

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Chapitre I: CONTEXTE DU PROJET	
I.2. COLLABORATION ICSN/IMRA	3
I.3. LE LABORATOIRE DE BIOTHERAPEUTIQUE	3
I.4. LES PLANTES AROMATIQUES DE MADAGASCAR.....	4
I.4.1. Répartition des plantes aromatiques par type biologique et par habitat	4
I.4.2. Origines des plantes introduites.....	5
I.4.3. Répartition par famille.....	5
Chapitre II: GENERALITES SU L'EPILEPSIE	
II.1. DEFINITION	12
II.2. EPIDEMIOLOGIE.....	12
II.3. CLASSIFICATION	13
II.3.1. Classification internationale	13
II.3.1.1. Crises généralisées	13
II.3.1.2. Crises partielles	14
II.3.1.3. Crises inclassables.....	16
II.4. DIAGNOSTIC POSITIF DES CRISES EPILEPTIQUES	16
II.5. ETIOLOGIE DES EPILEPSIES	17
II.5.1. Les causes vasculaires	17
II.5.2. Les causes métaboliques	18
II.5.3. Les causes toxiques	18
II.5.4. Les causes tumorales	18
II.5.5. Les causes traumatiques	18
II.5.6. Les causes infectieuses.....	19
II.6. TRAITEMENTS DES EPILEPSIES	20

II.7. CROYANCES MALGACHES SUR LES EPILEPSIES ET LEURS TRAITEMENTS TRADITIONNELS	31
II.8. METHODES D' ETUDES DES ANTICONVULSIVANTS	31
II.8.1. La méthode in vivo.....	31
II.8.1.1. L' électrochoc	32
II.8.1.2. Les produits chimiques.....	32
Chapitre III: GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES	
III.1. DEFINITION.....	36
III.2. EXTRACTION DES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILES (COVs).....	36
III.2.1. Microextraction en phase solides (SPME).....	36
III.2.1.1. Base physico-chimique de la SPME	37
<i>a-Propriété</i>	37
<i>b-Principe et fonctionnement de la SPME</i>	38
<i>c -Conditions de l' analyse SPME</i>	38
<i>d- Choix de revêtement de la fibre</i>	38
<i>e-Choix du mode d' extraction</i>	39
III.3. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES	40
III.4. COMPOSITIONS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES	44
III.4.1. Les constituants des huiles essentielles.....	44
III.4.2. Composition chimique et variabilité.....	47
III.4.3. Aromathérapie.....	48
III.1.3.4. Caractéristiques économiques.....	48
Chapitre IV: MATERIELS ET METHODES	
IV.1. TRAVAUX ETHNOBOTANQUES SUR TERRAIN	50
IV.1.1. Enquêtes ethnobotaniques	50
IV.1.2. Collecte de <i>Myrothamnus moschatus</i>	50
IV.2. TRAVAUX AUX LABORATOIRES.....	52

IV.2.1. Description botanique	52
IV.2.2. Etude phytochimique	54
IV.2.2.1. Extraction de l' huile essentielle	54
IV.2.2.2.Extraction de l'hydrolat.....	55
IV.2.2.3. CPG de l' huile essentielle	56
IV.2.2.4. CPG-FID.....	56
IV.2.2.5. Analyse SPME de la fumée et des feuilles de <i>Myrothamnus moschatus</i>	59
a- Broyage de l' échantillon	59
b- Analyse de la « fumée active »	60
b-1- Analyse de la « fumée active » à la température ambiante	60
. b-2- Analyse de la « fumée active » à 37° C	62
c- Analyse des feuilles	63
d- Analyse de la fumée passive.....	65
IV.2.3 Etude pharmacologique	66
IV.2.3.1. Animaux de laboratoires.....	66
IV.2.3.2. Protocoles expérimentaux.....	67
a-Test in vivo :	67
a-1- Test de l' HE de <i>Myrothamnus moschatus</i> sur la convulsion induite par la Pentylenetétrazole.....	67
a-2- Test de l' HE sur la convulsion induite par la Picrotoxine	68
a-3- Evaluation de l' activité sédatrice de l' HE du <i>Myrothamnus moscatus</i>	68
a-3-1-Introduction	68
a-3-2-Matériels et méthodes	69
a-3-2-1-Test de la traction :	69
a-3-2-2-Test de la planche à trous :	70
a-3-2-3-Test de la cheminée.....	71
b-Tests in vitro :	73

b-1-Test de fixation au récepteur GABAA-benzodiazépines	73
b-1-1-Produit testé :	73
b-1-2-Les réactifs :	73
b-1-3-Préparation du tissu :	73
b-1-4-Protocole expérimental :	73
b-1-5-Evaluation :	74
b-2- Test de HE sur les cellules nerveuses humaines type SH-SY5Y.....	74
IV.2.3.3. Analyse des résultats.....	75
Chapitre V: RESULTATS OBTENUS	
V.1. ETHNOBOTANQUES :	76
V.3. EXTRACTION DE L' HUILE ESSENTIELLE DE <i>MYROTHAMNUS moschatus</i> D' IFANDANA.....	79
V.3.1 Composition d' huile essentielle	79
V.3.2. La variabilité chimique des composés volatiles en fonction de l' origine géographique.....	82
V.4. RESULTATS PHARMACOLOGIQUES	92
V.4.1. Effet de l' HE de Myrothamnus sur la convulsion induite par la Pentylènetétrazole.	92
V.4.2. Effet de l' HE sur la convulsion induite par la Picrotoxine.....	95
V.4.3. Evaluation de l' activité sédatrice.....	96
V.4.3.1 Test de traction.....	96
V.4.3.2. Test de la cheminée.....	96
V.4.3.3 Test de la planche à trous.....	96
V.4.4. Test de fixation au récepteur GABA _A -benzodiazépines.	98
V.4.5. Effet de l' HE sur les cellules nerveuses SHSY5Y.	98
Chapitre VI: DISCUSSION	100
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE REFERENCES	108

WEBOGRAPHIES	110
--------------------	-----

BIBLIOGRAPHIES.....	110
---------------------	-----

ANNEXES

Publications relatives à ce travail

Phytomédicament

Liste des publications et brevets

Publications:

1- **Randrianarivo Emmanuel**, Filippo Maggi, Marcello Nicoletti, Philippe Rasoanaivo.

Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Myrothamnus moschatus* in convulsion induced by pentylenetetrazole and picrotoxin

Asian Pac J Trop Biomed 2016; 6(6):

2- Rakotosaona R, Nicoletti M, Papa F, **Randrianarivo E**, Rasoanaivo P, Maggi F.

Chemical composition of the essential oil of *Kaliphora madagascariensis* Hook. f.

Nat Prod Res. 2015 Sep 11:1-7

3- **Randrianarivo E**, Ralaibia Erménégilde, Rakotosaona R, Rasoanaivo P.

Essential oils of *Myrothamnus moschatus* for the prevention and/or adjunct/alternative treatments of convulsions and migraines.

Bulletin de l'Académie Malgache, XCV/1, 2015.

4- Fatiany Pierre Ruphin, Robijaona Baholy, **Randrianarivo Emmanuel**, Raharisololalao Amelie, Marie-Therese Martin.

Isolation and structural elucidation of cytotoxic compounds from the root bark of *Diospyros quercina* (Baill.) endemic to Madagascar.

Asian Pac J Trop Biomed 2014; 4(3): 169-175.

5- **Randrianarivo E**, Rasoanaivo P, Nicoletti M, Razafimahefa S, Lefebvre M, Papa F, Vittori S, Maggi F.

Essential-oil polymorphism in the 'resurrection plant' *Myrothamnus moschatus* and associated ethnobotanical knowledge.

Chem Biodivers. 2013 Nov;10(11):1987-98.

6- Fatiany Pierre Ruphin, Robijaona Baholy, **Randrianarivo Emmanuel**, Raharisololalao Amelie, Marie-Therese, Koto-te-Nyiwa Ngbolua .

Antiplasmodial, cytotoxic activities and characterization of a new naturally occurring quinone methide pentacyclic triterpenoid derivative isolated from *Salacia leptoclada* Tul. (Celastraceae) originated from Madagascar.

Asian Pac J Trop Biomed. 2013 Oct;3(10):780-4

7- **Randrianarivo E.**, Ralaibia B., Rasoanaivo P., Ratsimamanga S. (2009).

Mise en évidence de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux d'une plante malgache de la famille des *Fabaceae*.

(*Actes du symposium BIOMAD à Madagascar VO.9. pdf ; page 26*)

8- V. Ramanandraibe, H. Andriamanantoanina, A. Longeon., M. Ratsimbason., **E. Randrianarivo.**, M.-L. Bourguet-Kondracki.

Alkaloids from the Malagasy sponge *Stylissa carteri*.

Poster N° 25, XIème Symposium ICSN, Chimie et Produits Naturels, 7-8 Juin 2007, Gif-sur-Yvette, France

9- N. Rabeson, **E. Randrianarivo**, N. Ralaïarimanana, O. Rakotoson, A. Randrianantsoa (2005)

Etudes des effets d'extraits de *Clidemia hirta* et *Stenochlaena tenuifolia* sur l'ulcère expérimental chez la souris.

Ethnopharmacologia, 36, 61- 67.

10- **Randrianarivo E.**

Etude in vivo de l'activité antiulcéreuse de *Olex humbertii*.

Mémoire de DEA présentée le 14 Janvier 2004, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

11- A. Randrianantsoa, I .R. Ramonta, H. Rabarison, R.H. Ramananjanahary, O. Rakotoarison, J.N. Ralaïarimanana, **E. Randrianarivo.** (2003)

Etude ethnobotanique et thnopharmacologique de plantes médicinales de la région Nord-Ouest de Madagascar (Cas d'Ankarafantsika et Antrema/Katsepy).

Bulletin de l'Académie Nationale des Arts et des Sciences, 82/1-2, 483-489

Brevet:

1- RASOANAIVO Philippe, RAZAFIMAHEFA Andriantiaray Solofoniaina, **RANDRIANARIVO Emmanüel** (2014)

Composition pharmaceutique comprenant l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus* pour la prévention et les traitements des désordres du cerveau.

OMAPI N° MG/B/2012/OOOO36

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Représentation schématique des mécanismes d’actions des anti-épileptiques de seconde génération.....	31
Figure 02: Dispositif SPME.....	38
Figure 03 : Exemples des monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques	46
Figure 04 : Les principaux esquiterpène.....	47
Figure 05 : Quelques composés aromatiques.....	48
Figure 06 : Collecte <i>Myrothamnus moschatus</i>	51
Figure 07 : a) <i>Myrothamnus moschatus</i> pendant la saison humide	52
Figure 07 : b) Sites de collecte <i>Myrothamnus moschatus</i>	52
Figure 08 : <i>Myrothamnus moschatus</i>	54
Figure 09 : <i>Myrothamnus moschatus</i> collecté en Janvier 2010.....	55
Figure 10 : Extraction des HE de <i>Myrothamnus moschatus</i>	56
Figure 11: Extraction des hydrolats de <i>Myrothamnus moschatus</i>	56
Figure 12: HS-GC-FID Agilent 4890 utilisé pour l’analyse des composés volatils	59
Figure 13 : Broyage des feuilles de <i>M. moschatus</i> à l’aide d’un broyeur de marque MF DCFH48 IKA-WERK	60
Figure 14 : Appareil de combustion	62
Figure 15: Appareil de combustion avec une plaque chauffante	64
Figure 16 : Appareil pour l’analyse SPME des feuilles	65
Figure 17: Appareil pour l’analyse SPME des feuilles avec plaque de chauffage	66
Figure 18: a) Dispositif pour l’analyse SPME de la fumée passive	67
Figure 18 : b) Capsule pour la mise en combustion de l’échantillon.....	67
Figure 19 : Test de la traction	71
Figure 20 : Test de la planche à trous.....	72
Figure 21 : Test de la cheminée	73
Figure 22 : Les différentes régions écologiques de <i>Myrothamnus moschatus</i> à Madagascar	77

Figure 23 : Le chromatogramme GC/FID de l'huile essentielle extraite de <i>Myrothamnus moschatus</i> d'Ifandàna en Janvier 2010.....	82
Figure 24 : PCA des composés volatils des 5 différentes populations de <i>Myrothamnus moschatus</i>	85
Figure 25 : Chromatogramme des composés volatiles extraits de l'hydrolat de <i>Myrothamnus</i> collecté à Ambohiboroana	91
Figure 26 : Analyse de l'espace de tête de l'HE et des feuilles sèches de <i>M. moschatus</i> à 40°C, 80°C et 120°C	91
Figure 27 : Chromatogramme SPME-GC-FID	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Répartition par famille des plantes aromatiques de Madagascar.....	7
Tableau 02 : Classification internationale des crises épileptiques.....	14
Tableau 03 : Les différents types de fibres disponibles.....	39
Tableau 04 : : Les principales vertus médicinales de quelques HE endémiques de Madagascar..	42
Tableau 05 : : Détermination de la chromatographie CPG/FID, le facteur de rétention.....	57
Tableau 06 : Les informations sur les noms vernaculaires et les utilisations traditionnelles de <i>Myrothamnus moschatus</i> collecté dans 5 sites.....	78
Tableau 07 : Composition des huiles essentielles à partir des parties aériennes de <i>Myrothamnus moschatus</i>	80
Tableau 08 : Compositions chimiques de l'huile essentielle des 5 stations explorées de <i>Myrothamnus moschatus</i>	85
Tableau 09 : Pourcentage comparatif des constituants principaux de l'HE, des feuilles sèches et les fumées actives par analyse SPME	91
Tableau 10 : Effet de l'administration sous-cutanée de l'HE de <i>Myrothamnus moschatus</i> sur les paramètres mesurés de la convulsion induite par la Pentylènetétrazole	94
Tableau 11 : Effet de l'administration sous-cutanée de l'HE de <i>Myrothamnus moschatus</i> sur les paramètres mesurés de la convulsion chez les souris induite par la Picrotoxine.....	95
Tableau 12 : Activité sédatrice de l'HE de <i>Myrothamnus moschatus</i>	97

LISTE DES ABBREVIATIONS

AVC	: Accident vasculaire cérébrale
BDZ	: Benzodiazépine
CAR	: Carboxen
CBZ	: Carbamazépine
CNRS	: Centre Nationale de Recherches Scientifiques
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM	: Chromatographie en phase gazeuse liée à la masse
CSE	: classification syndromique des épilepsies
CW	: Carbowax
DE50	: Dose efficace 50
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DVB	: Divinylbenzène
EEG	: Electroencephalogramme
EPEPO	: Epilepsie partielle de l'enfant à paroxysmes occipitaux
EPI	: Epilepsies partielles idiopathiques
ETH	: Ethosuximide
FBM	: Felbamate
FID	: Flame Ionization Detector
FOS	: Fosphénytoïne
GABA	: Gamma amino butyric acid
GBP	: gabapentine
GVG	: gamma-vinyl-GABA
HE	: Huile Essentielle

HPLC	: Chromatographie en Phase Liquide à haute Performance
HS	: Headspace
ICSN	: Institut de Chimie des Substances Naturelles
IMRA	: Institut Malgache de Recherches Appliquées
IP	: Intrapéritonéal
IV	: Intraveineuse
LTG	: Lamotrigine
OMS	: Organisation Mondiale de la Sante
PA	: Polyacrylate
PB	: Phénobarbital
PCA	: Principal-component analysis
PDMS	: Polydimethylsiloxane
PRM	: Primidone
PSN-P	: Pôle Substances Naturelles-Plantes
PTH	: Phénytoïne
PTX	: Picrotoxine
PTZ	: Penthylène tétrazole
RCCV	: Rétrécissements concentriques du champ visuel
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
SNC	: Système Nerveux Central
SPME	: Micro-extraction en phase solide
TGB	: Tiagabine
TPM	: Topiramate
TPR	: Template resin
VOCs	: Composés Organiques Volatiles

VPA : Valproate de sodium

INTRODUCTION

Le système nerveux et le cerveau sont des structures biologiques complexes qui en font des structures très étudiées. Ce sont ces structures qui commandent en partie l'ensemble du corps humain. En effet ces systèmes coordonnent les mouvements musculaires, contrôlent le fonctionnement des organes, véhiculent les informations sensorielles et motrices vers les effecteurs et régulent les émotions. Cependant, ces structures se dérèglent parfois, provoquant de nombreuses pathologies du système nerveux. Parmi ces troubles graves du cerveau, la plus fréquente est l'épilepsie (Elger et al., 2008). L'épilepsie et la convulsion sont des troubles neurologiques chroniques les plus courantes affectant respectivement 5 à 10 et 15 à 30 sur 1000 des personnes. Elles ont un lourd impact socio-économique en termes de perte de productivité et constituent un fardeau pour les systèmes de soins de Santé. Près de 80% des personnes atteintes de ces maladies se trouvent dans les pays en développement où ils restent un problème majeur de santé publique, non seulement en raison de leurs répercussions sur la santé, mais aussi pour leur développement social, culturel, psychologique, et les conséquences économiques (Newton et al., 2012). La prévalence de l'épilepsie en Afrique sub-saharienne est plus élevée que dans d'autres parties du monde, avec 10 millions de personnes affectées directement selon les estimations de l'OMS (OMS-AFRO, 2004).

Cependant, les estimations varient sensiblement pour des raisons inconnues (Ngoungou et al., 2006). Les patients sont de tout âge, mais la maladie affecte surtout les enfants et les adolescents (Berg et al., 2013). Sur les hautes terres centrales de Madagascar, une étude épidémiologique sur l'épilepsie a démontré que la prévalence de la maladie était estimée à 27 ‰ (Andriantseho et al., 2004). En plus de l'environnement et les facteurs génétiques, les séquelles des infections du système nerveux central en particulier le neuropaludisme et la neurocysticercose sont les principales causes de crises d'épilepsie acquises en Afrique subsaharienne (Carter et al., 2004 ; Quet et al., 2009).

Un problème grave dans les pays à faible revenu est la faible disponibilité et le coût élevé des médicaments. Le déficit de traitement de l'épilepsie et des crises convulsives est définie comme la proportion de personnes qui ont besoin mais ne reçoivent pas de traitement adéquat (Meinardi et al., 2001). Ce déficit est d'environ de 75% dans les pays à faible revenu et atteint jusqu'à 90% dans les pays les plus pauvres en Afrique, situation tout à fait alarmante.

A Madagascar, cette insuffisance de traitement a été estimée à 92 %. Toutefois, compte tenu des conditions sociologiques, économiques et sanitaires du pays, il a été démontré que la véritable défaillance de traitement est encore plus élevée que cette estimation (Ratsimbazafy et al., 2011). En outre, en raison des coûts élevés des médicaments conventionnels qui doivent être pris tous les jours, ou à cause de l'attachement aux traditions culturelles, les plantes médicinales sont également utilisées. À cette fin, les populations locales malgaches utilisent la fumée de *Myrothamnus moschatus* afin d'expulser les mauvais esprits qui entrent dans le corps et sont considérés comme responsable des convulsions. Il est donc nécessaire ² et urgent d'étudier et de confirmer scientifiquement l'activité anticonvulsivante de cette plante endémique de Madagascar pour développer un nouveau médicament antiépileptique et anticonvulsivant à prix abordable et accessible.

Cette étude comportera six chapitres :

- le premier décrit l'introduction et le contexte du projet.
- le deuxième chapitre est consacré aux généralités sur l'épilepsie.
- le troisième chapitre rapporte les généralités sur les huiles essentielles utilisées en thérapeutique.
- le quatrième chapitre développe les matériels et méthodes.
- le cinquième chapitre présente les résultats obtenus.
- le sixième chapitre traite la discussion
- Et enfin, une conclusion avec les perspectives et les Références bibliographiques termine notre dissertation.

Objectif général

Etudier les activités biologiques et la variation écologique des constituants chimiques de l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus*.

Objectifs spécifiques

1. Evaluer l'activité anticonvulsivante et neuroblastique de l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus*.
2. Caractériser les principaux constituants chimiques de l'huile essentielle présents dans *Myrothamnus moschatus*.
3. Etudier le polymorphisme de l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus* dans différentes zones écologiques et l'activité anticonvulsivante de la plante récoltée dans chaque station.

Chapitre I : CONTEXTE DU PROJET

I.1. COLLABORATION ICSN/IMRA

Un accord de coopération entre l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles) et l'IMRA (Institut Malgache de Recherches Appliquées) a été signé en 2009. Le responsable pour la partie malgache était le feu Philippe Rasoanaivo, l'ancien Directeur de Recherche à l'IMRA, Chef du Laboratoire de Biothérapeutique de l'Institut et Professeur à l'Ecole Supérieure Polytechnique de l'Université d'Antananarivo. Du côté ICSN, les responsables de la collaboration étaient Dr Vincent Dumontet et Dr Françoise Guéritte.

Les deux parties s'attachent, dans le cadre de cette collaboration à découvrir de nouvelles molécules biologiquement actives à partir des plantes supérieures de la biodiversité tropicale de Madagascar et d'autre part, à renforcer les capacités du partenaire Sud en termes d'infrastructure et de formation

I.2. LE LABORATOIRE DE BIOTHERAPEUTIQUE

Le laboratoire de Biothérapeutique est l'un des Laboratoires de Recherches de l'IMRA qui a été sous la direction du regretté Professeur Philippe Rasoanaivo. Il travaille sur deux axes de recherche à savoir :

- le malaria : chimiothérapie, immunité protectrice,
- les maladies affectant le cerveau : épilepsie, trouble de mémoire, dysfonctionnement érectile au niveau du cerveau.

C'est dans le cadre du programme de recherche sur les maladies neuro-dégénératives que le Directeur du Laboratoire nous a confié l'étude de l'activité sur la convulsion et les neurones d'une plante aromatique endémique de Madagascar qui est *Myrothamnus moschatus* (MYROTHAMNACEAE).

I.3. LES PLANTES AROMATIQUES DE MADAGASCAR

Les premières évaluations des végétaux aromatiques au sein des flores autochtones et introduites sont présentées dans quelques publications de base (GATTEFOSSE, 1921; PERRIER DE LA BATHIE, 1923; DECARY, 1955). Ces auteurs ont mentionné les propriétés d'une soixantaine d'espèces qui nécessitent des études particulières pour valoriser leurs huiles essentielles.

Ensuite en 1996, Lala Henriette RAKOTOVAO et Emile RANDRIANJOHANY avaient recensé 110 espèces comprenant 58 espèces autochtones dont 86 % sont endémiques, et 52 espèces introduites. Elles sont réparties par type biologique et par habitat, selon leurs origines et enfin, en fonction de famille.

I.3.1. Répartition des plantes aromatiques par type biologique et par habitat

Malgré la même représentativité des principaux domaines (Est, Sambirano, Centre et Ouest) concernant le nombre des espèces aromatiques, la répartition de ces plantes en fonction de type biologique et de type d'habitat présente des différences notables ;

- les espèces ligneuses (arbres, arbustes, ou arbrisseaux) sont prédominantes dans les domaines oriental (75%), occidental (60%) et du Sambirano (57%) mais dans le domaine du centre ce sont plutôt les espèces herbacées qui sont les plus nombreuses.
- le nombre élevé d'espèces aromatiques introduites, herbacées ou ligneuses, est remarquable dans tous les domaines (sauf dans celui du Sud) : Centre (68 %), Est (75%), Ouest (50%) et Sambirano (90 %).

Du point de vue habitat naturel (forêt primaire ou formations secondaires tels que les recrûs forestiers, les savanes, ou les pseudo-steppes), la répartition des 58 espèces aromatiques autochtones est caractérisée par :

- dans le domaine oriental, 76% des espèces autochtones (16 sur 20), appartiennent aux forêts denses ombrophiles de basse altitude, situées entre 0 et 800 m;
- dans le domaine occidental, 12% seulement des autochtones sont forestières ; la majorité étant des espèces de savanes arborées qui occupent la plus grande partie du paysage de cette région. Il en est de même pour le domaine central où le pourcentage des espèces des pseudo-

steppes est plus élevé (87%), par rapport à celui des forêts climaciques (forêts denses humides de moyenne altitude et forêts sclérophylles du versant occidental) ;

- dans le domaine du Sambirano, on n'a répertorié que deux espèces aromatiques autochtones (*Croton bojerianum* et *Ravenala madagascariensis*) appartenant aux végétations secondaires. Il pourrait s'agir d'une zone insuffisamment inventoriée puisqu'elle comprend des massifs forestiers aussi riches que les forêts orientales, malgré les quelques différences floristiques et physiologiques existant entre les deux forêts.

Concernant les plantes introduites, le nombre des espèces aromatiques recensées, tous domaines phytogéographiques confondus, est de 52 ; quelques espèces ont une large répartition et se retrouvent à la fois dans deux ou trois domaines (*Ocimum gratissimum*, *Ocimum canum*, *Citrus aurantium*, *Eugenia jambolana*, *Cymbopogon* sp . et *Vetiveria zizanioides*, etc.). Ces plantes sont totalement absentes dans le domaine du Sud dont l'aridité ne permettrait pas leur installation.

Dans les quatre domaines phytogéographiques (Est, Sambirano, Centre, Ouest), les espèces cultivées (définies selon PERRIER DE LA BATHIE, 1923) et les espèces anciennement introduites, volontairement ou non et qui se sont naturalisées là où les forêts primitives ont été détruites par l'homme, sont nombreuses (12 espèces cultivées par domaine en moyenne et 7 espèces naturalisées). Les plantes aromatiques adventices et rudérales sont seulement au nombre de 2 à 3 espèces par domaine.

I.3.2. Origines des plantes introduites

Soixante pour cent (60%) des plantes aromatiques introduites sont originaires des terres orientales (Indo-Malaisie, Australie, Nouvelle Calédonie et Asie Orientale), 9 % d'Afrique, 11 % d'Amérique du Sud; une part assez élevée 20 %, est originaire des pays tempérés de la Méditerranée et d'Europe occidentale et centrale.

I.3.3. Répartition par famille

Toutes ces espèces se trouvent dans 34 familles dont les familles suivantes ont les plus grands nombres d'espèces aromatiques :

- ▲ RUTACEAE (12 espèces) ;
- ▲ FABACEAE (12 espèces) ;
- ▲ EUPHORBIACEAE (11 espèces) ;

- ♣ LAMIACEAE (8 espèces) ;
- ♣ LAURACEAE (7 espèces) ;
- ♣ MYRTACEAE (7 espèces.)

Certaines familles ne contiennent presque exclusivement que des espèces aromatiques autochtones, endémiques ou non, à savoir:

- CANNELLACEAE (3 espèces du genre endémique *Cinnamosma*);
- RUBIACEAE (*Ixora odorata*, *Danaïis fragrans*, *Santalina madagascariensis*);
- OLEACEAE (4 espèces du genre *Jasminum*);
- BIGNONIACEAE (*Phylloctenium* sp. , *Stereospermum euphoroides*);
- BURSERACEAE (les espèces du genre *Canarium* et *Sorindaria*);
- HERNANDIACEAE (*Hernandia voyronii*);
- MELIACEAE (*Cedrelopsis grevei*);
- MUSACEAE (*Ravenala madagascariensis*);
- MYRISTICACEAE (3 espèces endémiques du genre *Brochoneura*).

Toutefois ces deux familles n'ont que des espèces introduites :

- ♣ LAMIACEAE (*Ocimum basilicum*, *O. canum*, *O. gratissimum*, *Mentha piperita*, etc.);
- ♣ POACEAE (*Cymbopogon cilratus*, *C. nardus*, *C. winterianus*, *Vetiveri azizanioïdes*, etc.).

Les autres familles comme Rutaceae, Myrtaceae, Lauraceae, Piperaceae possèdent plus ou moins le même nombre d'espèces aromatiques introduites et autochtones. Le tableau 01 rapporte la répartition par famille des plantes aromatiques de Madagascar.

Tableau 01 : Répartition par famille des plantes aromatiques de Madagascar (RAKOTOVAO et RANDRIANJOHANY, 1996)

FAMILLE	Espèces introduites		Espèces autochtones	
	Noms scientifiques	Noms vernaculaires	Noms scientifiques	Noms vernaculaires
ACANTHACEAE	<i>Thumbergia fragrans</i>		<i>Brillantsia pubescens</i> <i>Rhinacanthus osmospermus</i>	Mandavohitra Voanakely
AMARYLLIDACEAE	<i>Allium cepa</i> <i>Allium sativum</i>	Tongolo Tongolombazaha		
ANNONACEAE	<i>Cananga odorata</i>	Pumph.(Ylang-Ylang)		
APIACEAE	<i>Foeniculum vulgare</i>	Tongologasy Tongololay Anizety Karaotintsoavaly	<i>Phellolophium madagascariensis</i>	Tsileondraohoaho Tongotrambohobe
APOCYNACEAE			<i>Alafia Perrieri</i>	Alafy, Rikiatra
ASTERACEAE	<i>Ageratum conyzoides</i> <i>Anthemis nobilis</i> <i>Artemisia absinthium</i> <i>Matricaria chamomilla</i> <i>Melissa officinalis</i> <i>Ruta graveolens</i>	Hanitrinimpatsaka Kamomy	<i>Helichrysum cardifolium</i> <i>Helichrysum gymmocephalum</i> <i>Helichrysum benthami</i> <i>Stenocline incana</i> <i>Stenocline ulinoides</i>	Fotsiavadika Rambiazina Tsimonomonona

	Senecio ambaviala	Ahifatra		
BIGNONIACEAE			Phylloctenium sp Stereospermum euphorioides	Voantsakalava mangarahara
BURSERACEAE			Canarium boivini Canarium madagascariensis	Ramy Ramy
CANELLACEAE	Cinnamosma fragrans	Mandravasarotra	Cinnamosma macrocarpa Cinnamosma madagascariensis	Sakaiala Sakaihazo
CLUSIACEAE	Callophyllum inophyllum	Foraha, Vitanona		
EUPHORBIACEAE			Antidesma madagascariensis Croton anisatum Croton arenicola Croton bojerianum Croton geayi Croton greveanus Croton stanneum Croton louveli	Taindalitra Anjety Fotsiavadika Somoro Kifio Volafoty Kifiatry
FABACEAE	Acacia furnesiana	Mimosa, Roy	Indigofera vohemarensis Mimosa grandidieri	Roipitiky
FLACOURTIACEAE			Aphloia maahgascariensis	Voafotsy
GERANIACEAE	Pelargonium capitatum	Mpiandrilavenona		

HERNANDIACEAE			<i>Hernandia voyroni jumelle</i>	Hazomalany
LAMIACEAE	<i>Hyptis pectinata</i> <i>Hyptis spicigera</i> <i>Mentha piperita</i> <i>Ocimum canum</i> <i>Ocimum gratissimum</i> <i>Ocimum suave</i> <i>Ocimum basilicum</i> <i>Rosmarinus officinale</i>	Afolava Afolava antahalaka Solila Rombafotsy Rombabe Romba Basilic Romarin		
LAURACEAE	<i>Cinnamomum camphora</i> <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Persea gratissima</i>	Ravintsara Hazokanelina Zavoka	<i>Canarium trichotomus</i> <i>Ravensara aromatica</i> <i>Ravensara crassifolia</i> <i>Ravensara perrier</i>	Havozo, Hazomanitra Tavolo Kabitso
LOGANIACEAE	<i>Buddleia madagascariensis</i>	Ramandravaka, Seva		
MALVACEAE			<i>Gossypium barbadense</i>	Landihazo
MELIACEAE	<i>Melia azedarach</i>	Voandelaka	<i>Cedrelopsis grevei</i>	Katrafay
MORINGACEAE	<i>Moringa pterygosperm</i>	Ananambo		
MUSACEAE			<i>Ravenala madagascariensis</i>	Ravinala
MYRISTICACEAE	<i>Myristica fragrans</i>	Rarambazaha	<i>Brochoneura acuminata</i> <i>Brochoneura chapelieri</i>	Hafotrarano Malotsiandrongo

MYRTACEAE	<i>Eucalyptus rostrata</i> <i>Syzygium aromatica</i> <i>Syzygium cumuni</i> <i>Syzygium jambos</i> <i>Melaleuca viridiflora</i> <i>Pimenta acris</i>	Kininina Jirofo, Karafoy Rotra Zamborizano Niaouli, Kininindrano Arbre piment	<i>Syzygium bernieri</i> <i>Syzygium emirnensis</i>	Roitry Voamaritampona, Rotrantanety Rotra
OLEACEAE			<i>Jasminum greveanum</i> <i>Jasminum pteropodum</i>	
ORCHIDACEAE	<i>Vanilla planifolia</i>		<i>Aerangis fastuosa</i> <i>Jumellea fiancoisii</i>	
PIPERACEAE	<i>Piper pyrifolium</i>			
POACEAE	<i>Cymbopogon citratus</i> <i>Cymbopogon martini</i> <i>Cymbopogon nardus</i> <i>Vetiveria zizanioides</i>	Fantakamanitra Palmarozà Fehana		
RANUNCULACEAE	<i>Ranunculus pinnatus</i>	Aforano, Anamalahondrano		
RUBIACEAE	<i>Ixora odorata</i>		<i>Danaïa fragrans</i> <i>Santalina madagascariensis</i>	Bongonomby Masonjoany

RUTACEAE	<i>Citrus nobilis</i>	Mandarina,	<i>Toddalia aculeata</i>	Kasimba, Fanidy
	<i>Citrus aurantium</i>	Voangasay	<i>Vepris madagascariensis</i>	Anzety
	<i>Citrus corticosus</i>	Laoranjy		
	<i>Citrus decumana</i>	Voahangibe, Trema		
	<i>Citrus hystrix</i>	Combava		
	<i>Citrus limonum</i>	Voasary, Tsoha		
	<i>Citrus medica</i>	Tolongoala		
SOLANACEAE	<i>Datura alba</i>	Ramiary, Kinanakoho		
VERBENACEAE	<i>Lantana camara</i>	Radriaka		
ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber officinale</i>	Sakaitany		
	<i>Aframomum angustifolium</i>	Longoza		
	<i>Hedychium coronarium</i>	Sakarivondambo		

Chapitre II : GENERALITES SUR L'EPILEPSIE

II.1. DEFINITION

L'épilepsie est un des troubles neurologiques les plus fréquents .Du point de vue historique, le terme «épilepsie» apparaît dans la langue française en 1503 prenant son origine de l'ancien grec : 'επιλαμβάνειν' (epilambanein) qui signifie « saisir » ou « attaquer par surprise »

Les crises d'épilepsie sont des manifestations cliniques paroxystiques motrices, sensibles, sensorielles ou psychiques, accompagnées ou non d'une perte de connaissance, liées à une décharge anormale, excessive et hypersynchrone d'un nombre plus ou moins étendu de neurones du cortex cérébral (Elger et Schmidt, 2008).

