 μM) than high KCl- (60 mM) pre-contracted aortic rings with respective E_{max} values of $82.9 \pm 2.2\%$ and $34.8 \pm 3.6\%$. The removal of endothelium almost abolished the relaxant effect of the extract. In addition, pre-treatment with *N*^w-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME, 100 μM), atropine (1 μM) or charybdotoxin (30 nM) plus apamin (30 nM), respective blockers of nitric oxide (NO) synthase, muscarinic receptors and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), significantly reduced the observed effect of NSHE. By contrast, the cyclooxygenase (COX) inhibitor indomethacin (10 μM) or the K⁺ channels blockers glibenclamide (10 μM), iberiotoxin (30 nM) and 4-amino-pyridine (4-AP, 1 mM) failed to modify the vasodilation. Finally, the acute intravenous injection of NSHE (1, 5, 10, 20 mg/kg) induced an immediate and transient hypotensive effect in anesthetized SHR and in WKY rats.

Conclusions: This experimental animal study suggests that hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. induces vasorelaxation through an endothelium-dependent pathway involving NO synthase (NOS) activation, EDHF production and muscarinic receptor stimulation. Additionally, our results determine that this vasorelaxant effect is translated by a significant hypotensive effect.

© 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Hypertension is a major global-health challenge because of its high prevalence and concomitant risks of cardiovascular disease which is the principal cause of death in all developed countries accounting for 50% of all deaths (Chockalingam, 2008). In China,

a cohort study has estimated that, in 2005, around 2.33 million cardiovascular deaths and 1.27 million premature cardiovascular deaths were attributable to high blood pressure (He et al., 2009). Additionally, a recent survey determined that the prevalence of hypertension was 36.21% in Xinjiang adult population, reflecting that this region is particularly affected (Liu et al., 2010). These data point out the imperative need to ameliorate the prevention and the treatment of hypertension in China. In this context, because the use of herbal medicine and edible plants is very common for the management of hypertension in China (Gu et al., 2002), scientific validation and determination of their mode of action appear to be highly necessary.

In Xinjiang, the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. are commonly used as traditional medicine and are in particular recommended for the treatment of hypertension (Liu, 1999). Species belonging to the *Nitraria* genus (Nitrariaceae) are shrubs bearing fleshy

Abbreviations: NSHE, hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall.; SHR, spontaneously hypertensive rats; WKY, Wistar Kyoto; PE, phenylephrine; ACh, acetylcholine; EDRFs, endothelium-derived relaxing factors; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; COX, cyclooxygenase; L-NAME, *N*^w-nitro-L-arginine-methyl ester; 4-AP, 4-amino-pyridine; SBP, systolic arterial blood pressure; DBP, diastolic arterial blood pressure; HR, heart rate.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 81 66 56 68; fax: +33 3 81 66 56 91.

E-mail address: cdemouge@univ-fcomte.fr (C. Demougeot).

0378-8741/\$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.

doi:10.1016/j.jep.2011.08.012

Please cite this article in press as: Senejoux, F., et al., Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae). J. Ethnopharmacol. (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.08.012

edible fruits. These plants are widely distributed in the Middle East and Central Asia as well as in the northwest region of China. They got special physiological properties of drought- and salt-resistances that prevent soil desertification and alleviate the degree of soil salinity-alkalinity (Zhao et al., 2002) thus conferring them a remarkable ecological value. A few phytochemical investigations of *Nitraria* species have found several classes of secondary metabolites including sterols, fatty acids, alkaloids and flavonoids derivatives (Tulyaganov and Allaberdiev, 2001, 2003; Hadj Salem et al., 2011; Suo and Wang, 2010). Despite their wide folk use as antihypertensive therapy, scientific data concerning the efficacy and the mode of action of the fruits of *Nitraria sibirica* are lacking.

The present study aimed to provide pharmacological evidences to support the use of fruits from *Nitraria sibirica* Pall. as antihypertensive therapy. By using the widely used *in vitro* model of rat isolated thoracic aortic rings, the vasorelaxant effect of a hydroalcoholic extract was studied as well as the underlying mechanisms. Furthermore, we assessed the acute hypotensive effect of this extract on anesthetized SHR and on their normotensive controls WKY rats.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The fruits of *Nitraria sibirica* Pall. were collected in July 2009 from Guma, Hotan, Xinjiang Uighur Autonomous Region, People's Republic of China, and identified by Prof. Nurbay Abdusalih of Institute of Resources and Environment Science of Xinjiang University. A voucher specimen (No. NS20090729) has been deposited at Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, XJIPC, CAS.

2.2. Preparation of the plant extract

Dried and powered fruits were extracted two times with 70% EtOH under reflux. The filtrate was evaporated under reduced pressure to give a hydroalcoholic extract of the fruits of *Nitraria sibirica* Pall.

2.3. Animals

Vascular reactivity experiments were conducted on 7- to 8-week-old male Wistar rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). *In vivo* experiments were conducted on 12-week-old male SHR and WKY rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12h–12h light:dark cycle and allowed free access to food and water. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996). Animal experiments were performed under licences (experiment authorization number 25-16 and protocol agreement B-25-056-6) obtained from the Veterinary Office of Franche-Comté (France).

2.4. Vascular reactivity

After anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg, ip), the thoracic aorta of male Wistar rats was excised, cleaned of connective tissue, and cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in organ baths containing standard Krebs solution (NaCl 118 mM, KCl 4.65 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 24.9 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucose 12 mM, pH 7.4), maintained at 37 °C and continuously aerated with 95% O₂, 5% CO₂, for isometric tension recording, as previously described (Demougeot et al., 2005). After a 90-min equilibration period under a resting tension of 2 g, the presence of functional endothelium

was verified by the ability of ACh (10 μM) to induce more than 80% relaxation in rings precontracted with PE (1 μM). In some rings, endothelium was mechanically removed. The completeness of endothelial denudation was confirmed by a >90% obliteration of the vasorelaxant response to ACh (10 μM).

2.5. Experimental protocols on isolated vessels

2.5.1. Effect of NSHE on contraction induced by PE and KCl in rat isolated aortic rings

Aortic rings were constricted with PE (1 μM) or KCl (60 mM) (Jiang et al., 2005; Xu et al., 2010). When the contraction reached a plateau, NSHE was added cumulatively (0.1–10 g/l) to rings with intact endothelium as well as to endothelium-denuded rings. The relaxation effect was calculated as the percentage of the contraction in response to PE or KCl.

2.5.2. Role of EDHF, NO and prostanoids in NSHE-induced vascular response

To determine if EDHF, NO and prostanoids are involved in the relaxant effect of NSHE, endothelium-intact rings were incubated with charybdotoxin plus apamin (inhibitors of EDHF production, 30 nM, Busse et al., 2002), indomethacin (a COX inhibitor, 10 μM, Mishra et al., 2000) or L-NAME (a NO synthase inhibitor, 100 mM, Mishra et al., 2000) for 30 min prior to pre-contraction by PE (1 μM). The cumulative concentration–response curves of NSHE were then constructed and compared with those obtained with untreated rings.

2.5.3. Role of muscarinic receptors in NSHE-induced vascular response

To assess whether NSHE produced vasodilation through the activation of muscarinic receptors, endothelium-intact aortic rings were incubated with atropine (a muscarinic receptor antagonist, 1 μM, Vasques et al., 1999) for 30 min prior to exposure to PE (1 μM) and cumulative concentrations of NSHE.

2.5.4. Role of K⁺ channels in NSHE-induced vascular response

The involvement of K⁺ channels in NSHE-induced relaxation was assessed by incubating endothelium-intact rings 30 min prior to pre-contraction by PE (1 μM) with several K⁺ channels inhibitor: 4-AP (a voltage-dependent K⁺ channel blocker, 1 mM, Nelson and Quayle, 1995; Tammaro et al., 2004), glibenclamide (a non-specific ATP-sensitive K⁺ channel blocker, 10 μM, Nelson and Quayle, 1995), and iberiotoxin (a large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel blocker, 30 nM, Cadorette et al., 2000). Then the cumulative concentration–response curves of NSHE were constructed and compared with those obtained in untreated rings.

2.6. Acute effect of NSHE on blood pressure and heart rate in anesthetized SHR and WKY rats

To assess the *in vivo* effect of NSHE, we determined the acute hypotensive effect of NSHE in SHR and WKY rats. After anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg, ip), the right carotid artery was cannulated with a small polyethylene catheter connected to a pressure transducer (Becton Dickinson, Sandy, UT, USA), the output of which was connected to a Gould TA 240 physiograph (Gould Instrument Systems, Courtaboeuf, France). The penile vein was also cannulated for the administration of NSHE (dissolved in an isotonic saline solution). The rat's body temperature was maintained at 37 °C with a heating pad. After a 20-min stabilization period, SBP, DBP and HR were recorded before and after the administration of successive doses of NSHE (1, 5, 10, 20 mg/kg, iv) or of the vehicle (isotonic saline solution, 1 ml/kg). Each subsequent injection was

administered when baseline values were fully recovered after the previous injection.

2.7. Total phenolic content

Total phenolic compounds were assayed according to the Folin–Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965) modified by Dewanto et al. (2002). An aliquot of diluted crude hydroalcoholic extract was added to 0.5 ml of distilled water and 0.125 ml of the Folin–Ciocalteu's reagent. The mixture was shaken and allowed to stand for 6 min, before addition of 1.25 ml of 7% Na₂CO₃. The solution was then adjusted with distilled water to a final volume of 3 ml and mixed thoroughly. After a 30-min incubation period in the dark, the absorbance was read at 760 nm. The total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per milligram of dry extract calculated from a standard curve of gallic acid. All samples were analysed in triplicate.

2.8. Data and statistical analysis

Values are given as means ± S.E.M. The NSHE-induced relaxation of aortic rings (%) was expressed as the percent decreases of the precontraction to PE (1 μM) or high KCl (60 mM). Concentration–response relationships were analysed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test. The NSHE-induced hypotension was calculated as the percentage of decrease of SBP or DBP compared to the baseline values. Values were compared by using paired *t* test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of NSHE on contraction induced by PE and KCl

As shown in Fig. 1, NSHE (0.1–10 g/l) induced a more potent vasodilation on PE- (1 μM, Fig. 1A) than on high KCl- (60 mM, Fig. 1B) pre-contracted aortic rings. The corresponding *E*_{max} values of NSHE was 82.9 ± 2.2% and 34.8 ± 3.6% respectively (*P* < 0.001). To determine the role of endothelium in the vasodilating effects of NSHE, we mechanically removed endothelial cells from aortic rings. Endothelium-denudation significantly reduced the effect of NSHE on both PE- (*P* < 0.001, Fig. 1A) and KCl-precontracted rings (*P* < 0.001, Fig. 1B).

3.2. Role of EDHF, NO and prostanoids in NSHE-induced vascular response in HSDE-induced relaxation

Considering the endothelium-dependent effects of NSHE, we investigated the involvement of EDHF, NO and prostanoids in NSHE-induced vasorelaxation in PE-constricted rings. L-NAME strongly decreased NSHE-induced relaxation (*P* < 0.001, Fig. 2A) with *E*_{max} values (%) of 45.1 ± 3.0 vs 82.9 ± 2.2 without the inhibitor (*P* < 0.001). To a lesser extent, the combination of charybdotoxin plus apamin blunted the relaxant effect of NSHE (*P* < 0.05, Fig. 2A), with *E*_{max} values (%) of 72.3 ± 4.2 vs 82.9 ± 2.2 without the inhibitors (*P* < 0.05). By contrast, pre-incubation of rings with indomethacin failed to modify NSHE-induced vasodilation (Fig. 2A).

3.3. Role of muscarinic receptors in NSHE-induced relaxation

As shown in Fig. 2B, the muscarinic receptor antagonist atropine significantly reduced the effect of NSHE (*P* < 0.001) and decreased the *E*_{max} value in comparison with untreated rings (55.1 ± 3.9 vs 82.9 ± 2.2%, respectively, *P* < 0.001).

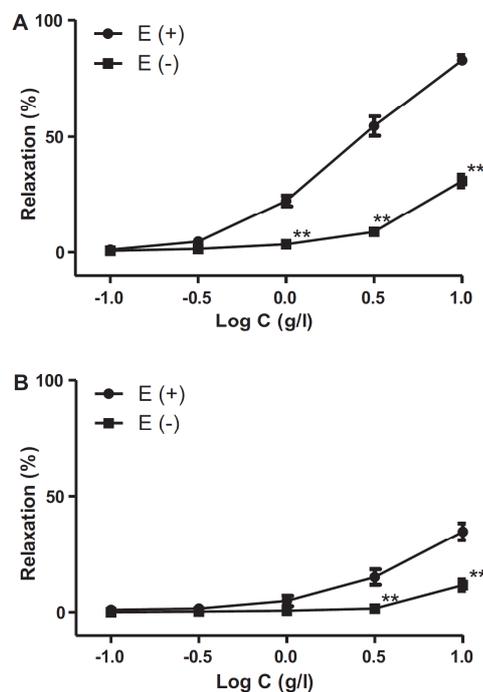


Fig. 1. (A) Cumulative concentration–response curves of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* (NSHE) on aortic rings with endothelium [E(+)] or without endothelium [E(-)] pre-contracted with phenylephrine (PE, 1 μM). ***P* < 0.001 vs control E(+). Values are means ± S.E.M. (*n* = 8–9 rings). (B) Cumulative concentration–response curves of NSHE on aortic rings with [E(+)] or without [E(-)] endothelium pre-contracted with KCl (60 mM). ***P* < 0.001 vs control E(+). Values are means ± S.E.M (*n* = 7 rings).

3.4. Role of K⁺ channels in NSHE-induced relaxation

To assess whether NSHE-induced vasodilation was mediated by the activation of K⁺ channels, aortic rings were incubated with the different K⁺ channel inhibitors glibenclamide, iberiotoxin and 4-AP. As shown in Fig. 3, none of these three blockers modified the vasorelaxant effect induced by the extract.

3.5. Effect of NSHE on SBP, DBP and HR in anesthetized WKY and SHR

In WKY rats, the baseline values of SBP, DBP and HR were 149 ± 12 mmHg, 116 ± 11 mmHg and 332 ± 17 beats/min, respectively. In SHR, the baseline values of SBP, DBP and HR were 202 ± 7 mmHg, 162 ± 7 mmHg and 360 ± 11 beats/min, respectively. Intravenous injections of NSHE (1, 5, 10, 20 mg/kg) induced a dose-dependent and transitory decrease in SBP (Fig. 4A) and DBP (Fig. 4B) for both SHR and WKY rats. The effect of each dose began immediately after injection of NSHE and was fully recovered after 5 min. By contrast HR was not affected by any of the injected doses of NSHE (data not shown).

3.6. Total phenolic content

The total phenol amount in the crude hydroalcoholic extract was 23.6 ± 0.03 mg of gallic acid equivalents per gram of dry extract (data not shown).

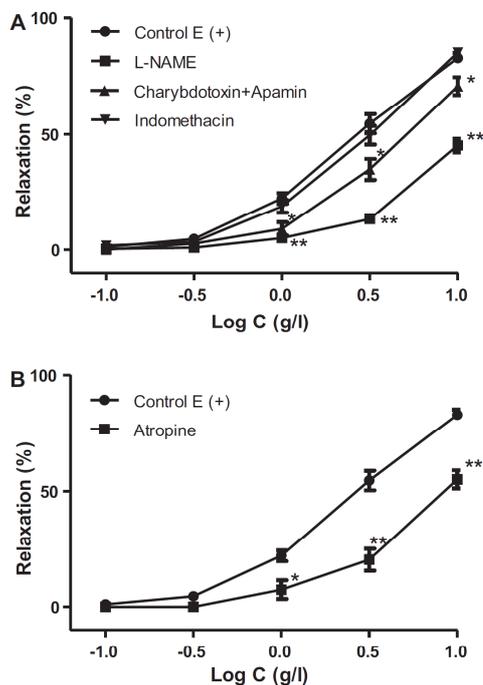


Fig. 2. Effects of (A) charybdotoxin (30 nM) plus apamin (30 nM), indomethacin (10 μ M), L-NAME (100 μ M) and (B) atropine (1 μ M) on NSHE-induced relaxation (control E(+)) on intact rat aortic rings pre-contracted with PE (1 μ M). Values are means \pm S.E.M. ($n=7-9$ rings). * $P<0.05$; ** $P<0.001$ vs control E(+).

4. Discussion

Although the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. are commonly used in traditional Uighur's medicine as antihypertensive therapy, the pharmacological evidences of their activity are lacking. Our results clearly confirm that *Nitraria sibirica* Pall. has both endothelium-dependent vasodilating properties and hypotensive effects.

Vascular tone and hence blood pressure are determined by the contractile state of vascular smooth muscle cells within the blood

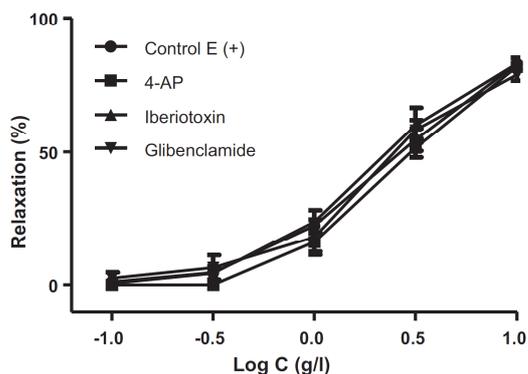


Fig. 3. Effects of 4-AP (1 mM), glibenclamide (10 μ M) and Iberiotoxin (30 nM) on NSHE-induced relaxation (control E(+)) on intact rat aortic rings pre-contracted with PE (1 μ M). Values are means \pm S.E.M. ($n=7-9$ rings).

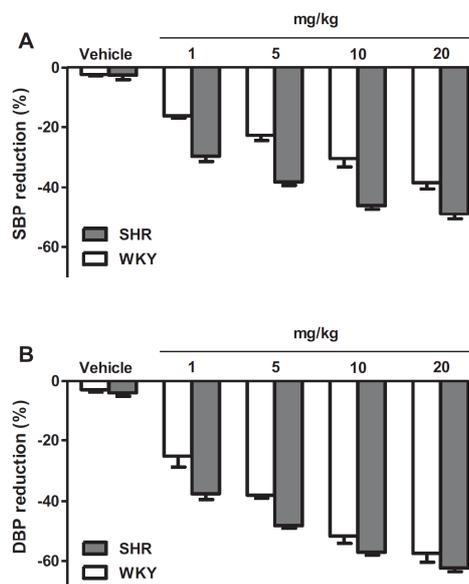


Fig. 4. Acute effect of NSHE (mg/kg, iv) on (A) systolic blood pressure (SBP) and (B) diastolic blood pressure (DBP) in anesthetized spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar Kyoto (WKY) rats. Values are means \pm S.E.M ($n=5$).

vessel wall. The role of endothelium is of particular importance since it regulates the vascular smooth muscle tone in conduit and resistance vessels by releasing EDRFs (Török, 2000), including NO, prostacyclin and an EDHF (Luksha et al., 2009). In the present study, NSHE induced a concentration-dependent vasorelaxant effect after PE-induced vasoconstriction that was dramatically reduced by endothelium removal. Because in large vessels such as aorta, NO plays a major role in the endothelium-dependent vasodilation, we investigated whether the effect is mediated by NOS activation. Our results show that L-NAME reduced the relaxing effect of NSHE are consistent with an NSHE-induced activation of the endothelial NOS. Under physiological conditions, NO production from endothelial cells is stimulated by a variety of mechanical forces such as shear stress and cyclic strain and humoral factors including ACh (Furchgott and Zawadzki, 1980). Our experiments reported that incubation of aortic rings with atropine, a selective muscarinic receptor antagonist, significantly blunted NSHE-induced relaxation thereby demonstrating that the extract contains one or more compounds acting as agonists of muscarinic receptors on endothelial cells. It is noteworthy that the reduction of the vasorelaxant effect of NSHE by atropine is lesser than the reduction induced by endothelium removal suggesting that the muscarinic receptor activation is not the sole mechanism responsible for the vasoactive properties of NSHE.

Beside NO, COX-derived products and EDHF participate in the control of vasomotor tone. In our study, the contribution of a release of COX products is ruled out because indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, did not alter the relaxation caused by NSHE. By contrast, the fact that increasing the KCl concentration in the Krebs solution to 60 mM markedly reduced the vasodilator response to NSHE suggests that part of its vasodilating effects is due to membrane hyperpolarization subsequent to K^+ channels opening. Once produced in endothelial cells, EDHF can diffuse to and activate smooth muscle K^+ channels leading to the smooth muscle hyperpolarization (Busse et al., 2002; Luksha et al., 2009).

Please cite this article in press as: Senejoux, F., et al., Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae). J. Ethnopharmacol. (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.08.012

In our study, we first investigated whether the extract modulates EDHF production by incubating the aortic rings with the combination of charybdotoxin (an inhibitor of intermediate and large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels) and apamin (a selective inhibitor of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels). Consistent with a contribution of EDHF in the effects of NHSE, the data demonstrated that the NHSE-evoked relaxation was reduced by the incubation with these toxins. Of note, it is now well established that muscarinic stimulation is associated with a release of EDHF (Hammarström et al., 1995). Thus, in the present case, it cannot be excluded that the EDHF-dependent effect is secondary to muscarinic receptor activation by NHSE. Notably, our results showed that the contribution of EDHF is only modest compared to the contribution of NOS activation, which is consistent with the slight contribution of EDHF in the endothelium-dependent relaxation of rat aorta (Castillo et al., 1997; Shimokawa et al., 1996). Second, to determine whether vascular smooth muscle K^+ channels participate to the vasodilator response to NHSE, we also used 4-AP, glibenclamide and iberiotoxin which preferentially block voltage-dependent K^+ channels, non-specific ATP-sensitive K^+ channels and large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels, respectively. Our data reported that none of these channels is modulated by NHSE.

The blood pressure is determined by the rate of blood flow produced by the heart (cardiac output) and the resistance of arterioles to blood flow. To determine whether the *in vitro* vasodilating properties of NHSE are translated by an acute *in vivo* hypotensive effect, we investigated the effect of intravenous infusion of NSHE. The data showed that NSHE dose-dependently diminished systolic and diastolic blood pressures in both hypertensive SHR and normotensive WKY rats. Although the mechanisms by which NHSE lower BP were not specifically elucidated in the present study, it is likely that this hemodynamic effect is related to a direct action of the extract on vascular tone since NHSE had no significant effect on heart rate. Of note, the effect of NHSE was greater in SHR than in WKY rats. It can be hypothesized that the beneficial effect of NHSE on EDHF and NO productions confers greater benefits in SHR rather than in WKY rats because SHRs themselves exhibit impaired vascular EDHF and NO availability (Kunes et al., 2004; Zhang et al., 2005). The combination of blood pressure lowering and improvement of endothelial NO and EDHF productions by NHSE are particularly interesting from a clinical point of view. Indeed, hypertension is associated with endothelial dysfunction that contributes to both development and persistence of high blood pressure as well as to the development of the complications of the disease (Higashi et al., 2002). Thus, beyond its effect on blood pressure, the consumption of the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. might exert beneficial effects on hypertension-induced target organ damage. Further experiments will be needed to verify this hypothesis.