La maladie épileptique (l'épilepsie au sens large) est définie par la répétition, chez un même sujet, de crises épileptiques spontanées.

Une crise épileptique unique ou la répétition dans le cadre d'une affection cérébrale aigue de crises épileptiques ne constituent donc pas une maladie épileptique. Il s'agit simplement de crises « accidentelles » accompagnant un dysfonctionnement transitoire et réversible du système nerveux central (Thomas et Arzimanoglou, 2000).

Bien que les données électroencéphalographiques (EEG) soient d'importance capitale dans le diagnostic des crises épileptiques, en aucun cas, le diagnostic ne se porte que sur ces seules données : il n'y a pas d'épilepsie sans crise clinique (Diop et al., 1998)

II.2. EPIDEMIOLOGIE

L'épilepsie, une des affections neurologiques chroniques les plus fréquentes, constitue un problème majeur de santé publique. Elle est considérée comme un problème important de santé publique en Afrique. La prévalence de l'épilepsie est plus élevée dans les pays en voie de développement que dans les pays développés bien que dans les pays en voie de développement à faibles revenus, beaucoup de facteurs favorisants puissent être prévenus.

La prévalence et l'incidence de l'épilepsie dans les zones rurales et périurbaines sont généralement plus élevées que dans les villes.

Le ratio standardisé de mortalité chez les patients épileptiques est de 2 à 3 fois supérieur à celui de la population générale. Le décès peut être en relation directe avec l'étiologie de l'épilepsie (alcoolisme, tumeur, affection dégénérative) ou survenir accidentellement au cours

d'une crise : état de mal épileptique, inhalation, asphyxie, traumatisme crânien secondaire, noyade...Les patients présentant une épilepsie à crises tonico-cloniques ou autrement appelées « grand mal » semblent les plus exposés (Thomas et Arzimanoglou, 2000).

II.3. CLASSIFICATION

II.3.1. Classification internationale

La classification internationale des crises épileptiques par la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie (LICE) en 1981 permet de distinguer, sur la concordance des critères cliniques et EEG, trois grands types de crises d'épilepsie : les crises généralisées, les crises partielles et les crises non-classées (tableau 02).

II.3.1.1. Crises généralisées

Dans les crises généralisées, la décharge paroxystique est d'emblée propagée aux deux hémisphères et semble, de ce fait, intéresser simultanément l'ensemble du cortex cérébral. Les caractéristiques cliniques de ces crises ne comportent donc aucun signe pouvant les rattacher à un système anatomique fonctionnel localisé dans des deux hémisphères. Les manifestations motrices, lorsqu'elles existent, sont d'emblée bilatérale et symétrique. Les manifestations EEG critiques sont caractérisées par des décharges de pointes, polypointes pointes-ondes ou polypointes-ondes bilatérales, synchrones et symétriques sur les deux hémisphères.

Tableau 02: Classification internationale des crises épileptiques

Crises généralisées	Crises partielles		
<i>Absences</i>	<i>simples</i>	<i>complexes</i>	<i>Secondairement généralisées</i>
<i>Crises myocloniques</i>	avec signes moteurs	début partiel simple suivi de troubles de la conscience et/ou d'automatismes	crises partielles simples secondairement généralisées
<i>Crises cloniques</i>	avec signes somatosensitifs ou sensoriels	sans troubles de la conscience dès le début de la crise, accompagnée ou non d'automatismes	crises partielles complexes secondairement généralisées
<i>Crises toniques</i>	avec signes végétatifs		crises partielles simples évoluant vers une crise partielle complexe vers une généralisation secondaire
<i>Crises tonico-cloniques</i>	avec signes psychiques		
<i>Crises atoniques</i>			

II.3.1.2. Crises partielles

Dans les crises partielles ou focales, la décharge paroxystique intéresse normalement un secteur limite des structures corticales, la zone épileptogène. Cette zone est constituée par une population neuronale confinée à une partie d'un seul hémisphère. Les premiers signes cliniques de la crise (signal-symptôme de Jackson) sont donc d'une valeur locomotrice car ils traduisent la désorganisation de la zone épileptogène et/ou de structures très proches. La sémiologie des crises partielles dépend des caractéristiques anatomo-fonctionnelles des

réseaux de la décharge critique à partir de la zone epileptogène, constitués par les différentes structures recrutées par la propagation de la décharge critique à partir de la epileptogène. La désorganisation séquentielle de ces structures est responsable des formules sémiologiques extrêmement variées d'un patient à l'autre mais remarquablement fixes d'une crise à l'autre chez un même patient, pour autant que la zone epileptogène soit unique. La sémiologie finale de la crise est produite par la succession et par l'intégration spatio-temporelle d'un certain nombre de signes cliniques élémentaires, positifs et inhibiteurs. La désorganisation critique d'un réseau epileptogène n'est jamais physiologique, ce qui explique le caractère dyspraxique et les simulacres de comportements rencontrés dans certaines crises à sémiologie élaborée. Les manifestations EEG des crises partielles sont unilatérales et focales au moins au tout début de crise. La décharge peut rester focale, se propager à une partie ou la totalité d'une hémisphère, voire embraser l'ensemble des deux hémisphères, provoquant une généralisation secondaire.

L'appréciation du niveau de la conscience est donc le critère fondamental permettant de différencier les deux types de crises partielles. Dans cette perspective, la conscience peut être définie comme la « qualité de réponse aux stimuli de l'environnement » et comme « possibilité de garder le souvenir des éléments intérieurs et extérieurs survenus pendant la crise ». L'appréciation du niveau de conscience peut s'avérer difficile en pratique, particulièrement dans les crises de très brève durée, dans certaines crises partielles à symptomatologie psychique et chez certains patients (très jeunes enfants par exemple). Le terme moins spécifique de « perturbation du contact » est préféré par certains auteurs, encore que dans certaines situations, il puisse être difficile de classer une crise durant laquelle le contact reste préservé mais le contenu n'est pas mémorisé par le patient.

Par ailleurs, l'existence d'un trouble de la conscience n'a pas en soi de valeur localisatrice. Ce signe reflète le caractère étendu de la décharge critique. En conséquence, on peut s'interroger sur l'intérêt d'une distinction entre crises partielles « simples » et « complexes », distinction qui ne préjuge en rien de l'origine et de la propagation de la décharge épileptique. Afin de résoudre ces problèmes, un nouveau système de classification basé uniquement sur la sémiologie des crises s'affranchissant des termes « simple » et « complexe » et séparant clairement crises et syndromes épileptiques est en cours de discussion au sein de la ligue internationale contre l'épilepsie.

II.3.1.3. Crises inclassables

Certaines crises restent inclassables soit par l'absence de renseignements cliniques suffisants (certaines crises convulsives nocturnes par exemple) soit en raison d'une sémiologie déroutante (certaines crises néonatales par exemple).

II.4. DIAGNOSTIC POSITIF DES CRISES EPILEPTIQUES

- Observation directe des crises

Le diagnostic positif de crise épileptique doit être évoqué devant la survenue brutale et inopinée d'un événement clinique bref dont les différentes séquences semblent s'enchaîner selon une progression logique et se reproduisent de façon stéréotypée d'un épisode à l'autre chez un même patient. Lorsque la conscience n'est pas abolie pendant la crise, le diagnostic repose sur la description des phénomènes cliniques par le patient. Lorsque la conscience est abolie pendant la crise, le diagnostic repose presque exclusivement sur la fiabilité des données recueillies auprès des témoins de l'épisode.

L'observation directe des crises est évidemment une situation privilégiée, rare en pratique courante.

Les meilleurs signes en faveur d'une crise généralisée convulsive sont la présence d'un stertor, d'une obnubilation post-critique et une morsure latérale de la langue. Ce dernier signe est cependant inconstant. Une asthénie intense, des courbatures musculaires sont également évocatrices. Une perte d'urine n'est ni constante ni spécifique.

Une amnésie totale couvrant une période isolée de rupture du contact oriente soit vers une absence, soit vers une crise partielle complexe. Dans la première situation, le début et la fin des manifestations sont brutales. Dans la seconde, l'altération du contact est souvent de plus longue durée et il existe habituellement un retour progressif à un état de conscience normal.

- L'électroencéphalogramme (EEG)

L'EEG est l'enregistrement de l'activité électrique du cortex cérébral à l'aide d'électrodes posées sur le cuir chevelu. Il joue un rôle important dans l'étude de l'épilepsie car cette

maladie correspond à la production par le cortex cérébral d'une activité électrique anormale très typique.

L'enregistrement de cette activité électrique et son analyse permettent d'aider le médecin à poser le diagnostic d'épilepsie. Cet enregistrement a évidemment toujours lieu entre les crises.

Il faudrait évidemment une grande chance pour que le patient fasse justement une crise durant l'enregistrement EEG qui dure 20 min en moyenne.

L'électroencéphalogramme (EEG) est donc un examen capital dans le processus diagnostique.

Il permet, dans une certaine mesure, de confirmer ou d'infirmer la suspicion clinique d'épilepsie et de préciser souvent le type d'épilepsie dont souffre le patient, ce qui aura des répercussions sur le choix du traitement. Cependant, il présente des limites qui rendent importants l'histoire du patient et l'expérience du médecin.

Dans certains cas de diagnostic difficile, on a recours à un enregistrement vidéo couplé à l'EEG, en continu, durant quelques jours. Cet examen a l'avantage de permettre l'enregistrement des crises.

II.5. ETIOLOGIE DES EPILEPSIES

Il existe différentes causes pouvant entraîner l'apparition de crises d'épilepsie qui survient souvent suite à des traumatismes antérieurs. Ces causes sont réparties en causes vasculaires, génétiques, métaboliques, infectieuses, traumatiques, tumorales ou encore liées aux maladies dégénératives.

II.5.1. Les causes vasculaires

Les causes vasculaires sont les plus fréquentes de survenue de crises épileptiques à tout âge. En effet de nombreuses épilepsies apparaissent suite à un accident vasculaire cérébral (AVC) qui est la première cause vasculaire. Parmi les AVC, on compte les AVC ischémique et hémorragique, les crises précoces ou épilepsie séquellaire mais également les crises généralisées tonico-cloniques et les crises partielles en rapport avec l'origine focale de l'accident. On retrouve aussi les malformations vasculaires cérébrales non rompues, les encéphalopathies hypertensives aiguës comme causes vasculaires des épilepsies.

II.5.2. Les causes métaboliques

Parmi les causes métaboliques on retrouve l'hypoglycémie, l'hypocalcémie (carence en calcium), l'hypercalcémie (surplus de calcium), hyponatrémie (carence en sodium), hypernatrémie (surplus de sodium), les insuffisances rénales ou hépatiques avancées ou encore les crises généralisées de type tonico-clonique.

II.5.3. Les causes toxiques

L'éthylisme, qui regroupe l'excès d'alcool, l'ivresse convulsive, les crises de sevrage (crises tonico-clonique survenant de quelques heures à trois jours après la dernière prise d'alcool) ainsi que l'épilepsie alcoolique proprement dite manifestée par des crises tonico-cloniques à répétition, est une cause fréquente de crises épileptiques. On retrouve également un surdosage de médicaments (antidépresseurs, neuroleptiques, lithium...), une intoxication par le monoxyde de carbone ou la consommation de stupéfiants parmi les causes toxiques favorisant les crises épileptiques.

II.5.4. Les causes tumorales

Comptant pour 10 % des causes d'épilepsies de l'adulte, les causes tumorales sont également les plus fréquentes lors d'apparition de crises partielles. En effet de nombreuses crises se manifestent suite à une tumeur et particulièrement une tumeur de siège hémisphérique tels qu'un méningiome, un gliome, une métastase cérébrale ou encore un astrocytome.

II.5.5. Les causes traumatiques

Les traumatismes crâniens résultant d'abcès ou d'hématomes sont particulièrement susceptibles de provoquer des convulsions. La plupart des crises provoquées par les traumatismes débutent moins d'un an après la lésion. Pour les traumatismes crâniens majeurs (perte de conscience durant plus de 24 heures, hématome sous-dural) le risque de crise est estimé à 17 fois le risque standard contre 1,5 pour les traumatismes crâniens mineurs (perte de conscience ou amnésie de moins de 30 min) (Annegers et al., 1998).

II.5.6. Les causes infectieuses

Une infection cérébrale entraînant une méningite, un méningo-encéphalite, un abcès ou un kyste est une cause d'apparition d'épilepsie immédiate ou différée.

La connaissance de ces différentes causes peut permettre aux médecins de pouvoir faire un diagnostic valable pour le patient atteint. Mais ce diagnostic se fait également à l'aide d'un interrogatoire du médecin au patient demandant : ses antécédents personnels de crises ou de pathologies potentiellement épileptogènes, ses antécédents familiaux d'épilepsies, les circonstances de survenue de la crise (les facteurs favorisants, la prise médicamenteuse, un traumatisme crânien récent) ou encore le déroulement de la crise si le patient en a le souvenir ce qui est rarement le cas ; c'est pourquoi le diagnostic épileptique est très difficile à effectuer. Un examen clinique peut également déceler des signes de crises épileptiques tels que des signes méningés, d'hypertension intracrânienne ou artérielle majeurs ou des signes de déficit post-critique tout comme un examen biologique avec le contrôle de l'urée, la glycémie, la calcémie, la phosphorémie, l'alcoolémie, le taux sanguin de médicaments prescrits ou encore la recherche de traces de stupéfiants. Des examens radiologiques tels qu'un scanner cérébral, systématique devant toute première crise d'épilepsie sauf lorsque les symptômes cliniques et l'EEG sont caractéristiques d'un syndrome idiopathique bien défini, ou une IRM (Imagerie par Raisonance Magnétique), permettent de déceler les tumeurs gliales, les malformations vasculaires ou les lésions localisées du lobe temporal et ainsi de rendre compte des caractéristiques de l'épilepsie du patient. Enfin un électroencéphalogramme qui enregistre les champs électriques peut montrer des signes de souffrance cérébrale au niveau d'une lésion focale et va permettre de rechercher des anomalies paroxystiques intercritiques témoignant d'une hyperexcitabilité neuronale et évocateurs d'épilepsie que sont les rythmes pointes, polypointes, pointes-ondes, ondes à front raide focalisées ou diffuses.

Une fois le diagnostic effectué, le médecin est en mesure de prescrire à son patient un ou plusieurs médicaments antiépileptiques afin de calmer et de contrôler les crises épileptiques.

II.6. TRAITEMENTS DES EPILEPSIES

Les deux impératifs du traitement antiépileptique sont le contrôle complet des crises et l'absence d'effet indésirable. Une démarche thérapeutique rationnelle s'appuie sur une connaissance de la pharmacologie des médicaments antiépileptiques dont le nombre s'est sensiblement accru ces dernières années. Les choix thérapeutiques dépendent d'une évaluation diagnostique précise du type de crise et, si possible, du type de syndrome épileptique en cause. En effet, chaque forme d'épilepsie répond de façon différente au traitement pharmacologique (Panayiotopoulos, 2005). Ces traitements pharmacologiques permettent de stabiliser les crises chez plus de 70% des cas, améliorant ainsi la qualité de vie des patients épileptiques. Cependant, ces traitements sont tous symptomatiques et obligent les patients à prendre des médicaments durant de longues années, voire tout au long de leur vie. L'échec du traitement médical pourra parfois faire envisager un traitement chirurgical.

Parmi les différents médicaments antiépileptiques, on peut distinguer deux grands groupes : les antiépileptiques de première génération, découverts de façon empirique et commercialisés avant 1990, et les molécules de deuxième génération, mises au point selon certaines hypothèses (neurotransmission GABAergique, canaux sodiques ou calciques) et mises sur le marché après cette date.

□ Quatre molécules classiques sont considérées comme des antiépileptiques majeurs, du fait de leur large spectre d'activité et de leur large diffusion. En France les deux plus anciens, le phénobarbital (PB, Gardenal[®], Alepsal[®], Kaneuron[®]) et la phénytoïne (PTH, Di-hydan[®]) ont tendance à être progressivement supplantés par la carbamazépine (CBZ, Tégretol[®]) et par le valproate de sodium (VPA, Depakine[®]).

Parmi les antiépileptiques de première génération figurent notamment :

- Le phénobarbital

Le phénobarbital qui est une molécule relativement ancienne présentant un effet antiépileptique dans à peu près toutes les formes d'épilepsie à l'exception des absences typiques. Il fait partie de la famille des barbituriques et sa fixation sur les sous-unités du récepteur GABA-A, modifie sa conformation allostérique, potentialisant ainsi les effets du GABA (Macdonald, 1988; Macdonald, 1989). Il est de moins en moins utilisé en Europe et aux Etats Unis en raison de ses effets secondaires et de sa toxicité.

- Phénytoïne

La phénytoïne (PTH, Di-hydan®) possède un large spectre d'activité antiépileptique s'étendant des crises partielles aux crises secondairement généralisées. Elle est inefficace dans les absences typiques, qu'elle semble même pouvoir aggraver (Perucca, 2001). En raison de ses effets sédatifs peu marqués, la PTH en préparation injectable (Dilatin, Prodilatin) est un médicament dans le traitement des états de mal épileptiques. Ce composé se lie aux canaux sodiques voltage-dépendants dans leur état inactivé, ralentit alors leur réactivation et diminue la capacité du neurone à produire des décharges à haute fréquence (Rogawski et Loscher, 2004). Elle semble modifier également les courants sodiques persistants (Niespodziany et coll., 2004).

Malgré son efficacité, l'utilisation en première intention de la PTH dans le traitement au long cours des épilepsies n'est pas conseillée. En effet la cinétique du médicament, non linéaire, se caractérise par une marge thérapeutique étroite. De ce fait, la PHT est un antiépileptique peu maniable : à partir d'un certain seuil, l'augmentation minime de la dose administrée provoque une brutale élévation du taux plasmatique, entraînant des signes d'intoxication, inaugurés par un nystagmus puis par des signes cérébello-vestibulaires. L'ajustement des doses nécessite habituellement à répéter les dosages plasmatiques. A moyen terme, la PTH a des effets cosmétologiques marqués, caractérisés par une hypertrophie gingivale, un épaississement des traits du visage, un hirsutisme, une hyperséborrhée, une acné. A long terme, les effets délétères sur la fonction cérébelleuse sont certains.

La posologie est de 5 à 8 mg/kg/jour chez l'enfant et de 3 à 5 mg/kg/jour chez l'adulte, soit 250 à 350 mg/jour. La dose totale journalière peut être d'emblée, en une ou deux prises. Des dosages plasmatiques toutes les 3 semaines pendant les 3 premiers mois doivent être effectuées afin de dépister un surdosage précoce.

- Carbamazépine

La carbamazépine (CBZ, Tegretol®, Tegretol® LP), synthétisée en 1961, possède un large spectre d'activité antiépileptique s'étendant des crises partielles aux crises secondairement généralisées (Brodie et French, 2000). Sa structure est proche des composés tricycliques prescrits dans le cadre de désordres psychiatriques (Birkhimer et coll., 1985) et elle présente le même mécanisme d'action sur les canaux sodiques que la phénytoïne (Schmidt et Elger, 2004). Elle interagit également avec les récepteurs à l'adénosine et présente une sélectivité pour le système limbique. C'est un médicament de choix dans le traitement des crises partielles, en raison de son efficacité, de sa bonne tolérance clinique et de l'absence de

perturbation des fonctions cognitives lors des traitements au long cours. Elle est déconseillée dans les épilepsies généralisées idiopathiques car elle peut aggraver les absences typiques et les myoclonies. L'introduction de nouvelles formes galéniques à libération prolongée permet de limiter le nombre de prises quotidiennes à deux. Lors de la mise en route du traitement, une éruption érythémateuse et prurigineuse survient dans 2 à 5 % des cas et impose en règle l'arrêt du traitement. Une sensation de malaise général, liée à un surdosage transitoire, avec des nausées, diplopie, asthénie, difficultés de concentration, est pratiquement constante lorsque l'ascension posologique a été trop rapide. La carbamazépine a des effets inducteurs enzymatiques marqués. La contraception orale est de ce fait aléatoire. Une leuconéutropénie modérée est fréquente lors des traitements chroniques à la CBZ. Une hyponatrémie est plus rare. Ces anomalies biologiques restent le plus souvent sans traduction clinique. La posologie est de 20 à 25 mg/kg/jour chez l'enfant, sous forme de solution buvable dosée à 100 mg pour 5 ml. En deux ou trois prises, ou sous forme de comprimés à effet prolongé dosés à 200 ou 400 mg en deux prises. Le traitement doit être introduit progressivement avec une posologie initiale de 100 à 200 mg, puis une augmentation de 100 mg par semaine.

- Valproate

Le Valproate (VPA), sel sodique de l'acide dipropylacétique ou acide valproïque ou valproate de sodium (Dépakine, Dépakine Chrono), synthétisé dès 1882, est un solvant organique dont les propriétés antiépileptiques ont été découvertes par hasard en 1963. Il s'agit d'un antiépileptique à très large spectre, actif sur tous les types de crises. Son efficacité est remarquable dans les épilepsies généralisées idiopathiques qui constituent son indication privilégiée (Brodie et Dichter, 1997 ; Rogawski et Loscher, 2004). Son efficacité dans les épilepsies partielles est démontrée. Elle est probablement comparable à celle des produits de référence dans ce domaine (PTH, CBZ).

De plus, il semble activer l'enzyme de synthèse du GABA, la L-Glutamic-acid-décarboxylase et module les canaux calciques à bas seuil (Macdonald, 1995). Les formes galéniques à libération prolongée peuvent autoriser une seule prise quotidienne.

Les inconvénients du VPA comprennent une prise de poids par effet orexigène, un tremblement d'attitude dose-dépendant et une alopécie partielle, inconstante et réversible. Les hépatopathies graves sont désormais exceptionnelles et être prévenues par un diagnostic précoce. Les signes d'appel comportent des troubles digestifs, une recrudescence

des crises et des modifications des paramètres hépatiques. Une hyperammoniémie modérée est constante mais rarement symptomatique chez les sujets à fonction hépatique normale.

La posologie usuelle est de 30 mg/kg/jour chez le petit enfant, sous forme de solution buvable à 200 mg par ml ou de sirop à 200 mg par cuillère-mesure en deux prises, et de 15 à 20mg/kg/jour chez l'enfant plus âgé et l'adulte, sous forme de comprimés à action prolongée dosés à 500 mg, soit 1000 mg à 1500 mg par jour en une ou deux prises. Le traitement doit être introduit progressivement, avec une posologie initiale de 250 à 500 mg puis une augmentation de 250 à 500 mg par semaine.

- L'éthosuximide

L'éthosuximide (ETH, Zarontin) est spécifiquement actif contre les absences typiques. (Brodie et Dichter, 1997) Il peut être utile dans le traitement des absences atypiques et des myoclonies. Son effet antiépileptique s'exerce à travers la réduction des courants calciques de type T situés sur les neurones relais thalamo-corticaux, bloquant leur décharge synchrone (Coulter et coll., 1989 a, b, c; Rogawski et Loscher, 2004) réduisant ainsi légèrement les courants sodiques persistants (Niespodziany et coll., 2004). La posologie chez l'enfant est de 20 à 25 mg/kg/jour en deux prises, en utilisant le sirop à 250 mg par mesure ou les capsules à 250 mg. Le traitement doit être introduit progressivement, avec une posologie initiale de 250 mg, puis une augmentation de 250 mg par semaine, en deux prises.

Parmi les antiépileptiques de seconde génération huit sont déjà utilisés en France depuis plusieurs années (Figure 02). Contrairement aux antiépileptiques de première génération, l'étude de leurs mécanismes d'action fait à présent partie du développement préclinique et clinique (Perucca et coll., 2007). Les nouvelles molécules antiépileptiques (GVG, FBM, GBP, LTG, TPM, TGB) présentent un certain nombre de caractéristiques communes. Leurs indications principales sont représentées par les patients mal contrôlés par les molécules antiépileptiques classiques ou qui présentent une intolérance à ces molécules.

- Vigabatrin

Le Vigabatrin ou gamma-vinyl-GABA (GVG, Sabril) est un inhibiteur irréversible de la GABA-transaminase et élève ainsi le taux intracérébraux de GABA, principal neuromédiateur inhibiteur du système nerveux central. L'inhibition étant irréversible, la durée d'action du GVG est prolongée ce qui autorise une monoprise quotidienne et rend

inutile le dosage plasmatique. Les interactions médicamenteuses sont limitées à une baisse modérée des taux de PTH. (Ben-Menachem 1995; Tolman et Faulkner 2009; Willmore 2009) Une indication privilégiée du GVG est représentée par le traitement des spasmes du syndrome de West où le GVG peut être prescrit en monothérapie de première intention. Sinon le GVG est indiqué en thérapeutique additive dans les épilepsies partielles, lorsque toutes les associations thérapeutiques appropriées se sont révélées idiopathiques comportant des absences typiques et des myoclonies, qu'il peut aggraver.

Le GVG est en règle bien toléré. Une psychose aiguë réversible dose-dépendant comporte une asthénie, fréquente en début de traitement mais transitoire et un effet orexigène. Récemment, des rétrécissements concentriques du champ visuel (RCCV), en règle asymptomatique ont été mis en évidence chez environ un tiers des patients traités au long cours par le GVG. Bien que l'imputabilité du GVG ne semble exclusive dans la survenue de ces RCCV, le législateur impose désormais la pratique d'une périmétrie visuelle statique ou cinétique préalable à l'instauration du traitement ; cette périmétrie sera régulièrement répétée tous les trois mois.

La dose utile est de 40 à 80 mg/kg/jour chez l'enfant, en utilisant préférentiellement les sachets de poudre à dissoudre dosés à 500 mg et de 20 à 55 mg/kg/jour chez l'adulte, soit 1500 à 4000 mg (3 à 8 comprimés à 500 mg) en une ou deux prises. Le traitement doit être introduit progressivement, avec une posologie initiale de 500 mg puis une augmentation de 500 mg par semaine.

-Felbamate

Le Felbamate (FBM, Taloxa) a été synthétisé à partir de la famille des carbamates. Son absorption est rapide et sa biodisponibilité élevée. C'est un inhibiteur enzymatique puissant qui subit les actions métaboliques des autres médicaments antiépileptiques et augmente les taux plasmatiques de PHT, CBZ et VPA. Ses mécanismes d'action sont multiples : il potentialise l'effet du GABA et se comporte comme antagoniste glutamatergique ; son efficacité est importante (Parker et coll., 2005 ; Yang et coll., 2007). En revanche, sa tolérance est parfois moyenne avec effets cognitifs et anorexie.

Le problème majeur est la possibilité d'hépatites toxiques et d'aplasies médullaires parfois mortelles, ce qui a considérablement réduit son utilisation et explique que sa délivrance soit soumise à des conditions particulières : usage hospitalier, indication de nécessité absolue après évaluation du rapport bénéfique/risque. L'indication légale est actuellement limitée aux patients présentant un syndrome de Lennox-Gastaut réfractaire.

La dose utile est de 15 à 45 mg/kg/jour, soit 600 à 3000 mg par jour en deux ou trois prises. Des comprimés à 400 et 600 mg sont disponibles. Le traitement doit être introduit progressivement avec une posologie initiale de 400 mg, puis une augmentation de 400 mg par semaine. Chez l'enfant, une dose initiale de 15 mg/kg/jour doit être prescrite en utilisant la solution buvable de 600 mg pour 5 ml. La co-prescription de PHT, CBZ et VPA impose une réduction des doses de ces médicaments. Une surveillance bimensuelle de l'hémogramme et l'enzymologie hépatique est nécessaire.

- Gabapentine

La gabapentine (GBP, Neurotin) avait initialement été conçue pour exercer des propriétés gabaergiques mais s'est avérée ultérieurement exercer ses propriétés antiépileptiques en agissant sur des canaux calciques voltage dépendants essentiellement présynaptiques. Son absorption est rapide, avec une biodisponibilité de 60% environ et une demi-vie de 5 à 7 heures. La GBP est bien tolérée, non métabolisée et n'exerce aucune interaction métabolique.

En raison de son profil de tolérance favorable, la GBP est indiquée en monothérapie de première intention ou en thérapeutique additive dans les épilepsies partielles de l'adulte et d'une intolérance aux autres médicaments pourraient constituer une indication de choix de la GBP. En revanche, la GBP n'est indiquée dans les épilepsies généralisées idiopathiques car elle semble aggraver les absences.

La dose utile est de 15 à 35 mg/kg/jour, soit 1800 à 3600 mg chez l'enfant et l'adulte, en trois prises. Des gélules à 100, 300 et 400 mg sont disponibles. Le traitement doit être introduit avec une posologie initiale de 400 mg, puis peut être rapidement augmenté de 400 mg toutes les 72 heures.

- Lamotrigine

La lamotrigine (LTG, Lamictal) est une phényltriazine initialement développée pour ses propriétés antifongiques. Elle agit par baisse de la libération des neurotransmetteurs excitateurs, glutamate essentiellement, mais aussi sur les canaux sodiques voltages-dépendants (Cheung et coll., 1992; Zona et Avoli, 1997). L'absorption est rapide et la biodisponibilité totale, avec une demi-vie longue. La molécule possède l'avantage d'un large spectre antiépileptique s'étendant des crises partielles aux crises généralisées.

La LTG est indiquée dans les épilepsies généralisées ou partielles réfractaires chez l'adulte et chez l'enfant de plus de 12 ans en complément d'un autre antiépileptique ou en

monothérapie après échec d'un traitement antérieur. Chez l'enfant de moins de 12 ans, elle peut être prescrite en association dans les formes sévères d'épilepsie généralisée. La LTG est bien tolérée. Elle bénéficierait même d'un effet psychotrope favorable. Elle est sensible aux effets inducteurs des autres antiépileptiques qui accélèrent son métabolisme tandis que ce dernier est diminué de moitié par le VPA. La dose utile, de 5 à 15 mg/kg/jour chez l'enfant et de 3 à 7 mg/kg/jour chez l'adulte, doit être doublée en cas d'inducteur enzymatiques associés (PB, CBZ, PHT, PRM) et divisée par deux en cas de co-prescription d'un inhibiteur enzymatique tel que le VPA. Un dosage plasmatique de la LTG, actuellement non disponible en routine, pourrait de ce fait être utile. La mise en route du traitement doit être progressive en raison de la possibilité, surtout en cas de prescription initiale trop rapide et/ou en cas d'association avec le VPA, d'éruptions cutanées en règle bénignes mais parfois graves.

- Tiagabine

La Tiagabine (TGB, Gabitril) est un inhibiteur spécifique de la recapture synaptique, neuronale et gliale, du GABA (Angehagen et coll., 2003). La molécule, rapidement absorbée, fortement métabolisée, est liée à 95% aux protéines plasmatiques. La demi-vie plasmatique est 7 à 9 heures. Les inducteurs enzymatiques (PB, CBZ, PHT) accélèrent l'élimination de la TGB, nécessitant une augmentation de ses doses. En revanche, la TGB est dépourvue d'effet inducteur enzymatique rendant une contraception orale possible.

La tiagabine est indiquée en thérapeutique additive dans les épilepsies partielles de l'adulte. Des sensations vertigineuses avec étourdissements, une asthénie et une sédation résument les effets indésirables. Ils seront évités par une augmentation progressive et la prise du médicament en fin de repas.

La dose utile est de 0,5 à 1 mg/kg/jour chez l'adulte, soit 30 à 70 mg par jour en trois prises. Des comprimés à 5, 10 et 15 mg sont disponibles. L'ascension posologique est au maximum de 5 mg par semaine.

-Topiramate

Le topiramate (TPM, Eptomax) est un inhibiteur faible de l'anhydrase carbonique. Ses mécanismes d'action sont multiples. Ainsi, en plus du blocage des canaux Na⁺, il possède un effet GABA-ergique et atténue la transmission glutamatergique. La biodisponibilité est totale avec une demi-vie longue et une faible fixation protéique. Les

interactions sont minimales. L'action antiépileptique du TPM dans les crises partielles et les crises secondairement généralisées est certaine et parfois importante (White, 2005)

Le TPM est indiqué en thérapeutique additive dans les épilepsies partielles de l'adulte et de l'enfant de plus de 4 ans. La tolérance neuropsychologique du TPM est parfois moyenne, avec nécessité d'augmenter la dose très progressivement les doses, par palier de 25 à 50 mg par semaine. Le médicament multiplie par 3 à 10 le risque de lithiase rénale ce qui le fait contre-indiquer chez les sujets ayant présenté des antécédents de coliques néphrétiques. Il présente de plus un effet anorexigène net responsable d'une assez fréquente perte de poids. La dose utile est de 3 à 15 mg/kg/jour chez l'adulte, soit 200 à 600 mg par jour en deux prises, et de 5 à 9 mg/kg/jour chez l'enfant. Des comprimés à 50, 100 et 200 mg sont disponibles. Le traitement doit être introduit progressivement avec une posologie initiale de 50 mg tous les 14 jours en deux prises.

-Fosphénytoïne

La fosphénytoïne (FOS, Prodilatin) est un ester de la PHT qui se comporte comme a voie une prodrogue convertie en PHT dans l'organisme. Un flacon à 750 mg de FOS est équivalent à 500 mg de PHT. Son principal intérêt est sa solubilité dans l'eau, ce qui permet d'utiliser la voie intramusculaire lorsque l'administration orale de la PHT est impossible ou contre-indiquée. Récemment commercialisée en France, la FOS est disponible sous forme injectable pour le traitement des états de mal épileptiques où l'intraveineuse (IV) reste la seule voie d'administration indiquée, et la prévention des crises sérielles post-traumatiques ou post-neurochirurgicales.

La dose utile pour le traitement des états de mal, chez l'adulte et de l'enfant de plus de 5 ans, est de 20 mg/kg d'équivalent-PHT en injection IV. Le rythme de la perfusion ne doit pas dépasser 150 mg d'équivalent-PHT par minute.

-Les antiépileptiques d'appoint

Benzodiazépines :

Les benzodiazépines (BDZ) ont un effet antiépileptique majeur et immédiat sur tous les types de crises. Le mécanisme d'action des benzodiazépines n'a été globalement élucidé qu'en 1987 quand Schqield et al. en ont cloné le récepteur (De Beaureparie, 2005)

Les BDZ renforcent les effets du GABA sur ses récepteurs cérébraux qui sont de type GABA A. Les récepteurs GABA A se situent dans la membrane cellulaire et contrôlent l'ouverture des canaux chlore des cellules nerveuses; il existe un récepteur au GABA B mais il est très différent et il n'est pas impliqué dans le traitement de l'anxiété. La fixation d'une molécule

de BDZ sur ou à proximité immédiate du récepteur GABA A potentialise l'action du GABA. Les benzodiazépines sont donc des inhibiteurs très puissants de l'excitabilité neuronale (De Beaureparie, 2005; Muster et al., 2005; Moulin, 1998; American Psychiatric Association, 1997). Des phénomènes de tolérance (épuisement sur l'effet antiépileptique) apparaissent après quelques semaines dans près de la moitié des cas. De plus, une dépendance (recrudescence des crises lors du sevrage ou rébond) est fréquente, rendant difficile l'arrêt du traitement. Pour ces raisons, l'emploi des BDZ reste limité dans le traitement chronique des épilepsies. Le diazépam (valium) et le clonazépam (Rivotril) IV sont utilisés dans le traitement d'urgence des crises sérielles ou des états de mal. Le diazépam par voie rectale est utile dans la prévention et le traitement des convulsions fébriles prolongées. Le clonazépam (Urbanyl) et le nitrazépam (Mogadon) (per os) sont utilisés en traitement adjuvant de certaines épilepsies rebelles ou dans d'autres indications : traitement intermittent de certaines épilepsies à recrudescence cataméniale, traitement de certaines morphéiques.

Autres médicaments

La primidone (PRM, Mysoline) se transforme dans l'organisme en phénobarbital. Ses effets, de ce fait sont difficiles à distinguer de ce dernier. La posologie est de 10 à 15 mg/kg/jour en une ou deux prises en utilisant les comprimés dosés à 250 mg.

La phénéturide, anciennement associé, à doses fixes, au PB et à la PHT dans la Trinuride, reste encore disponible en préparation magistrale.

La phénacémide (Epiclase) a été retiré de la pharmacopée française dans les années 80, comme les diones l'avaient été dans les années 60.

L'orténal, association de 100 mg de phénobarbital et de 5 mg de sulfate d'amphétamine, a été retirée du marché en 1997. Les toxicomanes pouvaient en effet extraire le correcteur amphétaminique afin de l'utiliser à des fins non médicales.

Le progabide (Gabrène) a été commercialisé en 1985 et retiré du marché en 1998, sa toxicité hépatique rendant compte d'un faible volume de prescription.

L'oxcarbazépine (Trileptal) est une prodrogue dans l'organisme en monohydroxy-CBZ. Elle bloque les canaux Na⁺ voltage dépendants (Bouquie et coll., 2010; Vohora et coll., 2010).. Elle est moins inductrice enzymatique que la CBZ, permettant des polythérapies plus faciles. Une hyponatrémie biologique, parfois symptomatique, est cependant fréquente.

L'oxcarbazépine est tolérée que la CBZ, avec une efficacité clinique comparable, ce qui permet d'élèver les doses totales administrées pour un même patient.

La zonizamide, de la famille des sulfonamides, est un inhibiteur faible de l'anhydrase carbonique. Son développement a été interrompu aux Etats-Unis et en Europe en raison d'une incidence élevée de lithiases rénales. L'incidence de cette complication étant très faible au Japon et en Corée ; la zonizamide est commercialisée dans ces pays dans le traitement des épilepsies partielles.

La losigamone présente une structure chimique originale. Ses mécanismes d'action sont peu connus. La molécule est totalement métabolisée et subit l'influence des autres antiépileptiques. La dose utile varie entre 1000 et 1800 mg/j. La molécule est efficace dans les épilepsies partielles, avec des effets secondaires discrets.

La levetiracetam (UBC-L059, Kepra) est un dérivé du piracetam son mécanisme d'action reste inconnue. L'absorption est rapide avec une demi-vie de 5 à 8 heures. Les doses utiles sont comprises entre 2000 et 4000 mg/j. La molécule est efficace dans les épilepsies généralisées aux épilepsies myocloniques.

Le stiripentol a un mode d'action indirect, passant par une interaction favorable avec la CBZ. Ce médicament, développé en France, pourrait de plus avoir des indications privilégiées en neuropédiatrie.

La remacémide, la ralitoline, le prégabalin et de nombreuses autres molécules originales sont en cours de développement préclinique et clinique.

Autres molécules utilisées dans le traitement des épilepsies :

de nombreux médicaments ont démontré une efficacité antiépileptique dans certaines conditions particulières. Les corticoïdes (sous forme d'hydrocortisone, de cortisone ou de tétracosactide) sont utilisés dans certaines encéphalopathies épileptogènes de l'enfant, dans le syndrome de West et dans le syndrome de Landau-Kleffner. Les immunoglobulines humaines peuvent être utiles dans l'encéphalite de Rasmussen. L'acétazolamide (Diamox), inhibiteur de l'anhydrase carbonique, est utilisé comme médicament anti-absence d'appoint et comme adjuvant de la CBZ dans certaines épilepsies partielles.

Malgré l'utilisation courante d'antiépileptiques, la pharmaco-résistance représente un grand défi dans le traitement de l'épilepsie. Chez plus de 30% des patients, les antiépileptiques classiques ne parviennent pas à supprimer les crises d'épilepsie (Perucca et coll., 2007).. La flunarizine (Sibélium), ainsi que d'autres inhibiteurs calciques, peut être utilisée comme d'appoint de certaines épilepsies pharmacorésistantes.

La figure 01 montre la représentation schématique des mécanismes d'actions des antiépileptiques de seconde génération.

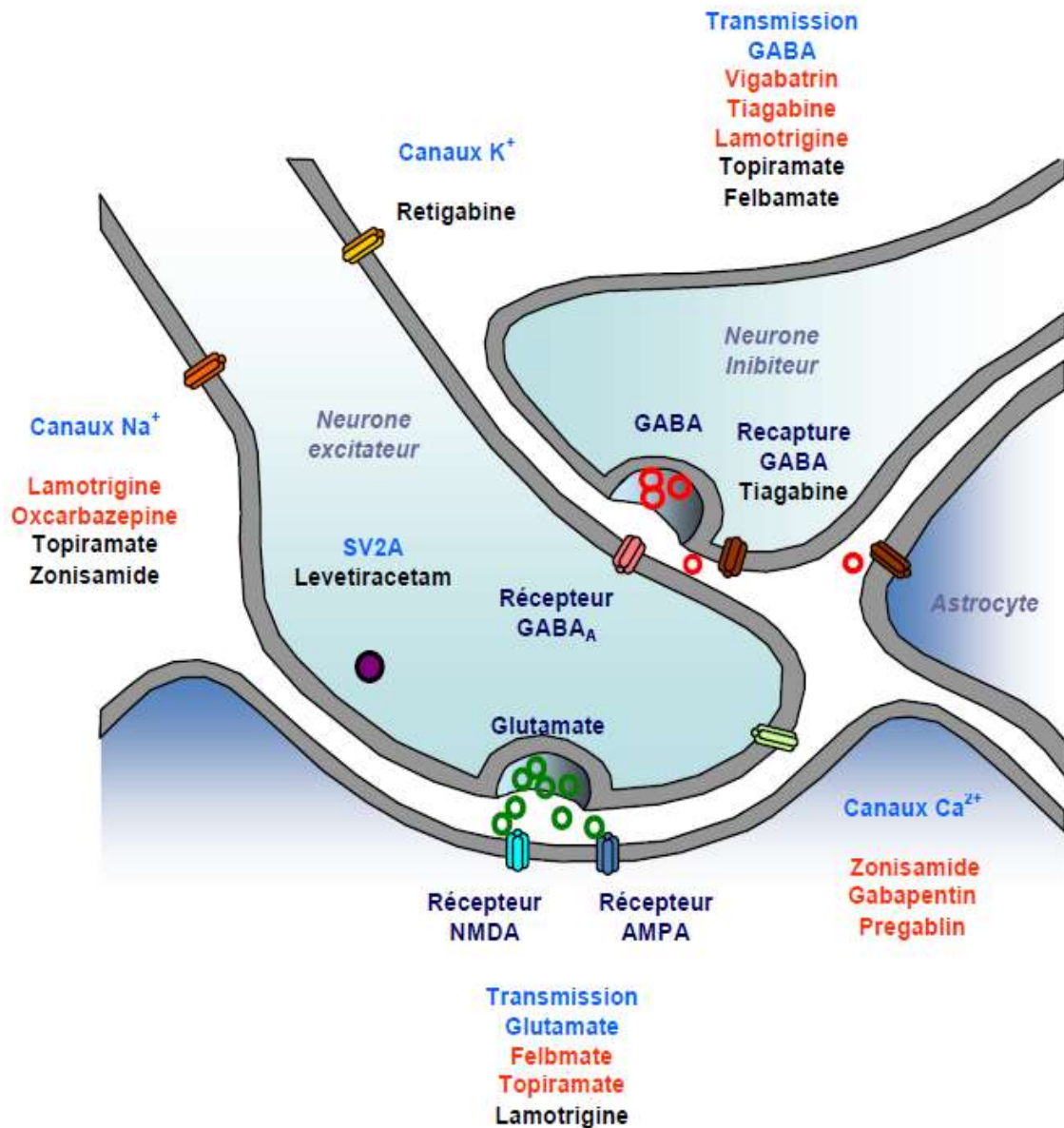


Figure 01: Représentation schématique des mécanismes d'actions des antiépileptiques de seconde génération. Figure adaptée de LaRoche et Helmers, 2004; Beyreuther et coll., 2007.

II.7. CROYANCES MALGACHES SUR LES EPILEPSIES ET LEURS TRAITEMENTS TRADITIONNELS

Selon les croyances traditionnelles malgaches, l'étiologie des maladies mentales et certains troubles du cerveau sont souvent attribués à la sorcellerie (mosavy) à la possession par des esprits mauvais, et au non accomplissement des devoirs aux ancêtres ou à la transgression des tabous (Fady) » (Robinson, 2007). Une maladie grave et une possession des esprits peuvent ainsi résulter de la violation des structures spirituelles.

A notre connaissance, le premier document traitant les croyances et les pratiques ethnomédicales des populations malgaches a été publié dans une thèse de doctorat en médecine en 1901 (Ramisiray, 1901). Selon ces croyances traditionnelles, l'épilepsie (androbe, maladie qui « signifie survenant en plein jour » et des crises convulsives (Fanintona) sont dues aux mauvais esprits qui entrent dans le corps. Ils sont la manifestation de la possession du mal. Ils sont considérés comme contagieux, et la maladie est transmise par la salive. Pour prévenir l'épilepsie, la plume d'un corbeau et une tige de Hazotokana (*Brachylaena ramiflora*) sont brûlés et le cendre est avalé avec de l'eau.

II.8. METHODES D'ETUDES DES ANTICONVULSIVANTS

Les mécanismes physiopathologiques des épilepsies ne peuvent être étudiés de façon approfondie chez l'homme pour des raisons à la fois technique, économique et éthique. La modélisation a donc pour but de reproduire les caractéristiques physiopathologiques principales des maladies afin de comprendre les mécanismes et de tester l'efficacité de nouveaux traitements constituant ainsi une approche pertinente de l'étude des pathologies.

Les antiépileptiques peuvent être étudiés selon deux méthodes : la méthode *in vivo* et la méthode *in vitro*.

II.8.1. La méthode *in vivo*

D'une façon générale, le modèle animal se définit comme une préparation simplifiée (chez l'animal) dans son intégrité qui permet l'étude, dans les conditions de laboratoire, de la physiopathologie et du traitement d'une maladie (Depaulis, 2003). Le choix d'un

modèle répond à plusieurs critères dont l'importance varie en fonction des questions posées: (1) *l'isomorphisme* se traduit par la similitude des symptômes entre le modèle et la traduction clinique de la pathologie; (2) *la prédictivité* est caractérisée par la similitude des profils pharmacologiques entre le modèle et la pathologie; enfin (3) *l'homologie* est définie par la similitude étiologique des mécanismes physiopathologiques (Dantzer, 1986).

Pour induire les crises convulsives chez les souris, on fait recours soit à l'électrochoc soit à des substances chimiques telles que le Penthylenetetrazol (PTZ), la strychnine, la picrotoxine, l'isoniazide, la yohimbine.

II.8.1.1. L'électrochoc (Holmes et al. 2008; Bialer et al. 2010)

L'essai de l'électrochoc a été d'abord utilisé comme une indication des composés efficaces contre le grand mal.

Les crises toniques en extension des membres postérieurs sont induites par des stimuli électriques qui sont supprimées par les antiépileptiques mais aussi par d'autres médicaments actifs sur le SNC.

Des groupes de 6 à 10 souris mâles (18-30 g) sont utilisés. Le test commence 30 mn après l'administration par la voie i.p ou 60 mn par la voie per os du produit à tester.

Un appareil avec des électrodes auriculaires et cornéaires est utilisé pour transmettre le stimulus. L'intensité du stimulus dépend de l'appareil, e.g 12 mA 50 Hz pour 0,2 seconde ont été utilisés. Dans ces conditions tous les témoins font des crises toniques en extension.

Les animaux sont observés pendant 20 mn. La disparition des convulsions toniques en extension des membres postérieurs est utilisée comme un critère positif. Le taux d'inhibition des crises relatives aux groupes contrôles est calculé. En utilisant des doses variées, les valeurs de la DE50 (Dose efficace 50 ou dose permettant de protéger 50% des animaux contre la convulsion) et 95% de l'intervalle de confiance sont calculés.

II.8.1.2. Les produits chimiques

Le Penthylenetetrazol (Métrazole) (PTZ) (White HS 1997; Rho et al. 1999; Bialer et al. 2010).

Le Penthylenetetrazol (PZT) est la 6,7,8,9-tetrahydro-5H-tetrazolo (1,5-a)azepine, (la DCI ou Dénomination Commune Internationale du Metrazol aussi connu sous le nom de pentetrazole.)

C'est un médicament utilisé comme stimulant circulatoire et respiratoire (autre nom commercial : Cardiazole). Les doses élevées provoquent des convulsions. Il a été utilisé dans les états de choc et découvert par le neurologue et psychiatre américano-hongrois Ladislav J. Meduna en 1934. On ne l'a jamais considéré comme efficace, les effets secondaires tels que les crises sont difficiles à éviter. Son approbation par la FDA (Food and Drug Administration) a été révoquée en 1982.

Il est considéré comme un antagoniste gabaergique. Son mécanisme épiléptogène au niveau des neurones est cependant mal éclairci diminuant le temps de rétablissement entre les potentiels d'action en augmentant la perméabilité de l'axone aux ions K^+ .

D'autres études ont montré une augmentation de la perméabilité membranaire à certains ions comme le sodium (Na^+) et le calcium (Ca^{2+}) conduisant à une excitation globale de la membraneneuronale.

Toutefois les caractéristiques pharmacologiques comme la biodisponibilité, le métabolisme, la demi-vie, l'excrétion ne sont pas connues.

En 1939, le PTZ a été remplacé par l'électrochoc comme méthode pour induire des crises dans les hôpitaux pour des malades mentaux en Angleterre.

Cet essai a d'abord été utilisé pour évaluer les substances antiépileptiques. Cependant il a été montré que la plupart des agents anxiolytiques sont aussi capables de prévenir ou d'antagoniser les convulsions induites par le métrazole.

Les souris mâles ou femelles, de poids corporel variant entre 18-22g sont utilisées. La substance à tester ou le médicament de référence est administré en sc, i.p, per os à un groupe de dix animaux.

Le PTZ est administré par voie sous cutanée 15mn après l'administration, 30mn en i.p, 1h en per os à la dose de 60mg/kg. Chaque animal est placé dans une cage individuelle pour être bien observé pendant une période de 1h. Les crises et les convulsions tonico-cloniques sont enregistrées. Au moins 80% des animaux dans le groupe contrôle doivent faire des convulsions.

Le nombre d'animaux protégés dans le groupe traité est calculé comme le pourcentage d'animaux affectés dans le groupe contrôle. Les valeurs de DE50 et latence d'apparition des crises sont calculées en comparaison avec le groupe contrôle.

La Strychnine (Apprison et al., 1996 ; Ghavanini et al., 2005)

L'action convulsivante de la strychnine est due à une interférence avec l'inhibition post-synaptique produite par la glycine.

La glycine est un important neurotransmetteur, inhibiteur des neurones moteurs et des interneurons dans la corde spinale, et la strychnine agit comme un antagoniste sélectif et compétitif qui bloque l'effet inhibiteur de la glycine sur tous ses récepteurs. L'inhibition post-synaptique de la strychnine dans le SNC est aussi produite par la glycine. Les composés qui reversent l'action de la strychnine ont montré des propriétés anxiolytiques.

Protocole :

Les groupes de dix souris males ou femelles de poids compris entre 18 à 22g sont utilisées. Ils sont traités oralement avec le produit à tester ou le produit de référence (e.g diazépam 5mg/kg).

Une heure après, on leur administre la strychnine à la dose de 2mg/kg. Le temps au bout duquel les convulsions apparaissent en extension et la mort est notée pendant une période d'une heure.

Avec cette dose de la strychnine les convulsions doivent être observées chez 80% des animaux du groupe contrôle.

Les valeurs DE50 sont calculées en utilisant des doses variées en prenant le pourcentage du groupe contrôle comme 100%. Les courbes temps/réponse, l'intervalle entre le traitement et l'injection de la strychnine varie de 30 à 120 mn.

L'isoniazide

L'isoniazide précipite les convulsions chez les patients sujets à des crises. Il est considéré comme un inhibiteur de la synthèse du GABA (Costa et al 1975). Les crises tonico-cloniques provoquées chez les souris sont antagonisées par les substances anxiolytiques.

Dix souris des deux sexes de poids entre 18 à 22g sont traitées avec le produit à tester ou le médicament de référence (e.g diazépam 10 mg/kg en i.p) par la voie per os ou i.p. Le groupe témoin reçoit le véhicule.

L'isoniazide 300 mg/kg (acide isonicotinique hydrazide) leur est injecté en sc 30 mn après administration par la voie i.p ou 1h après la voie per os du produit à tester ou le médicament de référence.

L'apparition des crises toniques, cloniques et la mort sont enregistrées pendant les 2h qui suivent.

Le pourcentage des crises ou la mort dans le groupe contrôle est pris comme 100%. La suppression des effets dans le groupe traité est calculée comme le pourcentage du contrôle. Les valeurs DE50 sont calculées.

La Picrotoxine (Mazarati et al., 1992)

Les convulsions induites par la picrotoxine sont utilisées pour une évaluation approfondie des composés actifs sur le SNC.

La picrotoxine est considérée comme un antagoniste des récepteurs GABAergiques qui agit en modifiant la fonction des canaux de transport des ions Cl⁻ du complexe de récepteurs gabaergiques.

Le médicament de référence (e.g diazépam 5 mg/kg en i.p) par la voie per os ou i.p. Le groupe témoin reçoit le véhicule.

On administre aux animaux 3,5 mg/kg de picrotoxine en sc 30 mn ou 1h après l'administration du produit à tester ou le produit standard respectivement par les voies i.p ou per os.

Les symptômes suivants sont observés pendant 30 mn : les crises cloniques, les crises toniques et la mort. Le temps du début des crises et de la mort sont enregistrés.

Pour les courbes temps/réponse les animaux reçoivent le produit 30, 60 ou 120 mn avant la picrotoxine. La protection est exprimée comme le taux d'inhibition relatif par rapport au véhicule contrôle. Le temps avec le plus grand taux d'inhibition est considéré comme le pic de l'activité du produit.

Les valeurs de la DE50 est calculées en prenant le pourcentage des crises dans le groupe contrôle comme 100%.

Chapitre III : GENERALITES SUR LES HUILLES ESSENTIELLES

III.1. DEFINITION

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique (Kalemba, 2003). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits (Burt, 2004), mais également à partir de gommes qui s'écoulent du tronc des arbres. Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation, expression à froid, comme les agrumes (Burt, 2004). De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (Santoyo et al., 2005) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Kimbaris et al., 2006).

III.2. EXTRACTION DES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILES (COVs)

III.2.1. Microextraction en phase solides (SPME)

La micro-extraction en phase solide était initialement une méthode complémentaire d'extraction pour caractériser les COVs, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides, surfactants, organométalliques, organochlorés, amines...). Elle a été développée par Arthur et Pawliszyn 1990 (Arthur et Pawliszyn, 1990), commercialisée en 1993 par Supelco (Bellefonte, PA, USA) et automatisée en 1996 par Varian (passeur automatique d'échantillons). Ensuite elle a été adaptée l'analyse d'autres matrices telles que les sols, les matériaux biologiques et plus récemment l'air.). Son champ d'application ne cesse de s'élargir vers les autres domaines comme l'agro-alimentaire, la médecine, la pharmacie et l'environnement. (Pawliszyn, 1999 ; Kataoka et coll., 2000).

III.2.1.1. Base physico-chimique de la SPME

a-Propriété

En utilisant les méthodes conventionnelles, on risque de perdre des composés pendant les différentes étapes d'extraction et de concentration (Stashenko et coll., 2007). Par contre la SPME regroupe les étapes de prélèvement, de traitement de l'échantillon (extraction, concentration et transfert au chromatographe via une désorption thermique) en un seul procédé. Ainsi elle diminue les pertes et les erreurs pendant les processus d'échantillonnage en plusieurs étapes. En particulier, elle constitue une meilleure méthode pour les analyses nécessitant une extraction longue et coûteuse et une grande consommation de solvants (Pawliszyn, 2011).

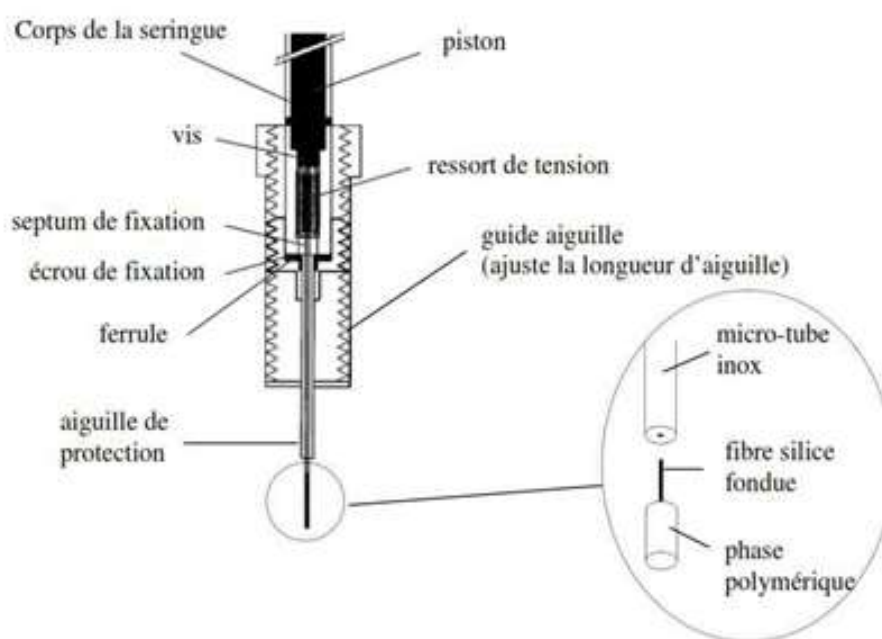


Figure 02 : Dispositif SPME (Pawliszyn, 2000)

La SPME est constituée d'une fibre en silice fondue (1 à 2 cm de long) dont une partie est insérée et maintenue dans un micro-tube en acier inoxydable (Figure 03). L'autre partie de la fibre est recouverte d'une phase polymérique, comme le montre la Figure 02, pour extraire les composés organiques d'un échantillon (Burgot et Pellerin, 2003). Introduit dans une aiguille inox, le micro tube fonctionne alors comme un piston et permet ainsi au polymère soit d'être exposé à la matrice pour l'extraction ou d'être protégé lors du stockage par

exemple. L'ensemble est supporté par une seringue modifiée permettant une utilisation plus aisée.

b-Principe et fonctionnement de la SPME

L'opération consiste à mettre en contact une petite quantité de la phase polymérique associée à un support solide avec la matrice de l'échantillon pour un temps prédéterminé, permettant ainsi le transport de la substance à analyser à partir de la matrice vers la phase polymérique. Un équilibre de concentration entre la matrice de l'échantillon et le revêtement de la fibre est atteint lorsque le temps de contact est suffisant. Dans cette condition, exposer la fibre plus longtemps avec la matrice n'accumulera pas plus d'analytes.

c -Conditions de l'analyse SPME

La mise au point analytique nécessite l'optimisation de différents paramètres d'extraction (nature de fibre température, temps d'extraction, effet de sel, , pH,...) et de désorption (Cortazar *et al.*, 2002)..

d- Choix de revêtement de la fibre

Le choix d'un revêtement de fibre (phase polymérique) approprié est fonction de la nature des analytes recherchés (polarité et de la volatilité). Il y donc une certaine affinité entre polymère et analyte qui joue un rôle important sur la sensibilité de la technique (Burgot et Pellerin, 2003 ; Prikryl et Sevcí, 2008 ; Bartelt, 1997). L'adsorption ou l'absorption se produit si les revêtements sont respectivement solides ou liquides lors de l'extraction des analytes à partir de l'échantillon. Il existe 4 groupes de revêtements de fibres disponibles sur le marché :

- Les revêtements monophasés comprenant qu'une seule couche de polymères liquides purs : le polydiméthylsiloxane (PDMS), le polyacrylate (PA),
- Les revêtements à phases mixtes contenant un film mixte de polymères liquides et de particules solides : le PDMS/divinylbenzène (PDMS/DVB), le Carboxen/PDMS (CAR/PDMS), le Carbowax/DVB (CW/BVD),
- Les fibres « sandwich » : le DVB/CAR/PDMS.

- Carbowax/template resin (CW/TPR) : une fibre spéciale pour HPLC. (Mester et Coll., 2001 ; Mester et Coll., 2005 ; Tuduri, 2002)

Tableau 03 : Les différents types de fibres disponibles

Revêtement	Epaisseur (μm)	Nature des composés extraits		T° maximale d'utilisation	Matériels compatibles
		Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Polarité		
PDMS	100	60-275	apolaire	280°C	CPG/HPLC
	30	80-500	apolaire	280°C	
	7	125-600	peu polaire	340°C	
PDMS /DVB	65	50-300	polaire	270°C	CPG
	60	50-300	polaire		HPLC
PA	85	60-300	très polaire	320°C	CPG/HPLC
CAR/PDMS	75	30-225	apolaire	320°C	CPG
CW/DVB	65	40-275	polaire		GC
CW/TPR	50		très polaire	260°C	HPLC
DVB/CAR/PDMS	50/30	40-275	peu polaire	270°C	CPG

Les temps d'extraction peuvent être très différents selon le revêtement polymérique utilisé. Les mélanges de phases peuvent être utilisés pour augmenter les capacités de rétention des fibres (Roberts et Coll., 2000).

e-Choix du mode d'extraction

La méthodologie SPME inclut deux modes d'extraction principaux :

- Une extraction directe ou par immersion où la fibre est immergée directement dans le liquide et les analytes se partagent entre la fibre et l'échantillon liquide. En général, les analytes polaires, semi-ou non-volatils sont extraits par ce mode (King *et al.*, 2004; Luan *et al.*, 2007; Rianawati et Balasubramania, 2009).
- Une extraction de l'espace de tête ("headspace") où la fibre est exposée dans l'espace de tête au dessus de l'échantillon. Dans ce processus, deux équilibres interviennent : l'équilibre échantillon-phase gazeuse et l'équilibre phase gazeuse-fibre. Ce mode est largement utilisé

pour l'extraction des composés volatils et apolaires (Harris *et al.*, 1999; Jaraula *et al.*, 2008; Llompart *et al.*, 1998).

Après l'extraction, la fibre est rétractée dans l'aiguille, retirée de l'échantillon et désorbée thermiquement directement dans un injecteur de chromatographe en phase gazeuse pour les composés volatils ou semi-volatils (Bianchin *et al.*, 2012; Globig et Weickhardt, 2005; Popp *et al.*, 2000). Pour les composés à faible volatilité ou thermiquement instables, la désorption s'effectue par un lavage avec des solvants organiques appropriés à la chromatographie en phase liquide (Chen et Pawliszyn, 1995; Lord et Pawliszyn, 2000).

(Chen, 2004)

III.3. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

Les H.E jouent de multiples fonctions au sein des plantes telles que :

- la protection contre les prédateurs de la plante (insecticide) (Al Moussawi et Al-Naib, 1975)
- l'attraction des insectes pollinisateurs. (Al Moussawi et Al-Naib, 1975)
- l'inhibition de la multiplication des bactéries et des champignons.
- l'inhibition de la germination et de la croissance des mauvaises herbes (Morrow et Fox, 1980).