To the best of our knowledge, data concerning the phytochemical composition of the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. are scarce. The present study determined that the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. are a source of phenolic compounds, with an amount being 23.6 mg acid gallic equivalent/g of dry extract. The occurrence of polyphenols in the NHSE is consistent with previous chemical investigations in fruits of *Nitraria* species since flavonol and anthocyanin derivatives have been identified (Halim et al., 1995; Khoo et al., 2010; Zheng et al., 2011). Because previous data reported that many of these secondary metabolites are capable of exerting endothelium-dependent vasodilation involving NO production (Chan et al., 2000; Schmitt and Dirsch, 2009), it cannot be excluded that such compounds contribute to the effects of NHSE.

5. Conclusions

The present study demonstrates that hydroalcoholic extract of the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. displays endothelium-dependent

vasorelaxing properties involving primarily NOS activation but also by EDHF release and muscarinic receptor stimulation. Additionally, this vasorelaxant effect is translated *in vivo* into a significant hypotensive effect in both SHR and WKY rats. Our data justify the traditional use of *Nitraria sibirica* Pall. for the treatment of hypertension in Xinjiang and encourage to perform further phytochemical studies aiming to identify the active principles of *Nitraria sibirica* Pall.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the French Région of Franche-Comté and funding from the French Ministry of Foreign and European Affairs.

References

- Busse, R., Edwards, G., Félétou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M., Weston, A.H., 2002. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 74–80.
- Cadorete, C., Sciotte, B., Brochu, M., St-Louis, J., 2000. Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 278, 567–576.
- Castillo, C., Reyes, G., Escalante, B., López, P., Castillo, E.F., 1997. Endothelium-dependent vasodilatation in rat aorta is mainly mediated by nitric oxide. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 40, 39–40.
- Chan, E.C., Pannangpetch, P., Woodman, O.L., 2000. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure–activity relationships. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 35, 326–333.
- Chockalingam, A., 2008. World Hypertension Day end global awareness. *Canadian Journal of Cardiology* 24, 441–444.
- Demougeot, C., Prigent-Tessier, A., Marie, C., Berthelot, A., 2005. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 23, 971–978.
- Dewanto, V., Wu, X.K., Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3010–3014.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Gu, D., Reynolds, K., Wu, X., Chen, J., Duan, X., Muntner, P., Huang, G., Reynolds, R.F., Su, S., Whelton, P.K., He, J., 2002. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in China. *Hypertension* 40, 920–927.
- Hadj Salem, J., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Paris, C., Fick, M., Humeau, C., 2011. Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives. *Food Chemistry* 124, 486–494.
- Halim, A.F., Saad, H.E., Hashish, N.E., 1995. Flavonol glycosides from *Nitraria retusa*. *Phytochemistry* 40, 349–351.
- Hammarström, A.K., Parkington, H.C., Coleman, H.A., 1995. Release of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) by M3 receptor stimulation in guinea-pig coronary artery. *British Journal of Pharmacology* 115, 717–722.
- He, J., Gu, D., Chen, J., Wu, X., Kelly, T.N., Huang, J.F., Chen, J.C., Chen, C.S., Bazzano, L.A., Reynolds, K., Whelton, P.K., Klag, M.J., 2009. Premature deaths attributable to blood pressure in China: a prospective cohort study. *The Lancet* 374, 1765–1772.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Matsuura, H., Oshima, T., Chayama, K., 2002. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *The New England Journal of Medicine* 346, 1954–1962.
- Jiang, H.D., Cai, J., Xu, J.H., Zhou, X.M., Xia, Q., 2005. Endothelium-dependent and direct relaxation induced by ethyl acetate extract from *Flos Chrysanthemi* in rat thoracic aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 101, 221–226.
- Khoo, N.K., White, C.R., Pozzo-Miller, L., Zhou, F., Constance, C., Inoue, T., Patel, R.P., Parks, D.A., 2010. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 339–347.
- Kunes, J., Hojna, S., Kadlecova, M., Dobesova, Z., Rauchova, H., Vokurkova, M., Loukovtova, J., Pechanova, O., Zicha, J., 2004. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiological Research* 53 (Suppl. 1), S23–S34.
- Liu, F., Ma, Y.T., Yang, Y.N., Xie, X., Li, X.M., Huang, Y., Ma, X., Chen, B.D., Gao, X., Du, L., 2010. Current status of primary hypertension in Xinjiang: an epidemiological study of Han, Uygur and Kazakh populations. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 90, 3259–3263.
- Liu, Y.M., 1999. *Pharmacography of Uighur, Part II. Science/Technology and Health Publishing House of Xinjiang*, p. 206.
- Luksha, L., Agewall, S., Kublickiene, K., 2009. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 202, 330–344.
- Mishra, S.K., Abbot, S.E., Choudhury, Z., Cheng, M., Khatib, N., Maycock, N.J., Zavery, A., Aaronson, P.L., 2000. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovascular Research* 46, 539–546.

Please cite this article in press as: Senejoux, F., et al., Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae). *J. Ethnopharmacol.* (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.08.012

- Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology* 268, 799–822.
- Schmitt, C.A., Dirsch, V.M., 2009. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide* 21, 77–91.
- Shimokawa, H., Yasutake, H., Fujii, K., Owada, M.K., Nakaike, R., Fuku-moto, Y., Takayanagi, T., Nagao, T., Egashira, K., Fujishima, M., Takeshita, A., 1996. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 28, 703–711.
- Singleton, V.L., Rossi Jr., J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
- Suo, Y., Wang, L., 2010. Extraction of *Nitraria tangutorum* seed lipid using different extraction methods and analysis of its fatty acids by HPLC fluorescence detection and on-line MS identification. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 390–399.
- Tammaro, P., Smith, A.L., Hutchings, S.R., Smirnov, S.V., 2004. Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 143, 303–317.
- Török, J., 2000. Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Physiological Research* 49, 107–114.
- Tulyaganov, T.S., Allaberdiev, F.K., 2001. Alkaloids of *Nitraria sibirica*. Dihydro-schoberine and nitrabirine N-oxide. *Chemistry of Natural Compounds* 37, 556–558.
- Tulyaganov, T.S., Allaberdiev, F.K., 2003. Alkaloids from plants of the *Nitraria* genus. Structure of sibiridine. *Chemistry of Natural Compounds* 39, 292–293.
- Vasques, C.A., Côrtes, S.F., Silva, M.S., de Medeiros, I.A., 1999. Muscarinic agonist properties of the hydrobutanol extract from aerial parts of *Waltheria viscosissima* St. Hil. (Sterculiaceae) in rats. *Phytotherapy Research* 4, 312–317.
- Xu, Z., Wang, X., Dai, Y., Kong, L., Wang, F., Xu, H., Lu, D., Song, J., Hou, Z., 2010. (±)-Preruptorin A enantiomers exert distinct relaxant effects on isolated rat aorta rings dependent on endothelium and nitric oxide synthesis. *Chemico-Biological Interactions* 186, 239–246.
- Zhang, Y., Gao, Y.J., Zuo, J., Lee, R.M., Janssen, L.J., 2005. Alteration of arterial smooth muscle potassium channel composition and BKCa current modulation in hypertension. *European Journal of Pharmacology* 514, 111–119.
- Zhao, K.F., Fan, H., Ungar, I.A., 2002. Survey of halophyte species in China. *Plant Science* 163, 491–498.
- Zheng, J., Li, H., Ding, C., Suo, Y., Wang, L., Wang, H., 2011. Anthocyanins composition and antioxidant activity of two major wild *Nitraria tangutorum* Bobr. variations from Qinghai-Tibet Plateau. *Food Research International* 44, 2041–2046.

II.2. Résultats complémentaires : Fractionnement bioguidé d'un extrait vasodilatateur de *Nitraria sibirica* Pall.

Introduction :

Fortement intéressés par cette plante et particulièrement motivés par la perspective d'une valorisation commerciale, nos collaborateurs chinois ont souhaité conserver le monopole de son étude chimique. Nous avons néanmoins pu entreprendre un fractionnement bioguidé de notre extrait hydro-éthanolique de fruits de *Nitraria sibirica*. Ce second travail a permis l'obtention d'une fraction vasoactive dont la composition chimique est actuellement étudiée dans le laboratoire du Dr Aisa.

Matériels et méthodes :

Le modèle d'aortes isolées a constitué l'outil d'évaluation de l'action vasodilatatrice des différentes fractions. Les expériences pharmacologiques ont été réalisées dans les mêmes conditions que lors du fractionnement bioguidé de l'extrait de *Ziziphora clinopodioides* (rats Wistar mâles de 7 à 8 semaines, endothélium intact, tension de base des anneaux aortiques = 2 g, contraction à la phényléphrine (PE) 10^{-6} M puis ajout de manière cumulative des différentes fractions de 10^{-3} à $10^{0,5}$ g/l). Une analyse de type ANOVA à deux facteurs suivie du test de Bonferroni a été employée pour la comparaison statistique des différentes activités.

Résultats :

Dans un premier temps l'extrait hydro-éthanolique (m = 3,50 g) a été séparé en deux fractions, solubles (F1, m = 2,50 g) ou non (F2, m = 1,00 g) dans le méthanol. Présentant une activité vasorelaxante significativement supérieure (Fig. 36 A), la partie soluble a ensuite été fractionnée par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex LH 20[®]) éluée par du méthanol. Cinq fractions (S1, S2, S3, S4, S5) ont été obtenues, présentant des masses respectives de 0,11 ; 0,30 ; 1,33 ; 0,35 et 0,12 g. Comme visualisé dans la Fig. 36B, les résultats montrent que seule la fraction S2 a présenté une forte action vasodilatatrice. Cette dernière a été transmise à nos collaborateurs et est en cours d'analyse chimique.

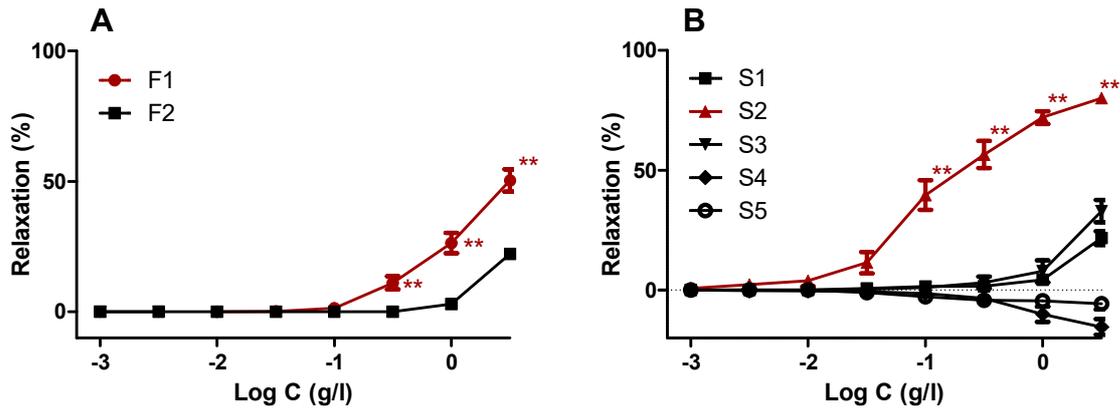


Figure 36. Courbes effet-concentration de différentes fractions de l'extrait hydro-éthanolique de fruits de *Nitraria sibirica* sur des anneaux aortiques de rats précontractés à la PE (10^{-6} M).

(A) Effets des fractions F1 et F2 ; (B) Effets des sous-fractions S1, S2, S3, S4 et S5.

Les valeurs représentent la moyenne \pm la SEM (n = 6 anneaux). ** ($p < 0,001$) différents des autres fractions.

Conclusion :

À l'heure actuelle, l'absence de données concernant la composition chimique de la fraction vasoactive S2 ne permet pas de conclure quant à la nature des métabolites vasoactifs. On remarquera cependant que cette fraction ainsi que l'extrait hydro-éthanolique brut ont répondu négativement à une caractérisation par le réactif de Dragendorff, suggérant une teneur alcaloïdique faible voire nulle. Cet élément tend à renforcer l'hypothèse d'une action vasorelaxante d'origine phénolique, comme formulé dans l'article précédent.

Chapitre V

Étude d'*Echinops integrifolius* Kar. & Kir.

全缘叶蓝刺头

I. Données bibliographiques

I.1. Données botaniques

Selon la dernière classification de l'APG (APG, 2009), l'espèce *Echinops integrifolius* peut être classée comme suit :

Division : Spermatophytes
Subdivision : Angiospermes
Classe : Dicotylédones à pollen triaperturé
Super-ordre : Euasterids II
Ordre : Asterales
Famille : Asteraceae
Genre : *Echinops*
Espèce : *integrifolius*

□ La famille des Asteraceae Bercht. & J.Presl (1820)

La famille des Asteraceae est l'une des plus importantes, d'un point de vue quantitatif, des dicotylédones. Elle comprend environ 23000 espèces réparties en plus de 1500 genres. Cosmopolite, cette famille reste cependant moins fréquemment distribuée dans les forêts tropicales humides.

Les Asteraceae (ou Compositae Giseke) forment un groupe facilement reconnaissable et sans aucun doute monophylétique. Les synapomorphies morphologiques et moléculaires sont en effet nombreuses. Les différentes espèces correspondent à des plantes herbacées, des buissons ou des arbres. Des canaux résinifères ou laticifères sont fréquemment rencontrés. Les feuilles, exstipulées, sont alternes, opposées ou verticillées. Elles sont simples, parfois profondément lobées ou découpées. Les bords sont entiers ou diversement dentés ; la nervation est généralement pennée ou palmée.

Les inflorescences sont indéterminées, les fleurs sont plus ou moins densément agglomérées en capitules entourés par un involucre de bractées, pouvant être terminales ou axillaires. Les fleurs sont hermaphrodites ou unisexuées, parfois stériles ; elles peuvent être actinomorphes ou zygomorphes. Leurs sépales sont profondément modifiés. Ils forment un pappus composé d'écailles, arêtes ou soies, persistantes et parfois soudées. Celles-ci peuvent être capillaires, velues, courtement barbues ou plumeuses. La corolle actinomorphe ou

zygomorphe est constituée de 5 pétales soudés. Il y a généralement 5 étamines, à filets libres insérées sur le tube de la corolle. Les anthères sont généralement soudées.

Il y a deux carpelles soudés à placentation basale formant un ovaire infère. Le style est composé de deux branches à surfaces stigmatiques couvrant la face interne ou réduites à deux bandes marginales. Le nectaire est situé au sommet d'un ovaire ne comportant qu'un unique ovule. Le fruit est un akène surmonté d'un pappus persistant, parfois comprimé, ailé, ou épineux. La fécondation est le plus souvent de type anémophile. Les akènes sont alors distribués par le vent, les soies du pappus formant ensuite un parachute. L'albumen est fugace voire absent (Judd et al., 2002).

□ Le genre *Echinops* L.

Le genre *Echinops* appartient à la sous-famille des Carduoïdeae et à la tribu des Cynareae Lam. (Susanna et al., 2006). Cette tribu est composée de 83 genres et plus de 2500 espèces. Cosmopolite, elle est cependant majoritairement distribuée dans l'hémisphère nord et particulièrement en Afrique du Nord et en Eurasie. Elle se caractérise par des capitules à fleurs toutes tubuleuses, hermaphrodites (rarement stériles ou unisexuées). Le style est renflé en noeud au-dessous des branches stigmatiques. Aussi connue sous le nom de Cardueae Cass., cette tribu peut se diviser en 5 sous-tribus (Susanna et al., 2006), elle inclut notamment les Echinopinae dont le genre *Echinops* fait partie.

D'étymologie grecque, le nom *Echinops* signifie «qui a l'apparence d'un hérisson». Il fait référence aux inflorescences caractéristiques du genre, sortes de globes à l'aspect hérissé, pouvant également être comparées à des oursins. Un genre homonyme (*Echinops* Martin) existe également dans le règne animal. L'espèce *Echinops telfairi*, un petit hérisson endémique de Madagascar, en constitue le seul représentant.

Le genre *Echinops* L. comprend environ 120 espèces végétales distribuées dans le bassin Méditerranéen, en Afrique tropicale ainsi que dans les régions tempérées de l'Eurasie (Sánchez-Jiménez et al. 2010). Ce genre correspond à des espèces vivaces atteignant 1 à 2 m de hauteur. Simples ou ramifiées, les tiges sont le plus souvent dressées. Les feuilles sont basales et caulinaires, sessiles ou pétiolées. La forme des feuilles est dentée ou découpée en lobes pennés et hérissés de pointes épineuses. La face supérieure est plus ou moins tomenteuse et parfois glandulaire. Les inflorescences, sphériques, sont regroupées en un

panicule discoïde. Elles portent de nombreux capitules constitués d'une seule fleur tubulée. L'involucre secondaire est formé de bractées laciniées (découpée en lanières) et pennatifides (feuille simple, pennée, profondément découpée jusqu'au milieu de chaque moitié du limbe, à la manière d'un peigne). L'involucre primaire est ellipsoïde et poilu. Les corolles sont de couleur blanche, grise, bleue ou violette. Elles forment des tubes allongés avec une gorge très courte et des lobes linéaires. Les appendices apicaux sont étroitement triangulaires. Le style est ramifié. Les pappus sont plus ou moins coniques (Flore de Chine).



Figure 37. *Echinops* sp.

□ **L'espèce *Echinops integrifolius* Kar. & Kir.**

L'espèce *Echinops integrifolius* correspond à des plantes herbacées vivaces de 20 à 90 cm de haut. Solitaires et non ramifiées, les tiges sont laineuses ou couvertes d'un tomentum aranéeux en dessous des inflorescences. La base est densément glandulaire et feuillée. Les feuilles sont sessiles, entières, linéaires à linéaires-lancéolée et mesurent 2 à 8 cm de long. La face inférieure des feuilles est laineuse ou tomenteuse, de couleur blanchâtre ou grisâtre. La face supérieure est verte et densément glandulaire. La marge est entière et révoquée. Les inflorescences d'environ 2 à 4 cm de diamètre sont solitaires. Les capitules sont uniflores et mesurent 1,6 cm. L'involucre est formé par 16 à 18 bractées. La corolle est blanche, ponctuée à l'extérieur de tubes non glandulaires. Les akènes mesurent 5 mm, ils sont recouverts de poils jaunâtres. Les pappus, d'environ 1,5 mm, sont presque entièrement soudés. Endémique de l'Asie centrale, l'espèce *E. integrifolius* a été rapportée dans la région du Xinjiang ainsi qu'en Mongolie, en Russie et au Kazakhstan. Sa période de floraison varie de Juillet à Septembre (Flore de Chine).

I.2. Chimiotaxonomie du genre *Echinops*

Aucune investigation chimique de l'espèce *E. integrifolius* n'avait été jusqu'alors entreprise. Des informations conséquentes concernant le genre *Echinops* sont cependant disponibles. Elles décrivent une variété importante de métabolites secondaires incluant des dérivés terpéniques, des thiophènes, des alcaloïdes, des lignanes ainsi que des flavonoïdes de natures diverses.

I.2.1. Métabolites d'origine terpénique

La composition des huiles essentielles de certaines espèces a été étudiée. Au niveau des racines, les métabolites volatils rapportés sont très majoritairement de nature sesquiterpénique. Des proportions importantes d'eudesm-7(11)-èn-4-ol (**85**) ont été détectées dans l'espèce *E. kebericho* (Hymete et al., 2007) tandis que présilphiperfol-7(8)-ène (**86**) est largement distribué dans les huiles d'*E. giganteus* (Menut et al., 1997). Les huiles essentielles d'inflorescences fraîches d'*E. graecus* sont riches en dérivés de type phenylpropène incluant notamment le méthyl chavicol (**87**) ; celles de l'espèce *E. ritro* sont majoritairement constituées de (*E*)-2-hexenal (**88**) et de monoterpènes tels que l'eucalyptol (**4**) et le paracymène (**89**) (Papadopoulou et al., 2006).

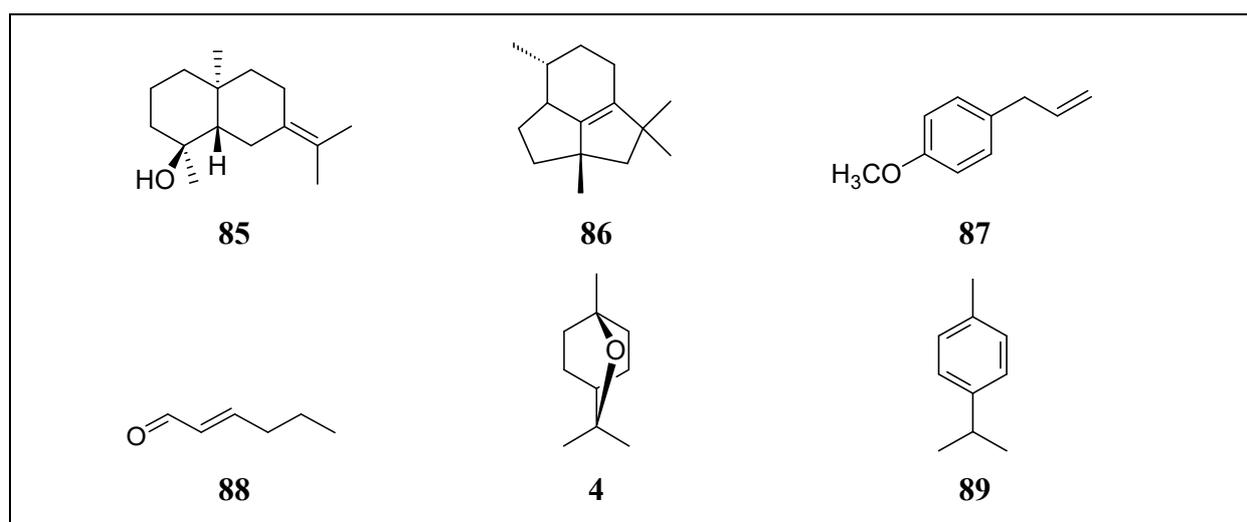


Figure 38. Constituants des huiles essentielles du genre *Echinops*

Des triterpènes pentacycliques de type lupane, oléanane, ursane ou taraxastane ont été mis en évidence dans le genre. Des stérols non spécifiques comprenant le stigmastérol, la campestérol et le β -sitostérol ont également été rapportés à plusieurs reprises (Sing et al., 1991 ; Sing et al., 1994 ; Hymete et al., 2005 ; Padashetty et Mishra, 2007).

On notera qu'une étude chimique des racines d'*E. spinosus* a permis l'identification de sesquiterpènes originaux au squelette inédit : les échinopines A (**90**) et B (**91**) (Dong et al., 2008). Ces composés présentent pour la première fois un système tétracyclique de type [3,5,5,7]. Un précurseur biogénétique de type guaiane est envisagé (Dong et al., 2008). Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par la mise en évidence de sesquiterpènes lactoniques de ce type dans le genre *Echinops*. La déhydrocostus lactone (**92**) a en effet été identifiée dans les racines d'*E. amplexicaulis* et d'*E. kebericho* (Abegaz et al., 1991). La (3 α ,4 α ,6 α)-3,13-dihydroxyguaia-7(11),10(14)-diène-12,6-lactone (**93**) et la (3 α ,4 α ,6 α ,11 β)-3-hydroxyguaia-1(10)-ène-12,6-lactone (**94**) ont aussi été isolées au cours d'une investigation chimique de l'espèce *E. ritro* (Li et al., 2010). Des lactones de type germacrène sont également rapportées, telles que le (+)-costunolide (**95**) et le dihydrocostunolide (**96**) décrits chez *E. amplexicaulis* et *E. kebericho*. Les racines d'*E. pappii* ont aussi permis de caractériser des lactones de type eudesmane incluant la santamarine (**97**) et la reynosine (**98**) (Abegaz et al., 1991).

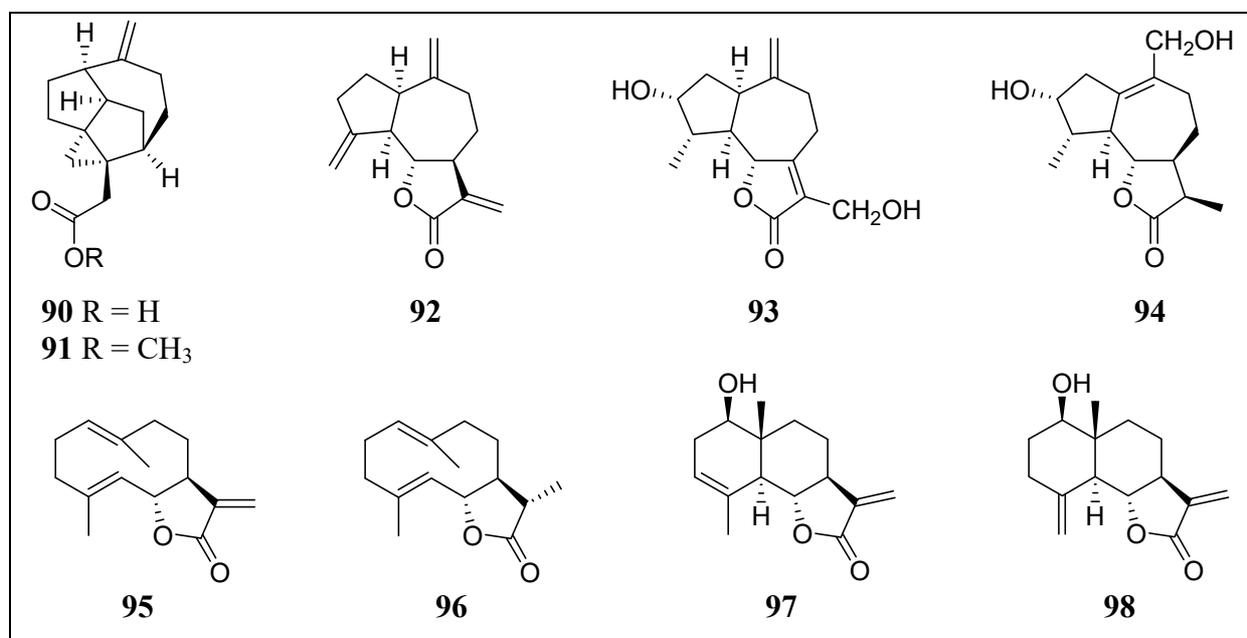
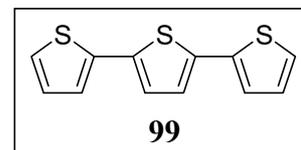


Figure 39. Échinopines A et B et lactones sesquiterpéniques rencontrées du genre *Echinops*

I.2.2. Métabolites de la voie des polyacétates

Isolé en 1947 au cours d'une étude chimique de *Tagetes erecta*, l' α -tertiophène (**99**) fut le premier thiophène d'origine naturelle décrit (Zehmeister et Sease, 1947). Plus d'une centaine de métabolites de ce type ont depuis été caractérisés. Spécifiquement rencontrés dans certains genres d'Asteraceae dont le genre *Echinops*, ces composés comprennent un, deux voire trois hétérocycles thiophéniques ainsi que des chaînes latérales présentant un nombre variable de doubles ou triples liaisons (Kagan, 1991).

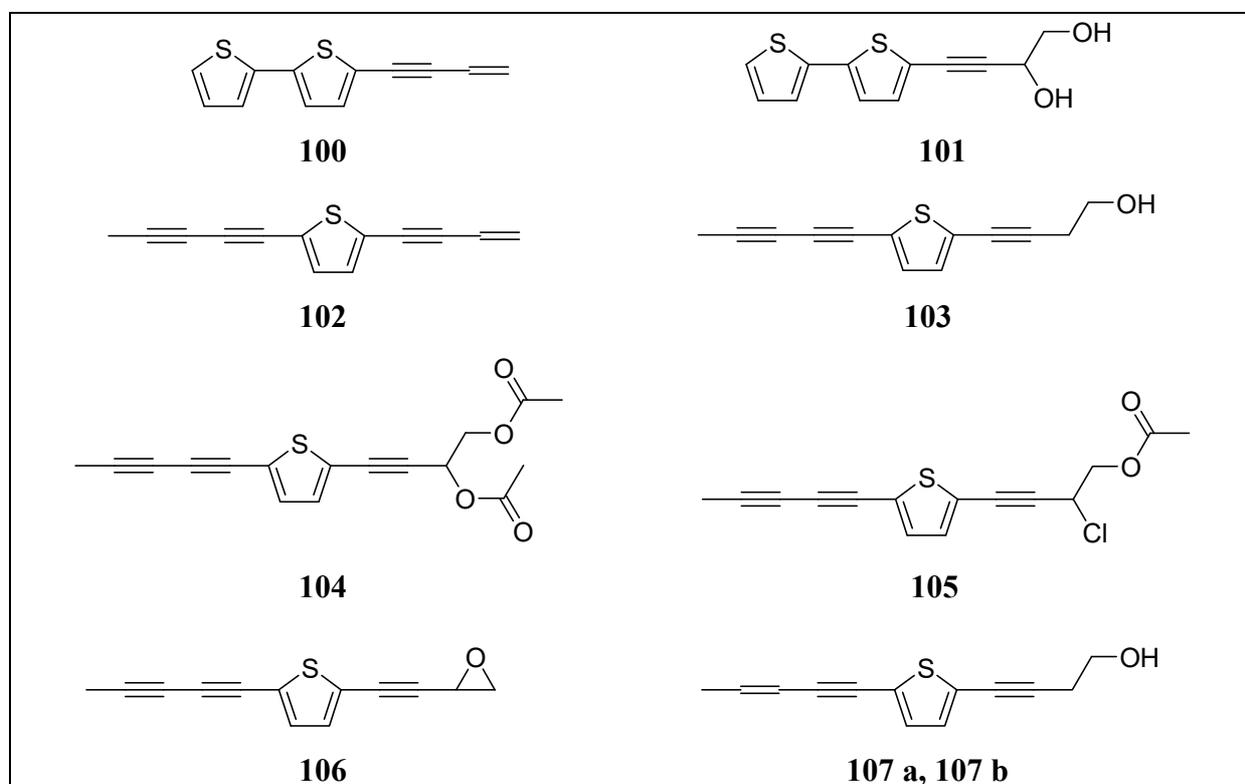


Les mécanismes à l'origine de la biogenèse de ces thiophènes naturels n'ont été que partiellement élucidés. Cependant, la majorité des hypothèses proposent l'acide oléique (C_{18:1} (9)) comme précurseur (Bohlmann et al., 1976 ; Margl et al., 2001). La formation de dérivés acétyléniques, probablement par voie enzymatique (Lee et al., 1998), ainsi qu'une réduction de la longueur de la chaîne carbonée interviendrait ensuite. L'incorporation de soufre aurait enfin lieu grâce à une réaction entre les intermédiaires polyacétyléniques et du sulfure d'hydrogène.

De nombreuses études chimiques ont donc été motivées par la présence de tels dérivés dans certaines espèces d'*Echinops*. Plusieurs dizaines de structures ont ainsi pu être identifiées. Le tableau V présente de manière non exhaustive certaines d'entre elles (Abegaz et al., 1991 ; Hymete et al., 2005 ; Fokialakis et al., 2006 ; Zhang et Ma, 2010). On remarque une grande diversité concernant les substitutions rencontrées. La longueur des chaînes carbonées est à l'inverse relativement constante. Elle est le plus souvent constituée de treize carbones pour les mono-thiophènes et de douze carbones pour les bi- et tri-thiophènes. Il est enfin important de constater que, dans ce genre, de tels métabolites semblent être exclusivement produits au niveau des racines (Abegaz et al., 1991).

Tableau V. Exemples de dérivés thiophéniques du genre *Echinops*

Thiophène	Formule	Source
α -terthiophène	99	<i>E. grijisii</i> , <i>E. macrochaetus</i> , <i>E. pappii</i> , <i>E. sphaerocephalus</i> , <i>E. ritro</i>
5-(but-3-èn-1-ynyl)-2,2'-bithiophène	100	<i>E. grijisii</i> , <i>E. macrochaetus</i> , <i>E. pappii</i> , <i>E. sphaerocephalus</i>
5-(3,4-dihydroxybut-1-ynyl)-2,2'-bithiophène	101	<i>E. grijisii</i>
5-(penta-1,3-diynyl)-2-(but-3-èn-1-ynyl)-thiophène	102	<i>E. ellenbeckii</i> , <i>E. sphaerocephalus</i>
2-(penta-1,3-diynyl)-5-(4-hydroxybut-1-ynyl)-thiophène	103	<i>E. giganteus</i> , <i>E. grijisii</i> , <i>E. hispidus</i> , <i>E. hoenellii</i> , <i>E. longisteus</i> , <i>E. macrochaetus</i> , <i>E. pappii</i> , <i>E. sphaerocephalus</i>
2-(penta-1,3-diynyl)-5-(3,4-diacétoxybut-1-ynyl)-thiophène	104	<i>E. ellenbeckii</i> , <i>E. giganteus</i> , <i>E. grijisii</i> , <i>E. hispidus</i> , <i>E. macrochaetus</i> , <i>E. sphaerocephalus</i>
5-(penta-1,3-diynyl)-2-(3-chloro-4-acétoxybut-1-ynyl)-thiophène	105	<i>E. ellenbeckii</i> , <i>E. giganteus</i> , <i>E. hispidus</i> , <i>E. hoenellii</i> , <i>E. longisteus</i> , <i>E. macrochaetus</i> , <i>E. sphaerocephalus</i> , <i>E. transiliensis</i>
5-(penta-1,3-diynyl)-2-(3,4-époxybut-1-ynyl)-thiophène	106	<i>E. ellenbeckii</i> , <i>E. sphaerocephalus</i>
(<i>E</i>)-5-(pent-3-èn-1-ynyl)-2-(4-hydroxybut-1-ynyl)-thiophène	107 a	<i>E. pappii</i> , <i>E. sphaerocephalus</i>
(<i>Z</i>)-5-(pent-3-èn-1-ynyl)-2-(4-hydroxybut-1-ynyl)-thiophène	107 b	<i>E. pappii</i> , <i>E. sphaerocephalus</i>


Figure 40. Exemples de structures thiophéniques du genre *Echinops*

On remarquera également l'existence de certains dimères. La cardopatine (**108 a**) et l'isocardopatine (**108 b**) ont ainsi été mises en évidence dans les espèces *E. bannaticus* et *E. ritro* (Lam et al., 1991 ; Zhang et Ma, 2010). L'échinoétherthiophène (**109**) a été isolé d'*E. latifolius* (Wang et al., 2007). Une étude chimique de l'espèce *E. grijissii* a de plus permis l'identification d'un hétéroside atypique : l'échinothiophène (**110**) (Koike et al., 1999). On notera qu'aucune hypothèse biogénétique n'a été formulée concernant la formation de ce dernier.

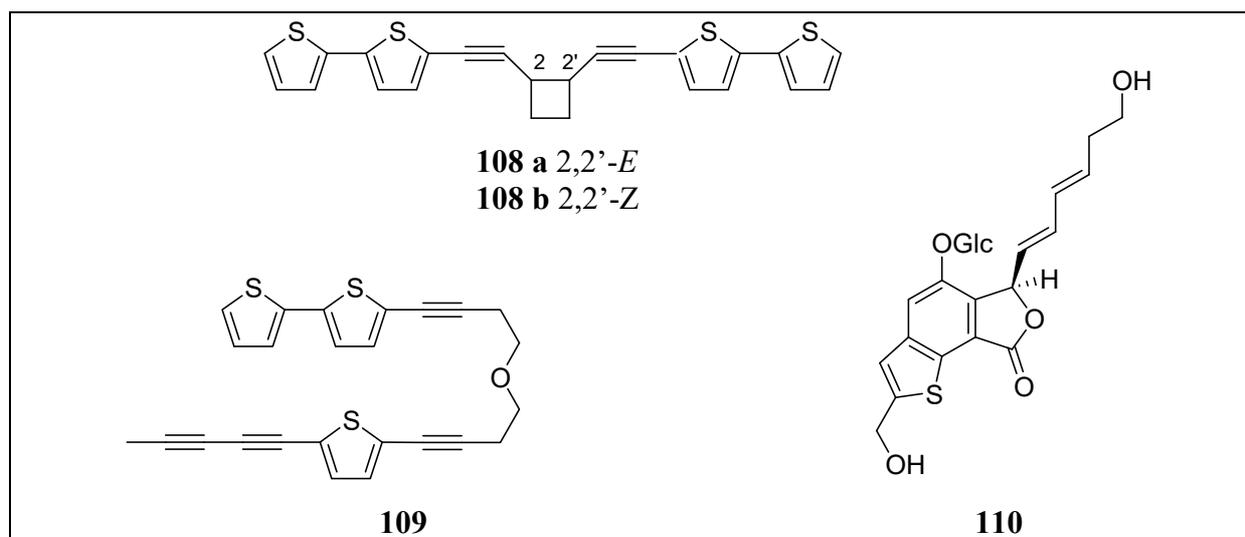


Figure 41. Structures thiophéniques complexes du genre *Echinops*

De longues chaînes hydrocarbonées saturées, des acides gras ainsi que des esters méthyliques d'acides gras ont également été identifiés (Wassel et Baghdadi, 1980, Hymete et al., 2005). Bien que possibles précurseurs de thiophènes et fréquemment rencontrés dans la famille des Asteraceae, aucun dérivé acétylénique n'a jusqu'alors été décrit dans le genre *Echinops*.

I.2.3. Métabolites alcaloïdiques

Des métabolites de nature alcaloïdique ont également été caractérisés dans le genre *Echinops*. La totalité des composés rencontrés sont issus du métabolisme de l'acide anthranilique (**66**). La condensation de cet acide avec une unité acétate est en effet à l'origine de la formation de quinoléines simples (**61**) ainsi que de quinolones. Rencontrées majoritairement dans la famille des Rutaceae (Hegnauer, 1988), de telles structures sont également décrites dans le genre *Echinops*.

L'échinine (**111**) et l'échinorine (**112**) ont ainsi été mises en évidence dans les graines de l'espèce *E. ritro* (Schroeder et Luckner, 1968 ; Döpke et Fritsch, 1969). Les parties aériennes d'*E. niveus* et d'*E. echinatus* ont également permis d'identifier l'échinopsine (**113**) ainsi que l'échinopsidine (**114**) (Chaudhuri, 1987 ; Bhakuni et al., 1990). Des hétérosides incluant la 4-méthoxy-8-(β -D-glucopyranosyloxy)-2(1H)-quinolinone (**115**) et la 1-méthyl-4-méthoxy-8-(β -D-glucopyranosyloxy)-2(1H)-quinolinone (**116**) ont enfin été isolés des parties aériennes d'*E. gmelinii* (Su et al., 2004). Ces deux métabolites représentent un exemple rare d'hétérosides de quinolinones d'origine naturelle.

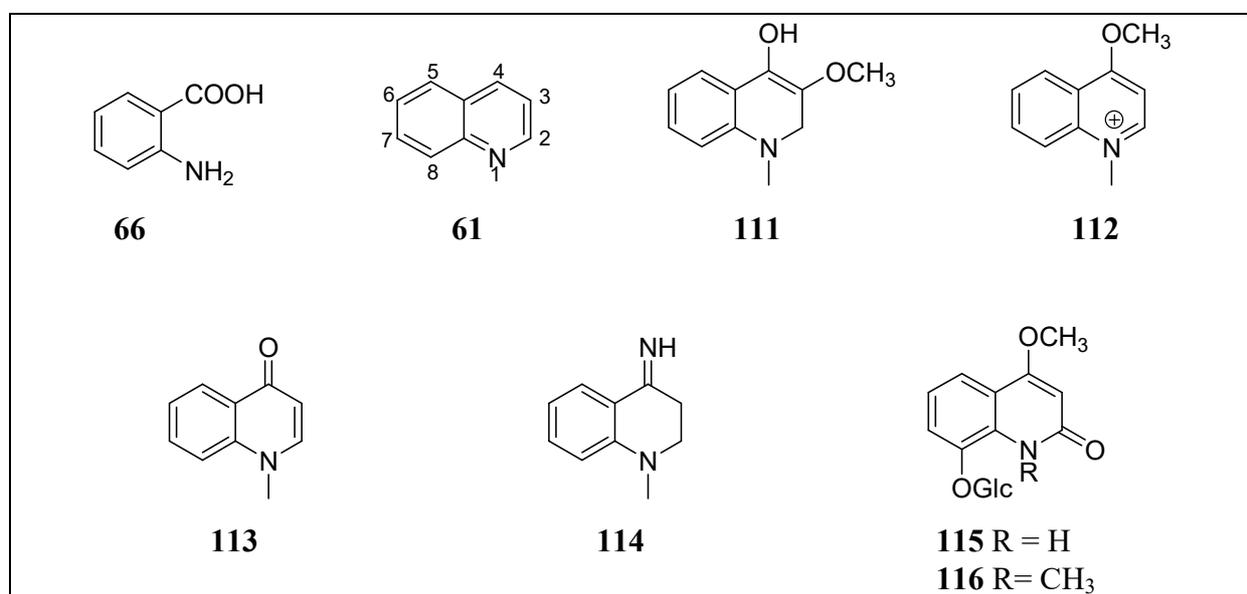


Figure 42. Structures alcaloïdiques du genre *Echinops*

Des alcaloïdes de type quinazolinique ont également été identifiés dans ce genre. L'échinozolinone (**117**) et la 7-hydroxyéchinozolinone (**118**), respectivement isolées des

parties aériennes et des fleurs de l'espèce *E. echinatus* (Chaudhuri, 1987, 1992), constituent, à notre connaissance, les seuls composés de cette nature décrits dans la famille des Asteraceae (Michael 1994, 2007). Il faut remarquer que la justesse de l'identification structurale de l'échinozolinone a été remise en cause. Il semblerait toutefois que cette divergence d'interprétation s'explique par la caractérisation du chlorhydrate de cet alcaloïde dans un cas (Chaudhuri, 1987) et de sa forme basique libre dans l'autre (Reisch et Gunaherath, 1989 ; Michael, 1994).



Figure 43. Structure de l'échinozolinone et de la 7-hydroxyéchinozolinone

I.2.4. Métabolites phénoliques

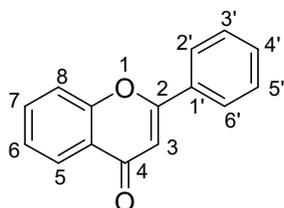
Les études phytochimiques menées sur le genre *Echinops* ont également mis en évidence une variété importante de composés phénoliques. De nombreux flavonoïdes ont été décrits. Des squelettes de type flavonol, flavone, flavanone, isoflavone ainsi que des néoflavonoïdes sont rapportés.

Des génines de type flavonols sont rencontrées dans les espèces *E. niveus* et *E. echinatus*. La quercétine (**37**), la tamarixétine (**119**), le kaempférol (**73**), le kaempféride (**120**) ou encore le 7-*O*-méthylkaempférol (**121**) ont été caractérisés. Des hétérosides sont également décrits incluant la rutine (**122**), le 3-*O*-rhamnosylkaempférol (**123**) ou la 7-*O*-rhamnosylmyricétine (**124**) (Singh et al., 1994, 2006).

Des flavones incluant l'apigénine (**20**), la lutéoline (**24**) ou le chrysoériol (**125**) ont été identifiées dans les parties aériennes des espèces *E. ritro* et *E. niveus* (Singh et Pandey, 1994 ; Chevrier, 1976). Plusieurs hétérosides correspondants tels que la 7-*O*-glucosyllutéoline (**27**) et la 7-*O*-rutinosylapigénine (**126**) sont décrits dans ces mêmes espèces. Des composés acylés, substitués par l'acide 4-coumarique, ont également été caractérisés. L'échinacine (**127**) et l'échinaticine (**128**) ont ainsi été isolées d'un extrait de la plante entière d'*E. niveus* et

l'échitine (**129**) a été mise en évidence dans les fleurs d'*E. echinatus* (Singh et Pandey, 1994 ; Ram et al., 1996).

Tableau VI. Flavonols et flavones rencontrés dans le genre *Echinops*



Composé	Position					
	3	5	7	3'	4'	5'
20	H	OH	OH	H	OH	H
24	H	OH	OH	OH	OH	H
27	H	OH	O-Glc	OH	OH	H
37	OH	OH	OH	OH	OH	H
73	OH	OH	OH	H	OH	H
119	OH	OH	OH	OH	OCH ₃	H
120	OH	OH	OH	H	OCH ₃	H
121	OH	OH	OCH ₃	H	OH	H
122	O-Rut	OH	OH	OH	OH	H
123	O-Rha	OH	OH	H	OH	H
124	OH	OH	O-Rha	OH	OH	OH
125	H	OH	OH	OCH ₃	OH	H
126	H	OH	O-Rut	H	OH	H
127	H	OH	O-Glc-(6''- <i>p</i> - coumaroyl)	H	OH	H
128	H	OH	O-Glc-(4''- <i>p</i> - coumaroyl)	H	OH	H
129	H	OH	O-Glc-(2''- <i>p</i> - coumaroyl)	H	OH	H

La 5,7-dihydroxy-8,4'-diméthoxyflavanone (**130**) ainsi qu'un hétéroside : le 5-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-7-*O*- β -D-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -D-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-8,4'-diméthoxyflavanone (**131**) ont enfin été décrits dans les feuilles d'*E. echinatus* (Yadava et Singh, 2006).

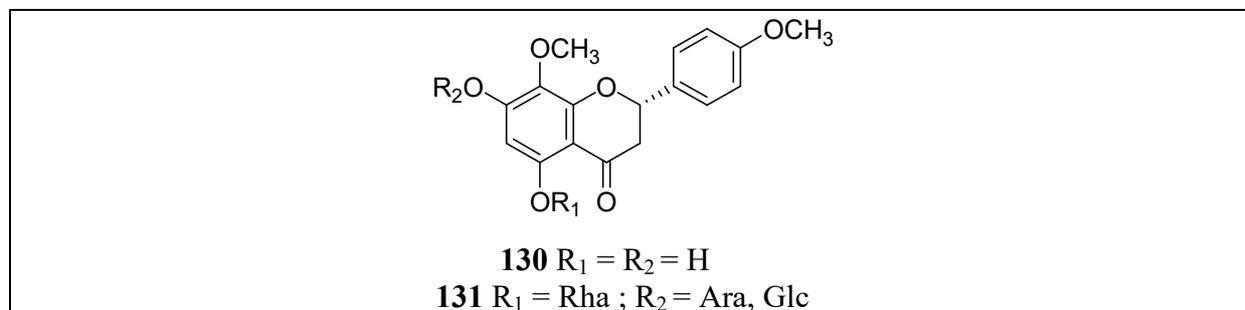


Figure 44. Flavanones du genre *Echinops*

Des structures flavonoïdiques plus étroitement distribuées ont aussi été caractérisées. La 7-hydroxyisoflavone (**132**) est notamment décrite chez *E. echinatus* (Singh et al., 2006). Les isoflavones sont très majoritairement rencontrés chez les Fabaceae. De tels métabolites sont néanmoins décrits dans plusieurs genres appartenant à la famille des Asteraceae (Reynaud et al., 2005).