Par ailleurs, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent leur confère des rôles et propriétés biologiques.

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani et al, 1999). Plus récemment, des études ont montré que les huiles essentielles de *Chromoleana odorata* et de *Mikania cordata* inhibent la lipoxycgénase L-1 de soja, modèle de la lipoxycgénase humaine (5-LO) impliquée dans les processus de l'inflammation (Bedi et al., 2004). Ensuite, dans une autre étude, il a été montré que celles de *Chromoleana odorata* exercent une inhibition sur la fonction Cyclooxygénase de la Prostaglandine H-synthétase (Bedi et al, 2010). Enfin, les mêmes auteurs ont montré que les huiles essentielles de *Cymbopogon giganteus*, *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus citriodora* avaient des activités inhibitrices sur la cyclooxygénase (Bedi et al, 2003).

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de *Melaleuca alternifolia* (Burt, 2004) ont été décrites. L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* (Barel et al., 1991), *A. terefolia*

(Unlu et al., 2002) et *A. milefolium* (Candan et al., 2003), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mis en évidence.

Certaines huiles essentielles comme *Aquilaria crassna* présentent des activités anti-tumorales (Dahham et al., 2016) et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle isolée des graines de *Nigella sativa* L. montre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération des métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek et al., 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant des cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa et al., 2004).

D'autres applications médicales ont été également rapportées. Les travaux réalisés par Oussou (2009), ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de *Ocimum canum* à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol, ceux de Monti et al., (2002) ont montré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles comme l'oestradiol. Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement (Umezu, 1999) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction de certaines drogues, comme la nicotine (Zhao et al., 2005).

Azanchi et al., (2017) ont montré l'activité anticonvulsivante de *Citrus aurantium*.

Le tableau 04 montre les principales vertus médicinales de quelques huiles essentielles extraites des plantes aromatiques endémiques de Madagascar.

Tableau 04 : Propriétés des quelques HE des plantes endémiques de Madagascar [Michat, 2006]

Dénomination	Principaux constituants	Propriétés	Usage traditionnel
HE D'ANZETY (<i>Vepris madagascariensis</i> , Baillon, H. Perrier)	α -pinène, p-cymène, eugénol, methyleugénol, et estragole	Antiseptique, analgésique	Douleurs de tous types musculaires et articulaires, infections digestives.
HE DE COMBAVA (<i>Citrus hystix</i> , DC)	S-citronnellal	Bactéricide, dépurative, carminative, vermifuge, astringente, tonique, stimulante.	Infections pulmonaires, intestinales, parasites intestinaux, entretien de la peau, des cheveux et des phanères (ongles).
HE D'HELICHRYSSE (<i>Helichrysum gymnocephalum</i> , (A.DC), Humbert)	1 -8 cinéole (>70 %), α et β pinènes	Anti-infectieux, anti-inflammatoire, régulateur endocrinien et digestif, antalgique	Coups, meurtrissures, varices, couperose, cicatrices, crevasses, prévention des oedèmes traumatiques (interventions dentaires), polyarthrites, perturbations du cycle, piqûres de guêpes et d'insectes
HE DE IARY (<i>Psiadia altissima</i> , (DC), Berth et Hook)	mono et sesquiterpènes plus de 90% ; monoterpènes : β - pinène (50 à 60 %), l' α - pinène, le sabinène, le limonène, le myrcène ; Les sesquiterpènes : β - caryophyllène, germacrène D	Anti- inflammatoire, stimulant respiratoire et énergétique	Soins de la peau, démangeaisons, psoriasis, éloigne les parasites (puces, poux).

HE DE ISSA (<i>Rhus taratana</i> , Bak)	monoterpènes (90 %)	Décongestionnant veineux	Stimule la circulation, possède un effet décongestionnant veineux.
HE DE KATRAFAY (<i>Cedrelopis grevei</i> , Baill)	β - carryophyllène, α - copaène, germacrène D	Anti-inflammatoire, anti-douleurs, fortifiant, tonique physique et sexuel, vasodilatateur.	Maux de dos, douleurs, rhumatismes et traumatismes, fatigue.
HE DE MANDRAVASAROTRA (OU SARO) (<i>Cinnamosma fragrans</i> , Baill.)	1–8 cinéole, α -pinène, sabinène, α - - terpinéol	Antiviral, expectorant, antifongique, stimulant immunitaire, antispasmodique calmant de la toux, neurotoxique, antiparasitaire, antibactérien.	Infection virales et bactériennes des voies respiratoire, gripes, rhumes, sinusites, otites, bronchites, angines, infections urinaires, infections bucco – dentaires, asthénies, amibiases, dépressions nerveuses.
HE DE SOUCI (<i>Calendula officinalis</i> , L.)	α -cadinol, terpènes complexes, saponines	Vasodilatateur local, régénérateur du tissu cutané, régulateur des fonctions hépato- bilaires et intestinales, calmant	Inflammations et maladies de la peau, plaies, contusions, blessures, dermatites, engelures, hémorroïdes, veines variqueuses.

III.4. COMPOSITIONS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

III.4.1. Les constituants des huiles essentielles

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (Buchanan et al., 2000). La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C₅), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C₁₀) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesquiterpénoïdes (C₁₅) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles.

Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (Figure 03).

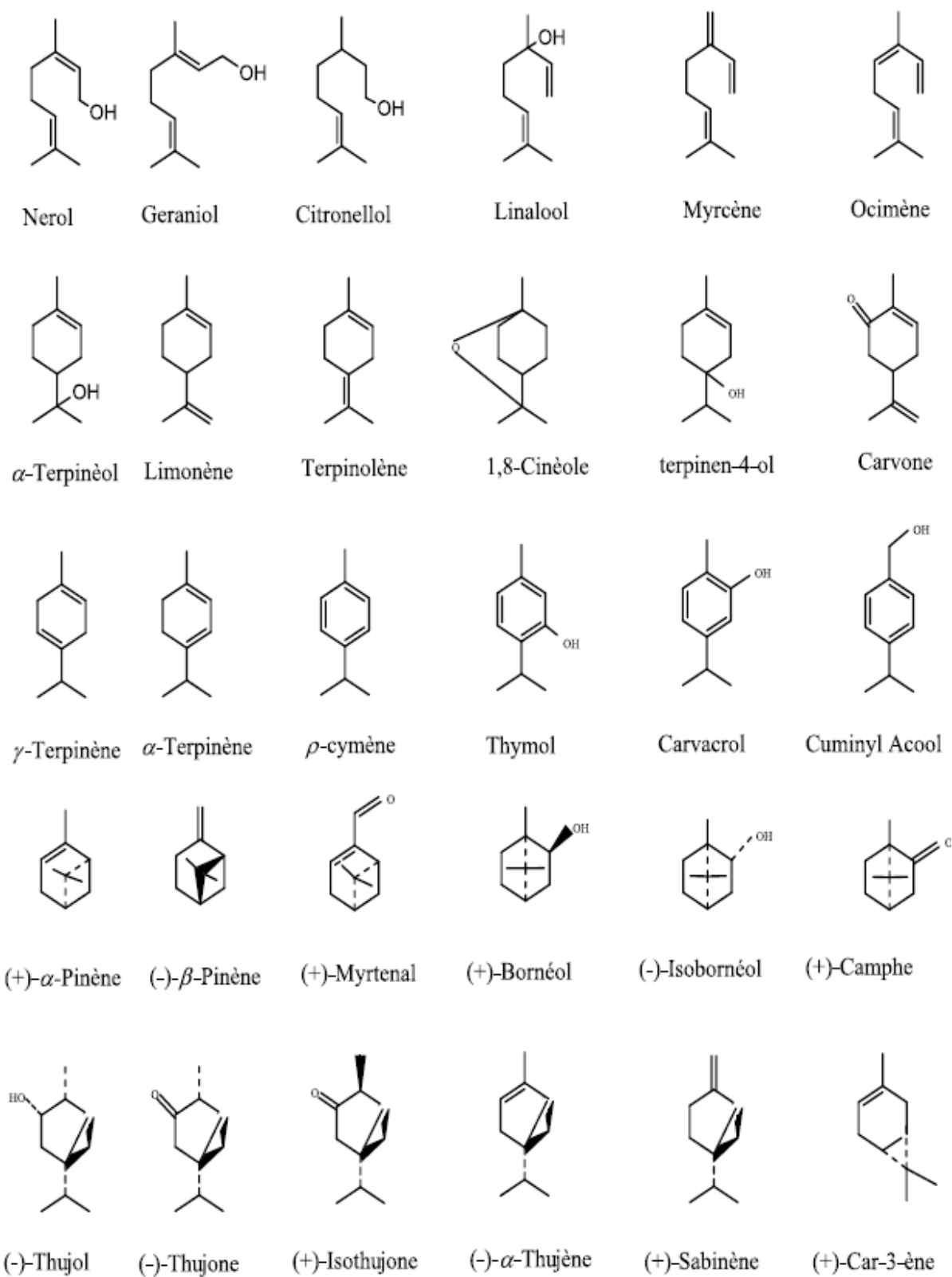


Figure 03: Exemples des monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques [Loomis & Croteau, 1980]

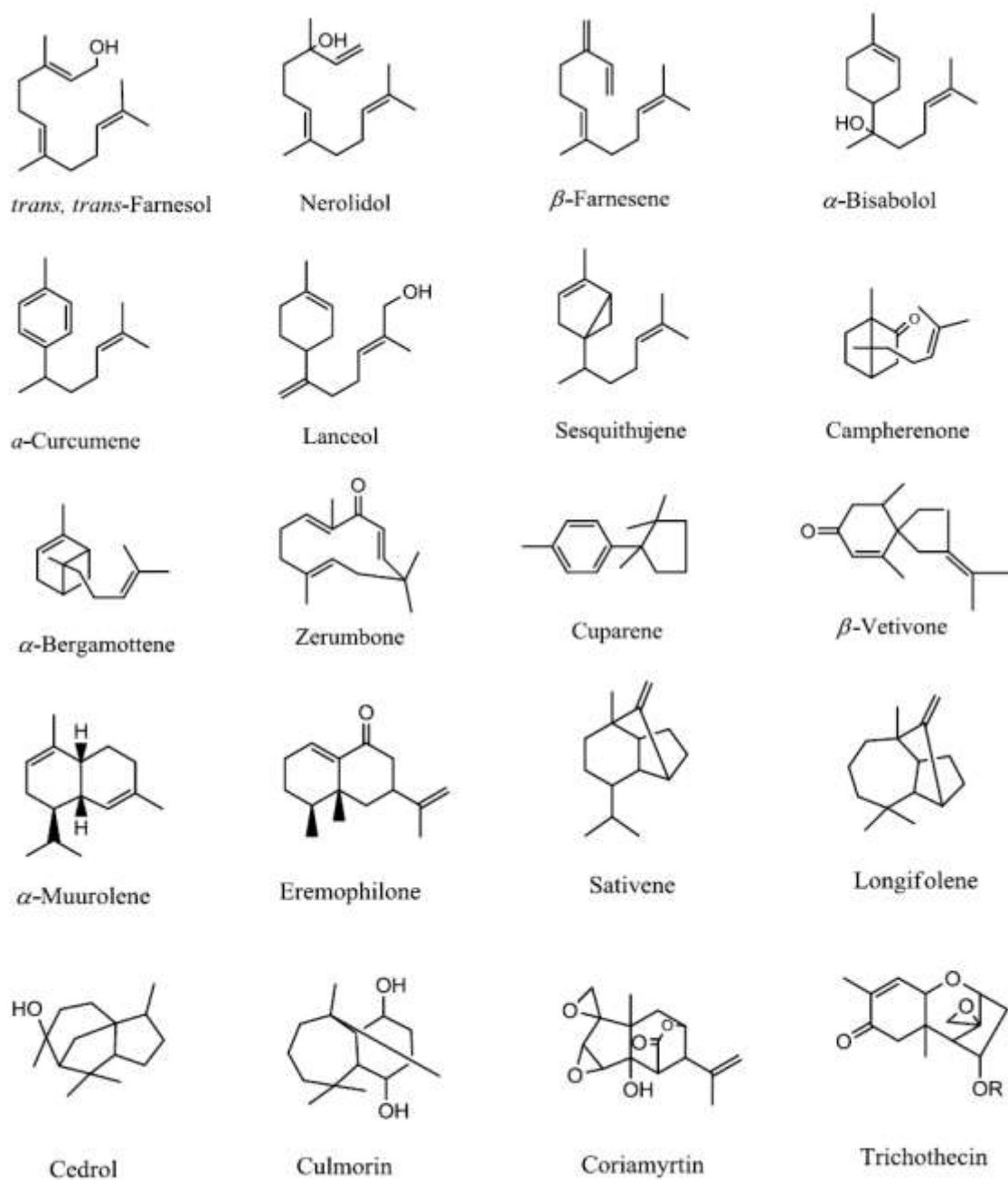


Figure 04 : Les principaux sesquiterpènes des HE

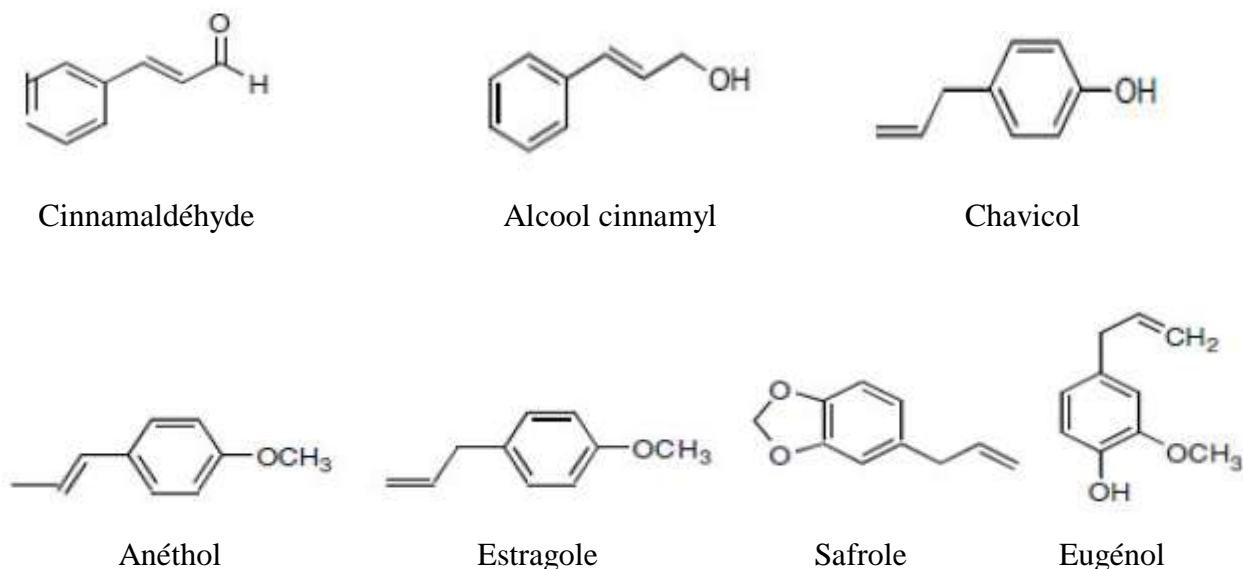


Figure 05: Quelques composés aromatiques

III.4.2. Composition chimique et variabilité

Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles ont été décrites. Elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis et al., 2002 ; Gonny et al., 2004 ; Burt, 2004 ; Boti et al., 2006, Oussou et al., 2009). L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Tomi et al., 2006).

Au sein d'une même espèce la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente : on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes. Le cas de *Chromoleana odorata* qui présente divers chémotypes, on peut citer ceux de la Côte d'Ivoire (α -pinène, géijérène et prégeijérène) (Bedi et al, 2001), du Benin (α -pinène, prégeijérène, géijérène, β -pinène et germacrène-D) (Avlessi et al., 2012) de la Chine (β -caryophyllène, δ -cadinène, α -copaène et oxyde de β -caryophyllène) et du Cameroun (α -Pinène et p-cymène). On peut aussi citer *Ageratum conyzoides* qui présente trois chémotypes : un chémotype à précocène I, un

chémotype à précocène I et précocène II, un chémotype à précocène II et à 6-méthoxyagératochromène (Nébié et al., 2004).

Kouamé en 2012 a démontré que le rendement en huile essentielle de *Chromoleana odorata* diffère avec la période et la zone de récolte. Il a également observé un seul et même chemotype sur l'ensemble des 5 sites. Ce chémotype est dominé par les sesquiterpènes germacrène-D (15,3-20,0%), géijérène (14,1-16,9%), prégeijérène (10,7-1β,γ%) et β-caryophyllène (7,5-9,7%) et le monoterpène α-pinène (7,6-10,3%) et identique à celui décrit dans la littérature (Bedi, 2001).

III.4.3. Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie (Roulier, 1992). Les HE sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (Kato et al., 1990; Schwartz et al., 1992; Sourai, 1989). La listerine, solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol, possède une grande activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (Kato et al., 1990). Les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires.

III.1.3.4. Caractéristiques économiques

Les huiles essentielles sont utilisées pour leur saveur et leur arôme dans plusieurs types de produits (produits pharmaceutiques, cosmétiques, insecticides, vétérinaires, boissons, etc ...). En aromathérapie, elles sont utilisées pour diverses indications thérapeutiques, notamment

pour leurs activités antibactériennes, le traitement de la toux et des affections respiratoires, la stimulation ou l'inhibition du système nerveux, et pour leur effet sédatif. Il existe une forte demande de ces produits dans les pays développés. Cette industrie peut donc apporter une importante contribution au développement économique d'un pays comme Madagascar. Des technologies relativement simples, comme l'utilisation d'équipement de distillation, de fabrication artisanale, et de techniques culturelles maîtrisable par des experts locaux peuvent être adoptées. La fluctuation des prix, qui est un phénomène fréquent dans ce secteur, peut être aussi atténuée en respectant la constance de la qualité.

Selon la littérature, le taux d'endémicité des plantes aromatiques est de 20% et la majorité des plantes à huile essentielle à valeur commerciale comme l'Ylang-Ylang, les clous de girofle, la cannelle, le poivre etc, ne sont pas endémiques de Madagascar [Rasoanaivo & De La Gorce, 1998]. Ainsi, les travaux scientifiques et l'exploitation de leur potentiel économique sur ce sujet sont largement insuffisants. La raison est la focalisation des sociétés exportatrices des huiles essentielles sur les huiles traditionnelles et faciles à vendre sur le marché internationale.

Pour résoudre le problème, il est très important de diversifier la production d'huile essentielle et d'étudier des nouvelles huiles essentielles tant sur le plan scientifique que commercial.

C'est la raison pour laquelle nous avons étudié une plante aromatique et endémique de Madagascar mais très rarement citée dans des revues scientifiques qui est « *Myrothamnus moschatus*, (Myrothamnaceae) »,

Ce projet, en collaboration avec l'Université de Camerino, vise à analyser la composition chimique de l'huile essentielle de 5 stations écologiques de cette plante, étudier l'activité anticonvulsivante et neuroprotectrice de chaque échantillon de l'huile de ces 5 sites.

L'intégrité de l'usage traditionnel de la plante avec la technique de la science moderne pourrait conduire à la découverte d'un nouveau médicament permettant à conserver la biodiversité et à alléger la pauvreté de malgache.

Chapitre IV : MATERIELS ET METHODES

IV.1. TRAVAUX ETHNOBOTANIKES SUR TERRAIN

IV.1.1. Enquêtes ethnobotaniques

Dans le cadre du projet ICSN/CNRS, des enquêtes ethnobotaniques ont été menées dans différentes régions de Madagascar, auprès des villageois et des tradipraticiens. Elles étaient basées sur des interrogations directes portant sur les noms, les usages des plantes dans la médecine traditionnelle, le mode de préparation, la partie utilisée.

IV.1.2. Collecte de *Myrothamnus moschatus*

Nous avons récolté *Myrothamnus moschatus* puisque son utilisation traditionnelle durant l'enquête ethnobotanique concerne les troubles du cerveau. La collecte a été effectuée en Janvier 2010, pendant la période de floraison de la plante, dans la région d'Ihorombe plus précisément à Ifandana. Cette collecte a été faite par l'équipe de l'IMRA (Figure 08). Deux herbiers ont été confectionnés sur place pour l'identification de la plante. L'un pour l'identification taxonomique au sein du département de botanique du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza d'Antananarivo et l'autre pour déposer dans l'herbarium de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées. Un code MAD0013/RECs a été attribué à chaque herbier et le nom vernaculaire, la date de récolte, les remarques sur l'odeur de la plante et les noms des collecteurs ont été enregistrés.



Figure 06 : Collecte de *Myrothamnus moschatus* à Ifandana.

Deux ans après la récolte de *Myrothamnus* dans cette partie sud de Madagascar, nous avons vu et appris, toujours pendant les enquêtes ethnobotaniques, que *Myrothamnus moschatus* pousse également à l'état sauvage dans d'autres régions à Madagascar. Cependant les usages dans la médecine traditionnelle varient d'un endroit à l'autre. Ceci nous a conduits à récolter cette plante dans différentes régions écologiques de Madagascar en vue de vérifier l'éventuelle variation de la composition chimique de *Myrothamnus moschatus* en fonction de l'origine géographique des échantillons ou chémotype. Ainsi la collecte a été réalisée sur 5 sites différents de Madagascar (figure 07) dont Ifandana (Ihosa), Ambohiboroana (Ambalavao), Ambondromisotra (Ambositra), Angavokely (carrion) et Ambatofotsy (Antananarivo atsimondrano). Les coordonnées géographiques de chaque endroit ainsi que les noms vernaculaires et les utilisations traditionnelles de chaque échantillon ont été enregistrés. (Tableau 05)

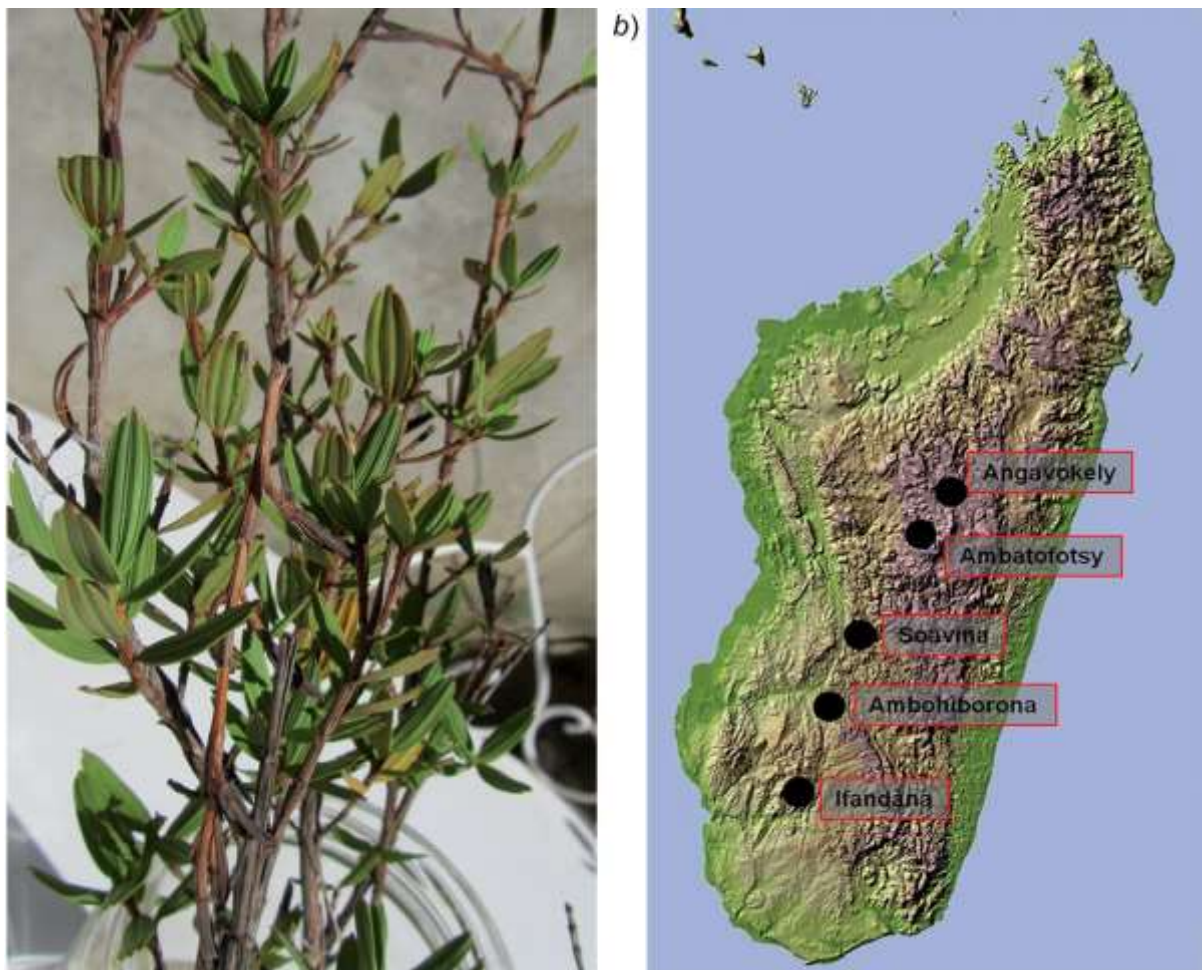


Figure 07. a) *Myrothamnus moschatus* pendant la saison humide.

b) Sites de collecte *Myrothamnus moschatus*

IV.2. TRAVAUX AUX LABORATOIRES

IV.2.1. Description botanique de *M. moschatus* (Millogo-Rasolodimby, 1991)

C'est un arbrisseau ou arbuscule de 0.2-1 m de haut avec des rameaux opposés, nombreux et courts, ouverts par les gaines foliaires. Les Feuilles sont subsessiles, opposées-décussées ; les stipules spiniformes, pouvant atteindre 10 mm de long ; de limbe plissé longitudinalement, ayant sur le dessus 2 profonds canalicules, correspondant à 2 fortes côtes sur la face inférieure, long de 8-15 mm sur 3-5 mm de large, en coin à la base, denté dans la partie apicale, parsemé de minuscules ponctuations glanduleuses sur les 2 faces ; les nervures longitudinales, parallèles, s'atténuent au niveau de chaque dent ; des glandes sécrétant des substances à odeur de musc sont présentes au niveau des crénelures.

Les inflorescences sont terminales et en épis ; les fleurs sont opposées-décussées puis verticillées ; les bractées sont assez développées et représentant la partie sommitale du limbe c'est-à-dire avec une paire de dents de chaque côté de la nervure médiane saillante sur la face inférieure ; les bractéoles 2, mucronées, plutôt rapprochées de la bractée que de l'axe de la fleur. Fleurs mâles, sans calice ni corolle ; étamines 3-4, à filets libres, très courts, longs de 1 mm ; anthère biloculaire, obovale, apiculée au sommet, longue de $\pm 1,5$ mm, à déhiscence latérale, après libération du pollen elle prend la forme d'un X ; pollen en tétrades tétraédriques, à exine lisse ; gynécée nul. *Fleurs* ♀ également sans périanthe, sans androcée ni trace de staminodes, à 3-4 carpelles soudés par leur angle interne ; styles courts, libres, un peu courbés au sommet ; stigmate \pm triangulaire, papilleux, situé sur la face interne du style ; ovules nombreux, bisériés, orthotropes au milieu et anatropes au sommet du carpelle ; placentation axile.

Le fruit est un follicule, une graine à albumen copieux.

Espèce endémique de rochers dénudés et ensoleillés des Hauts Plateaux et des reliefs du Sud de l'île.

Floraison : fleurs ♂ de janvier à mars et de juillet à décembre ; fleurs ♀ de janvier à février et d'octobre à décembre. Fruits de février à mars et de juillet à octobre.

La famille Myrothamnaceae ne comprend qu'un seul genre, *Myrothamnus*, et deux espèces: *M. flabellifolia* originaire d'Afrique du Sud, et *M. moschatus* (Synonyme *Myosurandra moschata* Baillon) endémique à Madagascar. Il pousse sur des sols granitiques peu profonds et est soumis à la sécheresse pendant les mois d'hiver et les saisons sèches. Il appartient aux

plantes de résurrection. Les espèces de résurrection sont des groupes de plantes terrestres et par des moyens divers, peuvent se remettre de la dessiccation complète. Ces plantes sont désignées " la dessiccation tolérante " et ont la capacité remarquable de survivre à l'état sec pendant des mois lors d'un stress par sécheresse sévère. Cependant, lors de l'arrosage, la plante retrouve ses fonctions physiologiques et métaboliques normales et devient pleinement fonctionnelle dans les 48 heures [Scott, 2000]. La tolérance de dessiccation du tissu végétatif est un phénomène trouvé partout dans le règne végétal [Bewley & Krochko, 1982].

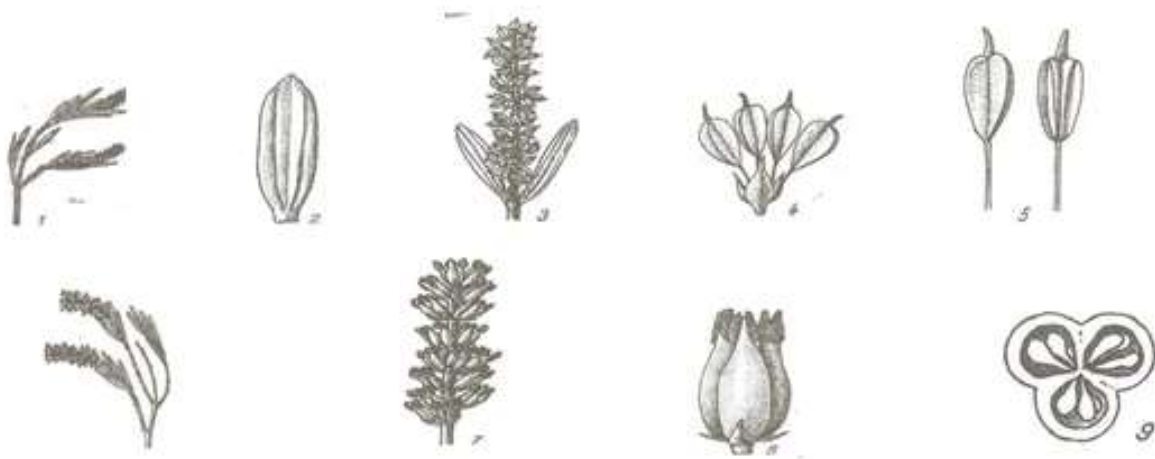


Figure 08 : *Myrothamnus moschatus* : **1.** Rameau florifère ♂ x 2/3 ; **2.** Feuille x 3 ; **3.** Inflorescence ♂ x 2 ; **4.** Fleur ♂ x 10 ; **5.** Étamine de dos et de face x 14. ; **6.** Rameau florifère ♀ x 2/3 ; **7.** Inflorescence ♀ Feuille x 2/3 ; **8.** Fleur ♀ x 8 ; **9.** Coupe transversale de l'ovaire x 10 [Millogo-Rasolodimby, 1991]



Figure 09 : *Myrothamnus moschatus* collecté en Janvier 2010.

(Cliché de l’auteur)

IV.2.2. Etude phytochimique

IV.2.2.1. Extraction de l’huile essentielle

Pour extraire l’huile essentielle de *Myrothamnus moschatus*, 6 kg des parties aériennes ont été placées sur une grille métallique dans un alambic et cet ensemble est porté à l’ébullition pendant 3 heures et les huiles essentielles sont entraînées à la vapeur. Après condensation et

liquéfaction, l'huile surmontant l'eau (non miscible) a été séparée de l'eau (hydrolat) par décantation dans une ampoule à décanter, l'huile obtenue a été mesurée puis séchée avec Na_2SO_4 anhydre et conservée dans un flacon à une température de -20°C avant l'analyse.



Chargement de la plante dans l'alambic



Distillation

Figure 10 : Extraction des HE de *Myrothamnus moschatus*

IV.2.2.2.Extraction de l'hydrolat

La phase aqueuse ou l'hydrolat a été soumise à un partage liquide-liquide en utilisant 1500 ml d'hexane. La fraction organique ainsi obtenue a été concentrée au rotavapor. (figure 11)



Figure 11 : Extraction des hydrolats de *Myrothamnus moschatus*

IV.2.2.3. CPG de l'huile essentielle

Les échantillons d'huile essentielle ont été analysés en CPG, dans un même appareil, suivant les mêmes conditions. La chromatographie en phase gazeuse (GC) a été réalisée à l'aide d'un chromatographe (GC 8000 TOP CE), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et une colonne Rtx-WAX (30m x 0,25 mm x 0.25µm épaisseur du film). Cet appareil est assisté par un ordinateur utilisant le logiciel Chrom-card pour le traitement des données par comparaison des indices de rétention avec les banques des données de l'IMRA. L'hydrogène a été utilisé comme gaz porteur. La programmation de la température du four a été de 50°C à 250°C avec un gradient de température de 5°C/mn. La température de l'injecteur et du détecteur a été fixée à 255°C.

IV.2.2.4. CPG-FID

Produits de références utilisés :

Pour identifier les constituants des échantillons d'huile essentielle, leurs comportements de séparation ont été déterminés afin de calculer leurs indices de rétention et les facteurs de réponses. Pour cela, des molécules de références achetées chez Sigma-Aldrich (Milan, Italie) ont été utilisés. L'hexane a été choisie comme solvant d'analyse. Le tableau 05 rapporte ces conditions expérimentales.

Tableau 05 : Détermination de la chromatographie CPG/FID, le facteur de rétention

Groupe des composés	R^{2a}	Pente ^b	RF \pm SD ^c
Monoterpènes hydrocarbonés			
β -Pinene	0.999	1.00	1.10 \pm 0.08
Limonene	0.999	1.16	
γ -Terpinene	0.999	1.09	
Monoterpènes aromatiques			
<i>p</i> -Cymene	0.998	1.09	1.09 \pm 0.00
Acetates monoterpénoidiques			
acetate d'Isobornyl	0.998	1.45	1.45 \pm 0.00
Monoterpènes oxygenés			
<i>trans</i> -Pinocarveol	0.998	1.45	1.44 \pm 0.10
1,8-Cineole	0.999	1.34	
Terpinen-4-ol	0.998	1.39	
Carvone	0.997	1.58	
Sesquiterpene hydrocarbonés			
(<i>E</i>)-Caryophyllène	1.000	0.95	1.05 \pm 0.14
α -Humulène	0.999	1.15	

^a R^2 , coefficient de régression linéaire

^bPente de régression linéaire de l'équation de la courbe de chacun des composés de référence normalisées

^cFacteur de réponse (RF) pour une classe volatile ; la moyenne des pentes de régression linéaire des composés représentatifs appartenant à cette classe

Analyses chimiques des huiles essentielles par CPG/FID et CPG/MS :

La chromatographie en phase gazeuse (GC) a été réalisée à l'aide d'un chromatographe « Agilent 4890D » (figure 12), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et une colonne capillaire HP-5 (5% phenylmethylpolysiloxane ; (25m x 0,32 mm, df: 0,17 μ m)) avec un débit de 1.4 mL/min. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur. La température du four a été programmée à partir de 60 ° C à 220 ° C à raison d'une montée de 4°C/min, puis de 280 ° C pendant 15mn à raison de 11° C / min.

L'identification des composés a été réalisée par calcul des indices de rétention ou Indices de Kovats en utilisant un mélange d'hydrocarbures aliphatiques (C8-C30) (Sigma, Milan, Italie) dans l'hexane, directement injecté entre l'injecteur CPG.

Les échantillons d'huile ont été dilués 1:100 dans l'acétone et injectés au volume de 1 μ l. L'analyse a été réalisée trois fois. Les données ont été traitées au moyen d'un logiciel HP3398A GC Chemstation (Hewlett-Packard, Rev A 01.01).



Figure 12 : HS-GC-FID Agilent 4890 utilisé pour l'analyse des composés volatils

L'analyse CPG/SM d'huiles essentielles a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Agilent 6890N équipé d'une colonne capillaire 5MS (5% phenylmethylpolysiloxane ; (30 m x 0,25 mm x 0,1 μ m épaisseur du film d'épaisseur)), directement couplée à un spectromètre de masse 5973N. Le programme de température précédent a été utilisé. La température de l'injecteur et du détecteur est fixée à 280 ° C. Le gaz vecteur était l'Hélium avec un débit de 1ml/min. Avant l'injection d'un volume de 2 μ l, les échantillons d'huile essentielle ont été dilués 100 fois dans l'acétone. L'analyse a été faite en triplicate. L'ionisation a été effectuée par impact d'électrons à 70 eV. L'appareil est équipé

d'un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse utilisant le logiciel ChemStation MSD (Agilent, version G1701DA D.01.00).

IV.2.2.5. Analyse SPME de la fumée et des feuilles de *Myrothamnus moschatus*

L'utilisation traditionnelle de *M. moschatus* par inhalation de la fumée pour le traitement de la convulsion nous a conduits à étudier la composition chimique de la fumée par SPME.

a- Broyage de l'échantillon

Cinquante grammes des feuilles séchées de la plante ont été broyées à l'aide d'un broyeur de marque Mill MFC DCFH48 IKA-WERK (Culatti, 220 V, 1,5 A, 95 WL, Kb 15 min). Un tamis moyen de 2 mm de diamètre a été choisi pour obtenir une poudre plus grossière (figure 13). La vitesse de l'outil de meulage a été programmée à la vitesse minimale afin d'éviter la perte des composés les plus volatils sous l'effet de la chaleur produite par le frottement.



Figure 13: Broyage des feuilles de *M. moschatus* à l'aide d'un broyeur de marque MFC DCFH48 IKA-WERK.

Dix milligramme de poudre recueillie à l'aide d'un erlenmeyer en verre de 100 ml a été prélevée et mise dans un flacon de 4 ml pour l'analyse SPME des composés volatils émis à

partir des feuilles à la température ambiante. Le reste de poudre a été servi pour la simulation de l'utilisation traditionnelle de la population du sud de Madagascar de cette plante

b- Analyse de la « fumée active »

La production de la fumée active (la fumée produite lorsqu'on fume une cigarette) a été simulée pour analyser les substances volatiles responsables de l'activité biologique de la plante lorsqu'elle est fumée. Pour cela, les composés volatils émis par la combustion des feuilles ont été concentrés sur la fibre PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, Etats-Unis, 100 µm d'épaisseur) d'une seringue d'un petit appareil SPME.

Deux séries de simulations ont été réalisés à la température ambiante et à 37°C pour reproduire autant que possible la température au niveau des poumons.

b-1- Analyse de la « fumée active » à la température ambiante

L'appareil comprend 3 parties (Figure 14) :

1. Une chambre de combustion formée par un tube de verre ayant un diamètre extérieur de 2 mm et un diamètre intérieur de 1,5mm dans laquelle l'échantillon de poudre a été mis à la combustion. Pour éviter l'aspiration éventuelle de plantes, une laine de verre servant comme filtre a été placée à l'embout buccal de la chambre.
2. Un ballon collecteur de fumée de 50 ml comportant trois bras : un bras latéral connecté à la chambre de combustion par une conduite et un tube de silicone, un bras de l'autre côté relié à l'entrée d'une seringue. Le bras du milieu muni d'un cône avec bouchon à vis, à la place du bouchon d'origine, est raccordé avec un septum pour les flacons SPME permettant l'insertion de la fibre. Le calcul du volume occupé par le gaz dans le ballon a été fait en mesurant préalablement le poids du ballon vide, ensuite de l'eau a été versée afin remplir la totalité jusqu'aux trois cols (car la totalité du ballon a été occupée par la fumée jusqu'aux cols). Ainsi le poids de l'eau ajoutée était de 70 g, alors le volume occupé par la fumée était environ 70 ml.
3. Une seringue de 60ml de volume pour aspirer la fumée produite à partir de la chambre de combustion des feuilles.

Cet appareil à combustion permet d'analyser la fumée de la même façon que celle produite lorsqu'on fume une cigarette (fumée "active").

Pendant notre expérience, 1,6 g d'échantillon a été placé dans la chambre de combustion (*Figure 14*).

L'échantillon a été brûlé avec un bec Bunsen ou un allume-cigare pour avoir une combustion. L'air a été aspiré deux fois à l'aide d'une seringue d'aspiration pour faciliter le début de la combustion dans le tuyau et pour aspirer la fumée produite et le retenir dans le flacon collecteur. La fumée en provenance de la canalisation a été emportée avec une vitesse élevée à cause du retraicissement de la section de l'embouchure, ensuite la vitesse diminue à la rentrée du ballon collecteur et tend à occuper progressivement tout le volume disponible. Ce type de flux imite ce qui se passe au niveau des voies respiratoires puisque l'air inhalé passe d'abord par la trachée puis les bronches, ensuite les bronchioles pour atteindre finalement les alvéoles. La période d'incubation commence après la fermeture du robinet au niveau du flacon relié avec la seringue d'aspiration et le perçage du septum par la seringue SPME.

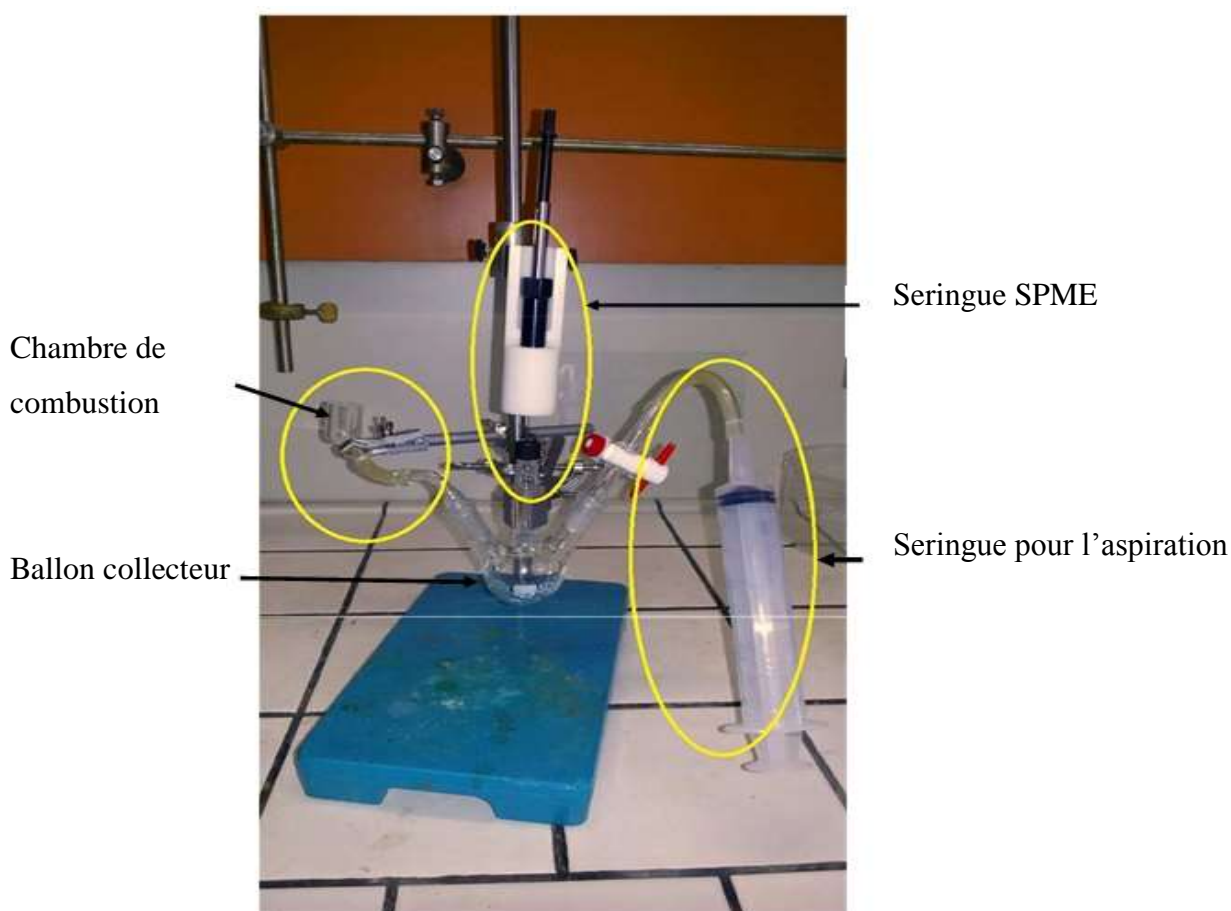


Figure 14 : Appareil de combustion

L'expérience a été répétée trois fois à d'intervalles d'aspirations différentes. Lors de la première expérience, deux aspirations ont été effectuées avec la seringue comme décrit ci-

dessus, au temps $t=0$, le bouchon a été percé et la fibre a été ensuite incubée pendant 20 min. Dans la deuxième expérience, deux séries d'aspirations ont également faites mais cette fois-ci, la première au temps $t = 0$ min, la seconde à l'instant $t = 10$ min et l'incubation de la fibre au temps $t=0$ jusqu'à $t=20$ min. Pendant la troisième expérience, quatre séries d'aspirations ont été réalisées, le premier au temps $t = 0$ min, la seconde à l'instant $t = 5$ min, le troisième au temps $t = 10$ min et la quatrième au temps $t = 15$ minutes. Le bouchon a été toujours percé à $t = 0$ et la fibre SPME a été incubée pendant 20 min au total. Ce temps écoulé, la fibre a été retirée et injectée, en mode sans division (splitless) à l'aide d'un injecteur pour SPME dans le chromatographe en phase gazeuse (Injecteur Supelco de 0,75 mm de diamètre interne). La désorption a eu lieu à une température de 250°C pendant 3 minutes. L'analyse par CPG-FID des composés volatils, a été effectuée en utilisant l'instrument Agilent 4890D couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID). La séparation des composés a été entreprise par une colonne capillaire HP-5 (30 m de long, 0,32 mm id, 0,25 μm , J & W Scientific, Folsom, CA, USA) en utilisant le programme de température suivant: 7 min à 60°C , puis $2^{\circ}\text{C} / \text{min}$ jusqu'à 130°C , puis $4^{\circ}\text{C} / \text{min}$ jusqu'à 140°C et enfin $20^{\circ}\text{C} / \text{min}$ jusqu'à 250°C pendant une durée totale de 60 min d'analyse.

. b-2- Analyse de la « fumée active » à 37°C

L'analyse de la fumée a été effectuée non seulement à la température ambiante mais également à 37°C dans le but de reproduire autant que possible la température au niveau des poumons. Pour cela, une plaque chauffante IKA RCT munie d'un thermostat a été montée (Figure 15) à l'appareil de combustion décrit ci-dessus pour chauffer le ballon collecteur. Le protocole reste le même que précédemment. Des aspirations ont été effectuées: aux temps $t = 0$ et $t = 10$ min, pour une durée totale d'incubation de 20 min. La fibre a été retirée et injectée dans le chromatographe en phase gazeuse avec un injecteur (liner) pour SPME (0,75 mm de diamètre interne Supelco) en mode splitless. La désorption a eu lieu à 250°C pendant 3 min, en utilisant le programme de température décrite ci-dessus.



Figure 15 : Appareil de combustion sur une plaque chauffante

c- Analyse des feuilles

Pour comparer les composants volatiles de la fumée et ceux des feuilles, l'analyse SPME des feuilles écrasées à l'intérieur du ballon a été également effectuée mais non seulement celle de la fumée. A cet effet, un ballon de 50 mL à trois cols (Figure 17) a été installé. Les cols latéraux ont été fermés par des robinets alors que la seringue SPME à fibre PDMS (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a été montée à celui du milieu. Pour l'extraction, 10 mg d'échantillon a été placé dans le ballon à col central fermé par un bouchon à vis avec septum PTFE / silicone (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Puis, la fibre a été introduite manuellement dans le col en

perçant le septum de silicone. L'incubation a été réalisée à la température ambiante pendant 20 min.

Après cette période, l'injection dans le chromatographe en phase gazeuse, à une température de 250 ° C pendant 3 min, a été faite après la désorption. Le programme de température rest le même que précédemment décrite ci-dessus.

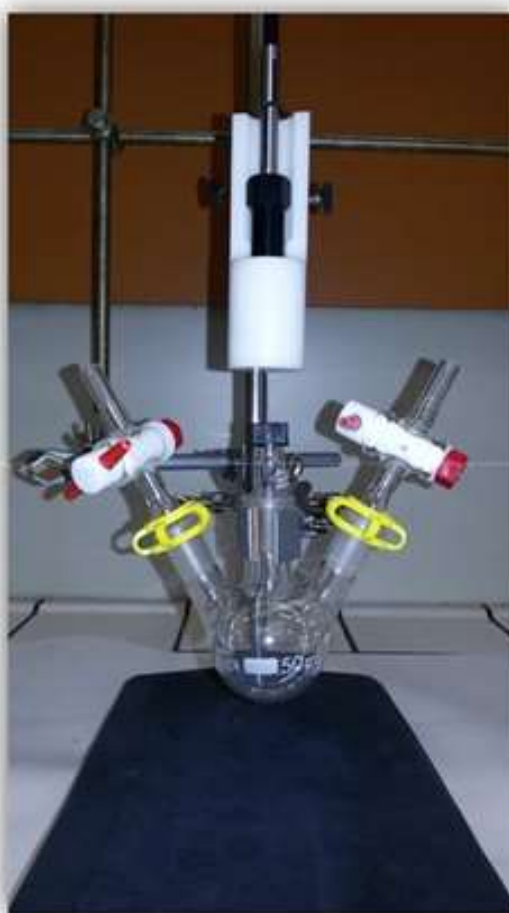


Figure 16 : Appareil pour l'analyse SPME des feuilles

Après avoir constaté que l'amplitude des pics chromatographiques obtenus n'est pas optimale, le poids de l'échantillon a été augmenté et les conditions d'analyse ont été modifiées. Pour ce faire, l'expérience a été répétée mais une plaque chauffante IKA RCT avec thermostat (Figure 17) a été utilisée. Quand la température de 37 ° C est atteint, le septum a été perforé manuellement avec la seringue SPME et la fibre PDMS a été laissée en incubation pendant 20 min. La désorption de la fibre par son injection dans le chromatographe en phase gazeuse a été réalisée à une température de 250 ° C pendant 3 min en mode splitless ; le programme de température reste le même que précédemment décrit ci-dessus.



Figure 17 : Appareil pour l'analyse SPME des feuilles avec plaque de chauffage

d- Analyse de la fumée passive

D'après les enquêtes ethnobotaniques, la fumée de la combustion qui s'est produit en surface de la plante a été inhalée par la population du Sud de Madagascar. Dans ce, la fumée inhalée, peut être considérée comme fumée secondaire ou fumée passive.

Pour reproduire cette condition, un deuxième dispositif expérimental a été conçu. Il est composé d' :

- Un entonnoir en verre renversé sur lequel la seringue SPME avec fibre PDMS a été montée. La fumée est dirigée vers la fibre à travers cet entonnoir. (Figure 18a)
- Une capsule en porcelaine sur laquelle la plante a été brûlée.

La capsule a été chauffée à l'aide d'un bec Meker pour avoir une chaleur rouge (environ 700 ° C) (Figure 18b). Ensuite 50 mg de l'échantillon a été versé rapidement à l'aide d'une spatule jusqu'à ce que la température diminue. Cette opération a été répétée jusqu'à ce que la quantité de l'échantillon atteigne 1 g.

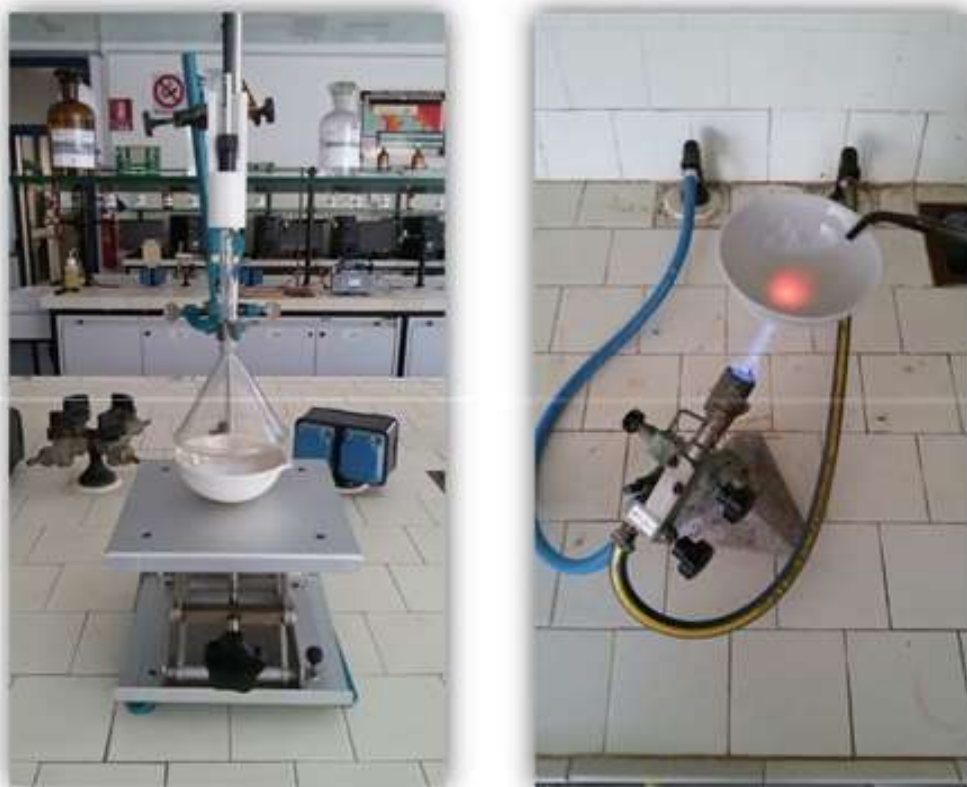


Figure 18 : a- Dispositif pour l'analyse SPME de la fumée passive ; b- Capsule pour la mise en combustion de l'échantillon

IV.2.3 Etude pharmacologique

IV.2.3.1. Animaux de laboratoires

Des rats et des souris mâles ou femelles sont utilisés pour évaluer les effets biologiques de l'HE de *Myrothamnus moschatus*. Ces animaux sont issus de l'animalerie de l'IMRA. Ils sont nourris par des aliments sous forme des granulés nutritionnellement équilibrés et abreuvés à volonté. Toutes les expériences ont été réalisées entre 13h et 18h.

Produits utilisés et leurs modes d'administration.

La Pentylentétrazole (PTZ) et la Picrotoxine (PTX) ont été achetées chez Sigma Chemical Co. (USA) tandis que le diazépam a été obtenu chez une pharmacie à Antananarivo. Tous ces

produits ont été dissouts dans la solution saline 0.9% et préparés juste avant l'expérience. Ils ont été administrés par voie intrapéritonéale (i.p). L'HE a été dissous dans l'huile d'olive et administrée par voie sous-cutanée situé derrière la tête. Le volume d'administration n'a pas été supérieur à 2ml/kg de poids corporel.

IV.2.3.2. Protocoles expérimentaux

Pour évaluer l'activité anticonvulsivante de l'HE de *Myrothamnus moschatus*, des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués.

a-Test in vivo :

a-1- Test de l'HE de *Myrothamnus moschatus* sur la convulsion induite par la Pentylenetétrazole (White HS 1997; Rho et al. 1999; Bialer et al. 2010).

Le principe de ce test est de provoquer expérimentalement la convulsion chez le Rat et d'étudier l'effet anticonvulsivant de l'HE.

Des Rats de souche Wistar mâles ou femelles de poids variant entre 200 et 250g ont été utilisés. Ils ont été repartis en 6 lots de 4 animaux dont un lot témoin et 5 lots traités. Les animaux du lot témoin ont reçu l'huile d'olive à 2ml/kg et le même volume d'HE à différentes doses (0.1, 0.2, 0.4, 0.8ml/kg) a été administré aux 4 lots traités. Le dernier lot traité a reçu le diazépam, produit de référence, à la dose de 5mg/kg. Dix minutes après l'administration de l'HE, du diazépam ou de l'huile d'olive seul, la PTZ a été injectée par voie i.p à la dose de 60mg/kg. Chaque animal a été placé dans une cage individuelle et la convulsion a été observée pendant 30mn après la PTZ. Le temps de latence pour l'apparition de la première crise convulsive, le pourcentage des animaux en convulsion ou en convulsion tonico-clonique, la durée de la crise convulsive et les scores de comportement convulsif ont été enregistrés. Ces scores ont été calculés de la manière suivante (Becker et al., 1995):

Score 0: sans réponse

Score 1: crispation de l'oreille et la face.

Score 2: secousse myoclonique sans redressement sur les membres postérieurs

Score 3: secousse myoclonique avec redressement sur les membres postérieurs

Score 4: crises tonico-cloniques bilatérales

Score 5: crises tonico-cloniques généralisées.

La mortalité pendant une période 24 h après la PTZ a également notée.

a-2- Test de l'HE sur la convulsion induite par la Picrotoxine (Mazarati et al., 1992)

Le principe reste le même que précédemment mais le test a été fait sur les souris.

Des souris adultes de race Swiss, mâles ou femelles, de poids entre 20 et 25g ont été utilisés. Les animaux sont divisés en 6 lots de 6 souris. Un lot témoin où les animaux ont reçu de l'huile d'olive à raison de 10ml/kg. Cinq lots traités dont 1 lot a reçu du diazépam (Valium®) à la dose de 5mg/kg et les 4 autres lots de l'HE aux doses de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 ml/kg. Dix minutes après l'administration de ces produits, chaque animal a reçu la Picrotoxine à la dose de 6mg/kg et a été observé pendant 30 mn. Les animaux qui ne convulsent pas dans une période de 30mn ont été considérés comme protégés de la convulsion. Le nombre d'animaux protégés dans chaque lot a été enregistré et exprimé en pourcentage. Chez les animaux non protégés, le temps de latence de la première apparition de la crise convulsive ainsi que la durée ont été enregistrés. La mortalité de l'animal a été notée pendant les 24 heures.

a-3- Evaluation de l'activité sédatrice de l'HE du *Myrothamnus moscatus*

a-3-1-Introduction

La détermination du profil psychopharmacologique d'une substance donnée nécessite l'utilisation d'une batterie de tests pharmacologiques, étant donné qu'il n'existe pas de méthodes spécifiques pour une classe pharmacologique donnée. En fonction des résultats obtenus sur la base de différents tests, l'on définira le profil psychopharmacologique d'une substance et au terme de ces études, une idée sur son utilisation clinique potentielle sera émise.

Les méthodes d'étude sont classées en 3 groupes:

- Méthode comportementale ou étude de la réponse de l'animal à l'administration de la molécule à l'aide de différents tests comportementaux.

- Méthode neurochimique ou recueil de dialysats et mesure des concentrations en neurotransmetteurs et ses métabolites, étude de la liaison sur les récepteurs et les transporteurs.
- Méthode électrophysiologique ou enregistrement de l'activité électrique des neurones utilisant l'EEG (électroencéphalogramme) et les autres enregistrements polygraphiques, permettent d'apprécier l'activité d'une substance sur le système nerveux (Cohen et al., 2008; Beaulieu, 2006).

Ces trois méthodes sont complémentaires dans la définition du profil psychopharmacologique d'une substance.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé les méthodes comportementales pour évaluer l'activité psychotrope des nos HE

a-3-2-Matériels et méthodes

Produit testé: - HE de *Myrothamnus moschatus*

Produit de référence: Diazépam (3mg/kg, IP).

Doses: Les doses utilisées pour déterminer le profil psychopharmacologique de nos HE ont été fixées à 0.4 et 0.8ml/kg.

Voies d'administration: la voie sous-cutanée a été utilisée. L'HE administrée a été diluée dans l'huile d'olive à raison de 2ml/kg.

Animaux: Des souris de race Swiss mâles et femelles pesant entre 20g et 25g ont été utilisées. Les méthodes comportementales suivantes ont été entreprises dans nos études.

a-3-2-1-Test de la traction :

Il consiste à suspendre des souris par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement (figure 19), et le temps mis par la souris pour amener au moins une des pattes postérieure à toucher le fil a été compté. Une souris normale effectue un rétablissement en moins de 5 secondes, le cas contraire signifie que la souris est soumise à une action sédatrice (Cohen et al., 2008; Beaulieu, 2006; Lempérière, 2006; Delorme et al., 2003; Orsini et Pellet, 2005).



Figure 19 : Test de la traction

a-3-2-2-Test de la planche à trous :

Il permet d'explorer la curiosité et le désir de fuite de l'animal. Pour ce faire, une planche de 40x40 cm et de 1.8cm d'épaisseur, percée de 16 trous de 3cm de diamètre, régulièrement espacés, a été utilisée. La souris a été déposée au centre de la planche et le nombre de fois que la souris plonge la tête dans un des trous au bout de 1, 2, 3 ,4 et 5 minutes a été compté (figure 20). La moyenne de trous explorés a été calculée pendant 5 minutes (Cohen et al., 2008; Beaulieu, 2006; Lempérière, 2006; Delorme et al., 2003; Orsini et Pellet, 2005).



Figure 20 : Test de la planche à trous

a-3-2-3 Test de la cheminée

Ce test consiste à placer verticalement une souris dans une éprouvette en verre de 30 cm de longueur, une souris normale tente de remonter généralement en une dizaine de secondes, les souris sont considérées comme ayant répondu au test lorsqu'elles effectuent la montée du cylindre en moins de 30 secondes (figure 21). La durée passée dans l'éprouvette jusqu'au moment où la souris cherchera à en sortir a été estimée. La réponse est positive si la souris remonte le tube en moins de 30 secondes (Cohen et al., 2008; Beaulieu, 2006; Lempérière, 2006; Delorme et al., 2003; Orsini et Pellet, 2005).



Figure 21 : Test de la cheminée

b-Tests in vitro :

b-1-Test de fixation au récepteur GABAA-benzodiazépines (Bernabe, 1986 ; Petrie et al., 2005)

b-1-1-Produit testé :

- HE de *Myrothamnus moschatus*

b-1-2-Les réactifs :

- [³H]-flunitrazépam

- Clonazépam

b-1-3-Préparation du tissu :

Des rats mâles Wistar ont été décapités et leurs cerveaux sont rapidement enlevés. Les cortex cérébraux ont été enlevés, pesés et homogénéisés avec un homogénéisateur Potter-Elvehjem dans 20ml de glace-sucrose 0,32M. L'homogénat est centrifugé à 1000g pendant 10mn. Le granulé a été éliminé et le surnageant a été centrifugé à 30000g pour 20mn. Le granulé membranaire qui en résulte a été mis dans 20 volumes de 0,05M d'une solution tampon tris acétate pH 6,9.

b-1-4-Protocole expérimental :

Les solutions suivantes ont été préparées :

- 1ml de solution tampon tris acétate à 0,05M et à pH 6,9
- 50μ de ³H- flunitrazépam à 0.5nM
- 30μl de DMSO.
- 20μ de clonazépam à 0,1mM
- 300μl de suspension du granulé dissout dans du tampon tris acétate à pH 6.9.

Ensuite 5 tubes ont été préparés dont

- le tube n°1 contient de flunitrazépam tritié et le DMSO (pour déterminer la liaison totale)
- le tube n°2 contenant le flunitrazépam tritié, le clonazépam (pour déterminer la liaison non spécifique.
- les 3 autres tubes n° 3, n°4 et n°5 contiennent chacun de flunitrazépam et respectivement de 20μ d'HE aux concentrations de 1/200, 1/2000 et 1/20000. La dilution a été faite avec le DMSO.

Puis tous les tubes ont été incubés à 4°C dans un bain de glace. Trois cent µl de la suspension de tissu ont été additionné aux tubes à dix secondes d'intervalle à plusieurs reprises.

Le minuteur commence avec l'addition du mélange dans le premier tube. Les tubes ont été incubés à 4°C pour 20mn et l'essai se termine par une filtration sous vide grâce aux tubes GF/B Whatman. Ces opérations ont été effectuées à dix secondes d'intervalle. Chaque filtre a été immédiatement rincé avec 5ml de tampon de glace à pH 6,9.

Le filtre a été ensuite séché, sous une lampe à incandescence blanche (100W), pendant vingt minutes. Après séchage, le filtre a été introduit dans une fiole de comptage (Kontron, St Quentin en Yvelines (78)), contenant 10 ml d'instagel (Packard, Rungis (94)).

Le comptage de la radioactivité (compteur à scintillation LKB Minibeta 1211, Wallac Oy, Finlande) a été effectué 24 à 48 heures après l'immersion du filtre dans l'instagel, la fiole a été laissée à la température de la pièce.

b-1-5-Evaluation :

La liaison spécifique est définie comme la différence entre la liaison totale et la liaison en présence du clonazépam. La liaison spécifique est approximativement 97% de la liaison totale du ligand.