Bien qu'ils présentent une structure assez éloignée de celles des autres types de flavonoïdes, les néoflavonoïdes sont également issus de la condensation de trois molécules d'acétates et d'un acide de type cinnamique. Ils sont de ce fait rattachés aux flavonoïdes. La distribution des néoflavonoïdes est plutôt restreinte. Ces métabolites sont majoritairement rencontrés chez les Clusiaceae, les Rubiaceae et les Fabaceae. La mise en évidence de la nivégine (**133**) et de la nivétine (**134**) dans les fleurs d'*E. niveus* constitue ainsi à notre connaissance l'unique description de néoflavonoïdes chez les Asteraceae (Singh et Pandey, 1990 ; Garazd et al., 2003).

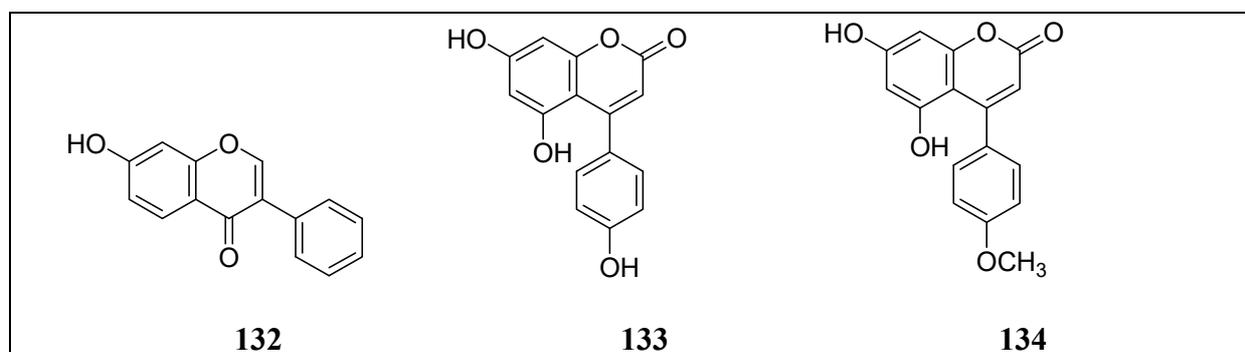


Figure 45. Isoflavonoïde et néoflavonoïdes du genre *Echinops*

Les racines d'*E. giganteus* ont enfin permis d'isoler deux lignanes furfurofuraniques : le (+)-4-hydroxy-2,6-di(3,4-diméthoxy)phényl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane (**135**) et le (+)-4-(3-méthylbutanoyl)-2,6-di(3,4-diméthoxy)phényl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane (**136**) (Tene et al., 2004). La formation de tels composés résulte du couplage de deux unités phénylpropaniques. D'origine enzymatique, leur biosynthèse est stéréospécifique (Dewick, 2002).

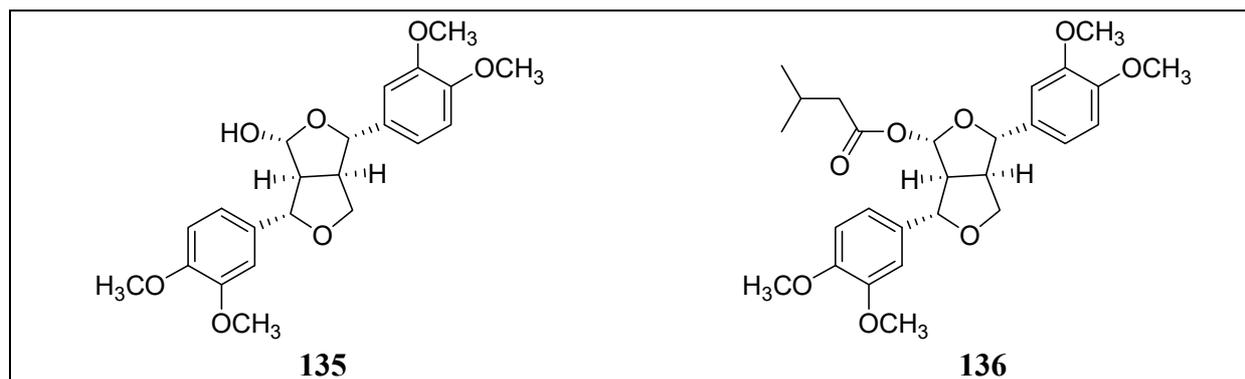


Figure 46. Lignanes du genre *Echinops*

I.3. Usages traditionnels

Bien que non répertoriée dans la Pharmacopée ouïghoure, l'espèce *E. integrifolius* constitue néanmoins une plante médicinale largement employée dans la région du Xinjiang. Les plantes entières sont notamment utilisées par de nombreux tradipraticiens ouïghours pour traiter l'HTA (Dr Haji Akber Aisa, communication personnelle).

L'emploi des racines de l'espèce *E. grijisii* est rapporté dans la Pharmacopée chinoise. Cette plante, commercialisée sous le nom de « Yuzhou Loulu », est employée pour stimuler la lactation ou « détoxifier » l'organisme (Zhang et Ma, 2010). Les racines de cette même espèce ainsi que celles d'*E. latifolius* peuvent également être utilisées pour traiter certains cancers (Graham et al., 2000).

Différentes utilisations médicinales du genre *Echinops* ont également été recensées en Inde. La plante entière d'*E. echinatus* y est employée comme anti-inflammatoire et comme antalgique. Ses racines constituent un remède contre la fièvre et la toux (Singh et al., 1989). Celles-ci peuvent également être utilisées comme diurétique ou pour soulager certains

troubles uro-génitaux. Administrées avant l'accouchement, elles permettraient d'accélérer la délivrance (Padashetty et Mishra., 2007). Des indications semblables sont rapportées au Maroc pour les racines de l'espèce *E. spinosus* (Lahsissene et al., 2009).

En Éthiopie, certaines espèces de ce genre sont indiquées dans le traitement de certains troubles cardiaques, de la migraine, de diarrhées, des hémorroïdes ainsi qu'en tant que vermifuge. (Hymete et al., 2005). Au Cameroun, les racines d'*E. giganteus* sont ajoutées à certaines préparations culinaires pour prévenir certains troubles cardiaques et gastriques (Tene et al., 2004). Une étude ethnobotanique menée dans le Nord du Sahara rapporte enfin l'utilisation d'infusion des parties aériennes de l'espèce *E. bovei* en cas d'infections oculaires, de troubles digestifs, de diarrhées ou de fièvres (Hammiche et Maiza, 2006).

I.4. Propriétés pharmacologiques

Les activités biologiques du genre *Echinops* ont fait l'objet d'un nombre conséquent d'investigations. En revanche, aucun effet sur le système cardiovasculaire n'a jusqu'alors été caractérisé.

Les propriétés des thiophènes distribués dans les racines de certaines espèces du genre ont motivé la majeure partie des travaux entrepris. Ces métabolites sont en effet responsables d'une importante variété d'actions pharmacologiques, telles que des propriétés insecticides (Sharma et Goel, 1994), bactéricides (Sharma et Mehta, 1989 ; Hymete et al., 2005), fongicides (Fokialakis et al., 2006), virucides (Marles et al., 1992 ; Hudson et al., 1993), antiparasitaires (Hymete et al., 2005) et cytotoxiques (Marles et al., 1992 ; Jin et al., 2008).

Peu de données relatives à la toxicité du genre sont disponibles. Néanmoins, les DL₅₀ d'extraits aqueux et éthanoliques de racines d'*E. giganteus* ont été évaluées chez la souris. Des valeurs comprises entre 70 et 80 mg/kg sont décrites. Chez ce même animal, l'administration d'un extrait chlorométhylénique de racines d'*E. grijisii* peut également être létale à une dose de 200 mg/kg (Jin et al., 2008). Ces faibles valeurs tendent à remettre en cause l'innocuité de tels remèdes et incitent à généraliser de telles évaluations. Certaines racines du genre semblent ainsi devoir être utilisées avec précaution.

Des actions anti-inflammatoires ont été démontrées chez le rat pour un extrait éthanolique de la plante entière d'*Echinops echinatus* (Singh et al., 1989). Le contenu terpénique ainsi que des dérivés de type flavanone pourraient être à l'origine de cette activité (Singh et al., 1991 ; Yadava et Singh, 2006).

Une diminution de la fertilité chez des rats mâles et femelles a enfin été démontrée suite à l'administration de différents extraits de racines d'*E. echinatus*. Des métabolites de nature stéroïdiques ou triterpéniques pourraient être responsables de ces effets (Sharma et al., 1988 ; Padashetty et Mishra, 2007).

II. Résultats expérimentaux et discussion

L'efficacité d'*Echinops integrifolius* Kar. & Kir. en tant que thérapie anti-hypertensive n'a, jusqu'alors, jamais été expérimentalement confirmée. Dans le but de permettre la rationalisation scientifique de l'usage traditionnel de cette espèce, nous nous sommes donc consacrés à l'évaluation de ses propriétés vasodilatatrices.

II.1. Évaluation des effets vasodilatateurs d'extraits hydro-éthanoliques d'*Echinops integrifolius*

Un premier screening, effectué sur l'échantillon d'un extrait hydro-éthanolique de plantes entières d'*Echinops integrifolius* (Extrait hydro-éthanolique I), a démontré un effet vasorelaxant intéressant (Fig. 47). Compte-tenu de cette action, la perspective d'études pharmacologiques et phytochimiques a nécessité la préparation d'un second extrait hydro-éthanolique (Extrait hydro-éthanolique II), réalisée par Ulugbek Karimov, doctorant dans le Xinjiang Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry dirigé par le Dr Haji Akber Aisa. L'évaluation de l'action vasodilatatrice de ce second extrait a cependant mis en lumière un effet significativement inférieur à l'extrait I et insuffisant pour envisager une étude pharmacologique (Fig. 47).

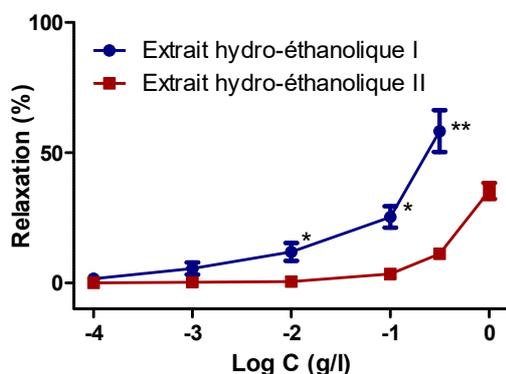


Figure 47. Courbes effet-concentration des extraits hydro-éthanoliques I et II d'*Echinops integrifolius* sur des anneaux aortiques de rats Wistar. Les anneaux, dont l'endothélium était intact, ont été précontractés à la PE (10^{-6} M) avant l'ajout de l'extrait de façon cumulative, de 10^{-4} à $10^{-0,5}$ g/l pour l'extrait I (quantité d'extrait disponible limitée) et de 10^{-4} à 1 g/l pour l'extrait II.

Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n = 5 anneaux).

* (p<0,05), ** (p<0,001) vs extrait hydro-éthanolique II.

II.2. Étude phytochimique d'*Echinops integrifolius*

En dépit de l'action vasodilatatrice modeste de l'extrait hydro-éthanolique II, la mise en évidence, dans la littérature, de métabolites originaux dans le genre *Echinops* ainsi que l'absence de données phytochimiques relatives à l'espèce *Echinops integrifolius* nous ont conduits à entreprendre une investigation chimique de cet extrait. On notera que celui-ci a réagi négativement avec le réactif de Dragendorff ainsi qu'avec l'isatine en présence d'acide sulfurique, suggérant respectivement l'absence de métabolites alcaloïdique et thiophénique. La composition de cette plante endémique de la région du Xinjiang a ainsi été étudiée pour la première fois et la signification chimiotaxonomique des différents métabolites identifiés a été discutée. Ce dernier travail a fait l'objet d'un article qui sera prochainement proposé dans *Biochemical Systematics and Ecology*.

Publication 5 : Étude phytochimique
d'*Echinops integrifolius* Kar. & Kir. (Asteraceae)

Chemical constituents from *Echinops integrifolius* Kar. & Kir.
(Asteraceae)

François Senejoux, Céline Demougeot, Parhat Kerram, Haji Akber Aisa,

Ulugbek Karimov, Alain Berthelot, Françoise Bévalot, Corinne Girard

Travail prochainement proposé dans **Biochemical Systematics and Ecology**

Chemical constituents from *Echinops integrifolius* Kar. & Kir.

(Asteraceae)

François Senejoux ^a, Céline Demougeot ^a, Parhat Kerram ^b, Haji Akber Aisa ^c,

Ulugbek Karimov ^c, Françoise Bévalot ^a, Corine Girard-Thernier ^{a*}

^a EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon, France

^b Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, PR China

^c Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, PR China.

* Corresponding author :

Dr Corine GIRARD-THERNIER

EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 BESANCON, France

Phone number: (33) 3 81 66 55 59

Fax number: (33) 3 81 66 55 68

E-mail: corinne.girard@univ-fcomte.fr

ABSTRACT

To the best of our knowledge, the present study constitutes the first phytochemical investigation of *Echinops integrifolius* Kar. & Kir. (Asteraceae). Four triterpenes (**1-4**), six flavonoids (**5-10**) and one coumarin (**11**) were isolated and identified. Among them, methoxyflavones **7-10** and coumarin **11** are firstly reported from *Echinops* genus.

1. Subject and source

Echinops integrifolius Kar. & Kir. is a perennial herb endemic to Central Asia (Lin, 1987), commonly used in traditional uighur medicine for the treatment of hypertension. The plants were collected from Burqin, Altay, Xinjiang Uighur Autonomous Region, P.R. China, in July 2009 (phase of fruiting) and authenticated by Prof. Guan-ming Shen of Xinjiang Institute of Ecology and Geography, CAS. A voucher specimen (N° EI20090626) has been deposited at Xinjiang Key Laboratory of Plant Resources and Natural Products Chemistry, XJIPC, CAS.

2. Previous work

The genus *Echinops* (Asteraceae) belongs to the Cynareae Lam. tribe (= Cardueae Cass.) (Susanna et al., 2006) and consists of about 120 species that are widely distributed in tropical Africa and in temperate areas of Europe and Central Asia. This genus has been widely investigated, with numerous compounds isolated from various species. *Echinops* species are known to elaborate acetylenic thiophenes (Abegaz et al., 1991), sesquiterpene lactones (Abegaz et al., 1991), alkaloids (Chaudhuri, 1992), lignans (Tene et al., 2004) and flavonoids (Singh and Pandey, 1990; 1994) and hydroxycinnamates (Jaiswal et al., 2011).

However, to the best of our knowledge, no phytochemical study has been undertaken on the species *Echinops integrifolius*.

3. Present study

The powdered air-dried whole plants of *E. integrifolius* (2 kg) were extracted in water for two days at room temperature, with a heating at 100°C 1 hour per day, and then extracted with ethanol (70 %). Concentration under reduced pressure of the hydroalcoholic solution provided 100 g of a crude extract, which was suspended in water (2 L) and then partitioned sequentially with hexane and dichloromethane (CH₂Cl₂) (each 8 x 200 mL) to yield 5.1 g and 4.5 g of hexanic and CH₂Cl₂ extracts, respectively. The CH₂Cl₂ extract was fractionated by repeated Sephadex LH-20 column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 1:1) to give six main fractions (Frs A–F). Fraction B (890 mg) was subjected to a flash column chromatography on silica gel eluting with a hexane-CH₂Cl₂ gradient (50:50 to 0:100) and then with a CH₂Cl₂-MeOH gradient (100:0 to 80:20) to yield compounds **1** (23 mg), **2** (26 mg), **3** (22 mg) and **4** (15 mg). Fraction D was also chromatographed on a silica gel flash column chromatography using CH₂Cl₂ containing increasing amounts of MeOH (100:0 to 80:20); a total of fourteen fractions were obtained (Frs D1-D14). Compound **5** (4 mg) was isolated from D8 (10 mg) by crystallization in MeOH. Compounds **6** (2 mg) and **7** (5 mg) were respectively isolated from D10 and D5. Fraction D6 (20 mg) was purified by repeated semi-preparative HPLC on a ACE 5[®] C₁₈ column (250 mm x 77.5 mm, 5 μm) to afford compounds **8** (5 mg) and **11** (2 mg). The flow rate was 1.8 ml/min and elution was performed with an isocratic solvent mixture of water/acetonitrile/MeOH (A:B, 1:1; A=H₂O and B=ACN/MeOH, 3:1). D9 (18mg) and E (10 mg) were also submitted to repeated semi-preparative HPLC to give respectively compounds **9** (2 mg) and **10** (2 mg). The flow rate was 1.8 mL/min and elution was performed with an

isocratic solvent mixture of water/acetonitrile/MeOH (A:B, 40:60; A=H₂O and B=ACN/MeOH, 3:1).

The structures of all isolated compounds were elucidated by analysis of their spectral data (MS, ¹H and ¹³C NMR, including COSY, HMQC, HMBC, and NOESY) and by comparison with the literature. They were identified as lupeol acetate (**1**) (Jamal et al., 2008), lupeol (**2**) (Jamal et al., 2008), β -sitosterol-3-glucoside (**3**) (Jayaprakasha et al., 2010), stigmasterol (**4**) (Elgendya et Al-Ghamdy, 2007), chrysoeriol (**5**) (Choi et al., 2005), apigenin (**6**) (Christensen and Lam, 1991), jaceidin (**7**) (Flamini et al., 2001) centaureidin (**8**) (Flamini et al., 2001), hispidulin (**9**) (Lee et al., 2010), axillarin (**10**) (Flamini et al., 2001) and umbelliferone (**11**) (Singh et al., 2010) (Fig. 1).

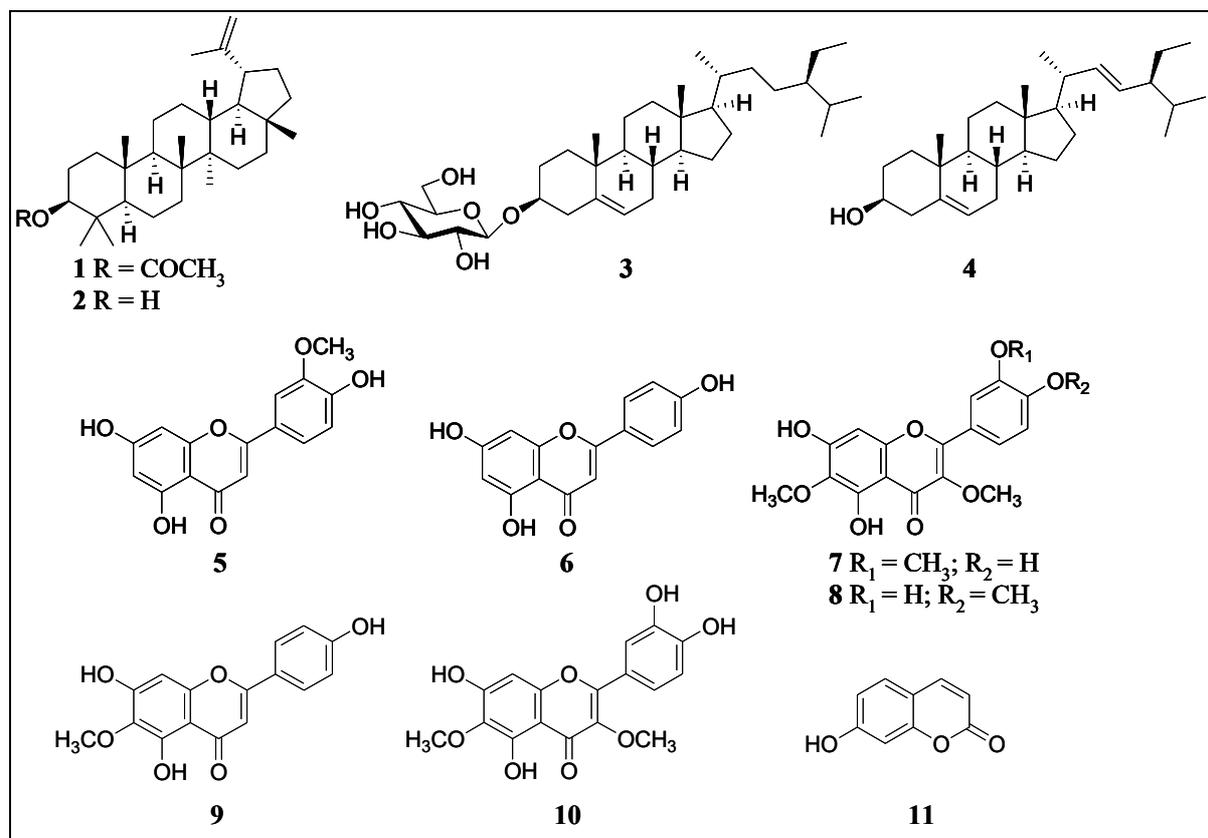


Figure 1. Chemical structures of the constituents from *Echinops integrifolius*.

4. Chemotaxonomic significance

In the present study, four triterpenes (1-4), six flavonoids (5-10) and one coumarin (11) were isolated and identified. Isolation of flavonoids and triterpenes are consistent with the chemical profile of the other *Echinops* species (Singh and Pandey, 1990; 1994). Conversely, coumarins have never been described in *Echinops* genus. Such kind of secondary metabolites is, however, quite common in the Asteraceae family (Zdero et al., 1990). Additionally, it should be note that 3- and 6-methoxyflavones (compounds 7-10) are also firstly reported in *Echinops* genus. Of interest, jaceidin (7), centaureidin (8), hispidulin (9) and axillarin (10) are widely distributed in *Centaurea* genus (Flamini et al., 2001; Akkal et al, 2003; Bicha et al., 2011) which belongs to the same tribe, supporting thus a chemotaxonomical relationship between those taxa. Further investigations on phenolic composition of *Echinops* species should be carried out in order to establish the chemotaxonomic significance of 3- and 6-methoxyflavonoids as well as coumarins in *Echinops* genus.

Acknowledgment This work was supported by a grant from the Région Franche-Comté and by the French Ministry of Foreign and European Affairs.

References

- Abegaz, B.M., Tadesse, M., Majinda, R., 1991. *Biochem. Syst. Ecol.* 19, 323.
- Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., Tillequin F., 2003. *Chem. Nat. Comp.* 39, 219.
- Bicha, S., Bentamene, A., Benaissa, O., Benayache, S., Garcia, V.P., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F., 2011. *Chem. Nat. Comp.* 47, 105.
- Chaudhuri P.K., 1992. *J. Nat. Prod.* 55, 249.
- Choi, D.Y., Lee J.Y., Kim, M.R., Woo, E.R., Kim, Y.G., Kang, K.W., 2005. *J. Biom. Sci.* 12, 949.
- Christensen, P., Lam, J., 1991. *Phytochemistry* 30, 2663.
- Elgendya, E.M., Al-Ghamdy, H., 2007. *Taiwan Pharm. J.* 59, 113.
- Flamini, G., Antognoli, E., Morelli, I., 2001. *Phytochemistry* 57, 559.
- Jamal, A.K., Yaacob, W.A., Din L.B., 2008. *J. Phys. Sci.* 19, 45.
- Jaiswal, R., Kiprotich, J., Kuhnert, N., 2011. *Phytochemistry* 72, 781.
- Jayaprakasha, G.K., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G.A., Patil B. S., 2010. *J. Agric. Food Chem.* 58, 180.
- Lee, G.T., Duan, C.H., Lee, J.N., Lee, K.S., Hong, J.T., Lee, K.K., 2010. *Nat. Prod. Sci.* 16, 207.
- Lin, R., 1987. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae (Flora of China)* 78, 16.
- Singh, R.P., Pandey, V.B., 1990. *Phytochemistry* 29, 680.
- Singh, R.P., Pandey, V.B., 1994. *Fitoterapia* 65, 374.
- Tene, M., Tane, P., Sondengam, B.L., Connolly, J.D., 2004. *Phytochemistry*. 65, 2101.
- Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., Arora, S., 2010. *Food Chem.* 120, 825.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Hidalgo, O., Vilatersana, R., Garnatje, T., 2006. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93, 150.
- Zdero, C., Bohlmann, F., Niemeier, H.M., 1990. *Phytochemistry* 29, 326.

Discussion générale et Conclusion

Discussion générale

D'ici 2025, plus de 1,65 milliard de personnes seront hypertendues dans le monde, et présenteront donc un facteur de risque majeur de morbi-mortalité cardiovasculaire. Dans ce contexte, l'identification de traitements anti-hypertenseurs efficaces et tenant compte des particularités des différentes populations du globe présente un réel intérêt de santé publique. Notre travail de thèse a permis l'étude de trois plantes médicinales ouïghoures traditionnellement employées pour leurs effets anti-hypertenseurs : *Ziziphora clinopodioides*, *Nitraria sibirica* et *Echinops integrifolius*. Dans l'optique de valoriser la biodiversité végétale de la région du Xinjiang, de valider l'utilisation traditionnelle de ces espèces et d'identifier leurs principes actifs, notre travail s'est articulé autour de deux axes :

- un axe pharmacologique mettant en œuvre des expériences *in vitro* sur vaisseaux isolés et *in vivo* chez le rat anesthésié
- un axe phytochimique permettant l'extraction, l'isolement et la caractérisation des principes actifs.

Nos travaux menés sur *Ziziphora clinopodioides* ont permis démontrer pour la première fois les effets vasodilatateurs d'un extrait chlorométhylénique des parties aériennes de cette espèce. Nous avons pu caractériser les mécanismes impliqués dans cette action et démontrer un effet indépendant de l'endothélium vasculaire, passant principalement par une inhibition des canaux calciques voltage- et récepteur-dépendants ainsi que par une réduction de la libération du calcium intracellulaire. L'étude phytochimique, par le biais d'un fractionnement bioguidé de l'extrait, a permis d'identifier les principaux composants vasoactifs. Ainsi, sept métabolites de nature phénolique ont été caractérisés incluant deux acétophénones (l'apocynine et la 4-hydroxyacétophénone), un dérivé cinnamique (le 4-hydroxycinnamate d'éthyle) et quatre flavones (l'acacétine, l'apigénine, la chrysin et la thymonine). Les effets vasorelaxants de la 4-hydroxyacétophénone, du 4-hydroxycinnamate d'éthyle ainsi que de la thymonine ont été mis en évidence pour la première fois.

Cette étude phytochimique a contribué à mettre en lumière un effet original concernant l'apocynine, composé largement utilisé en pharmacologie expérimentale comme inhibiteur de la NADPH oxydase. En effet, notre travail a montré que l'apocynine exerçait une action vasodilatatrice directe par l'intermédiaire d'un effet endothélium-dépendant relatif à une

Discussion générale et Conclusion

augmentation de la production de NO mais également d'un effet endothélium-indépendant mettant en jeu une modification des conductances calciques et potassiques du muscle lisse vasculaire. De plus, les expériences « *in vivo* » menées sur des rats SHR ont également mis en évidence l'effet hypotensif aigu induit par cette acétophénone.

L'étude menée sur *Nitraria sibirica* a permis de déterminer les propriétés vasoactives d'un extrait hydro-éthanolique des fruits de cette espèce. L'effet relaxant observé est presque exclusivement dépendant de l'endothélium vasculaire. Une augmentation de la libération de NO et d'EDHF, ainsi qu'une stimulation des récepteurs muscariniques ont été caractérisées. Des propriétés hypotensives aiguës ont aussi été mises en évidence chez des rats SHR et WKY. Un fractionnement bioguidé de cet extrait a été parallèlement entrepris. Il a permis l'obtention d'une fraction bioactive dont la composition chimique est actuellement étudiée par nos collaborateurs chinois.

Enfin, en dépit de l'activité vasodilatatrice modeste observée, l'investigation chimique d'un extrait *Echinops integrifolius* a été mise en œuvre. Le fait que cette espèce n'ait, à notre connaissance, jamais été étudiée offrait en effet un intérêt chimiotaxonomique potentiel. Onze métabolites ont été identifiés au cours de ce travail et la présence de coumarines ainsi que de flavones et de flavonols méthoxylés en position 3 et/ou 6 a été rapportée pour la première fois dans le genre *Echinops*. Des composés flavonoïdiques tels que l'apigénine ou la centauréidine (Orallo et al., 1998) ont en effet démontré des propriétés vasorelaxantes permettant d'expliquer, au moins partiellement, l'action vasodilatatrice modérée mais réelle de l'extrait étudié.

L'ensemble de nos résultats apporte des arguments scientifiques soutenant l'usage traditionnel des espèces *Ziziphora clinopodioides* et *Nitraria sibirica* dans des préparations à visée anti-hypertensive. Néanmoins, plusieurs points sont à considérer avant d'envisager une prédictivité clinique de nos données expérimentales.

Discussion générale et Conclusion

Les extraits évalués sont-ils représentatifs des remèdes traditionnels ?

Dans un premier temps, la pertinence des protocoles d'extractions sélectionnés mérite d'être examinée. Certaines dissemblances existent en effet entre la préparation des différents extraits étudiés et celles des remèdes utilisés traditionnellement. Pourtant, la composition chimique d'un extrait, et donc les propriétés pharmacologiques qui en découlent, dépendent étroitement du procédé d'extraction ainsi que du solvant utilisés.

Lors de l'étude menée sur *Ziziphora clinopodioides*, une lixiviation hydro-éthanolique a été effectuée en lieu et place de la décoction traditionnellement réalisée. Le traitement thermique associé à ce mode de préparation a donc été supprimé. Il est pourtant envisageable que celui-ci puisse être responsable de certaines modifications de composition voire d'activité. L'impact d'un traitement thermique similaire sur la teneur en principes vasoactifs et/ou les propriétés vasodilatatrices de l'extrait étudié mériterait ainsi d'être évalué.

Le caractère faiblement hydrosoluble des métabolites vasoactifs caractérisés requiert aussi une attention particulière. L'extraction traditionnelle, uniquement aqueuse, ne semble en effet pas être spécialement adaptée à l'obtention de composés de polarité modérée. Néanmoins, la température élevée de la solution extractive constitue un élément favorable. Il est également nécessaire de préciser que le procédé traditionnel de préparation fait intervenir deux extractions successives (Dr Mouboul Ablise, communication personnelle) qui permettent ainsi un meilleur rendement. Une comparaison des profils HPLC de notre extrait et d'une décoction pourrait néanmoins être envisagée de manière à confirmer la présence de chacun des métabolites vasorelaxants caractérisés au cours de ce travail.

Les actions vasodilatatrices hétérogènes mises en évidence pour deux extraits hydro-éthanoliques d'*Echinops integrifolius* sont probablement la conséquence de variations d'ordre chimique. On remarquera cependant que la préparation des extraits a fait intervenir un traitement thermique conséquent incluant trois heures de chauffage à reflux dans l'eau ainsi qu'une extraction à l'éthanol bouillant. Il n'est pas exclu que l'intégrité chimique de certains constituants vasoactifs en ait été affectée. De plus, un procédé moins drastique aurait pu être privilégié en vue l'étude phytochimique qui a été réalisée par la suite.

Discussion générale et Conclusion

Lors de l'utilisation traditionnelle de l'espèce *Nitraria sibirica*, les fruits constituent la drogue et sont consommés secs. L'objectif de l'extraction était donc d'en obtenir le *totum* chimique. Les données relatives à leur composition, assez restreintes, décrivent néanmoins des métabolites secondaires de natures alcaloïdique et flavonoïdique. Pour ces derniers, l'extraction hydro-éthanolique réalisée semble être pertinente au regard de la polarité des structures décrites (majoritairement hétérosidiques et incluant des anthocyanes). Le choix des solvants n'apparaît cependant pas optimal pour permettre l'extraction de composés alcaloïdiques. Toutefois, il est probable que la réponse négative de l'extrait au réactif de Dragendorff soit représentative d'une teneur alcaloïdique faible au niveau des fruits utilisés pour cette préparation.

On remarquera ainsi que l'importante variabilité chimique des fruits du genre *Nitraria* (Osmanov et al., 1982 ; Li et al., 2007 ; Zheng et al., 2011) ainsi que les actions pharmacologiques discordantes évaluées pour différents extraits d'*Echinops integrifolius* stigmatisent parfaitement le principal défaut des matières premières végétales : une teneur inégale en principes actifs. L'étude d'un extrait unique issu de plantes récoltées à une période et dans un environnement définis pourrait ainsi n'être que partiellement représentative des médications employées. L'évaluation chimique voire pharmacologique d'échantillons multiples, récoltés à des périodes et dans des lieux différents, semblerait, dans l'absolu, nécessaire.

La standardisation d'extraits ou de préparations à base de plantes représente ainsi l'un des principaux objectifs de nos collaborateurs chinois. Un tel procédé constitue en effet un moyen efficace de limiter la variabilité inhérente au matériel d'origine végétale et permet d'envisager une action pharmacologique reproductible et constante. Cependant, cette standardisation ne saurait se soustraire à la mise en évidence d'indicateurs de la qualité thérapeutique des différentes plantes médicinales et donc à l'identification des composés responsables de leurs effets.

La réalisation de fractionnements bioguidés des extraits vasoactifs de *Ziziphora clinopodioides* et de *Nitraria sibirica* a été motivée en partie par une telle perspective. Certaines précisions concernant le protocole expérimental mis en place et les différents résultats obtenus méritent cependant d'être apportées.

Discussion générale et Conclusion

Intérêts et limites du fractionnement bioguidé réalisé.

Si notre modèle d'aortes isolées présente l'avantage d'exclure toute probabilité de faux-positifs, il est tout d'abord important de rappeler que l'emploi d'un tel outil d'évaluation est associé à certaines limites d'ordre méthodologique. En effet, des quantités d'échantillon particulièrement importantes ainsi que des temps d'analyse relativement longs sont requis³. Ces éléments doivent ainsi être pris en considération lors de la mise en place d'un bioguidage et le nombre de fractions à évaluer doit être adapté.

D'un point de vue plus général, il est ensuite nécessaire de constater qu'un extrait végétal constitue un mélange particulièrement complexe. Ainsi, certains effets pharmacologiques peuvent parfois être induits par les actions synergiques de différents composés. En conséquence, le fractionnement d'un extrait peut être responsable d'une altération voire d'une abolition de l'action initiale. On remarquera que, lors de nos études, les différentes séparations et purifications réalisées ont toujours été associées à une augmentation de l'effet observé. Ces données suggèrent ainsi des actions synergiques limitées concernant les propriétés vasodilatatrices directes et aiguës mises en évidence. Cependant, le modèle *in vitro* d'aortes isolées n'intègre pas la totalité des mécanismes régulateurs de la PA. Ainsi, il n'est pas exclu que les propriétés anti-hypertensives des plantes étudiées impliquent des actions pharmacologiques multiples, complémentaires voire synergiques de l'effet vasorelaxant caractérisé. Une telle hypothèse sera notamment développée ultérieurement dans cette discussion.

Enfin, la perspective de caractériser de nouvelles entités chimiques permettant d'élargir l'arsenal thérapeutique anti-hypertensif constitue une motivation supplémentaire à la mise en place de fractionnements bioguidés d'extraits vasorelaxants. Cependant, les actions vasodilatatrices significatives exercées par certains composés largement rencontrés dans le règne végétal sont à prendre en considération. Il est en effet assez fréquent que des métabolites phénoliques de nature flavonoïdique (Sanchez de Rojas et al., 1996 ; Orallo et al., 1998) ou cinnamique (Othman et al., 2002 ; Chen et al., 2009) aient été déterminés responsables des activités vasodilatatrices de plantes antihypertensives. On peut également remarquer que certains triterpènes pentacycliques fréquemment distribués, tels que l'acide

³ En moyenne une centaine de mg et une journée d'analyse par fraction.

Discussion générale et Conclusion

ursolique ou l'acide oléanique, sont vasorelaxants et ont pu être isolés au cours de séparations bioguidées (Aguirre-Crespo et al., 2006).

Même si, dans le cadre de telles études, l'originalité des métabolites mis en évidence peut faire défaut, la très grande diversité de structures vasoactives existante permet pourtant d'envisager la caractérisation de métabolites plus inattendus (Fig. 48). À titre d'exemple, un alcaloïde tricyclique atypique, la cassiarine A (Matsumoto et al., 2010), ainsi qu'une série de composés indoliques originaux, les villocarines (Matsuo et al., 2011) ont récemment démontré d'intéressantes propriétés vasorelaxantes.

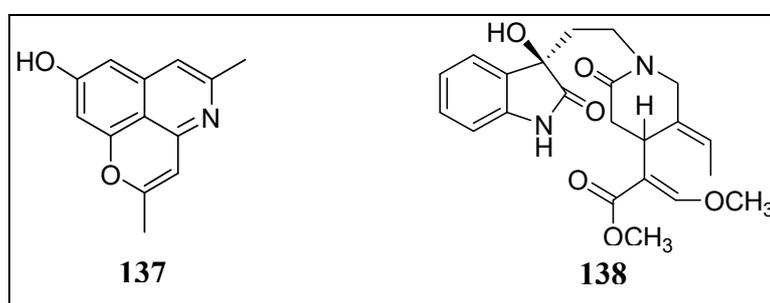


Figure 48. Structures de la cassiarine A (**137**) et de la villocarine B (**138**)

Ainsi, la mise en place de ce type de fractionnements bioguidés pourrait être associée à un screening préalable du profil chimique des extraits étudiés afin de confirmer ou d'infirmer la présence de métabolites communs aux propriétés vasoactives avérées. L'aspect chimiotaxonomique des espèces étudiées semble également devoir être considéré avec attention. On remarquera que, dans notre cas, une latitude restreinte dans la sélection des différentes plantes a réduit nos exigences d'originalité.

Discussion générale et Conclusion

Le choix des modèles expérimentaux utilisés in vitro et in vivo est-il judicieux et adapté ?

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction de cette thèse, les principaux déterminants de la PA sont le débit cardiaque, la volémie et les résistances vasculaires périphériques. En cas d'HTA essentielle, le débit cardiaque et la volémie des patients ont le plus souvent des valeurs normales, du moins lors de la phase chronique de la pathologie. Aussi, l'HTA est principalement sous-tendue par une augmentation des résistances vasculaires périphériques, elle-même conditionnée par une augmentation du tonus vasculaire et un épaissement de la paroi artérielle. Ceci explique pourquoi la plupart des anti-hypertenseurs sont des vasodilatateurs et justifie que la mise en évidence de propriétés vasorelaxantes sur des segments artériels isolés soit considérée comme un élément prédictif d'une efficacité anti-hypertensive. Le modèle d'anneaux aortiques isolés de rat est ainsi un modèle de référence en pharmacologie vasculaire et constitue notamment l'outil majoritairement employé pour l'évaluation des effets vasoactifs d'extraits végétaux.

Il est cependant important de constater que dans nos études, bien que nous intéressant à des plantes anti-hypertensives, nous avons choisi d'utiliser des aortes provenant de rats mâles de type Wistar, c'est-à-dire de souche normotendue. L'intérêt d'un tel choix est de pouvoir étudier strictement les propriétés vasodilatatrices de nos extraits et les mécanismes impliqués, sans que les multiples anomalies vasculaires associées à la maladie hypertensive n'interfèrent avec l'interprétation des résultats. En effet, il est avéré que les anneaux aortiques de rats hypertendus sont caractérisés par une moindre production de NO, une anomalie de la voie des COX et de l'EDHF, une réactivité exagérée aux agents vasoconstricteurs, et une surproduction d'espèce réactives de l'oxygène, entre autres (Kunes et al., 2004). Cependant, l'utilisation d'artères « normales » présente l'inconvénient de probablement sous-estimer l'efficacité de nos extraits en cas d'HTA, en ne permettant pas d'exploiter la totalité des propriétés pharmacologiques de nos extraits.

Un autre inconvénient de ce modèle, qui en limite la prédictivité clinique, est le fait qu'il utilise des segments d'artères de *conductance* (aorte) dont les anomalies du tonus ne sont que faiblement impliquées dans l'élévation de la PA en cas d'HTA. En effet, le terme « résistances vasculaires périphériques » désigne les résistances exercées par les artères de *résistance* principalement représentées par les artères de diamètre inférieur à 300 μm . Les mécanismes gouvernant la motricité des grosses artères sont différents, surtout

Discussion générale et Conclusion

quantitativement, de ceux des vaisseaux de résistances (Zygmunt et al., 1995). Ainsi, il est bien établi que la relaxation endothélium-dépendante aortique est majoritairement NO-dépendante et que la contribution, du moins physiologique, de la voie des COX et de l'EDHF est modeste. En revanche, au niveau des artères de résistance, la contribution de la voie du NO, des dérivés des COX et d'EDHF s'exerce en proportions équivalentes. L'action positive des fruits de *Nitraria sibirica* sur la production de l'EDHF semble particulièrement digne d'intérêt et permet d'émettre à nouveau l'hypothèse d'une sous-estimation de l'efficacité thérapeutique des extraits par notre modèle *in vitro*. Il serait ainsi intéressant de compléter notre travail en étudiant l'impact des extraits sur un modèle d'artères de résistance isolées (artères mésentériques par exemple).

Les propriétés vasorelaxantes de l'extrait de *Nitraria sibirica* ou de l'apocynine sur les artères de résistance ont néanmoins pu être évaluées de façon indirecte par le biais des études réalisées *in vivo*. En effet, les différentes administrations intra-veineuses effectuées ont permis la démonstration d'un effet hypotenseur à court terme, qui reflète – entre autres – la dilatation des artères de résistance. Dans nos études, nous avons utilisé des rats spontanément hypertendus (SHR) qui développent une HTA sévère, et qui constituent la souche de rats mimant le mieux l'HTA essentielle. Nous avons suggéré précédemment que les études de réactivité vasculaire *in vitro* chez des rats normotendus sous-estiment l'efficacité des composés étudiés. Les résultats obtenus montrant que l'extrait de *Nitraria* et l'apocynine ont des effets hypotenseurs plus marqués chez les rats SHR que chez leurs contrôles normotendus tendent à confirmer cette hypothèse.

Néanmoins, ce type d'études réalisant en aigu une injection unique d'un extrait ou d'un composé comporte des limites. Certes, elles permettent d'apporter la confirmation que les effets vasodilatateurs mis en évidence *in vitro* se traduisent effectivement par une réduction de la PA. Cependant, le caractère aigu de ces expériences ne permet pas de prendre en compte les processus physiopathologiques complexes impliqués dans le développement et le maintien de l'HTA. L'effet *hypotenseur* doit ainsi être distingué de l'effet *anti-hypertenseur* recherché en thérapeutique. Aussi, seule une étude pharmacologique à moyen ou long terme, utilisant une administration répétée de l'extrait, idéalement par voie orale, permettra de déterminer si l'extrait prévient l'augmentation de la pression artérielle chez un animal jeune ou s'il réduit le niveau d'HTA chez un animal plus âgé, s'il améliore la fonction

Discussion générale et Conclusion

endothéliale, et s'il réduit les remodelages cardiaques et vasculaires caractéristiques de l'HTA (Packer et al., 1994). De plus, ce type d'investigation permettrait de prendre en compte les processus de résorption et de métabolisation qui n'ont pas été évalués dans nos expériences.

Enfin il est nécessaire de remarquer que les études pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* réalisées durant notre travail ont pu se heurter à un problème méthodologique inhérent à la solubilité des différents extraits et composés évalués. En effet, les études réalisées exigent la préparation de solutions aqueuses. Ainsi, à l'exception de l'extrait hydro-éthanolique des fruits de *Nitraria sibirica*, fortement hydrosoluble, les autres extraits ou composés ont dû être préalablement dissous dans un solvant moins polaire, le DMSO. Dans nos expériences, l'effet propre de ce solvant a été systématiquement étudié, tant *in vitro* qu'*in vivo*, et s'est révélé très faible aux concentrations maximales utilisées. Cependant à plus fortes doses, le DMSO induit une vasorelaxation et un effet hypotenseur. Ainsi, l'action hypotensive de l'extrait chlorométhylénique de *Ziziphora clinopodioides* n'a pas pu être évaluée car les quantités de DMSO auraient été trop importantes. Différents essais de solubilisation de cet extrait avec de l'éthanol ou des tensioactifs tels que le Tween 20 ou le Tween 80 se sont également révélées infructueuses.

Discussion générale et Conclusion

L'efficacité anti-hypertensive des extraits et composés testés met-elle en jeu d'autres effets que les effets vasodilatateurs observés?

Le choix de notre modèle de screening a permis la mise en évidence des propriétés vasodilatatrices directes et aiguës des différents extraits et composés testés. Toutefois, il faut reconnaître que la plupart des activités observées (évaluées par la CE50) peuvent être considérées comme relativement modestes. Aussi, comme évoqué précédemment, il est probable que l'action anti-hypertensive des espèces étudiées fasse intervenir certains mécanismes additionnels.

Tout d'abord, bien que nous n'ayons pu évaluer *in vivo* l'action de *Ziziphora clinopodioides*, il apparaît vraisemblable que l'effet inhibiteur calcique caractérisé au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires soit également effectif au niveau cardiaque. Il pourrait ainsi être associé à des actions inotrope et chronotrope négatives permettant une réduction du débit cardiaque et donc une diminution de PA.

Il est ensuite nécessaire de considérer que les expériences mises en place ne permettent pas d'évaluer l'impact des extraits sur les régulations à moyen et long termes de la PA. Ainsi, des interactions avec le système rénine-angiotensine-aldostérone ou des effets diurétiques ne peuvent être exclus. En faveur d'une telle hypothèse, des actions inhibitrices de l'enzyme de conversion ont été mises en évidence pour certains métabolites identifiés au cours de ce travail. En effet, de nombreuses structures flavonoïdiques incluant des flavonols, des flavones et des anthocyanes sont capables d'inhiber cette enzyme à des concentrations de l'ordre de 10^{-4} M. À titre d'exemple, la CI50 de l'apigénine sur l'enzyme de conversion a été évaluée à 280 μ M (Balasuriya et Rupasinghe, 2011).