Les données ont été analysées et les valeurs de pourcentage d'inhibition de la liaison du 3H-flunitrazépam ont été calculées.

b-2- Test de HE sur les cellules nerveuses humaines type SH-SY5Y.

Pour évaluer l'activité neuroprotectrice de l'HE, des cellules nerveuses humaines de la lignée de SH-SY5Y ont été mises en culture. Des différentes concentrations d'HE (1 :40000, 1 :80000, 1 :160000, 1 :320000) ont été ajoutées dans chaque culture. Après 48 h d'incubation les cellules ont été fixées et le marquage des microfilaments d'actine a été effectué. Les filaments d'actine sont des composants de cytosquelette et jouent un rôle important sur la morphologie et la physiologie cellulaire. Ainsi pour bien mettre en évidence la morphologie des cellules, un marquage a été réalisé à l'aide de phalloïdine qui est un composé se liant d'une manière sélective aux microfilaments d'actine et visible par imagerie fluorescente.

IV.2.3.3. Analyse des résultats

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm s.e.d (Standart error deviation ou écart-type réduit. Chaque moyenne des lots traités ont été comparées avec celle du lot témoin en analysant par le test paramétrique « t » de Student. La différence sera significative à partir du degré de signification $p < 0.05$.

Chapitre V : RESULTATS OBTENUS

V.1. ETHNOBOTANIKES :

Pendant notre travail de terrain dans la région d'Isalo, nous avons appris que les feuilles sèches de *Myrothamnus moschatus* sont fumées comme un cigare et la fumée est recueillie dans un sac plastique de riz. Le patient en convulsion inhale la fumée pour expulser les mauvais esprits qui entrent dans son corps. La toux et l'asthme sont également traités avec ce mode d'utilisation. Dans la littérature, on sait que *Myrothamnus moschatus* pousse à l'état sauvage dans différentes régions écologiques de Madagascar (Figure 22) et il a été rapporté que la fumée est utilisée pour traiter l'asthme et en infusion contre la toux (Millogo-Rasolodimby, 1991). A Ambohiboroana, la fumée est utilisée pour le traitement de la migraine mais également pour expulser les mauvais esprits. *Myrothamnus moschatus* est également utilisée comme une plante psychoactive dans la région Sud de Madagascar, près de Betroka, Ivohibe et autour de Beraketa (Boiteau, 1967). Dans les hautes terres centrales, la décoction est utilisée contre les vomissements et les feuilles sont brûlées pour des rituels magiques (Razafindrambao, 1971).



Figure 22 : Les différentes régions écologiques de *Myrothamnus moschatus* à Madagascar

Myrothamnus moschatus possèdent plusieurs noms vernaculaires malgaches différents selon les groupes ethniques des sites explorés. Ces noms sont évocateurs de son utilisation traditionnelle :

- Chez le groupe ethnique Merina, il est connu sous le nom de *maimbelona*, association de deux mots : *maina* qui signifie sec et *velona*, vivant. Ce nom évoque la propriété de résurrection de l'espèce;
- Chez l'Antandroy, son nom est *maharoaka* ou, *maharoaky* (de *maha*, capable et *roaka*, expulser). Ce nom est lié l'usage traditionnel magique de la plante, ainsi on croit que cette plante est capable d'expulser les mauvais esprits ou le diable
- L'éthnie Bara le nomme *somorombato* (de *somorona*, nom commun des toutes les plantes qui sont fumés à Madagascar pour leurs propriétés narcotiques et *vato*, pierres. Ainsi ce nom reflète non seulement les propriétés narcotiques de l'espèce mais également son écologie puisqu'elle pousse sur les rochers.
- Chez l'Antanosy on l'appelle *riadriatra*, répétition du mot *riatra*, faire du bruit si brûlé ;
- L'éthnie Betsileo donne deux noms différents à cette plante : *Fanalalahy* et *Tsimarofy*. Le premier vient du mot *fanala*, action d'enlever ou d'arracher et *lahy*, mâle, homme ou mari ; ce nom indique son utilisation comme un philtre magique pour créer des problèmes et des confusions entre un couple, aboutissant au divorce. Le deuxième est l'association de deux mot *tsy*, sans et *marofy*, débile ou maladif, ce nom désigne son usage dans les maladies chroniques comme l'asthme ou la toux.

Le tableau 06 rapporte les informations sur les noms vernaculaires et utilisations traditionnelles de *Myrothamnus moschatus* collecté dans 5 sites.

.

Tableau 06 : Les informations sur les noms vernaculaires et les utilisations traditionnelles de *Myrothamnus moschatus* collecté dans 5 sites

Localité	GPS (Longitude Latitude)	Altitude (m)	Nom vernaculaire (groupes ethniques)	Utilisation traditionnelle
Ifandàna	S/22°800'39'' E/46°823'03''	883	Maharaoky (Bara)	Traitement des convulsions, des toux et asthmes; fumée utilisée pour chasser les mauvais esprits
Ambohiboroana	S/21°853'45'' E/46°845'51''	1048	Fanalalahy, Tsimaharofy (Betsileo)	Fumée utilisée pour chasser les mauvais esprits Traitement des toux et migraines
Ambondromisotra	S/20°819'60'' E/46°855'00''	1123	Harify (Betsileo)	Sans utilisation Traditionnelle
Angavokely	S/18°855'01'' E/17°843'58''	1447	Maimbelona (Imerina)	Vague utilisation traditionnelle
Ambatofotsy	S/19°806'08'' E/47°831'32''	1308	Maimbelona (Imerina)	Vague utilisation traditionnelle
Betroka, Ivohibe,Beraketa	Non explorée Non explorée	Non explorée Non explorée	Somorombato, Riadriatra (Antandroy)	Feuilles sont fumées pour ses effets narcotiques

V.3. EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *MYROTHAMNUS moschatus* D'IFANDANA.

La distillation à la vapeur de 6kg de la plante fraîche nous a permis récolter 43,8 g d'huile essentielle de couleur jaune claire et 7,44g d'hydrolat concentré de couleur jaune orangée. Le rendement est respectivement de 0,73 % et de 0,12%.

V.3.1 Composition d'huile essentielle

L'analyse de HE par la GC/FID et GC/MS nous a permis d'identifier 40 composants volatils qui correspondent à 98.2% des compositions totales (Rasoanaivo et al., 2012). Ils sont rapportés dans le tableau 07. Les composés principaux se trouvent dans 83.1 % des huiles. Ils sont représentés par les monoterpénoïdes bicycliques *trans*-pinocarvéol (35.6 %) et son produit d'oxydation pinocarvone (20.0 %). Ces constituants volatils sont également libérés et absorbés au cours de rituels dans lesquels la fumée des feuilles brûlées est inhalée [Viljoen *et al.*, 2002]. D'autres constituants présents à teneur significatif sont l' α -pinène (10.5%), β -selinène (8.5 %) et l'acétate de perillyl (de 6.0 %).

La majeure partie de l'huile est dominée par la présence de monoterpènes oxygénés (75.0 %), riches en alcools et en cétone. Le reste est essentiellement constitué par des hydrocarbures monoterpéniques (15.9 %) et les hydrocarbures sesquiterpéniques (8.8 %). La figure 23 rapporte le profil de chromatogramme..

Tableau 07: Composition des huiles essentielles à partir des parties aériennes de *Myrothamnus moschatus* récolté à Ifandana (Janvier 2010)

N°	Composés *	RF ^b	RI ^c	Littérature	Ris ^d	Forme biologique				ID ^e
						Dessiccation		Rehydratation		
						% (n=3) ±SD	RSD% ^f	% (n=3)	RSD% ^f	
					ADAMS	NIST 08				
1	α -Thujene	1,10	926	930	929			tr	5,8	Std
2	α -Pinene	1,10	932	939	937	5,8±0,20	3,4	10,5±0,05	0,5	Std
3	Camphene	1,10	946	954	949	0,2±0,01	4,6	0,3±0,00	0,3	Std
4	Thuja-2,4(10)-diene	1,10	952	960		0,1±0,00	4,4	tr ^g	2,7	Ri,MS
5	β -Pinene	1,10	974	979	976	0,4±0,02	3,5	0,7±0,00	0,6	Std
6	Myrcene	1,10	992	990	991	tr	4,6	0,1±0,00	2,6	Std
7	p-Cymene	1,09	1026	1024	1024	0,9±0,01	0,8	1,6±0,01	0,6	Std
8	Limonene	1,10	1030	1029	1026	0,4±0,01	1,8	2,3±0,00	0,2	Std
9	1,8-Cineole	1,44	1032	1031	1032	0,4±0,00	0,4	0,7±0,03	3,9	Std
10	p-Cymenene	1,10	1089	1091		0,1±0,00	4,4	0,2±0,00	2,8	Ri,MS
11	6-Camphenone	1,44	1095	1096		0,1±0,00	1,6	0,2±0,02	6,3	Ri,MS
12	trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1,44	1121	1122	1113	0,7±0,00	0,2	0,5±0,01	1,1	Ri,MS
13	α -Campholenal	1,44	1126	1126		0,3±0,01	3,1	0,3±0,00	0,8	Ri,MS
14	trans-Pinocarveol	1,44	1139	1139	1139	36,3±0,14	0,4	35,6±0,07	0,2	Std
15	trans-Pinocamphone	1,44	1159	1162	1163	0,5±0,11	8,7	tr	4,8	Ri,MS
16	Pinocarvone	1,44	1162	1164	1163	19,8±0,08	0,4	20,0±0,04	0,2	Ri,MS
17	cis-Pinocamphone	1,44	1172	1175		tr	8,9	0,1±0,01	8,1	Ri,MS
18	Terpinen-4-ol	1,44	1177	1177	1177	tr	4,3	tr	3,5	Std
19	trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1,44	1186	1189		2,8±0,04	1,4	3,3±0,05	1,4	Ri,MS
20	Myrtenal	1,44	1191	1195	1191	1,1±0,01	1,1	1,2±0,01	1,1	Std
21	Myrtenol	1,44	1193	1195	1196	1,8±0,01	0,3	1,4±0,03	0,3	Std
22	trans-Carveol	1,44	1218	1216	1218	0,9±0,00	0,4	0,9±0,03	1,0	Std
23	cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1,44	1227	1227		2,3±0,02	0,7	2,1±0,05	1,2	Ri,MS
24	cis-Carveol	1,44	1231	1229	1229	tr	11,7	tr	9,9	Ri,MS
25	(Z)-Ocimenone	1,44	1231	1229		0,1±0,01	4,1	tr	1,4	Ri,MS
26	Cumin aldehyde	1,44	1239	1241	1240	tr	1,7	tr	4,0	Ri,MS
27	Carvone	1,44	1243	1243	1242	0,4±0,02	4,6	0,4±0,01	2,3	Std
28	Perilla aldehyde	1,44	1272	1271	1274	0,2±0,01	6,0	0,2±0,00	2,5	Ri,MS
29	Isobornyl acetate	1,45	1284	1285		0,2±0,04	4,9	0,2±0,01	3,1	Ri,MS
30	trans-Sabinyl acetate	1,45	1289	1290		tr	6,6	tr	5,7	Ri,MS
31	Perilla alcohol	1,44	1294	1295	1295	tr	2,5	tr	8,7	Ri,MS
32	trans-Pinocanyl acetate	1,45	1297	1298		0,3±0,02	8,6	0,2±0,01	6,7	Ri,MS
33	Myrtenyl acetate	1,45	1324	1326	1328	0,3±0,01	2,3	0,3±0,02	5,7	Ri,MS
34	β -Elemene	1,05	1387	1390	1385	tr	10,5	tr	9,4	Ri,MS
35	(E)-Caryophyllene	1,05	1410	1408	1416			tr	5,9	Std
36	p-Cymen-7-ol acetate	1,45	1420	1422		tr	11,4	tr	8,9	Ri,MS
37	Perillyl acetate	1,45	1436	1436		12,7±0,26	2,1	6,0±0,09	1,5	Ri,MS ^h
38	β -Selinene	1,05	1479	1490	1485	8,5±0,09	1,1	8,5±0,03	0,4	Ri,MS
39	δ -Selinene	1,05	1484	1492	1491	tr	1,0	0,2±0,00	2,9	Ri,MS
40	Fukinanolide	1,00	1800	1798	1798			0,5±0,01	2,1	Ri,MS
Total identifié (%)						98,2		98,6		
Groupe des composés (%)										
-Monoterpènes hydrocarbonés						13,5		15,9		
-Monoterpènes oxygénés						75,0		73,5		
-Sesquiterpènes hydrocarbonés						8,7		8,8		
-Autres						1,0		0,5		

^a Composés appartenant à chaque classe, listés dans l'ordre de leur élution dans une colonne HP-5

^b Facteur de réponse relatif du détecteur FID

^c Indice de rétention de la colonne HP-5, déterminée expérimentalement en utilisant des séries homologues des alcanes à C8-C30.

^d Indice de rétention relatif pris d' Adams [Adams, 2007] et / ou 08 du NIST [NIST, 2008] respectivement pour DB-5 et la colonne capillaire HP-5

^e Méthodes d'identification: std, basée sur la co-injection avec des étalons authentiques; MS, basée sur la comparaison avec WILEY, ADAMS et la base de données NIST MS 08; Ri, basée sur la comparaison de Ri avec ceux rapportés dans ADAMS et le NIST 08

^f Ecart-type relatif

^g tr, traces (valeur moyenne inférieure à 0,1%)

^h Indice de rétention et MS prises de NIST 08, [Brophy *et al.*, 1982] et [Silva *et al.*, 2007]

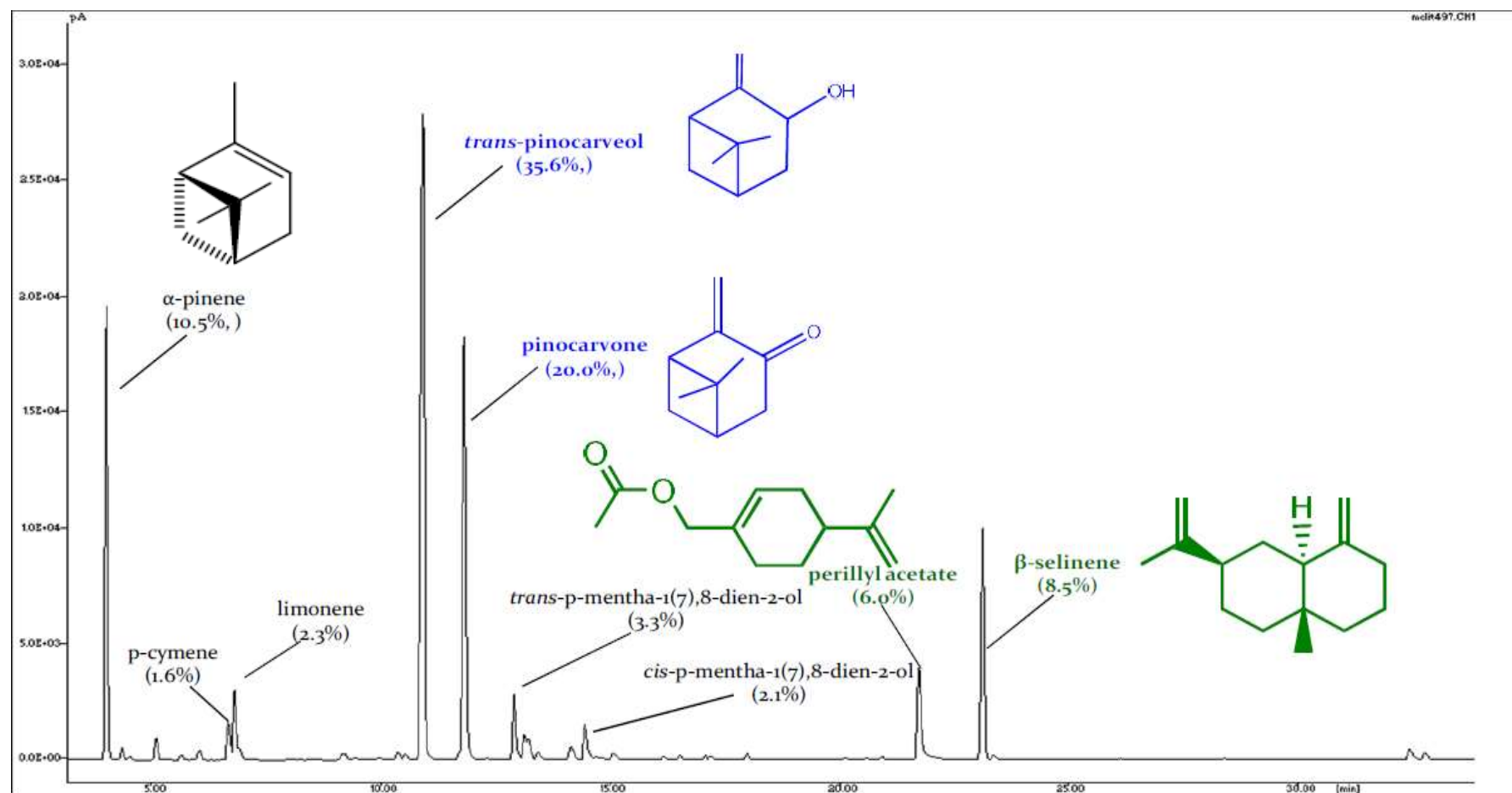


Figure 23: Le chromatogramme GC/FID de l'huile essentielle extraite de *Myrothamnus moschatus* d'Ifandàna en Janvier 2010.

V.3.2. La variabilité chimique des composés volatiles en fonction de l'origine géographique

Les compositions des huiles essentielles de *Myrothamnus moschatus*, dans 5 stations différentes sont rapportées dans le Tableau 08. Au total 94 composés volatiles correspondant à 67-98% des compositions totales ont été identifiés.

Dans la partie centrale nord, Ambatofotsy, Angavokely et Soavina, les fractions majoritaires représentées par les sesquiterpènes oxygénés, sont respectivement, de l'ordre de 51.3%, 47.6% et 54.9%. Elles sont surtout des oxydes de caryophyllènes (10.2, 19 et 21.9% respectivement) et de caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 β -ol (6, 8.7, 10.4% respectivement). Les autres sont représentés par les sesquiterpènes hydrocarbures (35.2, 23.0 et 10.5%, respectivement.), dont δ -cadinène (14.8, 4.1 et 0.9%, respectivement.), β -elemène (1.4, 5.1 et 0.4%, respectivement.) et β -selinène (1.4, 3.7 et 3.7%, respectivement.) comme constituants majeurs. La quantité des monoterpènes sont faibles (tous à 2.3%) dans ces populations de *Myrothamnus*. Du point de vue morphologique la dimension des feuilles est de 1x2cm.

Les populations du Sud, Ambohiboroana et Ifandàna sont caractérisées par la forte concentration en monoterpène oxygénée (♀ 53.5%, ♂ 59.8% et 65.1% respectivement) suivie par les sesquiterpènes hydrocarbures (♀ 12.7%, ♂ 22.8% et 20.7% respectivement) et les monoterpènes hydrocarbures (♀ 16.1%, ♂ 21.7% et 11.7% respectivement). Cependant leurs profils chimiques sont significativement différents. Les majeurs constituants volatiles du genre femelle et mâle ont été comparés chez les populations qui poussent à Ambohiboroana : b-selinène (♀ 12.3– ♂ 22.7%), trans-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol (♀ 13.2 – ♂ 15.8%), limonène (♀ 11.7– ♂ 15.2%), et cis-p-mentha-1(7),8-diène-2-ol (♀ 10.9 – ♂ 13.3%). En effet aucune différence significative des compositions chimiques n'a été observée entre les deux genres sauf chez le mâle, les monoterpènes hydrocarbonés qui existent en concentration un peu élevée (21.7% vs 16.1%) et la faible teneur sesquiterpène hydrocarbures (12.7% vs 22.8%). En ce qui concerne les échantillons d'Ifandàna, les composés majeurs sont transpinocarveol (34.1%), pinocarvone (14.2%), b-selinène (12.2%), perillyl acetate (8.3%), et α -pinène (7.9%). Sur le plan morphologique, les plantes de *Myrothamnus moschatus* du sud ont des feuilles plus petites (0.5x1cm) que celles du central-nord.

Les analyses multivariantes des constituants chimiques de *Myrothamnus moschatus* ont révélé que les plantes malgaches de *Myrothamnus moschatus* peuvent être groupées en 3

différents chémotypes. La représentation graphique en 2D des analyses des composés principaux (PCA) montre qu'ils représentent 69.3% des compositions totales (figure 24).

La variabilité des données est dictée par la teneur en monoterpènes oxygénés tels que trans-pinocarvéol, cis- et trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol((18.6; 26.0), (10.3; _10.6), et (15.5, _9.5), respectivement.), et par celle en mono- et sesquiterpène hydrocarbures comme les limonène et β -selinène ((12.4; _10.8) and (22.7; _7.0), respectivement.). La population de la partie supérieure droite de la courbe du score PCA provient de la région d'Isalo (Ifandana) (figure 24a). Elle est corrélée positivement avec des composants dans la position similaire de la parcelle de trans-pinocarvéol et de pinocarvone. La population d'Ambohiboroana est sur la partie inférieure droite de la courbe de score PCA dont la position est similaire à la parcelle de cis- et trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, limonène, et β -selinène. Il a un taux remarquablement élevé de sesquiterpène β -selinène dans le genre femelle par rapport à l'individu mâle. Enfin, 3 populations provenant d'Ambatofotsy, Angavokely et Ambondromisotra sont sur la partie gauche de la courbe du score PCA. Elles sont caractérisées par les composés dont la parcelle est similaire à celle des sesquiterpènes comme l'oxyde de caryophyllène, les α - et les β -isomères de caryophylla-4(12),8(13)-dièn-5-ol et de δ -cardinène.

Les constituants chimiques majeurs trouvés dans les populations malagasy de *Myrothamnus moschatus* comme le trans-pinocarveol, la pinocarvone, la limonène, le trans-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, cis-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol, l' α -pinène, et la β -selinène sont également rapportés dans les études de *Myrothamnus flabellifolia* de l'Afrique du Sud (Viljoen et al., 2002) et de Zimbabwe (Chagonda et al., 1999).

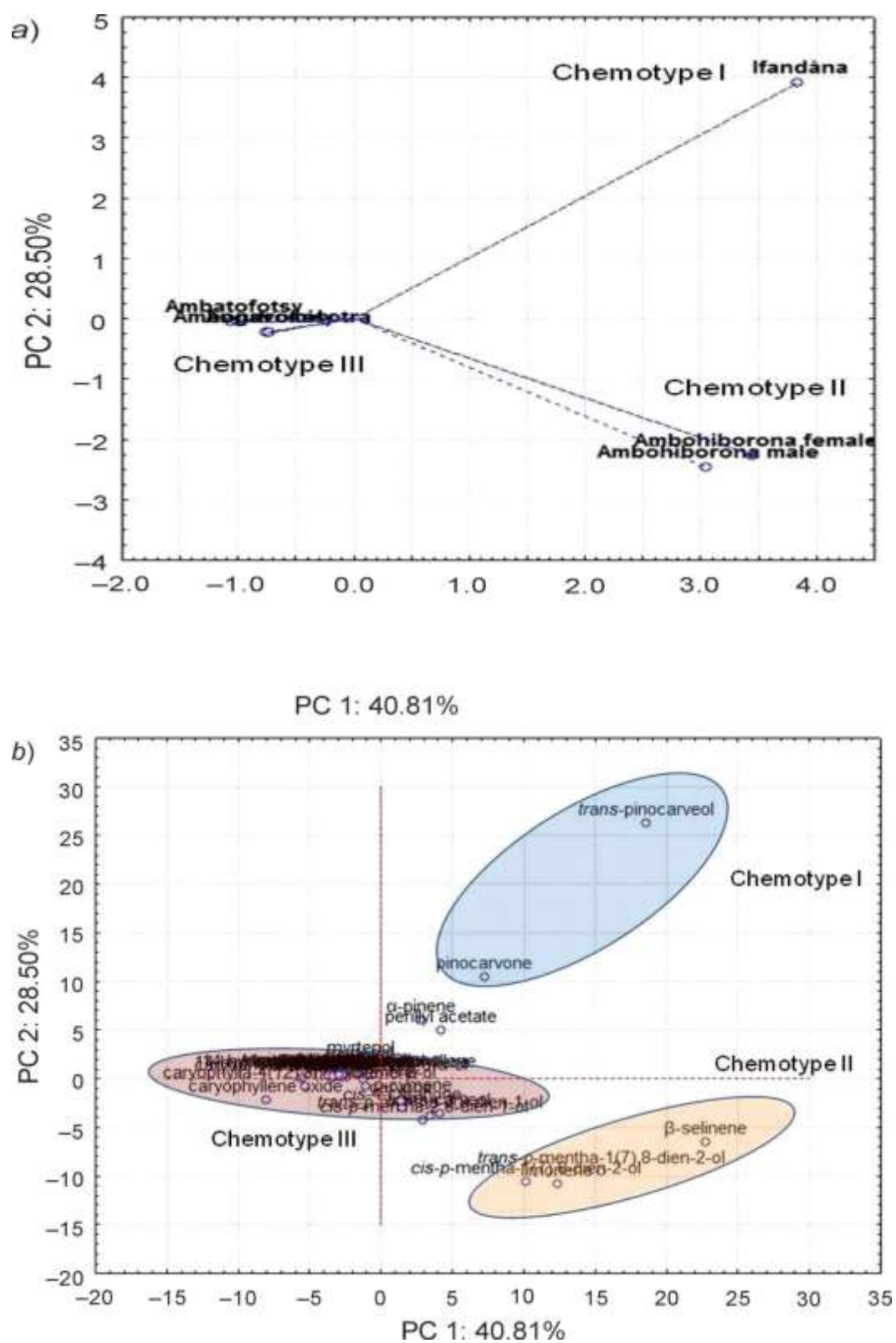


Figure 24 : PCA des composés volatils des 5 différentes populations de *M. moschatus*

Tableau 08 : Compositions chimiques de l'huile essentielle des 5 stations explorées de *Myrothamnus moschatus*

Component ^{a)}	RI ^{b)}	RI (Lit.) ^{c)}	[%] ^{d)}					ID ^{e)}	
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	Ambohiboroana			Ifandàna
						Female	Male		
a-Thujene	925	924						Tr ^{f)}	RI, MS
a-Pinene	938	939	0.3	0.3	0.1	0.5	0.4	7.9	Std
Camphene	954	954				Tr	Tr	0.3	Std
Thuja-2,4(10)-diene	960	960						0.1	RI, MS
Benzaldehyde	961	960						Tr	Std
b-Pinene	979	979	Tr	Tr		Tr	Tr	0.5	Std
Myrcene	992	990						0.1	Std
trans-Dehydroxylinalool oxide	992	991	Tr	0.1					RI, MS
cis-Dehydroxylinalool oxide	1007	1006	Tr	0.1					RI, MS
p-Cymene	1021	1020	Tr	0.1	Tr	3.0	4.6	1.2	Std
Limonene	1024	1024	0.1	0.3	0.1	11.7	15.2	1.4	Std
1,8-Cineole	1026	1026				Tr	Tr	0.5	Std
Lavender lactone	1034	1034			Tr				RI, MS
m-Cymenene	1082	1082				1.3	1.5		RI, MS
Hotrienol	1089	1089 ^{g)}		0.1	Tr				RI, MS
p-Mentha-1,3,8-triene	1108	1108						0.4	RI, MS
trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1119	1119				4.9	5.6	0.7	RI, MS
a-Campholenal	1122	1122						0.7	RI, MS
cis-Limonene oxide	1132	1132				Tr	Tr		RI, MS
cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1133	1133				5.2	5.2		RI, MS
trans-Pinocarveol	1135	1135	Tr		0.5	Tr	Tr	34.1	Std
trans-Limonene oxide	1138	1137				0.4	0.3		RI, MS
Pinocarvone	1161	1160	Tr		0.2	1.1	0.7	14.2	RI, MS
Borneol	1165	1165						Tr	Std
cis-Pinocamphone	1172	1172						0.1	RI, MS
Terpinen-4-ol	1174	1174						0.1	Std
cis-Pinocarveol	1182	1182						Tr	RI, MS
trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1186	1187				13.2	15.8	4.4	RI,MS
a-Terpineol	1186	1186						0.1	

Tableau 08 (suite)

Component ^{a)}	RI ^{b)}	RI (Lit.) ^{c)}	[%] ^{d)}					ID ^{e)}	
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	Ambohiboroana			Ifandàna
						Female	Male		
Myrtenal	1194	1194				0.4	Tr	1.2	Std
Myrtenol	1195	1195						1.7	RI, MS
trans-Caran-4-one	1195	1196				0.4	0.7		RI, MS
cis-Caran-4-one	1199	1200				3.4	4.3		RI, MS
trans-Carveol	1216	1215				4.9	6.2	1.3	RI, MS
cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1227	1227				10.9	13.3		RI, MS
cis-Carveol	1225	1226				0.9	1.0	0.8	RI, MS
(Z)-Ocimenone	1226	1226				0.9	1.0	0.4	RI, MS
Cumin aldehyde	1238	1238						0.1	RI, MS
Carvone	1239	1239				3.2	3.6	0.5	Std
Perilla aldehyde	1269	1269						0.3	RI, MS
p-Menth-1-en-7-al	1272	1273				0.7	0.6		RI, MS
Isobornyl acetate	1282	1283				0.5	0.5	0.3	Std
p-Cymen-7-ol	1289	1289						Tr	RI, MS
trans-Sabinyl acetate	1290	1289						Tr	RI, MS
Perilla alcohol	1295	1294						0.3	RI, MS
trans-Pinocarvyl acetate	1298	1298						0.3	RI, MS
Myrtenyl acetate	1324	1324						0.4	Std
a-Terpinyl acetate	1346	1346				Tr	Tr		RI, MS
a-Cubebene	1345	1345	1.6	0.3	Tr				RI, MS
a-Copaene	1374	1374	2.3	1.2	0.6	Tr	Tr		RI, MS
b-Cubebene	1387	1387	1.1	0.2	Tr				RI, MS
b-Elemene	1389	1389	1.4	5.1	0.4	Tr	0.1		RI, MS
Cyperene	1398	1398			0.1				RI, MS
(E)-Caryophyllene	1418	1417	0.7	3.6	0.2		0.1	0.2	Std
p-Cymen-7-ol acetate	1422	1421						Tr	RI, MS
Perillyl acetate	1434	1436	0.5	2.0	1.1	2.6	1.1	8.3	RI, MS ^{h)}
cis-Muurola-3,5-diene	1448	1448	1.3	Tr					RI, MS
a-Humulene	1452	1452	Tr	0.7	Tr				Std

1991

Tableau 08 (Suite)

Component ^{a)}	RI ^{b)}	RI (Lit.) ^{c)}	[%] ^{d)}					ID ^{e)}
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	<u>Ambohiboroana</u>		Ifandàna
						Female	Male	
Rotundene	1457	1457			Tr			RI, MS
allo-Aromadendrene	1458	1458	0.9	0.7	0.5			RI, MS
cis-Cadina-1(6),4-diene	1461	1461	0.5					RI, MS
trans-Cadina-1(6),4-diene	1475	1475	2.0	0.4				RI, MS
g-Murolene	1478	1478	3.1	0.8				RI, MS
b-Selinene	1488	1489	1.4	3.7	3.7	22.7	12.3	12.2
Epicubebol	1491	1493	4.6	1.0	Tr			RI, MS
d-Selinene	1492	1492			1.6			0.2
a-Murolene	1499	1500	1.1	0.7	0.3			RI, MS
a-Bulnesene	1507	1509	0.2		0.3			RI, MS
Cubebol	1513	1514	4.3	0.7				RI, MS
g-Cadinene	1513	1513			Tr			RI, MS
trans-Calamenene	1520	1521	Tr	Tr	0.9	0.1	0.1	RI, MS
d-Cadinene	1521	1522	14.8	4.1	0.9	0.1	0.1	RI, MS
trans-Cadina-1,4-diene	1532	1533	1.7	0.4				RI, MS
a-Calacorene	1543	1544	1.0	0.8	0.7			RI, MS
(E)-Nerolidol	1563	1561	0.5	3.0	0.9			Tr
Palustrol	1567	1567	0.8					RI, MS
Caryophyllene oxide	1583	1582	10.2	19.0	21.9	0.9	1.1	0.1
Glenol	1587	1586	1.3	0.6				RI, MS
b-Copaen-4a-ol	1589	1590	1.3	Tr	1.2	Tr		RI, MS
Viridiflorol	1591	1592	2.9	1.9	3.1	0.2		Std
b-Oplophenone	1609	1607	1.6	1.5	2.9			RI, MS
1-Epicubenol	1626	1627	4.6	1.1	Tr			RI, MS
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5a-ol	1637	1639	2.3	2.8	4.0	0.4	0.2	RI, MS
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5b-ol	1639	1639	6.0	8.7	10.4	0.7	0.5	RI, MS
a-Murolol	1644	1644	1.3					RI, MS
Cubenol	1645	1645	2.0	0.6	0.3			RI, MS
Pogostol	1651	1651	4.1	0.7	3.9			RI, MS

Tableau 08 (suite)

Component ^{a)}	RI ^{b)} RI (Lit.) ^{c)} [%] ^{d)}							ID ^{e)}
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	Ambohiboroana	Ifandàna	
						Female	Male	
Selin-11-en-4a-ol	1657	1658			1.7			RI, MS
(Z)-14-Hydroxy-9-epicaryophyllene	1667	1666	0.7	1.0	1.7			RI, MS
(E)-14-Hydroxy-9-epicaryophyllene	1668	1668	1.6	2.0	3.0			RI, MS
Cadalene	1676	1675	0.2	0.2	0.4			RI, MS
Eudesma-4(15),7-dien-1b-ol	1686	1687	0.3					RI, MS
Nerolidyl acetate	1714	1716	0.9	2.7				RI, MS
Fukinanolide	1798	1798 ^{g)}					0.8	RI, MS
Total identified [%]			87.3	73.6	67.4	95.1	96.0	98.8
Grouped compounds [%]								
Monoterpene hydrocarbons			0.3	0.7	0.2	16.1	21.7	11.7
Oxygenated monoterpenes			0.5	2.3	1.8	53.5	59.8	65.1
Sesquiterpene hydrocarbons			35.2	23.0	10.5	22.8	12.7	20.7
Oxygenated sesquiterpenes			51.3	47.6	54.9	2.1	1.7	0.2

^{a)} Composés listés dans l'ordre de leur élution dans une colonne HP-5. Leurs nomenclatures étaient en comparaison avec Adams .^{b)} Indice de rétention de la colonne HP-5, déterminée expérimentalement en utilisant des séries homologues des alcanes à C8- C30.^{c)} Indice de rétention linéaire pris à partir de Adams.^{d)} Valeurs de pourcentage sont les moyennes de 3 déterminations, avec un RSD% pour les composés principaux inférieurs à 5% .^{e)} ID, Identification: Std, basée sur la comparaison avec les composés authentiques; MS, basée sur la comparaison avec les bases MS de Wiley, Adams, et NIST 08; RI, basés sur la comparaison des valeurs moyenne de RI avec celles de Adams , Tr, traces (valeurs < 0.1%).^{f)} Indice de rétention linéaire pris à partir de NIST 08 .^{h)} Indice de rétention linéaire pris à partir de Brophy et al. and Silva et al.