Enfin, on rappellera également que nos expériences *in vitro* ont été menées sur des aortes isolées de rats Wistar, normotendus et caractérisés par une faible production d'espèces réactives de l'oxygène. L'intervention du stress oxydant a ainsi été négligeable au cours de nos investigations et les éventuelles propriétés antioxydantes de nos extraits n'ont de ce fait pas pu être mises en valeur. Pourtant, l'implication d'un tel effet dans l'activité anti-hypertensive des espèces étudiées est tout à fait envisageable au regard du rôle important exercé par le stress oxydant dans la physiopathologie de l'HTA (Ceriello, 2008).

Discussion générale et Conclusion

Le stress oxydant ou stress oxydatif se caractérise par une production anormalement élevée d'espèces réactives de l'oxygène, non compensée par les capacités antioxydantes de l'organisme. Les effets délétères d'une telle anomalie peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies dont l'HTA. Au niveau vasculaire, le stress oxydant et plus particulièrement les anions superoxydes produits par la NADPH oxydase seraient notamment impliqués dans le développement et le maintien de la dysfonction endothéliale (Cai et Harrison, 2000). Capables de se combiner au NO, les anions superoxydes contribuent en effet à réduire la disponibilité vasculaire de cet EDRF ainsi qu'à augmenter la production de peroxynitrites (ONOO⁻), composés cytotoxiques.

De nombreuses études ont démontré les effets bénéfiques d'antioxydants d'origine naturelle et plus particulièrement de composés de nature phénolique sur la fonction endothéliale en cas d'HTA (Maccha et Mustafa, 2005 ; Hodgson, 2006 ; Fraga et al., 2011). L'occurrence systématique de tels métabolites dans les espèces que nous avons étudiées suggèrent qu'une diminution du stress oxydant pourrait être impliquée dans l'effet thérapeutique de certaines plantes anti-hypertensives ouïghoures. Ces propriétés pourraient ainsi constituer un élément bénéfique supplémentaire soutenant les actions vasorelaxantes aiguës mises en évidence.

Conclusion

Ce travail de thèse a donc permis d'apporter des arguments scientifiques favorables à l'utilisation anti-hypertensive de *Ziziphora clinopodioides* et de *Nitraria sibirica* en médecine traditionnelle ouïghoure. La mise en lumière de propriétés vasodilatatrices ainsi que la caractérisation des mécanismes impliqués constituent en effet les premiers éléments expérimentaux démontrant les bénéfices cardio-vasculaires de telles plantes. On remarquera que l'identification des composés vasoactifs de *Ziziphora clinopodioides* s'est également inscrite dans une perspective de valorisation industrielle puisqu'un procédé d'extraction des métabolites phénoliques de cette espèce a récemment été breveté par nos collaborateurs chinois (Weijun, 2010).

Concernant l'espèce *Echinops integrifolius*, toute conclusion apparaît délicate au regard des effets hétérogènes caractérisés au niveau vasculaire. Des expériences supplémentaires semblent ainsi nécessaires afin de déterminer avec plus de précision le potentiel vasoactif des plantes de cette espèce. Une action anti-hypertensive indépendante d'effets vasodilatateurs directs ne peut cependant pas être exclue. La réalisation d'une étude phytochimique a néanmoins permis d'obtenir des données chimiotaxonomiques utiles concernant cette espèce et le genre *Echinops*.

Bibliographie

Bibliographie

- ABEGAZ BM, TADESSE M, MAJINDAS R. Distribution of sesquiterpene lactones and polyacetylenic thiophenes in *Echinops*. *Biochemical systematics and ecology*, **1991**, 19, 323-328.
- ADELSTEIN R, CONTI M. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature*, **1975**, 256, 597-598.
- AGHAJANI Z, ASSADIAN F, MASOUDI F, CHALABIAN A, ESMAELI M, TABATABAEI-ANARAKI M, RUSTAIYAN A. Chemical composition and in vitro antibacterial activities of the oil of *Ziziphora clinopodioides* and *Z. capitata* subsp. *capitata* from Iran. *Chemistry of natural compounds*, **2008**, 44, 387-389.
- AGUIRRE-CRESPO F, VERGARA-GALICIA J, VILLALOBOS-MOLINA R, JAVIER LÓPEZ-GUERRERO J, NAVARRETE-VÁZQUEZ G, ESTRADA-SOTO S. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, **2006**, 79, 1062-1068.
- AHN S, ZHAO H, SMITH ML, ORY MG, PHILIPS CD. BMI and lifestyle changes as correlates to changes in self-reported diagnosis of hypertension among older Chinese adults. *Journal of the American Society of Hypertension*, **2011**, 5, 21-30.
- AMIRI H. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Natural Product Research*, **2009**, 23, 601-606.
- ANAES **2000**. Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle. Recommandations cliniques et données économiques.
- ANNUAIRE STATISTIQUE DU XINJIANG (Xinjiang tongji nianjian), Pékin, Zhongguo tongji chubanshe, **2002**, pp. 107-109.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **2009**, 161, 105-121.
- ASTULLA A, ZAIMA K, MATSUNO Y, HIRASAWA Y, EKASARI W, WIDYAWARUYANTI A, ZAINI NC, MORITA H. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *Journal of Natural Medicines*, **2008**, 62, 470-472.
- BALASURIYA BWN, RUPASINGHE HPV. Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease*, **2011**, 5, 172-188.
- BARBOSA-FILHO JM, MARTINS VKM, RABELO LA, MOURA MD, SILVA MS, CUNHA EVL, SOUZA MFV, ALMEIDA RN, MEDEIROS IA. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 – 2000. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2006**, 16, 421-446.
- BHAKUNI RS, SHUKLA YN, THAKUR RS. Alkaloids and lipid constituents of *Echinops niveus*. *Phytochemistry*, **1990**, 29, 2697-2698.
- BEEVERS G, LIP GHY, O'BRIEN E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *British Medical Journal*, **2001**, 322, 912-916
- BELYAEV NF, DEMEUBAEVA AM. Chromatographic study of the composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides*, a vicarious form of *Origanum vulgare*. *Chemistry of Natural Compounds*, **1999**, 35, 52-54.
- BIMURZAEV AA, NIKONOV GK. Phenolic carboxylic acids and iridoids from *Ziziphora bungeana*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, **1988**, 4, 597-598.
- BOHLMANN F, ZDERO C, GRENZ M. Polyacetylene compounds. Part 241. Constituents of some genera of the tribes Helenieae and Senecioneae. *Phytochemistry*, **1976**, 15, 1309-1310.
- BOLTON TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiology Review*, **1979**, 59, 606-718.

Bibliographie

- BUSSE R, EDWARDS G, FÉLÉTOU M, FLEMING I, VANHOUTTE PM, WESTON AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2002**, 23, 374-380.
- CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, **2000**, 87, 840-844.
- CASTETS R. Opposition politique, nationalisme et islam chez les Ouïghours du Xinjiang. [Ressource électronique]. Les Études du CERI n° 110, Octobre 2004.
Disponible sur : www.ceri-sciencespo.com/publica/etude/etude110.pdf (Page consultée le 27 avril 2011).
- CERIELLO A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*, **2008**, Suppl 2, S181-S184.
- CHADWICK CC, SAITO A, FLEISCHER S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1990**, 87, 2132-2136.
- CHAUDHURI PK. Echinoxolinone, an alkaloid from *Echinops echinatus*. *Phytochemistry*, **1987**, 26, 587-589.
- CHAUDHURI PK. 7-hydroxyechinoxolinone, a new alkaloid from the flowers of *Echinops echinatus*. *Journal of Natural Products*, **1992**, 55, 249-250.
- CHEN GP, YE Y, LI L, YANG Y, QIAN AB, HU SJ. Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. *Life Sciences*, **2009**, 84, 81-88.
- CHEVRIER M. The flavonoids of *Echinops ritro*. *Fitoterapia*, **1976**, 47, 115-118.
- COHEN RA, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, **1995**, 92, 3337-3349.
- COLLIN S, LEVY B. Physiopathologie de l'hyporéactivité vasculaire au cours des états de choc. *Réanimation*, **2008**, 17, 101-110.
- CORDELLINI S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *General Pharmacology*, **1999**, 32, 315-320.
- COWLEY AW, LIARD JF, GUYTON AC. Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. *Circulation Research*, **1973**, 32, 564-576.
- DAVIS MJ, WU X, NURKIEWICZ TR, KAWASAKI J, DAVIS GE, HILL MA, MEININGER GA. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, **2001**, 280, 1427-1433.
- DE QUATRO V, CHAN S. Raised plasma-catecholamines in some patients with primary hypertension. *Lancet*, **1972**, 1, 806-809.
- DE WARDENER HE. The primary role of the kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension: part 1. *Clinical Sciences*, **1990**, 79, 193-200.
- DEWICK MP. Medicinal natural products – a biosynthetic approach. 2^{ème} éd. John Wiley & Sons, Chicester, **2002**, 507 p.
- DÖPKE W, FRITSCH G. Echinine, a dihydroquinoline-alkaloid from seeds of *Echinops ritro* L. *Pharmazie*, **1969**, 24, 782.
- DUAN JA, WILLIAMS ID, CHE CT, ZHOU RH, ZHAO SX. Tangutorine, a novel beta-carboline alkaloid from *Nitaria tangutorum*. *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40, 2593-2596.
- DZAU VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*, **1988**, 77, 4-13.

Bibliographie

- DZHUMAGALIEVA FD, KUL'ZHANOV ZK. Effect of *Ziziphora bungeana* extract on heart vessels. *Akademi Nauk Kazakhskoi*, **1968**, 11, 15-19.
- EBRAHIMI SN, HADIAN SN, SONBOLI A. Chemical composition of the essential oil of *Ziziphora capitata* L. from Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **2009**, 12, 678-682.
- FÉLÉTOU M, BUSSE R, EDWARDS G, FLEMING I, WESTON AH, VANHOUTTE PM. Communication between endothelial and smooth muscle cells. *Médecine Sciences*, **2003**, 19, 1242-1250.
- FLORE DE CHINE. Monographie du genre *Echinops* L. 21, 54.
- FLORE DE CHINE. Monographie d' *Echinops integrifolius* Kar. & Kir. 21, 61.
- FLORE DE CHINE. Monographie du genre *Nitraria* Pall. 11, 41.
- FLORE DE CHINE. Monographie de *Nitraria sibirica* Pall. 11, 42.
- FLORE DU PAKISTAN [Ressource électronique]. Monographie de *Ziziphora clinopodioides* Lam. Disponible sur : http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=250090615 (Page consultée le 15 juin 2011).
- FLORE DU PAKISTAN [Ressource électronique]. Monographie du genre *Ziziphora* L. Disponible sur : http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=135332 (Page consultée le 15 juin 2011).
- FOKIALAKIS N, CANTRELL CL, DUKE SO, SKALTSOUNIS AL, WEDGE DE. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 1651-1665.
- FRAGA CG, LITTERIO MC, PRINCE PD, CALABRÓ V, PIOTRKOWSKI B, GALLEANO M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **2011**, 48, 63-67.
- FURUKAWA K, TAWADA Y, SHIGEKAWA M. Regulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **1988**, 15, 263, 8058-8065.
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **1980**, 288, 373-376.
- GALLAGHER P, HERRING B, STULL J. Myosin light chain kinases. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **1997**, 18, 1-16.
- GARAZD MM, GARAZD YL, KHILYA VP. Neoflavones. 1. Natural distribution and spectral and biological properties. *Chemistry of Natural Compounds*, **2003**, 39, 54-121.
- GHAFFARI H, YASA N, MOHAMMADIRAD A, DEHGHAN G, ZAMANI MJ, NIKFAR S, KHORASANI R, MINAIE B, ABDOLLAHI M. Protection by *Ziziphora clinopoides* of acetic acid-induced toxic bowel inflammation through reduction of cellular lipid peroxidation and myeloperoxidase activity. *Human and experimental toxicology*, **2006**, 25, 325-332.
- GHAHHARI J, VAEZI GH, SHARIATIFAR N, ZENDEHDEL KM. The study of hydroalcoholic extract of *Ziziphora tenuior* on visceral pain with writhing test in mice. *Ofogh-e-Danesh Journal*, **2009**, 15, 24-29.
- GIGANTE B, PIRAS O, DE PAOLIS P, PORCELLINI A, NATALE A, VOLPE M. Role of the angiotensin II AT₂-subtype receptors in the blood pressure-lowering effect of losartan in salt-restricted rats. *Journal of Hypertension*, **1998**, 16, 2039-2043.
- GOTH B. Indigenous use of plants in south-eastern Australia. *Telopea*, **2008**, 12, 215-226.
- GRAHAM JG, QUINN ML, FABRICANT DS, FARNSWORTH NR. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 73, 347-377.

Bibliographie

- GRAVEL E, POUPON E. Biosynthesis and biomimetic synthesis of alkaloids isolated from plants of the *Nitraria* and *Myrioneuron* genera: an unusual lysine-based metabolite. *Natural Product Reports*, **2010**, 27, 32-56.
- GRYNBERG A. Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids. *Journal of Human Hypertension*, **2005**, 19, S25-S33.
- GU D, HE J, WU X, DUAN X, WHELTON PK. Effect of potassium supplementation on blood pressure in Chinese: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Hypertension*, **2001**, 19, 1325-1331.
- GU D, REYNOLDS K, WU X, CHEN J, DUAN X, MUNTNER P, HUANG G, REYNOLDS RF, SU S, WHELTON PK, HE J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in china. *Hypertension*, **2002**, 40, 920-927.
- GUYTON A. Textbook of Medical Physiology, 7th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co, **1986**.
- HADJ SALEM J, CHEVALOT I, HARSCOAT-SCHIAVO C, PARIS C, FICK M, HUMEAU C. Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives. *Food Chemistry*, **2011**, 124, 486-494.
- HALIM AF, SAAD HEA, HASHISH NE. Flavonol glycosides from *Nitraria retusa*. *Phytochemistry*, **1995**, 40, 349-351.
- HAMMICHE V, MAIZA K. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**, 105, 358-367.
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ. Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle essentielle. Service des recommandations professionnelles, **2005**.
- HEAD GA. Baroreflexes and cardiovascular regulation in hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **1995**, 26, S7-S16.
- HEGNAUER R. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 2423-2427.
- HILGERS RH, WEBB RC. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Experimental Biology and Medicine*, **2005**, 230, 829-835.
- HILL MA, ZOU H, POTOCHNIK SJ, MEININGER GA, DAVIS MJ. Signal transduction in smooth muscle: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca²⁺ signaling pathways underlying myogenic reactivity. *Journal of Applied Physiology*, **2001**, 91, 973-983.
- HISAYAMA T, TALAYANAGI I, OKAMOTO Y. Ryanodine reveals multiple contractile and relaxant mechanisms in vascular smooth muscle: simultaneous measurements of mechanical activity and of cytoplasmic free Ca²⁺ level with fura-2. *British journal of pharmacology*, **1990**, 100, 677-684.
- HODGSON JM. Effects of tea and tea flavonoids on endothelial function and blood pressure: a brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **2006**, 33, 838-841.
- HUDSON JB, HARRIS L, TEEPLE A, TOWERS GH. The anti-HIV activity of the phytochemical alpha-terthienyl. *Antiviral Research*, **1993**, 20, 33-43.
- HUGHES AD. How do thiazide and thiazide-like diuretics lower blood pressure? *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, **2004**, 5, 155-160.
- HUSSEIN SR, KAWASHTY SA, TANTAWY ME, SALEH NAM. Chemosystematic studies of *Nitraria retusa* and selected taxa of Zygophyllaceae in Egypt. *Plant Systematics and Evolution*, **2009**, 277, 251-264.

Bibliographie

- HYMETE A, IVERSEN TH, ROHLOFF J, ERKO B. Screening of *Echinops ellenbeckii* and *Echinops longisetus* for biological activities and chemical constituents. *Phytomedicine*, **2005**, 12, 675-679.
- HYMETE A, ROHLOFF J, KJØSEN H, IVERSEN TH. Acetylenic thiophenes from the roots of *Echinops ellenbeckii* from Ethiopia. *Natural Product Research*, **2005**, 19, 755-761.
- HYMETE A, ROHLOFF J, IVERSEN TH, KJØSEN H. Volatile constituents of the roots of *Echinops kebericho* Mesfin. *Flavour and Fragrance Journal*, **2007**, 1, 35-38.
- IBARRA M, PÉREZ-VIZCAÍNO F, COGOLLUDO A, DUARTE J, ZARAGOZÁ-ARNÁEZ F, LÓPEZ-LÓPEZ JG, TAMARGO J. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Medica*, **2002**, 68, 307-310.
- IBRAGIMOV AA, MAEKH SK, YUNUSOV SY. The structure of schoberine. *Chemistry of Natural Compounds*, **1976**, 11, 297.
- IBRAGIMOV AA, OSMANOV Z, YAGUDAEV MR, YUNUSOV SY. Alkaloids of *Nitraria sibirica*. Structure of nitrabirine, *Chemistry of Natural Compounds*, **1983**, 19, 202-205.
- IBRAGIMOV AA, YUNUSOV SY. Alkaloids of *Nitraria schoberi*, Structure of nitraraine, *Chemistry of Natural Compounds*, **1986**, 21, 502-509.
- IGNARRO LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **1989**, 3, 31-36.
- ISAMUKHAMEDOVA M, UMAROVA RU, ABUBAKIROV NK. Ursolic acid and beta-sitosterol from *Ziziphora pamiralaica*. *Chemistry of natural compounds*, **1987**, 22, 616.
- JIANG ZJ, ZHANG GJ, WANG JH. Flavonoid constituents from the seeds of *Nitraria Tangutorum* Bobr. *Acta Botanica Sinica*, **1989**, 31, 241-243.
- JIN W, SHI Q, HONG C, CHENG Y, MA Z, QU H. Cytotoxic properties of thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. *Phytomedicine*, **2008**, 15, 768-777.
- JUDD WS, CAMPBELL CS, KELLOGG EA, STEVENS P. Botanique Systématique - Une perspective phylogénétique. 1^{ère} éd. De Boeck Université, Paris, **2002**, 467 p.
- KAGAN J. Naturally occurring di- and trithiophenes. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, **1991**, 56, 87-169.
- KAWABE K, WATANABE TX, SHINO K, SOKABE H. Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneously hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrids. *Japanese Heart Journal*, **1978**, 19, 886-894.
- KAPETANIDIS J, KOKKALOU E. Flavonoids from the aerial parts of *Ziziphora taurica* Marsch Bieb. ssp. *cleonioides* (Boiss.) P.H. Davis (Lamiaceae). *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **1988**, 63, 206-208.
- KEARNEY PM, WHELTON M, REYNOLDS K, MUNTNER P, WHELTON PK, HE J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, **2005**, 365, 217-223.
- KELLNER T. Le Xinjiang et les Ouïgours [Ressource électronique]. Janvier 2002.
Disponible sur : <http://www.diploweb.com/p7kell2.htm> (Page consultée le 27 avril 2011)
- KHOSRAVI AR, MINOUEIANHAGHIGHI MH, SHOKRI H, EMAMI SA, ALAVI SM, ASILI J. The potential inhibitory effect of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essential oils on the growth of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2011**, 42, 216-224.
- KO EA, HAN J, JUNG ID, PARK WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research*, **2008**, 44, 65-81.

Bibliographie

KOIKE K, JIA Z, NIKAIDO T, LIU Y, ZHAO Y, GUO D. Echinothiophene, a novel benzothiophene glycoside from the roots of *Echinops grijissii*. *Organic Letters*, **1999**, 1, 197-198.

KOMORI K, SUZUKI H. Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circulation Research*, **1987**, 61, 586-593.

KOMORI S, KAWAI M, PACAUD P, OHASHI H, BOLTON TB. Oscillations of receptor-operated cationic current and internal calcium in single guinea-pig ileal smooth muscle cells. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, **1993**, 424, 431-438.

KONYALIOGLU S, OZTURK B, MERAL G. Comparison of chemical compositions and antioxidant activities of the essential oils of two *Ziziphora* taxa from anatolia. *Pharmaceutical biology*, **2006**, 44, 121-126.

KUNES J, HOJNA S, KADLECOVA M, DOBESOVA Z, RAUCHOVA H, VOKURKOVA M, LOUKOTOVA J, PECHANOVA O, ZICHA J. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiological Research*, **2004**, 53, Suppl 1, S23-S34.

LAHSISSENE H, KAHOUADJI, TIJANE M, HSEINI S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia*, **2009**, 186, 1-30.

LAM J, CHRISTENSEN LP, THOMASEN T. Thiophene derivatives from *Echinops* species. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 1157-1159.

LAPHAM JW. Tot Mizaj: Four characters in Uyghur traditions of health, medicine, and longevity. Interviewing Hotan county elders in Xinjiang with Beijing Educated Uyghurs. Thèse : Anthropologie : Oregon State University : 2005.

LAWES CM, VANDER HOORN S, RODGERS A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*, **2008**, 371, 1513-1518.

LEE J, CHOI KC, YEUM CH, KIM W, YOO K, PARK JW, YOON PJ. Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in chronic two-kidney, one clip hypertensive rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **1995**, 10, 619-623.

LEE M, LENMAN M, BANAS A, BAFOR M, SINGH S, SCHWEIZER M, NILSSON R, LILJENBERG C, DAHLQVIST A, GUMMESON PO, SJODAHL S, GREEN A, STYMNE S. Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. *Science*, **1998**, 280, 915-918.

LI YQ, ZHANG YN, WANG MZ, ZHENG YJ, WANG ML. Pigment extraction from fruits of *Nitraria sibirica* fruit and its physical and chemical properties. *Journal of Shandong Agricultural University*, **2005**, 1-6.

LI H, ZHANG Y, ZHANG P. The research overview of plants of the genus *Nitraria* L. *Journal of Agricultural Science*, **2006**, 27, 61-64.

LI FQ, LIU JR, WANG LS. Determination on the content of total alkaloids in Uygur medicine *Nitraria*. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*, **2007**, 06, 35.

LI N, YANG XJ, MENG DL, LI X. Isolation and identification of chemical constituents from stem and root of *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, **2009**, 26, 691-693.

LI LB, REN J, CHENG ZM, ZHU HJ. Three new sesquiterpenoids from *Echinops ritro* L. *Helvetica chimica acta*, **2010**, 93, 1344-1349.

LIU YM. Pharmacography of Uighur. Science/Technology and Health Publishing House of Xinjiang (Part II), **1999**, p. 206.

LIU F, MA YT, YANG YN, XIE X, LI XM, HUANG Y, MA X, CHEN BD, GAO X, DU L. Current status of primary hypertension in Xinjiang: an epidemiological study of Han, Uygur and Hazakh populations. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **2010**, 90, 3259-3263.

Bibliographie

- MACHHA A, MUSTAFA MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **2005**, 46, 36-40.
- MACKERRAS C. The Uighur Empire according to the Tang dynastic histories: a study in Sino-Uighur relations. 2e éd, Columbia, University of South Carolina Press, **1973**, 226 p.
- MACLENNAN DH, BRANDL CJ, KORCZAK B, GREEN NM. Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, **1985**, 316, 696-700.
- MARGL L, EISENREICH W, ADAM P, BACHER A, ZENK MH. Biosynthesis of thiophenes in *Tagetes patula*. *Phytochemistry*, **2001**, 58, 875-881.
- MARLES RJ, HUDSON JB, GRAHAM EA, ARNASON JT. Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic tricyclic thiophenes. *Photochemistry and Photobiology*, **1992**, 56, 479-487.
- MAS M. A close look at the endothelium: Its role in the regulation of vasomotor tone. *European Urology Supplement*, **2009**, 8, 48-57.
- MATSUMOTO T, KOBAYASHI T, ISHIDA K, HIRASAWA Y, MORITA H, HONDA T, KAMATA K. Vasodilator effect of Cassiarin A, a novel antiplasmodial alkaloid from *Cassia siamea*, in rat isolated mesenteric artery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2010**, 33, 844-848.
- MCFADZEAN I, GIBSON A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, **2002**, 135, 1-13.
- MCNEILL JR, JURGENS TM. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **2006**, 84, 803-821.
- MEHMOOD R, IMRAN M, MALIK A, TAREEN RB. Ziziphorins A and B. New Flavonoids from *Ziziphora tenuior*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, **2010**, 65, 1397-1400
- MENUT C, LAMATY G, WEYERSTAHL P, MARSCHALL H, SEELMANN I, AMVAM ZOLLO PH. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXI. Tricyclic sesquiterpenes from the root essential oil of *Echinops giganteus* var. *lelyi* C. D. Adams. *Flavour and Fragrance Journal*, **1997**, 1, 415-421.
- MERAL EG, KONYALIOGLU S, OZTURK B. Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides*. *Fitoterapia*, **2002**, 73, 716-718.
- MICHAEL JP. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Product Reports*, **1994**, 11, 63-172.
- MICHAEL JP. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Product Reports*, **2007**, 24, 223-246.
- MICHEL T., FERON O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *Journal of Clinical Investigation*, **1997**, 100, 2146-2152.
- MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, VANE JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **1976**, 263, 663-665.
- MONCADA S, VANE JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacological Reviews*, **1978**, 30, 293-331.
- NAGHIBI F, MOSADDEGH M, MOTAMED SM, GHORBANI A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2005**, 2, 63-79.
- NARUMIYA S, FITZGERALD GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *Journal of Clinical Investigation*, **2001**, 108, 25-30.

Bibliographie

- NASIROV SM, IBRAGIMOV AA, ADRIANOV VG, MAEKH SK, STRUCHKOV YT, YUNUSOV SY. The structure of nitrarine. *Chemistry of Natural Compounds*, **1977**, 12, 294-301.
- NELSON MT, QUAYLE JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology*, **1995**, 268, 799-822.
- NIAZMAND S, DERAKHSHAN M, AHMADPOUR ME, HOSAENI K. The inhibitory effect of *Ziziphora clinopodioides* Lam. on gastric acid output at basal, vagotomized and vagal stimulated conditions in rat. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **2010**, 13, 36-39.
- NIGRO D, FORTES ZB, CARVALHO MH, SCIVOLETTO R. Chronic but not acute treatment with hydralazine reverses the decreased endothelium-dependent responses in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension A*, **1989**, 11, 573-586.
- NISHIZUKA Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **1995**, 9, 484-496.
- NOREL X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. *Science World Journal*, **2007**, 7, 1359-1374.
- OGANESYAN GB, GALSTYAN AM, GACH-BAITS E, MNATSAKANYAN VA. Oleanolic acid and flavonoid glycosides from *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Armysanskii Khimicheskii Zhurnal*, **1990**, 43, 210-211.
- OGANESYAN GB, GALSTYAN AM, MNATSAKANYAN VA, PARONIKYAN RV, TER-ZAKHARYAN YZ. Phenolic and flavonoid compounds of *Ziziphora clinopodioides*. *Chemistry of natural compounds*, **1991**, 27, 247
- ORALLO F, LAMELA M, CAMIÑA M, URIARTE E, CALLEJA JM. Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corcubionensis*. *Planta Medica*, **1998**, 64, 116-119.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (WORLD HEALTH ORGANIZATION). International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *Journal of Hypertension*, **1999**, 17, 151-183.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Promoting the role of traditional medicine in health systems: A strategy for the African region 2001-2010. Harare, World Health Organization, **2000**.
- OSMANOV Z, IBRAGIMOV AA, YUNUSOV SY, NIGMATULLAEV A, TAIZHANOV K. Dynamics of the accumulation of the alkaloids of *Nitraria*. *Chemistry of Natural Compounds*, **1982**, 18, 372.
- OTHMAN R, IBRAHIM H, MOHD MA, AWANG K, GILANI AU, MUSTAFA MR. Vasorelaxant effects of ethyl cinnamate isolated from *Kaempferia galanga* on smooth muscles of the rat aorta. *Planta Medica*, **2002**, 68, 655-657.
- OZTURK YS, AYDIN S, TECIK B, BASER KHC. Effects of essential oils from *Ziziphora* species on swimming performance in mice. *Phytotherapy Research*, **1995**, 9, 225-227.
- OZTURK S, ERCISLI S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. *Food Control*, **2007**, 18, 535-540.
- PACKER CS. Changes in arterial smooth muscle contractility, contractile proteins, and arterial wall structure in spontaneous hypertension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **1994**, 207, 148-174.
- PADASHETTY SA, MISHRA SH. Effect of terpenoidal fraction of *Echinops echinatus* roots on reproductive parameters of male rats. *Journal of Natural Medicines*, **2007**, 61, 452-457.
- PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **1987**, 327, 524-526.

Bibliographie

- PAN B, ZHANG Y. Characteristics and conservation of biodiversity in Xinjiang. *Science in China Series D: Earth Sciences*, **2002**, 45, S174-S179
- PAPADOPOULOU P, COULADIS M, TZAKOU O. Essential Oil Composition of two Greek *Echinops* species: *E. graecus* Miller and *E. ritro* L. *Journal of essential oil research*, **2006**, 18, 242-243.
- PARK WS, HAN J, EARM YE. Physiological role of inward rectifier K(+) channels in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, **2008**, 457, 137-147.
- PFITZER G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *Journal of Applied Physiology*, **2001**, 91, 497-503.
- RAM SN, ROY R, SINGH B, SINGH RP, PANDEY VB. An acylflavone glucoside of *Echinops echinatus* flowers. *Planta Medica*, **1996**, 62, 187.
- RAMADAN FM, UPCHURCH JR, KEAGY BA, JOHNSON G Jr. Endothelial cell thromboxane production and its inhibition by a calcium-channel blocker. *The Annals of Thoracic Surgery*, **1990**, 49, 916-919.
- RECKELHOFF JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, **2001**, 37, 1199-1208.
- REISCH J, GUNAHERATH GMKB. Synthesis of quinazolinones related to the structure proposed for echinozolinone. *Journal of Natural Products*, **1989**, 52, 404.
- REYNAUD J, GUILLET D, TERREUX R, LUSSIGNOL M, WALCHSHOFER N. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Natural Product Reports*, **2005**, 22, 504-515.
- SALEHI P, SONBOLI A, EFTEKHAR F, NEJAD-EBRAHIMI S, YOUSEFZADI M. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH. f. from Iran. *Biological pharmaceutical bulletin*, **2005**, 28, 1892-1896
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ I, LAZKOV GA, HIDALGO O, GARNATJE T. Molecular systematics of *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae): A phylogeny based on ITS and trnL-trnF sequences with emphasis on sectional delimitation. *Taxon*, **2010**, 59, 698-708.
- SANCHEZ DE ROJAS VR, SOMOZA B, ORTEGA T, VILLAR AM. Isolation of vasodilatory active flavonoids from the traditional remedy *Satureja obovata*. *Planta Medica*, **1996**, 62, 272-274.
- SARR M, NGOM S, KANE MO, WELE A, DIOP D, SARR B, GUEYE L, ANDRIANTSITOHAINA R, DIALLO AS. In vitro vasorelaxation mechanisms of bioactive compounds extracted from *Hibiscus sabdariffa* on rat thoracic aorta. *Nutrition and metabolism*, **2009**, 6, 45.
- SCHIFFRIN EL, TOUYZ RM. Vascular biology of endothelin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **1998**, 32, S2-S13.
- SCHROEDER P, LUCKNER M. Physiology of formation of the quinoline alkaloid echinorine in *Echinops ritro*. *Planta Medica*, **1968**, 16, 99-108.
- SENER B. Recent results in the search for bioactive compounds from Turkish medicinal plants. *Pure and Applied Chemistry*, **1994**, 66, 2295-2298.
- SEZIK EG, TUMEN G, BASER KHC. *Ziziphora tenuior* L. a new source of pulegone. *Flavour and Fragrance Journal*, **1991**, 6, 101-104.
- SEZIK E, YESILADA E, SHADIDOYATOV H, KULIVEY Z, NIGMATULLAEV AM, ARIPOV HN, TAKAISHI Y, TAKEDA Y, HONDA G. Folk medicine in Uzbekistan. I. Toshkent, Djizzax, and Samarqand provinces. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 92, 197-207.
- SHAKIROV R, TELEZHENETSKAYA MV, BESSONOVA IA, ARIPOVA SF, ISRAILOV IA, SULTANKHODZHAEV MN, VINOGRADOVA VI, AKHMEDZHANOVA VI, TULYAGANOV TS,

Bibliographie

- SALIMOV BT, TEL'NOV VA. Alkaloids. Plants, structures, properties. *Chemistry of Natural Compounds*, **1996**, 32, 596-676.
- SHALTOUT KH, SHEDED MG, EL-KADY HF, AL-SODANY YM. Phytosociology and size structure of *Nitraria retusa* along the Egyptian Red Sea coast. *Journal of Arid Environments*, **2003**, 53, 331-345.
- SHARMA A, GOEL HC. Some naturally occurring phytophoto-toxins for mosquito control. *Indian Journal of Experimental Biology*, **1994**, 32, 745-751.
- SHARMA KS, MISHRA S, MEHTA BK. Antifertility activity of *Echinops echinatus* in albino rats. *Indian Journal of Medical Sciences*, **1988**, 42, 23-26.
- SHARMA KS, MEHTA BK. Antimicrobial activity of *Echinops echinatus* root extract. *Fitoterapia*, **1989**, 60, 82-83.
- SHEAHAN MC, CHASE MW. A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae R.Br. based on morphological, anatomical and *rbcl* DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **1996**, 122, 279-300.
- SHEN MY, ZUANAZZI JA, KAN C, QUIRION JC, HUSSON HP, BICK IRC. Alkaloids from *Nitraria billardieri*. *Natural Product Letters*, **1995**, 6, 119-125.
- SINGH B, GAMBHIR SS, PANDEY VB, JOSHI VK. Anti-inflammatory activity of *Echinops echinatus*. *Journal of Ethnopharmacology*, **1989**, 25, 189-199.
- SINGH RP, PANDEY VB. Nivetin, a neoflavonoid from *Echinops niveus*. *Phytochemistry*, **1990**, 29, 680-681.
- SINGH B, RAM SN, PANDEY VB, JOSHI VK, GAMBHIR SS. Studies on anti-inflammatory activities of taraxasterol acetate from *Echinops echinatus* in rats and mice. *Phytotherapy Research*, **1991**, 5, 103-106.
- SINGH RP, PANDEY VB. Further flavonoids of *Echinops niveus*. *Fitoterapia*, **1994**, 65, 374.
- SINGH S, UPADHYAY RK, PANDEY MB, SINGH JP, PANDEY VB. Flavonoids from *Echinops echinatus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2006**, 8, 197-200.
- SLEIGHT P. Smoking and hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, **1993**, 15, 1181-1192.
- SOMLYO AP, SOMLYO AV. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1968**, 159, 129-145.
- STÉVENIN C, ECOMARD MA, HUBER D, MARRE M. Hypertension artérielle et diabète. *Diabétologie et facteurs de risque*, **2002**, 8, 194-198.
- STEVENS A, LOWE J. Histologie humaine. 2e éd. Bruxelles; Paris: De Boeck université; **1997**, 408 p.
- STUEHR DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *Journal of Nutrition*, **2004**, 134, S2748-S2751
- SU YF, LUO Y, GUO CY, GUO DA. Two new quinoline glycoalkaloids from *Echinops gmelinii*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2004**, 6, 223-227.
- SUO Y, WANG L. Extraction of *Nitraria tangutorum* seed lipid using different extraction methods and analysis of its fatty acids by HPLC fluorescence detection and on-line MS identification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2010**, 112, 390-399.
- SURKS HK, MOCHIZUKI N, KASAI Y, GEORGESCU SP, TANG KM, ITO M, LINCOLN TM, MENDELSON ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase 1alpha. *Science*, **1999**, 19, 286, 1583-1587.

Bibliographie

- SUSANNA A, GARCIA-JACAS N, HIDALGO O, VILATERSANA R, GARNATJE T. The Cardueae (Compositae) revisited: Insights from ITS, trnL-trnF, and matK nuclear and chloroplast DNA analysis. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **2006**, 93, 150-171.
- SVENSSON J, HAMBERG M. Thromboxane A2 and prostaglandin H2: potent stimulators of the swine coronary artery. *Prostaglandins*, **1976**, 12, 943-950.
- TASHKHODZHAEV B, IBRAGIMOV AA, IBRAGIMOV BT, YUNUSOV SY. Structure of the alkaloid schoberine. *Chemistry of Natural Compounds*, **1989**, 25, 24-28.
- TENE M, TANE P, SONDEGAM BL, CONNOLLY JD. Lignans from the roots of *Echinops giganteus*. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2101-2105.
- TIAN HG, GUO ZY, HU G, YU SJ, SUN W, PIETINEN P, NISSINEN A. Changes in sodium intake and blood pressure in a community-based intervention project in China. *Journal of Human Hypertension*, **1995**, 9, 959-968.
- TIMMIS AD, NATHAN AW. Essential Cardiology. 3e éd. Oxford : Blackwell Science Ltd, **1997**, XI-378 p.
- TROPICOS [Ressource électronique]. *Nitraria sibirica* Pall.
Disponible sur : <http://www.tropicos.org/Name/34600191?tab=synonyms> (Page consultée le 15 juillet 2011)
- TULYAGANOV TS, IBRAGIMOV AA, YUNUSOV SY. Komarovine, komarovidine: Alkaloids of *Nitraria komarovii*. IV. Total synthesis of komarovine and komarovidine. *Chemistry of Natural Compounds*, **1981**, 17, 149-152.
- TULYAGANOV TS, IBRAGIMOV AA, YUNUSOV SY. Alkaloids of *Nitraria komarovii*. VII. Structure and synthesis of komarovinine. *Chemistry of Natural Compounds*, **1983**, 18, 604-606.
- TULYAGANOV TS, YUNUSOV SY. Alkaloids of *Nitraria komarovii*. X. Structures of tetrahydronitramarine, tetrahydrokomarovinine, dihydroisokomarovine, and tetrahydroisokomarovine. *Chemistry of Natural Compounds*, **1990**, 26, 49-53.
- TULYAGANOV TS. Alkaloids of *Nitraria komarovii*. XIII. Nitramine *N*-oxide and the structure of dehydroschoberine. *Chemistry of Natural Compounds*, **1993**, 29, 31-34.
- TULYAGANOV TS, ATADZHANOV RS, ABDULLAEV ND, KRISTALLOV EL, OSMANOV Z. Alkaloids of *Nitraria komarovii*. XV. Vasicinone and deoxyvasicinone *N*-oxides. *Chemistry of Natural Compounds*, **1993**, 29, 509-511.
- TULYAGANOV TS, ALLABERDIEV FK. Alkaloids of *Nitraria sibirica*. dihydroschoberine and nitrabirine *N*-oxide. *Chemistry of Natural Compounds*, **2001**, 37, 556-558.
- TULYAGANOV TS, NAZAROV OM, MAKHMUDOV OE, VDOVIN AD, ABDULLAEV ND. *N*-allylisonitrarine and narcissin from plants of the *Nitraria* genus. *Chemistry of Natural Compounds*, **2001**, 37, 470-473.
- TULYAGANOV TS, ALLABERDIEV FK. Alkaloids of *Nitraria sibirica*. Structures of nitramidine and nitraridine. *Chemistry of Natural Compounds*, **2002**, 38, 602-604.
- TULYAGANOV TS, ALLABERDIEV FK. Alkaloids from plants of the *Nitraria* genus. structure of sibiridine. *Chemistry of Natural Compounds*, **2003**, 39, 292-293.
- TULYAGANOV TS. Alkaloids from *Nitraria komarovii*. Structures of nitraridine, dihydronitraridine, and tetrahydronitraridine. *Chemistry of Natural Compounds*, **2006**, 42, 459-461.
- TULYAGANOV TS, KOZIMOVA NM, ALLABERDIEV FK. Alkaloids from plants of the genus *Nitraria*. *Chemistry of Natural Compounds*, **2006**, 42, 198-200.

Bibliographie

- UPUR H, YUSUP A, UMAR A, MOORE N. Uighur traditional medicine syndrome of abnormal savda in men is associated with oxidative stress, which can be improved by Munziq and Mushil of abnormal Savda. *Thérapie*, **2004**, 59, 483-484.
- ÜSTÜNES L, ÖZER A, LAEKEMAN GM, CORTHOUT J, PIETERS LAC, BAETEN W, HERMAN AG, CLAEYS M, VLIETINCK AJ. Chemical characterization and pharmacological activity of nazlinin, a novel indole alkaloid from *Nitraria schoberi*. *Journal of Natural Products*, **1991**, 54, 959-966.
- VANHOUTTE PM, BOULANGER C. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertension Research*, **1995**, 18, 87-98.
- VANHOUTTE PM. [Endothelial dysfunction and vascular disease]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, **2002**, 1-15.
- VERDIAN-RIVI M. Effect of the essential oil composition and biological activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. on the against *Anopheles Stephensi* and *Culex pipiens Parva* from Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2008**, 15, 185-188.
- WANG Y, LI X, LI LH, MENG DL, LI ZL, LI N. Two new thiophenes from *Echinops latifolius* and their phototoxic activities. *Planta Medica*, **2007**, 73, 696-698.
- WARD R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management* / éd. par JH Laragh et BM Brenner, New York: Raven Press, **1995**.
- WASSEL GM, BAGHDADI HH. The constitution of the wild Egyptian plants *Echinops spinosissimus* Turra. *Herba Hungarica*, **1980**, 19, 7-9.
- WEBB D, VALLANCE P. Endothelial function in hypertension. Others factors in endothelial cell dysfunction in hypertension and diabetes. Ed. Cohen RA Pagano PJ, Springer: NY, **1997**.
- WEBB RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, **2003**, 27, 201-206.
- WEIJUN Y. *Ziziphora clinopodioides* Lam. total flavonoid extract and production method thereof and application thereof in cardiovascular drug. Brevet 101623325. 13-01-2010.
- WHELTON SP, CHIN A, XIN X, HE J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Annals of Internal Medicine*, **2002**, 136, 493-503.
- WOODRUM DA, BROPHY CM. The paradox of smooth muscle physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2001**, 177, 135-143.
- WRIGHT CI, VAN-BUREN L, KRONER CI, KONING MM. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, 114, 1-31.
- WU X, HAYSTEAD TA, NAKAMOTO RK, SOMLYO AV, SOMLYO AP. Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergisms with cyclic nucleotide-activated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**, 273, 11362-11369.
- WU Y, HUXLEY R, LI L, ANNA V, XIE G, YAO C, WOODWARD M, LI X, CHALMERS J, GAO R. Prevalence, Awareness, Treatment and Control of Hypertension in China: Data from the China National Nutrition and Health Survey 2002. *Circulation*, **2008**, 118, 2679-2686.
- XING SL, ZHANG PH, JI QL, JIA HL, WANG XH. Essential oil compositions and antioxidant activities of two *Ziziphora* species in Xinjiang. *Food science*, **2010**, 31, 154-159.
- XUEYU L, MIAO M, DAFANG C. Analysis on the characteristics of botanical species diversity in Xinjiang. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, **1998**, 4, 289-303.
- YADAVA RN, SINGH SK. New anti-inflammatory active flavanone glycoside from the *Echinops echinatus* Roxb. *Indian journal of chemistry*, **2006**, 45b, 1004-1008.

Bibliographie

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K, MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **1988**, 332, 411-415.

YANG J, LI N, MENG DL, LI W, LI X. Isolation and identification of chemical constituents from *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Journal of Shenyang Pharmacy University*, **2008**, 25, 456-458.

ZEHMEISTER L, SEASE JW. A blue-fluorescing compound, terthienyl, isolated from marigold. *Journal of the American Chemical Society*, **1947**, 69, 273.

ZHANG X, MA Z. Characterization of bioactive thiophenes from the dichloromethane extract of *Echinops grijsii* as Michael addition acceptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 397, 1975-1984.

ZHAO KF, FAN H, UNGAR IA. Survey of halophyte species in China. *Plant Science*, **2002**, 163, 491-498.

ZHENG J, LI H, DING CX, SUO YR, WANG LS, WANG HL. Anthocyanins composition and antioxidant activity of two major wild *Nitraria tangutorum* Bobr. variations from Qinghai-Tibet Plateau. *Food Research International*, **2011**, 44, 2041-2046.

ZHOU MS, NISHIDA Y, CHEN QH, KOSAKA H. Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rats. *Hypertension*, **1999**, 34, 39-43.

ZYGMUNT PM, RYMAN T, HÖGESTÄTT ED. Regional differences in endothelium-dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. *Acta Physiologica Scandinavica*, **1995**, 155, 257-266.

Annexes

Annexes

Les tableaux présentés dans cette annexe sont issus d'une revue de McNeill et Jurgens (2006). Les mécanismes des actions vasorelaxantes de différents extraits de plantes ou de composés purifiés sont rapportés. Les contributions de l'endothélium (endo), du monoxyde d'azote (NO), de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP), des produits des cyclo-oxygenases (Eico) ainsi que l'impact sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et sur les conductances potassique (K^+C) ou calcique (CC) ont été particulièrement analysés.

Table 1. Mechanisms by which plant-based natural products evoke vasodilatation.