Ces résultats montrent que la composition d'huile essentielle de *M. moschatus* est très sensible aux facteurs écologiques, avec une variation qualitative et significative. Il est à noter que la variation de la composition chimique est associée avec des variations sur les utilisations ethnobotaniques de l'échantillon. Malheureusement, nous n'avons recueilli des échantillons provenant de la partie Sud-Est de Madagascar en raison de l'insécurité alarmante. Par ailleurs, nous avons été surpris de constater que la composition de l'huile essentielle de l'échantillon recueilli à Ambohiborona qui n'est pas géographiquement éloignée d'Ifandana ne contenait que de petites quantités de trans- pinocarvéol et pinocarvone. Nous avons donc analysé la composition chimique des substances volatiles dans l'hydrolat. À cette fin, on a extrait la phase aqueuse avec de l'hexane et la phase organique a été décantée, séchée sur du sulfate de sodium et évaporé à sec à 30 ° C sous pression réduite. Le profil de chromatogramme est représenté sur la Figure 25. Trans- pinocarvéol (56,9%) et pinocarvone (20,1%) ont été les deux principaux composés identifiés; ils sont restés dans la phase aqueuse pendant la distillation à la vapeur.

Nous avons effectué une analyse Headspace à différentes températures de l'huile essentielle et de feuilles sèches de *M. moschatus* recueillies à Ifandana à l'aide d'Agilent 7694E échantillonneur d'espace de tête, couplé avec la chromatographie en phase gazeuse (publication en cours). Cet instrument permet la capture des espaces de têtes volatiles sans sélectivité. Les résultats sont présentés sur la Figure 26. Il est clair que les changements de taux des principaux volatils (alpha-pinène, trans- pinocarvéol, pinocarvone, acétate périllylique et, trans-selinène) dépendent de la température. Il semble qu'à une température similaire à celle du corps humain (40 °C) alpha-pinène et pinocarvone dominant dans la fraction volatile analysée par l'instrument (la première dans l'huile, la seconde dans les feuilles sèches). D'autre part, ces composés volatiles diminuent avec l'augmentation de la température (80 ° C, et 120 ° C) , en laissant le rôle important dans la caractérisation la fraction volatile à trans-pinocarvéol . Le pinocarvone existe seulement en très petites quantités dans l'espace de tête des feuilles sèches et de l'huile essentielle de *M. moschatus* à basse température.

Nous avons également effectué l'analyse de la composition chimique de la fumée passive et active à l'aide de technique de micro-extraction en phase solide (SPME : Solid Phase Micro-Extraction). Les résultats pertinents sont présentés sur le Tableau 09 et les profils chromatographiques sont rapportés sur la Figure 27.

La différence la plus frappante est la présence de limonène dans la fumée de *M. moschatus* alors qu'il a été trouvé en petites quantités dans les feuilles sèches et dans l'huile essentielle

de la plante. En plus de cette différence, la composition chimique de l'huile essentielle (Figure 27), en matières volatiles de feuilles sèches et de la fumée active de *M. moschatus* sont pratiquement qualitativement similaires .

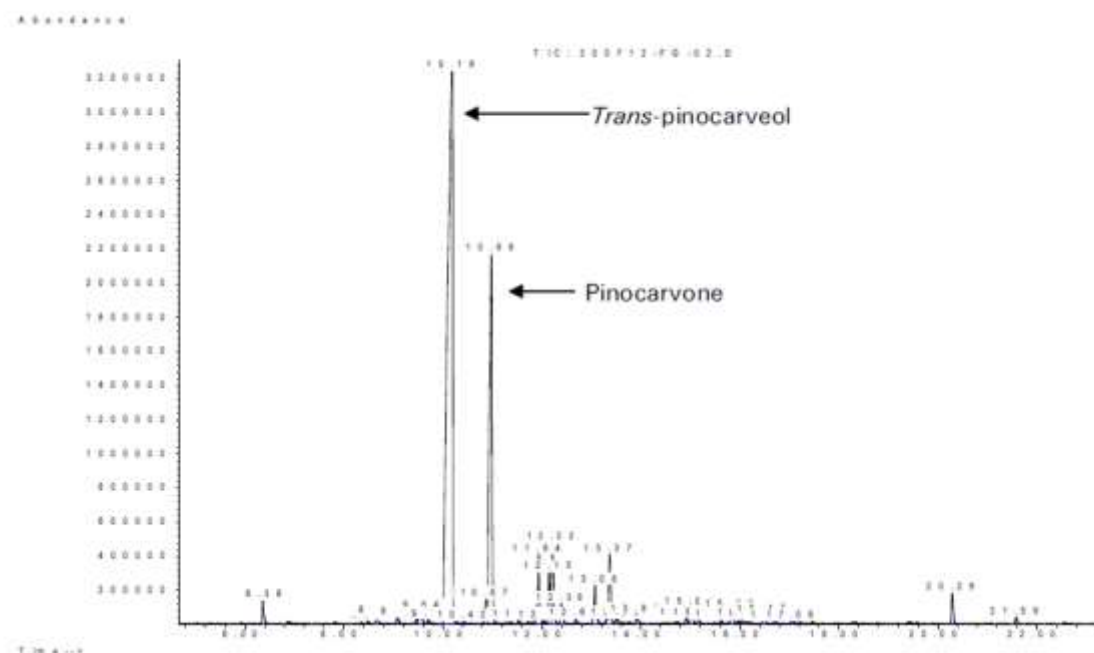


Figure 25: Chromatogramme des composés volatiles extraits de l'hydrolat de *Myrothamnus* collecté à Ambohiboroana.

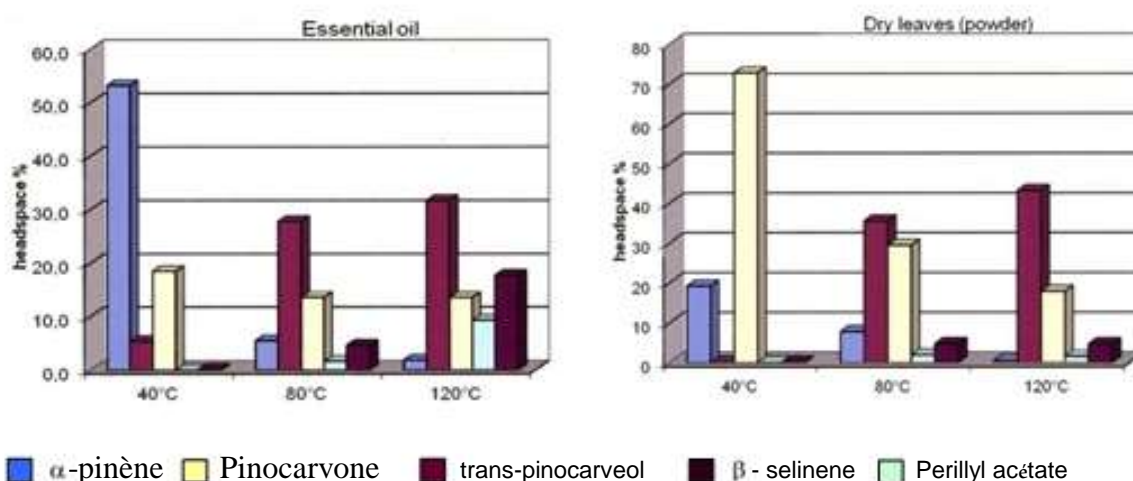
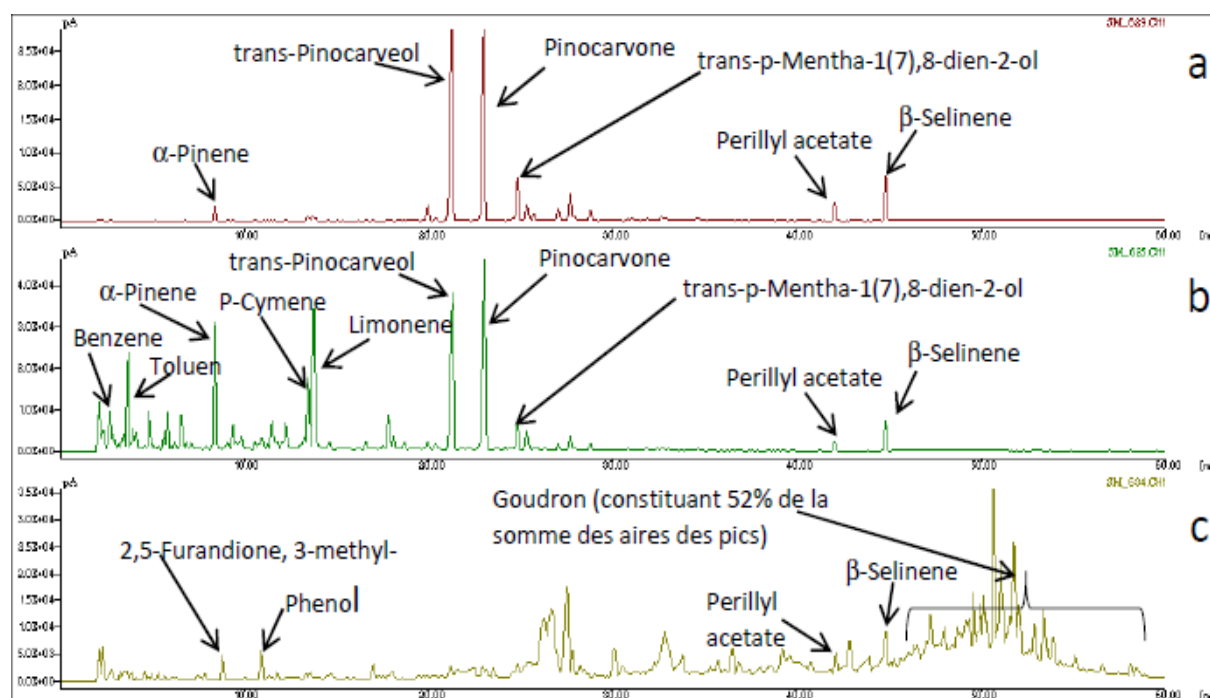


Figure 26: Analyse de l'espace de tête de l'HE et des feuilles sèches de *M. moschatus* à 40°C, 80°C et 120°C

Tableau 09 : Pourcentage comparatif des constituants principaux de l'HE, des feuilles sèches et les fumées actives par analyse SPME

Composés	HE (saison sèche)	HE (saison humide)	Feuilles sèches à 37°C	Fumée
α-Pinène	5.8	10.5	1.3	4.8
p-Cymène	0.9	1.6	-	4.6
Limonène	0.4	2.3	0.5	6.6
Trans-Pinocarvéol	36.3	35.6	35.5	12.2
Pinocarvone	19.8	20	30.5	15.1
Trans-p-Mentha-1(7),8-diène-2-ol	2.8	3.3	5.9	
Cis-p-Mentha-1(7),8-diène-2-ol	2.3	2.1		
Perillyl acétate	12.7	6.0	2.6	0.6
β-Sélinène	8.5	8.5	5.2	1.3



- Profil des composés volatiles des feuilles sèches à 37°C
- Profil des composés volatiles des fumées directement libérées par feuilles brûlées (simulation de fumée activement inhalée par une cigarette)
- Profil des composés volatiles de fumée passive libérée par les feuilles brûlées (simulation de fumée passivement inhalées)

Figure 27 : Chromatogramme SPME-GC-FID

Pour la fumée passive, le pourcentage identifié était très faible et les principaux composés sont presque totalement perdus (Figure 30c). En effet, 52% de la somme des aires sont des molécules non identifiées constituées par des goudrons ou tar (total aerosol residue). De nombreux composés caractéristiques d'une combustion incomplète, à savoir de nombreux alcanes, des alcènes, des alcools et des acides gras à chaîne longue sont présents sous une forme de goudron ou condensat.

Toutefois, à partir des chromatogrammes on peut constater que les constituants volatils des deux types de fumée étudiés, active et passive sont totalement différents. (Figure 30b-c)

V.4. RESULTATS PHARMACOLOGIQUES

V.4.1. Effet de l'HE de *Myrothamnus* sur la convulsion induite par la Pentylènetétrazole.

L'administration intrapéritonéale de PTZ chez les rats provoque une convulsion partielle d'abord puis sous forme tonico-clonique environ deux minutes plus tard.

L'huile essentielle obtenue à partir des plantes collectées à Ambohiborona aux doses de 0,8 ml/kg ; 0,4 ml / kg et 0,2 ml/kg n'induit pas les mêmes effets que celle d'Ifandana sur la convulsion. En effet, l'HE provoque seulement une légère augmentation significative de la latence des crises et une réduction de la durée de crise par rapport au contrôle.

Le Tableau 10 rapporte l'effet de l'administration sous-cutanée de l'HE de *Myrothamnus moschatus* d'Ifandana (0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8ml/kg) sur les paramètres mesurés de la convulsion induite par la Pentylènetétrazole.

Ce tableau montre que le temps de latence avant l'apparition des crises convulsives du lot témoin est de 68s et l'administration des doses croissantes de l'HE augmente ce temps en fonction de la dose de l'HE. Cette augmentation est significative ($p < 0,05$) à partir de 0,2ml/kg et à 0,8ml/kg on n'observe plus de convulsions, comme avec le diazépam administré à 5mg/kg.

Ces résultats montrent que l'administration sous-cutanée de l'HE et intrapéritonéale de diazépam augmente de façon dose-dépendante le temps de latence des crises convulsives.

Quant à l'intensité, l'incidence des crises tonico-cloniques et la durée des crises, elle diminue chez les animaux traités par rapport à celle des animaux témoins. Ainsi chez le lot témoin, elles sont de 4,6, 100% et 115,2s respectivement et à partir de la dose de 0,2ml /kg ces 3

paramètres diminuent significativement avec les doses testées et à 0,8ml/kg tous les animaux sont protégés des crises convulsives type tonico-cloniques. Dans les mêmes conditions expérimentales, le diazépam à 5mg/kg protège aussi les animaux des crises convulsives.

Ces résultats montrent que l'administration sous-cutanée de l'HE diminue de façon dose-dépendante l'intensité des crises, l'incidence des crises tonico-cloniques et la durée des crises convulsives.

Concernant le taux de mortalité, il diminue, chez les animaux traités par rapport à celui du lot témoin (50%), à partir de 0.1ml/kg (25% à 0%). Dans les mêmes conditions expérimentales, le diazépam à 5mg/kg protège les animaux de la mortalité

Tableau 10 : Effet de l'administration sous-cutanée de l'HE de *Myrothamnus moschatus* sur les paramètres mesurés de la convulsion induite par la Pentylnetetrazole chez le rat (n=4).

Produits	Doses	Temps de latence des crises convulsives(s)	Protection contre les crises convulsives (%)	Score des crises / 5	Incidence des crises tonico-cloniques (%)	Durée des crises convulsives(mn)	Mortalité dans 24h (%)
Huile d'olive	-	65±5	0	4,6±0.1	100	115,2±10,4	50
Diazépam (mg/kg)	5	-	100	0,0±0.0	0	0,0±0,0	0
Huile essentielle (ml/kg)	0,1	115±8	0	4,2±0.4	75	100,7±10,1	25
	0,2	147±11*	0	3,2±0.1*	50	85,4±7,3	0
	0,4	340±9**	50	2,0±0.1*	0	10,2±4,2**	0
	0,8	-	100	0,0±0.0	0	0,0±0,0	0

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (n=4)

V.4.2. Effet de l'HE sur la convulsion induite par la Picrotoxine.

L'administration intrapéritonéale de la Picrotoxine à 6mg/kg chez les souris provoque des convulsions tonico-cloniques. Le temps de latence, la durée des crises convulsives, le taux de protection contre les crises et la mortalité varient en fonction de la dose de produits administrés.

Le Tableau 11 montre l'effet de l'administration sous-cutanée de l'HE de *Myrothamnus moschatus* sur ces paramètres mesurés de la convulsion chez les souris induite par la Picrotoxine.

Ce tableau montre que le temps de latence, la durée des crises et le taux des animaux protégés de la convulsion sont respectivement de 360s, 74s et 0% chez le lot témoin. Le diazépam (5mg/kg) provoque 80% de protection alors que l'HE n'est pas capable de protéger les souris contre les crises convulsives. Cependant l'HE augmente le temps de latence et réduit la durée des crises de manière dose-dépendante.

A propos de la mortalité, l'HE diminue la mortalité à partir de 0,4ml/kg. Ainsi aux doses de 0,4 et 0,8ml/kg, elle est respectivement de 40% et 20%. Aux doses faibles (0,1 et 0,2ml/kg) tous les animaux sont morts. Néanmoins, le lot traité par le diazépam (5mg/kg) reste en vie.

Tableau 11: Effet de l'administration sous-cutanée de l'HE de *Myrothamnus moschatus* sur les paramètres mesurés de la convulsion chez les souris induite par la Picrotoxine (n=5).

Produits	Doses	Temps de latence des crises (s)	Durée des crises (s)	Protection (%)	Mortalité (%)
Huile d'olive	-	360±23	74±7	0	100
Diazepam (mg/kg)	5	1684±56	8±1	80	0
Huile essentielle (ml/kg)	0,1	489±24	68±7	0	100
	0,2	658±36*	51±4*	0	100
	0,4	876±34**	34±2**	0	40
	0,8	1369±50***	33±1***	0	20

* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 ; (n= 5)

V.4.3. Evaluation de l'activité sédatrice

Les résultats des effets sédatifs de l'HE de *Myrothamnus moschatus* sont exprimés en comparaison avec le groupe contrôle.

V.4.3.1 Test de traction

On observe que les animaux traités par l'huile essentielle du *Myrothamnus moschatus* aux doses de 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8ml/kg réalisent un rétablissement normal immédiat (Tableau 12). Ceci indique que cette huile essentielle n'a pas des effets sédatifs significatifs sur les comportements de la souris.

V.4.3.2. Test de la cheminée

Les animaux traités à l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus* à 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8ml/kg, ne montrent pas de perte de l'initiative et de la curiosité.

V.4.3.3 Test de la planche à trous

Dans ce test, l'huile essentielle du *Myrothamnus moschatus* (0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8ml/kg, sc) ne réduit pas le nombre cumulatif des trous explorés (en relation avec leur curiosité).

Ces données nous mènent à conclure que l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus* ne possède pas d'effet sédatif sur le système nerveux central.

Tableau 12 : Activité sédative de l'HE de *Myrothamnus moschatus*(n=6)

Test	Paramètres mesurés	Témoins	Diazépam IP	Huiles essentielle de <i>Myrothamnus moschatus</i>			
			DZP (3mg/kg)	HE (0.1ml/kg)	HE (0.2ml/kg)	HE (0.4ml/kg)	HE (0.8ml/kg)
Test de la traction	Temps de rétablissement	0,9 s±0,0	10s±0,3	0,7 s ± 0,1	1s± 0	1,1 s±0,12	1,2s±0,16
Test de la cheminée	Temps pour remonter le tube	7 s± 0,5	> 2 mn	7,2 s ± 2	7,4 s ± 1,7	7,5 s±1,9	7,6±1,5
Test de la planche à trous	Trous explorés au cours de 5mn	10 ± 1	0,0±0,0	12 ± 1	11±1,8	11,8±2,0	11,5±1,8

(n=6)

V.4.4. Test de fixation au récepteur GABA_A-benzodiazépines.

Il s'agit du taux de fixation à différentes concentrations de l'HE de *Myrothamnus moschatus*. L'activité est définie comme étant la capacité de déplacer le flunitrazépam de son site de fixation au GABAA-BZD pour lesquels nous avons un faible taux de fixation du flunitrazépam. Ce résultat montre que l'HE déplace de manière modérée le flunitrazépam. Le taux de fixation au complexe de récepteur GABAA-benzodiazépine est dose-dépendante

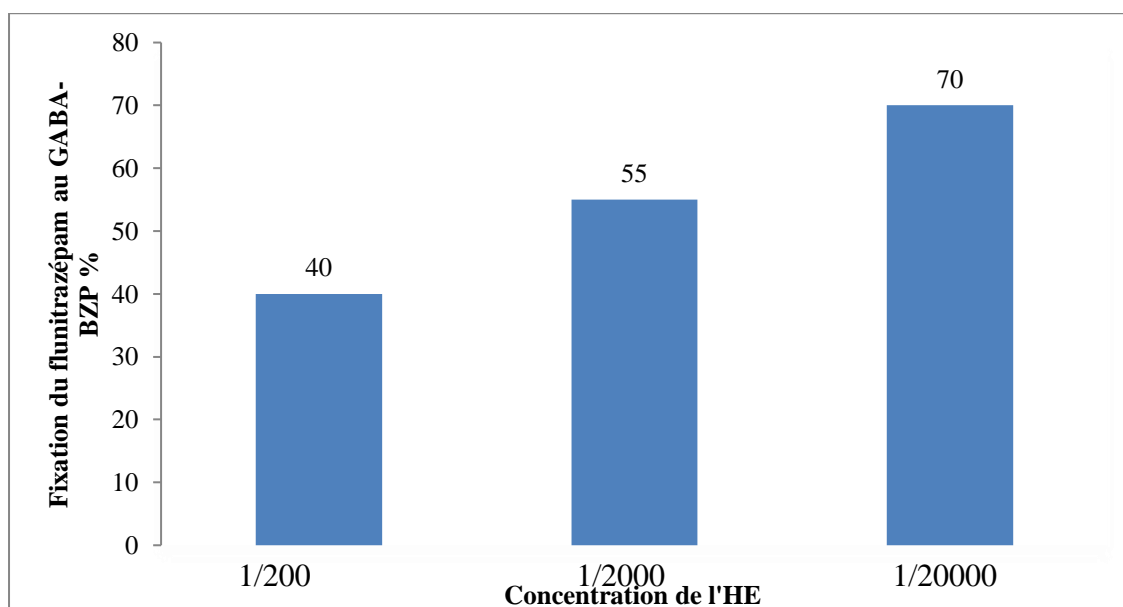


Figure 31 : Test de fixation au récepteur GABAA-benzodiazépines

V.4.5. Effet de l'HE sur les cellules nerveuses SHSY5Y.

Après 48 heures d'incubation des cellules SHSY5Y suivie de coloration à l'aide de phalloïdine, les cytosquelettes reflétant la morphologie cellulaire sont colorés en rouge. Les images (figure 31) en immunofluorescence montrent clairement que les cellules de contrôle ont une morphologie de type épithélial qui est une forme polygonale, avec très peu ou pas de protrusions cellulaires (neurites). Par contre, les cellules traitées avec l'HE à différentes concentrations (1 : 40000, 1 : 80000, 1 : 160000, 1 : 320000) montrent une morphologie neuronale typique. En effet, les cellules ont développé un grand nombre de neurites qui connectent les cellules les unes avec les autres, formant ainsi un réseau de neurones. Cet effet est dose-dépendant.

Ce résultat montre que l'HE est capable de promouvoir la neuritogénèse c'est-à-dire la formation des neurones et leurs différenciations de manière dose-dépendante.

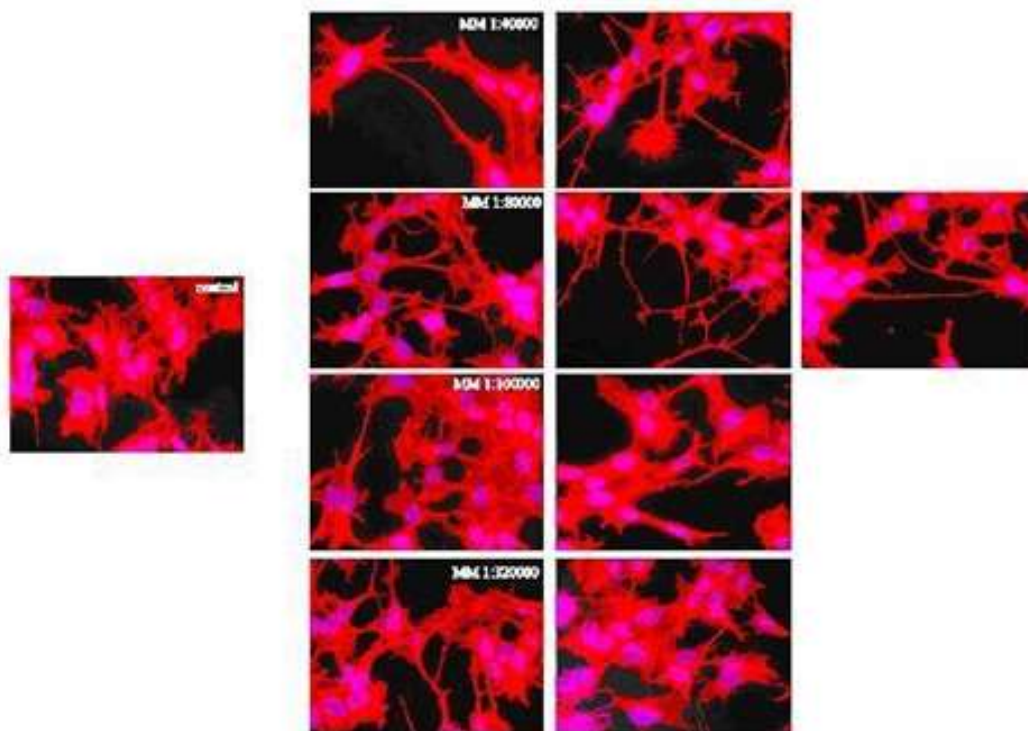


Figure 32 : Croissance neuronale observée à différentes concentrations de l'huile essentielle de *M. moschatus*

Chapitre VI : DISCUSSION

Les objectifs généraux de cette étude étaient d'étudier les activités biologiques et la variation écologique des constituants chimiques de l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus* en fonction des 5 sites écologiques.

Dans l'ensemble les travaux de laboratoire ont confirmé les utilisations traditionnelles de fumée de *M. moschatus* pour le traitement des convulsions. Ils ont également confirmé notre hypothèse postulant que les constituants actifs seraient les substances volatiles. Des auteurs ont rapporté les effets anticonvulsivants des huiles essentielles extraites de 30 espèces végétales et 30 constituants isolés (Almeida et al. 2011). Des modèles animaux spécifiques, à savoir les convulsions induites par les produits chimiques convulsivants (PTZ, picrotoxine, pilocarpine, strychnine), l'électrochoc étaient principalement utilisés pour l'évaluation de l'activité anticonvulsivante. C'est avec cette tendance que nous avons évalué l'effet de l'huile essentielle de *M. moschatus* dans le modèle PTZ et PTX. L'effet anticonvulsivant était évident, sans aucune toxicité à la dose la plus élevée testée (0,8ml/kg), et sans effet sédatif. En plus de son activité anticonvulsivante, les huiles essentielles ont également diverses activités dans le système nerveux central (SNC), tels que l'anxiété, l'apprentissage, la mémoire, l'attention, l'excitation, la relaxation, la sédation et le sommeil, l'humeur, le comportement et la perception, le stress, la démence et la maladie d'Alzheimer (Dobetsberger et al. 2011). Une activité supplémentaire qui attire notre attention est la croissance des neurones induite par les huiles essentielles. On croyait autrefois que la régénération nerveuse du système nerveux central des mammifères était irréversible. Cependant la neuroscience moderne a révélé que les nerfs se réorganisent en permanence tout au long de leur vie. La plasticité neuronale, également connue sous le neuroplasticité, est le changement de la structure, la fonction et l'organisation des neurones ou des cellules nerveuses, en réponse à de nouvelles circonstances. Il se réfère spécifiquement au renforcement ou l'affaiblissement de connexions nerveuses ou l'ajout de nouvelles cellules nerveuses basées sur des stimuli extérieurs. Parfois la neuroplasticité peut également contribuer à l'endommagement des cellules nerveuses. Il a été suggéré que les meilleurs exemples pour l'étude de la plasticité peuvent être dans le domaine de l'épilepsie (Scharfman, 2002). On a aussi récemment mis en évidence que les neurones endommagés se régénèrent sous les stimuli chimiques. À ce point, la d-limonène a été étudiée pour sa capacité à favoriser la croissance des neurones dans les cellules PC12m3. Certains auteurs ont démontrés que la croissance des neurones peut être induite lorsque les cellules sont traitées avec la d-limonène (Shinomiya et al., 2012). De même, les β -eudesmol a été rapporté capable de provoquer l'extension des neurones dans les cellules des phéochromocytomes du rat (Obara et al., 2002). Nos résultats montrent que

l'huile essentielle de *M. moschatus* induit l'extension des neurones des cellules SHSY5Y en culture. Une revue de la littérature rapporte que la neuritogénèse est obtenue non seulement avec les huiles essentielles mais également avec des composés provenant de sources naturelles possédant une potentielle activité sur l'excroissance des neurites (More et al., 2012). La régénération neuronale ou la neurogénèse peut également être induite en présence de substances stimulatrices telles que le facteur de croissance des nerfs (NGF) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), et ceci a été exploité dans des modèles d'épilepsie. En effet il a été démontré que l'administration du facteur de croissance fibroblastique 2- (FGF-2) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) dans une lésion d'hippocampe réduit les crises convulsives spontanées dans un modèle d'épilepsie chez les rats adultes (Paradiso et al., 2009). Ainsi l'effet anticonvulsivant de l'HE de *Myrothamnus moschatus* pourrait être expliqué par sa capacité à stimuler les cellules germinales, de développer et de différencier des nouveaux neurones et des axones à la manière de BDNF et le NGF. La perte des neurones est l'une des principales caractéristiques d'une lésion neuronale. La réorganisation du réseau neuronal perdu dans le cerveau lésé est nécessaire pour la restauration des fonctions physiologiques normales. En effet, la croissance neuronale joue un rôle important dans la protection nerveuse ou neuroprotection. Beaucoup de patients et des familles touchées par l'épilepsie posent cette question : est-ce que les crises d'épilepsie endommagent le cerveau? Sur la base des données expérimentales et cliniques, Sutula et al., ont rapporté que les crises convulsives répétées non contrôlées entraînent des dommages neuronaux qui contribuent au déclin progressif de la fonction cognitive (Sutula et al., 2003). En effet, il est important de développer des traitements par les neuroprotecteurs pour éviter les conséquences à long terme des crises convulsives répétées, une intervention efficace permettant le contrôle complet des crises. Pour cela, les huiles essentielles entre autre l'HE de *Myrothamnus moschatus* pourrait être un bon candidat.