Plant (common name)	Extract and (or) "purified compound"	Use	Biological preparation	Endo	NO	cGMP	ROS	K ⁺ C	Eico	CC	Reference
<i>Aconitium japonicum</i>	"Mesacominine"	Analgic antirheumatic	Rat gastric arteries	+	-			+	-		Miyamura et al. 2002
<i>Albizia inopinata</i>	Ethanol		Rat BP	+	+						Pires et al. 2000
<i>Allium sativum</i> (garlic)	Aqueous	Antihypertensive antihyperlipidemic	Rat BP	+	+						Zahid Ashraf et al. 2005
<i>Allium fistulosum</i> (Welsh onion)	Aqueous	Antihypertensive antihyperlipidemic	Rat aorta	+	+	+		-			Chen et al. 1999
<i>Allium sativum</i> (garlic)	Aqueous	Antihypertensive antihyperlipidemic	Rat aorta	+	-	+		+			Ashraf et al. 2004
<i>Allium sativum</i> (garlic)	Aqueous/ethanol	Antihypertensive antihyperlipidemic	Rat pulmonary artery	+	+		+				Ku et al. 2002
<i>Allium sativum</i> (garlic)	"Allicin"	Antihypertensive antihyperlipidemic	Rat pulmonary artery	+	+		+				Kim-Park and Ku 2000
<i>Allium sativum</i> (garlic)	Aqueous	Antihypertensive antihyperlipidemic	Rat pulmonary artery	+	+						Kaye et al. 2000
<i>Allium sativum</i> (garlic)	"Allicin"	Antihypertensive antihyperlipidemic	Perfused rat lung		-						Fallon et al. 1998
<i>Allium sativum</i> (garlic)	Garlic powder	Antihypertensive antihyperlipidemic	Rat pulmonary artery	+/-	+						Wang et al. 2001
<i>Alpinia henryi</i>	"Cardamonin"	Carminative	Rat mesenteric artery	+/-	+/-	+/-					Wang et al. 2001
<i>Alseis yucatanensis</i> (wild mamee, cacao-ete)	"Alpinetin"	Antioxidant	Rat aorta	+/-	+/-	+/-					Sligh et al. 2004
<i>Alstonia scholaris</i> (chhatim)	Aqueous		Guinea pig pulmonary artery	+	+				+		Channa et al. 2005
<i>Amni visnaga</i> (khella)	Ethanol	Bronchodilatory	Guinea pig aorta								Rauwald et al. 1994
<i>Anacardium occidentale</i> (cashew)	"Visnadin"		Guinea pig aorta								Runnie et al. 2004
<i>Angelica keiskei</i>	Methanol	Antioxidant	Rat aorta	+	+						Matsuura et al. 2001
<i>Antrodia camphorata</i>	"Xanthoangelol"		Rat aorta	+/-	+/-						Wang et al. 2003
<i>Apium graveolens</i>	Aqueous	Antihypertensive	Rat aorta	+	+	+					Ko et al. 1991a
<i>Apocynum venetum</i> (Luobuma)	"Apigenin"	Antihypertensive	Rat aorta	-	-	-					Kwan et al. 2005
<i>Apocynum venetum</i> (Luobuma)	Ethanol	Antihypertensive	Rat superior mesenteric artery	+	+	+		+			Tagawa et al. 2004
<i>Arbutus unedo</i> L.	Aqueous	Antihypertensive	Perfused rat mesentery	+	+						Ziyyat et al. 2002
<i>Ariemisia scoparia</i> (Yin-Chen)	"Scoparone"	Hypolipidemic	Rat aorta	+	+	+					Huang et al. 1992

Table 1 (continued).

Plant (common name)	Extract and (or) "purified compound"	Use	Biological preparation	Endo	NO	cGMP	ROS	K ⁺ C	Eico	CC	Reference
<i>Artemisia verlotorum</i>	Aqueous		Rat aorta	+	+	+					Calderone et al. 1999
<i>Buxus microphylla</i>	"Cyclo-virobuxine D"	Cardiac insufficiency, angina pectoris	Porcine coronary	+	+						Grossini et al. 1999
<i>Caesalpinia sappan</i>	Aqueous	Antiplatelet aggreg.	Rat aorta	+	+	+					Hu et al. 2003
	"Brazilin"			+	+	+					Xie et al. 2000
<i>Caesalpinia sappan</i>	Methanol	Promote blood circulation	Rat aorta	+	+	+					
	"Brazilin"			+	+	+					
	"Hematoxylin"			+	+	+					
<i>Capsicum frutescens</i> (green chili)	Methanol		Rat aorta	+	+						Abeywardena et al. 2002
<i>Carica papaya</i> (papaya)	Methanol	Antioxidant	Rat aorta	+	+						Rumnie et al. 2004
<i>Carica papaya</i> (papaya)	Methanol	Antioxidant	Rat aorta	+	+						Abeywardena et al. 2002
<i>Chondrodendron papyphyllum</i>	"12-O-methylcurine"	Antipyretic antispasmodic	Rat aorta	-							Guedes et al. 2002
<i>Chondrodendron platyphyllum</i>	"Curine"	Antipyretic, malaria	Rat mesentery	-							Dias et al. 2002
<i>Citrus unshiu</i>	Aqueous	Antioxidant	Diabetic rat aorta	+	+						Kamata et al. 2005
<i>Cordyceps sinensis</i> (Chong-Cao)	Aqueous	Antitumor	Rat aorta	+	+						Chion et al. 2000
<i>Corydalis tubers</i>	"Protopine"		Rat aorta	-							Ko et al. 1992
<i>Crataegus oxyacantha</i> (hawthorn)	"Monoacetyl-vietxin-rhamnoside"	Heart failure	Rabbit femoral artery		+						Schussler et al. 1995
<i>Crataegus oxyacantha</i> (hawthorn)	Ethanol	Heart failure, angina	Rat mesenteric artery	+	+	+					Chen et al. 1998b
<i>Crataegus oxyacantha</i> (hawthorn)	"Procyanidins"	Heart failure, antihypertensive	Rat aorta	+	+	+					Kim et al. 2000
<i>Croton cajicara</i> (sacaca)	"trans-Dihydrocrotonin"	Antihypertensive	Rat BP	+	+						Silva et al. 2005
<i>Croton schiedeanus</i>	"Quercetin 3,7-dimethyl ether"	Antioxidant	Rat aorta	+/-	+/-	+					Guerrero et al. 2002
<i>Cuphea carthagenensis</i>	Ethanol	Antihypertensive	Rat aorta	+/-	+	+					Schuldt et al. 2000
<i>Curcuma longa</i> (turmeric)	Aqueous	Antioxidant antihyperlipidemic	Rat BP								Zahid Ashraf et al. 2005
<i>Cymbopogon citratus</i> (lemongrass)	Methanol	Antioxidant	Rat aorta	+	+						Rumnie et al. 2004
<i>Cymbopogon citratus</i> (lemongrass)	Methanol	Antioxidant	Rat aorta perfused mesentery	+	+						Abeywardena et al. 2002

Table 1 (continued).

Plant (common name)	Extract and (or) "purified compound"	Use	Biological preparation	Endo	NO	eGMP	ROS	K ⁺ C	Eico	CC	Reference
<i>Cynara scolymus</i> (artichoke)	Aqueous	Camminative, lipid lowering	Rat aorta	+	+						Li et al. 2004a
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	"Fraxinellone" "Dictamine" "Floranol"	Antioxidant	Rat aorta Rat mesenteric	+ +/-	+/-		-			+ +	Yu et al. 1992 Rezende et al. 2004
<i>Dioclea grandiflora</i>	"Dioclein"	Kidney stones, prostate gland	Rat aorta	+	+	+					Lemos et al. 1999
<i>Diospyros kaki</i>	Hexane; n-butanol	Antihypertensive	Rat aorta	+	+						Yin et al. 2005
<i>Drymis winteri</i>	"Polygodial"	Antinociceptive	Rabbit corpus cavernosum	+	+	+		+			Andre et al. 2003
<i>Elaeis guineensis</i> (palm fronds)	Methanol	Tonic	Rat aorta	+	+						Abeywardena et al. 2002
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Siberian ginseng)	Aqueous		Dog carotid Rat aorta Rat mesenteric artery	+ + +	+			+			Kwan et al. 2004b
<i>Eucommia ulmoides</i> (Tu-Chung; Du-Zhong)	Aqueous	Antihypertensive	Rat aorta Dog carotid	+ +	+	+		+			Kwan et al. 2003
<i>Eucommia ulmoides</i> (Tu-Chung; Du-Zhong)	Aqueous	Antihypertensive	Rat aorta Rat mesenteric artery (distal)	+ +	+			+			Kwan et al. 2004a
<i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga)	Hydroalcoholic	Antihypertensive, diuretic	Rat aorta	+	+	+					Wazlawik et al. 1997
<i>Evodia rutaecarpa</i> (Wu-Chu-Yu)	"Rutaecarpine"	Antihypertensive	Rat aorta	+	+	+					Chiou et al. 1997
<i>Evodia rutaecarpa</i> (Wu-Chu-Yu)	"Dehydro-evodiamine" "Evodiamine" "Rutaecarpine" "Evodiamine"	Gastrointestinal antihypertensive	Rat aorta	+/- +/- + +/-	+/ +/ + +	+/ +/ + +	- - - -				Chiou et al. 1996
<i>Evodiae Fructus</i> (Wu-Chu-Yu)	"Forsythiaside"	Antihypertensive	Rat mesenteric artery	+/-	+					+	Chiou et al. 1992
<i>Forsythia suspensa</i> (forsythiaside)	Extract (GBE)	Antihypertensive	Rat aorta	+	+					+	Iizuka and Nagai 2005
<i>Ginkgo biloba</i>	"Quercetin" Extract (Egb)	Regional ischemia	Rat aorta	+	+						Kubota et al. 2001
<i>Ginkgo biloba</i>	Methanol	Dementia	Porcine basilar artery	+	+						Chen et al. 1998a
<i>Gynandropsis gynandra</i> (Maman)	Ethanol	Antioxidant	Rat aorta	+	+						Runnie et al. 2004
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Ethanol	Antioxidant, antiinflammatory	Porcine coronary	+	+						Tanner et al. 1999

Table 1 (continued).

Plant (common name)	Extract and (or) "purified compound"	Use	Biological preparation	Endo	NO	eGMP	ROS	K ⁺ C	Eico	CC	Reference
<i>Hypericum perforatum</i> (St. John's wort)	Ethanol	Antidepressive	Perfused cat lung	-	-	-	-	-	-	+	Hoover et al. 2004
<i>Ipomoea batatas</i> (sweet potato)	Methanol	Antioxidant	Rat aorta	+	+	-	-	-	-	-	Runnie et al. 2004
<i>Kaempferia galanga</i>	"Ethyl cinnamate"	Antihypertensive, rheumatism	Rat aorta	+	-	-	+	+	+	+	Othman et al. 2002
<i>Leonurus Artemisia</i> (Yi-Mu-Cao)	"Leonurine"	Myocardial ischemia, dysmenorrhea	Rat aorta, dog carotid artery	-	-	-	-	-	-	+	Chen and Kwan 2001
<i>Ligustrum purpurascens</i>	Ethanol		Rat aorta	-	-	-	-	-	-	+	Wong et al. 2001
<i>Ligustici wallichii</i>	Chloroform extract	Regional ischemia	Rat aorta	+	+	-	-	-	-	-	Rhyu et al. 2004
<i>Ligusticum</i>	"Tetramethyl-pyrazine"	Vascular disorders	Rat aorta	-	-	+	+	-	-	-	Tsai et al. 2002
<i>Ligusticum chuaxiong</i>	"Butylidenephthalide"	Thrombosis, stroke	Dog coronary artery; femoral vein	-	-	-	-	-	-	+	Ko et al. 2002
<i>Ligustium wollichii</i>	"Tetramethyl-pyrazine"	Antihypertensive	Dog saphenous vein	-	-	-	-	-	-	+	Wang et al. 1991
<i>Ligustium wollichii</i>	"Tetramethyl-pyrazine"	Antihypertensive	Dog mesenteric artery	-	-	-	-	-	-	+	Kwan et al. 1990
<i>Listea cubeba</i>	"Lautetamine"		Rat aorta	-	-	-	-	-	-	+	Chen et al. 1994
<i>Magnolia fargesii</i>	"Denedatin B"	Antiplatelet	Rat aorta	-	-	-	-	-	-	+	Yu et al. 1990
<i>Magnolia litiflora</i>	Hexane; ethyl acetate; n-butanol	Antihypertensive	Rat aorta	+	+	-	-	-	-	+	Yin et al. 2005
<i>Malaleuca quinquernervia</i>	"4-Benzoyl-2-C- β -glucopyranosol-3,5-dihydroxy-6-methylphenyl β -D-glucopyranoside"	Sedative, pain relief	Rat aorta	+	+	-	-	-	-	-	Lee et al. 2002b
<i>Mentha x villosa</i>	"Rosesside"	Antihypertensive	Rat BP	+	+	-	-	-	-	-	Lahlou et al. 2002
<i>Mentha x villosa</i> (hortela-da-folha-miúda)	Essential oil	Anesthetic; smooth muscle relaxant	Rat BP	+/-	+/-	-	-	-	-	-	Guedes et al. 2004
<i>Metha arvensis</i> (mint)	Methanol	Cardinative	Rat aorta	+	+	-	-	-	-	-	Runnie et al. 2004
<i>Morinda citrifolia</i> (Noni)	Methanol	Antioxidant	Rat aorta	+	-	-	-	-	-	-	Runnie et al. 2004
<i>Morinda lucida</i>	Aqueous	Malaria diabetes	Rat aorta	+/-	+/-	+	+	-	-	-	Eitarh and Enneka 2004
<i>Ocotea duckei</i>	"Reticuline"		Rat aorta BP	+	+	-	-	-	-	+	Dias et al. 2004

Table 1 (continued).

Plant (common name)	Extract and (or) "purified compound"	Use	Biological preparation	Endo	NO	cGMP	ROS	K ⁺ C	Eico	CC	Reference
<i>Olea europaea</i> (olive oil)	Phenolic		Rat aorta	-	-	-					Benkhalti et al. 2003
<i>Orthosiphon aristatus</i>	"Methyliripariochromene A"	Antihypertensive	Rat aorta	-					+		Matsubara et al. 1999
<i>Ouratea semiserrata</i>	Hydro-ethanolic	Astringent, antiinflammatory	Rat aorta	+	+				-		Cortes et al. 2002
<i>Paeoniae lactiflora</i>	Aqueous	Antiinflammatory	Rat aorta	+	+						Goto et al. 1996
<i>Panax ginseng</i> (ginseng)	"Ginsenosides" Rb1; Rg1	Antihypertensive	Perfused rabbit lung	+	+						Chen 1996
			Rabbit aorta	+	+						
			Rabbit corpus cavernosum	+	+		+				
<i>Panax ginseng</i> (ginseng)	"Ginsenosides"	Antihypertensive	Rat aorta	+	+						Li et al. 2001
<i>Panax ginseng</i> (ginseng)	"Triinolein"	Antihypertensive	Rat aorta	+	+						Hong et al. 1995
<i>Pertilla frutescens</i>	"Perillaldehyde"	Diuretic sedative	Rat aorta	-	-						Takagi et al. 2005
<i>Persea Americana</i> (avocado pear)		Antihypertensive	Rat aorta	+	+				+		Owolabi et al. 2005
<i>Petasites formosanus</i>	"iso-S-petasin"	Asthma cough	Rat aorta	-					+		Wang et al. 2002
<i>Peucedanum japonicum</i>	"(+)-cis-4'-O-acetyl-3'-O-angeloyl-khellactone"	Cold, cough, headache	Rat aorta	+/-	+/-				-		Lee et al. 2002a
<i>Piper betle</i> (betel)	Methanol	Carminative	Rat aorta perfused mesentery	+	+				+		Runnie et al. 2004
<i>Piper methysticum</i> (kava)	"Kavain"	Anxiolytic	Rat aorta	-							Martin et al. 2002
<i>Platycodon spicata</i>	"(+)-Nantenine"	Asthma, diabetes	Rat aorta	-							Orallo and Al-zueta 2001
<i>Platycodon spicata</i>	"Glaucine"		Rat aorta	-					+		Loza et al. 1993
<i>Polygonatum odoratum</i>	Hexane; n-butanol	Antihypertensive	Rat aorta	+	+						Yin et al. 2005
<i>Psittacanthus cabyculanus</i> (mistletoe)	Ethanol	Antihypertensive	Rat aorta	+	+				-		Rodriguez-Cruz et al. 2003
<i>Pueraria lobata</i> (kudzu root)	"Puerarin"	Antioxidant	Rat aorta	-							Dong et al. 2004
<i>Ribes nigrum</i> (black currant)	Aqueous	Antioxidant	Rat aorta	+	+				-		Nakamura et al. 2002
<i>Sabiae miltiorrhiza</i> (Dan-shen)	Aqueous	Antihypertensive	Rat aorta	+	+						Kamata et al. 1993
<i>Sabiae miltiorrhizae</i> (Dan-Shen)	"Des(alpha-carboxy-3,4-dihydroxyphenethyl) lithospermic acid"	Antihypertensive	Rat aorta	-							Nagai et al. 1996
<i>Schizandra chinensis</i>	Aqueous	Antioxidant	Rat aorta	+	+						Lee et al. 2004

Table 1 (continued).

Plant (common name)	Extract and (or) "purified compound"	Use	Biological preparation	Endo	NO	cGMP	ROS	K ⁺ C	Eico	CC	Reference
<i>Selaginella tamariscina</i>	Ethyl acetate: n-butanol	Antihemostatic	Rat aorta	+	+	+		+	-		Yin et al. 2005
<i>Selaginella tamariscina</i>	"Amenoflavone"	Antiinflammatory	Rat aorta	+	+	+					Kang et al. 2004
<i>Sophora flavescens</i>	"Vexibinol"		Rabbit and rat aorta							+	Yamahara et al. 1990
	"Kurarinone"									+	Yin et al. 2005
<i>Sorbus commixta</i>	n-Butanol	Antiatherosclerosis	Rat aorta	+	+						Kwan 2002
<i>Stephania tetrandra</i> (Hanfangji)	"Tetrandrine"	Antihypertensive	Perfused rat mesentery	-						+	Kim et al. 1997
<i>Stephania tetrandra</i> (Hanfangji)	"Tetrandrine"	Antihypertensive	Rat aorta							+	Kim et al. 1997
<i>Stephania tetrandra</i> (Hanfangji)	"Fangchinoline"		Rat aorta							+	Kwan 2002
<i>Stephania tetrandra</i> (Hanfangji)	"Tetrandrine"	Antihypertensive	Perfused rat mesentery							+	Kwan 2002
<i>Theobroma cacao</i> (cocoa)	Oral solution	Antioxidant	Human digital pulse wave amplitude		+						Fisher et al. 2003
<i>Tripterospermum lanceolatum</i>	"Norathyriol"		Rat aorta	-		-				+	Ko et al. 1991b
<i>Tripterospermum taiwanense</i>											
<i>Uncaria</i>	"Hirsutine"	Antihypertensive	Rat aorta	-						+	Yano et al. 1991
<i>Uncaria rhynchophylla</i>	"Rhyncho-phylline"	Antihypertensive	Rat aorta, mesenteric, renal	-						+	Zhang et al. 2004
<i>Uncaria rhynchophylla</i> (Gou-Teng)	"Isorhyncho-phylline"	Antihypertensive	Rat aorta, mesenteric, renal	-						+	Horie et al. 1992
<i>Uncaria rhynchophylla</i> (Gou-Teng)	"Hirsutine"	Antihypertensive	Rat aorta	-						-/+	Yuzurihara et al. 2002
<i>Uncariae ramulus et uncus</i>	"Ceisso-schizine methyl ether"	Antihypertensive	Rat aorta	+/-	+/-						Goto et al. 2000
<i>Uncariae ramulus et uncus</i>	Aqueous	Antihypertensive	Rat aorta	+/-	+	+				+	Testai et al. 2002
<i>Urtica dioica</i>	Aqueous	Antihypertensive	Rat aorta	+	+	+					Fields et al. 2003
<i>Valeriana officinalis</i> (Valerian)	Commercial extract	Sedative	Feline pulmonary bed		-						Tirapelli et al. 2004
<i>Viguiera arenaria</i>	"Pimaradienoic acid"		Rat aorta	+/-	+/-	+/-				+/-	Tenorio et al. 2005
<i>Viscum album</i> (mistletoe)	Aqueous	Antihypertensive	Guinea pig perfused heart		+						Seya et al. 2003
<i>Vitaceae</i>	"Vitisin C"		Rabbit aorta	+	+	+					Schuldt et al. 2005
<i>Vitis labrusca</i> (red wine)	Ethyl acetate	Antioxidant	Perfused rat mesentery		+					+	Berti et al. 2003
<i>Vitis vinifera</i> (grape seeds)	"Procyanidins"	Antioxidant	Human internal mammary	+	+	+					Berti et al. 2003

Table 1 (continued).

Plant (common name)	Extract and (or) "purified compound"	Use	Biological preparation	Endo	NO	cGMP	ROS	K ⁺ C	Eico	CC	Reference
<i>Vitis vinifera</i> L. (grape seeds)	"Procyanidins"	Antioxidant	Human mammary aorta	+	+	+			+		Aldimi et al. 2003
<i>Zingiber officinale</i> (ginger)	Carminative		Rabbit BP								Chayur and Gilani 2005
Plant source not given (grape skins)	Aqueous	Antioxidant	Rabbit aorta	-	-	+				+	Fitzpatrick et al. 1993
	"Quercetin"		Rat aorta	+	+	+					
	"Tannic acid"			+	+	+					
(green tea)	"Epigallocatechin-3-gallate"	Antihypertensive	Rat aorta	+	+	+	+				Lorenz et al. 2004
	"Polyphenols"	Antioxidant	Porcine coronary artery	+	+	+	+				Andriantsitohaina 1999
(red wine, blueberry, grape seed)	"Polyphenols"	Antioxidant	Rat aorta	+	+	+					Andriantsitohaina et al. 1999
	"Leucocyanidin"			+	+	+					
Red wine	"Procyanidins"			+	+	+					
	"Anthocyanin"			+	+	+					
	"Polyphenols"	Antioxidant	Porcine coronary artery	+	+	+	+				Ndiaye et al. 2005
	"Genistein"	Estrogenic properties	Rabbit aorta	-	-	-				+	Li et al. 2004b
	"Genistein"	Estrogenic properties	Rabbit basilar artery	-	-	-				+	Torregrosa et al. 2003
	"Daidzein"			-	-	-				+	
	"Zearalanone"			-	-	-				+	
	"Biochanin A"			-	-	-				+	
	"Genistein"	Estrogenic properties	Porcine coronary artery	-	-	-					Lee and Man 2003
	"Genistein"	Estrogenic properties	Rat pulmonary artery		+	+					Karamsetty et al. 2001
	"Genistein"	Estrogenic properties	Human forearm artery	+	+	+					Walker et al. 2001
	"Genistein"	Estrogenic properties	Rabbit coronary artery	-	-	-				+	Figtree et al. 2000
	"Zearalanone"	Phytoestrogenic properties	Rat mesenteric artery	-	-	-				+	Nevala et al. 1998
	"Daidzein"	Phytoestrogenic properties		-	-	-				+	
	"Polyphenols"	Antioxidant	Porcine coronary artery	-	+	+					Taubert et al. 2002

Note: +, dependency; -, independency; +/-, both dependent and independent component; Endo, endothelium; NO, nitric oxide; cGMP, cyclic guanylate monophosphate; ROS, reactive oxygen species; K⁺C, K⁺ channel function; Eico, eicosanoids; CC, calcium channel function; BP, blood pressure.

Nom du document : THESE françois finale mise en forme DEF 2003.doc
Rpertoire :
Modèle : E:\Documents and Settings\pharmacognosie\Application
Data\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Titre : I
Sujet :
Auteur : fsenejou
Mots clés :
Commentaires :
Date de création : 08/12/2011 14:28:00
N de révision : 1
Dernier enregistr. le : 08/12/2011 14:52:00
Dernier enregistrement par : pharmacognosie
Temps total d'édition :22 Minutes
Dernière impression sur : 08/12/2011 15:30:00
Tel qu'à la dernière impression
Nombre de pages : 203
Nombre de mots : 36 529 (approx.)
Nombre de caractères : 200 910 (approx.)