En plus on sait que les cellules nerveuses de la lignée SH-SY5Y augment la synthèse des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 du cortex cérébrale. Or l'activation de ces récepteur par leurs agonistes endogènes qui sont l'anandamide et l'arachidonoylglycerol diminuent la libération des molécules excitatrices cérébrales comme le glutamate. Donc l'activité anticonvulsivante de l'HE pourrait être liée à sa capacité à augmenter le nombre de récepteurs aux canabinnoïdes qui entraînant la diminution du mécanisme excitateurs du cerveau.

Nous avons trouvé de manière surprenante que la composition d'huile essentielle de l'échantillon prélevé à Ambohiborona contient de petites quantités de trans-pinocarvéol et pinocarvone. Nous avons ensuite extrait l'hydrolat avec de l'hexane et trouvé que la phase

organique contient de la trans-pinocarvéol et de la pinocarvone comme produits majoritaires et constituent 77% des composants totaux. Ces deux composés sont donc restés dans la phase aqueuse lors de la distillation à la vapeur. Par ailleurs, la phase organique n'a pas d'effet anticonvulsivant à différents doses testées (0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8ml/kg). Ce résultat indique que le constituant (s) majeur de l'extrait n'est (sont) pas responsable(s) de l'activité anticonvulsivante. Ils peuvent agir en synergie avec d'autres composés mineurs, ou des constituants complètement différents peuvent être responsables de l'activité biologique. Ce résultat est conforme à la perte d'efficacité de l'huile essentielle après 2 mois d'utilisation, probablement due à une évaporation progressive des substances volatiles bioactives qui ne sont pas liées à la trans-pinocarvéol et pinocarvone (Observation pendant les essais cliniques).

Cela nous a incités à procéder à l'analyse de l'espace de tête de l'huile essentielle de *M. moschatus* et les feuilles sèches, ainsi que l'analyse SPME (Microextraction en phase solide) de feuilles sèches et fumées.

La fumée des feuilles sèches de *M. moschatus* est utilisé pour traiter les convulsions, les migraines, l'asthme. Les plus pertinents résultats ont été obtenus avec l'analyse SPME des fumées actives et passives. La SPME est une nouvelle technique d'extraction d'un échantillon qui apporte des capacités uniques à l'analyse chromatographique des solutions diluées dans des matrices difficiles à la fois liquide et gazeux (Vas et al., 2004).

Nous avons constaté que la différence la plus frappante entre la composition chimique des fumées, des feuilles sèches et de l'huile essentielle de *M. moschatus* était l'importante présence de limonène dans les fumées. Nous avons postulé que le trans-pinocarvéol pourrait être un précurseur de ce composé lors de réarrangement thermique. En effet, il a été confirmé que le limonène est le premier produit de la pyrolyse du β -pinène et le trans-pinocarvéol. Une publication scientifique a rapporté les réarrangements thermiques de monoterpènes et monoterpénoïdes (Stolle et al., 2009). La limonène était également retrouvée dans la composition de la fumée de cigarette et cigare en quantité considérable (Matsushima et al., 2014 ; Pandey et Kim, 2010). Il est important de mentionner que dans la liste des substances volatiles anticonvulsivantes (Almeida et al., 2011), la limonène est le seul composé qui est présent dans *M. moschatus*. En outre, ce composé possède un effet neuroprotecteur (Shinomiya et al., 2012). Par conséquent, pour l'usage thérapeutique de la l'huile essentielle de *M. moschatus*, il peut être nécessaire d'ajuster la teneur en limonène en ajoutant de limonène exogène.

A part la nourriture, l'un des premiers usages des plantes et qui est souvent négligé était la production de fumer, datant de l'époque des premiers espèces d'hominidés. Les plantes ont été brûlées à des fins médicinales et récréatives, des cérémonies magico-religieuses, la lutte contre les ravageurs, la conservation des aliments, des arômes et parfums. L'utilisation de la fumée d'origine végétale est donc un trait culturel important. En Afrique, brûlant les plantes et inhalant la fumée émise pendant des rituels, par exemple, pour expulser les mauvais esprits ou pour traiter les maladies respiratoires tels que la toux, le rhume, les infections, la grippe et l'asthme est, très fréquent. Cependant, ce mode d'administration des composés actifs reste chimiquement et pharmacologiquement mal étudié puisque les études sur les produits de la combustion des matières volatiles d'espèces végétales et leurs dérivés sont relativement rares. La thérapie par inhalation offre certains avantages tels que moins d'invasivité, la spécificité du site, la facilité et la rapidité pour atteindre les bronchioles, les poumons et le cerveau, l'absence du premier passage hépatique, moins d'exposition systémique et moins d'effets indésirables et donc a été pratiquée en médecine traditionnelle depuis les temps anciens. Généralement, la combustion des composés qui ne sont pas présents dans tous les extraits au solvant ou avec la méthode d'extraction standard, par exemple distillation à la vapeur, qui sont normalement utilisés dans les études phytochimiques et la formation de nouveaux composés au cours du processus de combustion, par rapport à la matrice naturelle peut se produire. En fait, lors de la combustion, plusieurs composants volatils peuvent se dégrader, par hydrolyse, par oxydation, par déshydratation et par pyrolyse produisant des dérivés qui possèdent une meilleure activité que les molécules mères. D'autre part, la fumée est connue par la présence de plusieurs composés toxiques, par exemple benzopyrènes, conduisant à une cytotoxicité générale plutôt que des effets thérapeutiques. Il reste donc un défi pour les chercheurs d'identifier les composés actifs dans la fraction complexe de la fumée émise par la combustion des plantes utilisées par les tradipraticiens. A cet effet, la découverte des techniques SPME (MicroExtraction en Phase Solide) optimise l'analyse des fumées. Ainsi nous avons effectué l'analyse SPME de la fumée produite par la combustion des feuilles.

La fumée des feuilles sèches de *M. moschatus* est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des convulsions, des migraines et de l'asthme. Par ailleurs nos résultats montrent que l'huile essentielle et la fumée présentent une différence importante au niveau des constituants chimiques en fonction de la température. En effet cette dernière pourrait changer les propriétés physico-chimiques de la fumée et de l'huile essentielle.

La différence entre les deux types de fumée (active et passive) pourrait être expliquée par le principe de la combustion d'une cigarette (Figure 32) puisque la formation des fumées est

similaire à celle des fumées de cigarette. En effet, le fait de fumer directement, ou de façon active, et recevoir de la fumée indirecte ou passive produisent des phénomènes différents. Quand le fumeur l'allume, le bout distal de la cigarette, elle dégage d'une fumée sous forme d'aérosol qui est une suspension de fines gouttelettes d'eau et de microparticules dans une phase gazeuse. La combustion peut dépasser 1000°C et nécessite la présence d'oxygène. Elle est dans la plupart des cas incomplète et produit, à part la fumée, des cendres. Après la zone de combustion, deux autres phénomènes, se produisent : la pyrolyse et la distillation, qui ne nécessitent pas ou peu d'oxygène, mais peuvent s'effectuer en présence d'autres gaz tel que l'azote. Certaines substances organiques du tabac sont détruites par la pyrolyse et la distillation à la température entre 1000 et 2000°C et se transforment en résidus carbonés, huileux et gazeux peu volatils, qui entre dans la composition de la fumée active (US, 2010). Cette dernière est donc composée dans sa phase gazeuse de composés organiques volatiles extraits par la chaleur à partir du tabac restant et par distillation d'azote et d'oxygène, de gaz carbonique et de gaz toxiques. La fumée passive est plus riche en composant chimique, gazeux et particuliers. Elle est moins concentrée ou ne contient presque plus de composés organiques volatils. Par contre la substances toxique domine (52% de goudron) et ne présente aucun intérêt thérapeutique.

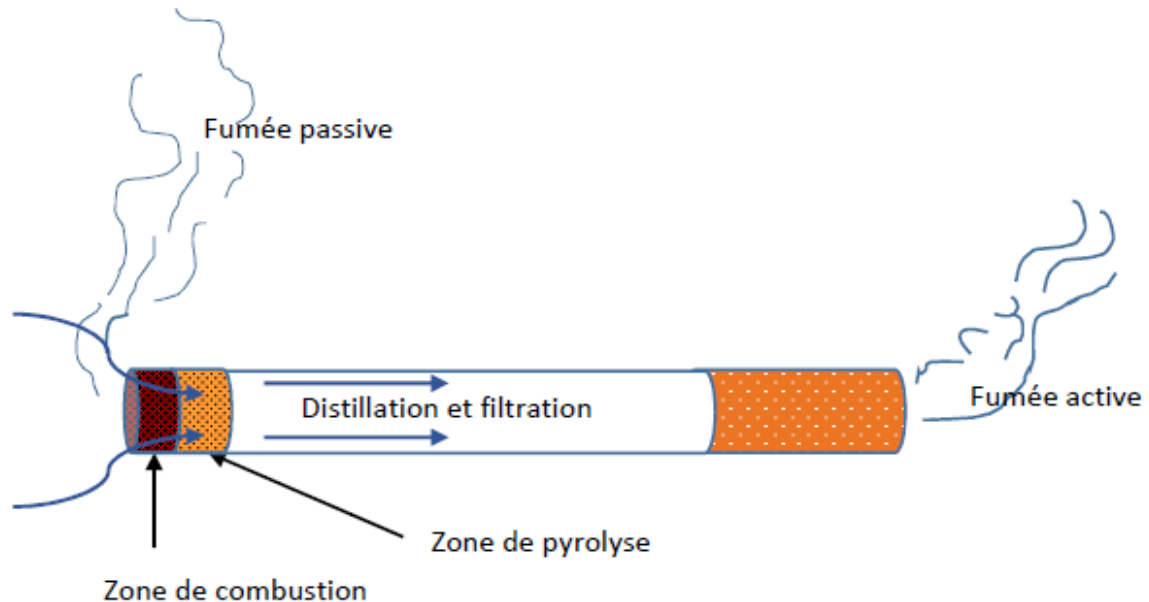


Figure 33 : Principe de formation des fumées de cigarette

Les analyses phénotypiques ont été principalement utilisées pour évaluer les activités anticonvulsivantes des huiles essentielles. Les études complémentaires, visant à élucider le mécanisme (s) d'action de l'huile ou des composants individuels sont encore rares. L'épilepsie

est souvent considérée comme le résultat d'un déséquilibre entre le système nerveux excitateur et inhibiteur conduisant à la décharge neuronale hypersynchrone inappropriée. Les médicaments antiépileptiques agissent généralement sur ces deux paramètres. D'une part, il y a des médicaments qui antagonisent les récepteurs et les canaux impliqués dans le processus de l'excitation et d'autre part, il y a ceux qui améliorent ou potentialisent les phénomènes d'inhibition. Les antiépileptiques inhibiteurs des décharges excessives neuronales ou leurs propagations ont le(s) mécanisme(s) d'action suivants (Lignelet, 2011).

- la réduction de la perméabilité au sodium (Na^+) de la membrane cellulaire des canaux sodiques voltage-dépendants. Ces canaux sodiques sont responsables de la dépolarisation de la membrane de la cellule nerveuse et de la conduction des potentiels d'action à travers la surface des cellules neuronales. Le blocage de ce type de canaux est le plus fréquent mécanisme d'action des médicaments antiépileptiques actuellement disponibles sur le marché tels que la phénytoïne, la carbamazépine, la lamotrigine, le felbamate, le topiramate, l'oxcarbazépine, la zonisamide, la rufinamide et la lacosamide;
- la réduction de la perméabilité au calcium (Ca^{2+}) de la membrane cellulaire des canaux calciques voltage-dépendants, ce qui entraîne la réduction de la génération de potentiels d'action (Angehagen et al., 2005). Ces canaux calciques contribuent à l'excitabilité électrique des neurones et sont étroitement impliqués dans le contrôle de la libération des neurotransmetteurs à partir des terminaisons nerveuses pré-synaptiques. Les antiépileptiques agissant par l'intermédiaire de ce mécanisme comprennent: le valproate et l'éthosuximide;
- l'augmentation du courant sortant de potassium (K^+): les canaux potassiques voltage-dépendants sont principalement responsables de la repolarisation de la membrane cellulaire à la suite d'une augmentation du potentiel d'action mais également le maintien de l'équilibre entre l'entrée et la sortie d'ions dans chaque neurone. Les antiépileptiques empruntant ce mécanisme comprennent la rétigabine;
- renforcer les effets inhibiteurs des neurotransmetteurs GABA (Gamma-Amino-Butyric Acid), entraînant une augmentation de la perméabilité à l'ion chlorure qui réduit l'excitabilité neuronale. Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur prédominant dans le système nerveux central des mammifères et libéré dans plus de 40% des synapses. Les antiépileptiques agissant par l'intermédiaire de ce mécanisme sont: les barbituriques, les benzodiazépines, la gabapentine, le lévétiracétam, la tiagabine, la vigabatrine, le topiramate et le valproate;

- inhiber le neurotransmetteur excitateur qu'est le glutamate. Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le cerveau des mammifères. L'antiépileptique agissant par ce mécanisme est la lamotrigine.

Le test de l'activité de l'HE de *Myrothamnus moschatus* à faible dose sur la convulsion provoquée par la Pentylènetétrazole montre que l'HE diminue l'intensité, la durée et la fréquence des crises convulsives, augmente le temps de latence des crises et protège tous les rats contre la mort pendant l'observation. A la dose de 0,8ml/kg, l'HE protège complètement tous les animaux traités contre la crise convulsive.

Cependant, testée sur la convulsion provoquée par la Picrotoxine (PTX) chez les souris, l'HE de *M. moschatus* n'a qu'une activité modérée. En plus le résultat sur le test de fixation de l'HE donne un taux de fixation faible au complexe de récepteur GABA-benzodiazepines. Le PTZ est un stimulant du système nerveux central doué des propriétés épiléptogènes et est utilisé largement pour étudier les phénomènes des crises et d'identifier les extraits / composés susceptibles de contrôler les crises (Koutroumanidou et al., 2013). Le PTZ est un antagoniste non compétitif de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) au niveau du récepteur GABA_A, par lequel il exerce son effet convulsif mais le mode d'action moléculaire exact n'est pas encore entièrement élucidé. Le site de fixation exact de PTZ au complexe récepteur GABA_A ou autres sites n'est pas encore connu (Hansen et al., 2004). Le récepteur GABA_A est un canal chlorure dont l'ouverture est médiée par la fixation de l'agoniste qui est le GABA. Cette action induit une inhibition majeure du système nerveux central provoquant la sédation, le sommeil et l'inhibition des convulsions (Kaila et al., 2014). Le test sur le PTZ est effectué pour identifier l'efficacité d'un produit sur les crises convulsives généralisées (Löscher and Schmidt, 1988; De Deyn et al., 1992; Kupferberg and Schmutz, 1998). De ce fait, l'effet de l'HE sur la convulsion induite par le PTZ pourrait expliquer son efficacité sur les crises convulsives généralisées chez les rats. La Picrotoxine (PTX) est un autre agent chimique convulsif qui est également largement utilisés dans le modèle animal de convulsion. Il s'agit également d'un antagoniste non compétitif du récepteur GABA_A. Il bloque les canaux chlorures ou module d'une manière allostérique ces canaux d'où son effet convulsivant (Lasoń et al., 2013). Ainsi, l'activité anticonvulsivante de l'HE de *Myrothamnus moschatus* pourrait être attribuée en partie à sa fixation sur le récepteur GABA_A même si elle est modérée. Cette faible fixation pourrait être la cause de l'absence de propriété sédative de l'HE. On ne sait pas encore lequel des constituants de l'HE est à l'origine de cet anticonvulsivant mais on peut dire qu'un ou plusieurs constituants majeurs sont impliqués directement dans l'activité sur le complexe de canal chlorure du récepteur GABA_A.

Néanmoins, cela n'exclut pas l'implication d'autres mécanismes comme l'antagonisme des canaux sodiques ou calciques voltage-dépendants puisque des études ont montré que les crises convulsives provoquées par le PTZ peuvent être bloquées par l'ethosuximide qui réduit les courants calciques des canaux de type T type calcium currents (Rho and Sankar, 1999). La différence d'efficacité contre les convulsions induites par la PTZ et PTX pourrait être expliquée par la différence de mécanisme d'action sur le blocage des entrées des ions chlorures causé par ces deux agents convulsivants et l'action provoquée par le (s) composant (s) d'HE de *M. moschatus*.

D'après nos observations ethnopharmacologique sur l'utilisation native de *M. moschatus*, l'inhalation de sa fumée semble est très efficace pour arrêter les convulsions de la personne malade. L'huile essentielle a une forte odeur agréable similaire à celle des conifères. Et des auteurs (Efron, 1956 ; Betts et al., 1995) ont rapporté que les crises convulsives peuvent être également contrôlées par la stimulation olfactive. La réception et l'interprétation de l'odeur se produit dans le système limbique du cerveau, en particulier dans le lobe temporal qui est le site des formes les plus courantes d'épilepsie souvent associées à la pharmacorésistance. Après l'inhalation, l'huile essentielle stimule les récepteurs de l'odorat dans le nez puis des messagers chimiques seront envoyés par les nerfs vers le système limbique du cerveau.

Des modèles animaux ont confirmé ce lien entre l'olfaction et les crises convulsives. En effet des déficiences en neurotransmetteurs ont été détectés dans le lobe olfactif des rats génétiquement épileptiques (Dailey et al., 1991) parce que la stimulation olfactive par forte odeur de toluène est capable d'atténuer l'incidence, la durée et l'intensité des crises chez les rats (Ebert et Löscher, 2000). En plus, des études cliniques ont démontré que la stimulation électrique du lobe olfactif constitue un traitement efficace contre l'épilepsie réfractaire aux autres traitements (Han et al., 2014). La stimulation chimique ou électrique du système olfactif peut donc diminuer ou arrêter les convulsions. Ainsi l'efficacité par inhalation de l'HE contre les crises convulsives pourrait être due à la stimulation du système olfactif. L'inhalation de l'huile essentielle de *M. moschatus* pourrait avoir une place importante dans l'application thérapeutique pour la prévention des convulsions. En outre son effet anticonvulsivant est rapide parce que l'absorption par le nez est aussi rapide qu'une injection intraveineuse. Par ailleurs, l'huile essentielle peut également être utilisée comme traitement de l'épilepsie réfractaire aux antiépileptiques existants.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail rentre dans le cadre de la valorisation de la biodiversité et de la médecine traditionnelle malgache.

Les principaux constituants chimiques de *Myrothamnus moschatus* dans les 5 stations explorées ont été identifiés. La variation des composants volatiles de l'HE de cette plante en fonction des sites étudiés nous a conduits à conclure qu'il y a 3 chémotypes différents dans les populations de *Myrothamnus moschatus*. Ces différences sont non seulement dues à la variabilité des plantes mais aussi à l'interaction de l'environnement et de la sélection génétique conduisant à ce polymorphisme. L'absence de relation entre la dioïcité et la phytochimie au sein d'une population confirme que la production de différentes classes de métabolites secondaires au sein des espèces dioïques est un phénomène rare (Simpson, 2013). Cette étude représente également un exemple montrant les relations entre l'écologie, les variations chimiques, les données ethnobotaniques et la confirmation de certaines utilisations ethnomédicales par des méthodes scientifiques.

Les utilisations traditionnelles de *M. moschatus* pour le traitement de la convulsion ont été confirmées par les méthodes scientifiques et traduites en applications thérapeutiques abordables pour la gestion des crises convulsives pour lesquelles les médicaments classiques seuls ne sont pas efficaces et aussi pour les patients n'ayant pas accès aux médicaments conventionnels. En effet il ne faut pas négliger les croyances traditionnelles qui sont profondément liées à la culture ((Tikhtman, 2013) si on veut palier l'insuffisance des soins de santé primaire disponibles à Madagascar. L'intégration des pratiques thérapeutiques modernes aux pratiques traditionnelles est nécessaire et cela implique des collaborations médicales étroites entre les médecins et les tradipraticiens. C'est la stratégie même de l'OMS 2014-2023 sur la médecine traditionnelle.

Nos résultats ouvrent de nombreuses pistes de recherche pour exploiter à fond toutes les activités biologiques possibles de *Myrothamnus moschatus*. Ainsi nous envisageons procéder à :

- élucider le(s) mécanisme(s) d'action de l'huile essentielle de *M. moschatus* en isolant le ou le(s) composants responsable(s) de cette activité anticonvulsivante puisque la plupart des tests pharmacologiques utilisés pour valider l'activité anticonvulsivante des huiles essentielles sont des tests phénotypiques, c'est-à-dire basés seulement sur l'observation des comportements des animaux.
- étudier le rôle de l'odorat et le système olfactif dans les effets anticonvulsivants de l'huile essentielle,

- explorer l'utilité thérapeutique de l'huile essentielle dans d'autres troubles cérébraux, dans le cadre de la polypharmacologie c'est-à-dire l'efficacité thérapeutique d'un ou des principe(s) actif(s) sur plusieurs maladies.
- assurer la pérennité de la disponibilité de *Myrothamnus moschatus* par la mise au point de la culture en grande échelle. Néanmoins, il s'agit d'un grand défi pour nous puisque cette plante ne pousse que dans les rochers et en plus, elle est sensible aux facteurs environnementaux.

REFERENCES

WEBOGRAPIHIES

Tuduri L (2002). *Analyse de traces de composes organiques volatils dans l'air par microextraction sur phase solide*. [en ligne]. Pau, <http://www.theses.fr/2002PAUU3007>

BIBLIOGRAPHIES

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4th edn, *Allured Publishing Corporation Company Carol Stream, IL., USA*.

Almeida RN, Maria de MF, Maior FNS, Sousa DP (2011). Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules*, 16: 2726-2742.

Al Mousawi A.H. and Al-Naib F.A.G. (1975). Allelopathic effects of Eucalyptus microtheca F.Muell. *J. Univ. Kuwait, (Sci)* 2: 59-65

American Psychiatrie Association (1997). Practice guidelines for the treatment of patients with schizophrenia. *AMJ Psych.* 154:1 -36.

Andriantseho LM, Ralaizandriny D (2004). Prévalence communautaire de l'épilepsie chez les Malgaches. *Epilepsies*, 16(2): 83-86.

Angehagen M, Ben-Menachem E, Ronnback L, Hansson E (2003). Novel mechanisms of action of three antiepileptic drugs, vigabatrin, tiagabine, and topiramate. *Neurochem Res*, 28:333-340.

Angehagen M, Ronnback L, Hansson E, Ben-Menachem E (2005). Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *J Neurochem*, 94:1124-1130.

Annegers JF, Hauser A, Coan SP, Rocca WA (1998) A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *N Engl J Med.* 338(1): p. 20-4.

Apprison MH, Galvez-Ruano E, Robertson DH, Lipkowitz KB. (1996). Glycine and GABA receptor: Molecular Mechanisms controlling chloride ion flux. *J. Neurosci. Res.*, 43: 372-381.

Arthur C.L., Pawliszyn J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62: 2145-2148.

10-Association Française de Normalisation. Recueil de normes Françaises “Huiles essentielles”, AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006., 1986

Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouénou B., Menut C. & Sohounhloué D. (2012). Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.

Azanchi T, Shafaroodi H, Asgarpanah J (2017). Anticonvulsant activity of Citrus aurantium blossom essential oil (neroli): involvement of the GABAergic system. *Nat Prod Commun* Nov; 9(11):1615-1618.

Barel S., Segal R. & Yashphe J. (1991). The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 33: 187-191.

Bartelt R J. (1997). Calibration of a Commercial Solid-Phase Microextraction Device for Measuring Headspace Concentrations of Organic Volatiles. *Analytical Chemistry*. 1 fevrier. 69(3) : 364-372. DOI 10.1021/ac960820n.

Beaulieu P. (2006). Pharmacologie de la douleur. *Les presses de l'Université, Montréal*, 608.

Becker A, Grecksch G, Brosz M. (1995). Antiepileptic drugs--their effects on kindled seizures and kindling-induced learning impairments. *Pharmacol Biochem Behav*, 52(3): 453-9.

Bedi G., Tonzibo Z.F., Chalchat J.C. & N'Guessan Y.T. (2001). Composition chimique des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* L. King Robinson (Asteraceae) Abidjan Côte d'Ivoire. *Journal de la Société Ouest Africaine de Chimie*, 11: 29-37.

Bedi G., Tonzibo Z.F., Chopard C. & N'Guessan Y.T. (2004). Etude des effets antidouleurs des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* et de *Mikania cordata*, par action sur la Lipoxigénase L-1 de soja. *Physical Chemical News*, 15: 124-127.

Bedi G., Tonzibo Z.F., Oussou K.R., Chopard C., Mahy J.P. & N'Guessan Y.T. (2010). Effect of essential oil of *Chromolaena odorata* (Asteracea) from Ivory coast, on cyclooxygenase function of prostaglandin-H synthase activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(8): 535-538.

Ben-Menachem E (1995). Vigabatrin. *Epilepsia* 36 Suppl 2:S95-104.

Berg, A.T.; Jallon, P.; Preux, P.M. (1986). The epidemiology of seizure disorders in infancy and BERNABE J. Etude in vitro des récepteurs aux benzodiazépines, D.E.À. de toxicologie, centre des sciences de l'Environnement de Metz, , 113 p.

Betts T, Fox S, MacCallum R. (1995). Using olfactory stimuli to abort or prevent seizures: countermeasure or cue-controlled arousal manipulation? Is there something special about smell? *Epilepsia*, 36(Suppl 3): S25.

Bewley JD, Krochko JE (1982) Desiccation-tolerance. In OLLange, PS Nobel, CB Osmond, H Ziegler, eds, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 12B. *Physiological Ecology II*. Springer-Verlag, Berlin, 325–378.

Bialer, M. and H.S. White (2010) Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 9(1): p. 68-82.

Bianchin J.N., Nardini G., Merib J., Dias A.N., Martendal E., Caraseka E (2012). Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure. *Journal of Chromatography A* 1233: 22-29

Birkhimer LJ, Curtis JL, Jann MW. (1985) Use of carbamazepine in psychiatric disorders. *Clin Pharm*, 4:425-434.

Boiteau P (1967). Sur deux plantes autochtones de Madagascar utilisées à la manière du chanvre comme stupéfiant. *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris*, 264: 41-42.

Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Kouakou G., N'guessan Y.T. Costa J. & Casanova. (2006). Combined analysis of cymbopogon giganteus Chiov. Leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and 13-NMR. *Compte rendu de Chimie*, 99 : 164-168.

Bouquie R, Dailly E, Bentue-Ferrer D (2010). Therapeutic drug monitoring of oxcarbazepine. *Thérapie*, 65:61-65.

Brodie MJ, Dichter MA (1997) Established antiepileptic drugs. *Seizure*, 6:159-174.

Brodie MJ, French JA (2000) Management of epilepsy in adolescents and adults. *Lancet* 356:323-329.

Brophy JJ, Flynn TM, Lassak EV, Pickard J (1982) The volatile herb oil of Kippistia suaedifolia. *Phytochemistry*, 21 : 812–814.

Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L (2000). Biochemistry & Molecular Biology of plants. *American Society of plant Physiologists*: Rockville, MA, p 1367.

Burgot, G. et Pellerin, F. (2003) "Microextraction en phase solide (SPME)." *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation, P2, n°P1430*: 1430.1-1430.20.

Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food and Microbiology*, 94: 223-253.

Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokemen A. & Akpulat H.A. (2003) Antioxydant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achilla millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 215-220.

Carter JA, Neville B, White S, et al. (2004) Increased prevalence of epilepsy associated with severe falciparum malaria in children. *Epilepsia*, 45: 978-981.

Chagonda L. S., Makanda C., Chalcat J.-C., Essent J. (1999). *Oil Res*, 11, 573.

Chen J., Pawliszyn J.B (1995). Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 67: 2530-2533.

Chen Y. (2004). *New Calibration approaches in solid phase microextraction for on-site analysis*. Waterloo, Ontario, Canada.

Cheung H, Kamp D, Harris E (1992). An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neuronal voltage-activated sodium channels. *Epilepsy Res*, 13:107-112.

Cohen Y., Jacquot C (2008). *Pharmacologie: Abrégés de pharmacie*. 6ème Edition, Masson

Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA (1989a). Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann Neurol*, 25:582-593.

Cortazar E., Zuloaga O., Sanz J., Raposo J.C., Etxebarria N., Fernández L.A (2002) MultiSimplex optimisation of the solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and phthalates from water samples. *Journal of Chromatography A* 978: 165-175.

Costa E, Groppetti A, Mao CC, et Suria A (1975). New concept on the mechanism of action of benzodiazepines. *Life Sci.* 17: 167-186.

Dailey JW, Mishra PK, Ko KH, Penny JE, Jobe PC (1991). Noradrenergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia*, 32(2): 168-73.

Dantzer R (1986) Behavioral, physiological and functional aspects of stereotyped behavior: a review and a re-interpretation. *J Anim Sci*, 62:1776-1786.

- De Beaureparie** (2005). Biochemical and neurobiological bases of psychiatry. *EMC-Psych*,; 2:4-39.
- De Sousa A.C, Alviano D.S, Blank AF, Alves P.B, Aliano C.S, Gattass C.R.** (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56: 677-681.
- De Deyn P.P.,D'Hooge, R.,Marescau,B.,Pei,Y.-Q.** (1992). Chemical model of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsant. *Epilepsy Research*, 12,87–110.
- Decary R** (1955) Quelques plantes aromatiques et à parfum de la flore de Madagascar, *Journal d' Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquees*, 2: 416.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. & Mazza G.** (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74:101-109.
- Delorme A, Fluckiger M.** (2003). Perception et réalité : une introduction à la psychologie des perceptions *Neurosciences & cognition. De Boeck Université, Bruxelles*, 516.
- Depaulis A** (2003). Physiopathologie des crises d'épilepsie. *Encycl med Chir Ed Scientifiques et MEDICALES Elsevier SAS* ; 17-044-R-10 10 p.
- Diop AG et al.** (1998). Filières des soins anti-épileptiques en Afrique. *Epilepsie*, 1998;10:115-121.
- Dobetsberger C, Gerhard Buchbauer.** (2011). Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26: 300-316.

Ebert U, Löscher W. (2000). Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. *Neurosci Lett*; 287(3): 199-202.

Efron R. (1956). The effect of olfactory stimuli in arresting uncinate fits. *Brain*, 79(2): 267-81.

Elger, C.E. and D. Schmidt (2008). Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behav*, 12(4): p. 501-39.

Gattefosse J (1921) Les végétaux aromatiques de Madagascar. *Agriculture. Coloniale*, Ministère des Colonies - Jardin Colonial, 46 :1-9.

Ghavanini AA, Matters AD, Puil E.(2005). Glycinergic inhibition in the thalamus revealed by synaptic receptor blockade. *Neuropharmacology*, 49: 338- 349.

Globig D., Weickhardt C (2005). Fully automated in-tube solid-phase microextraction for liquid samples coupled to gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381: 656-659.

Gonny M., Bradesi P. & Casanova J (2004). Identification of the components of the essential oil from Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal*. 19: 424-433.

Han CL, Hu W, Stead M, Zhang T, Zhang JG, Worrell GA, et al. (2014). Electrical stimulation of hippocampus for the treatment of refractory temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull*, 109: 13-21.

Hansen SL, Sperling BB, Sanchez C. (2004). Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(1): 105-13.

Harris S.A., Whitticar M.J., Eek M.K (1999). Molecular and isotopic analysis of oils by solid phase microextraction of gasoline range hydrocarbons. *Organic Geochemistry* 30: 721-737.

Hiragami F, Kano Y. (2012). Neurite outgrowth of PC12 mutant cells induced by orange oil and d-Limonene via the p38 MAPK pathway. *Acta Medica Okayama*, 66(2): 111-118.

Holmes, G.L. and Q. Zhao (2008). Choosing the correct antiepileptic drugs: from animal studies to the clinic. *Pediatr Neurol*, 38(3): p. 151-62.

Jaraula C.M.B., Kenig F., Doran P.T., Priscu J.C., Welch K.A (2008) SPME-GCMS study of the natural attenuation of aviation diesel spilled on the perennial ice cover of Lake Fryxell. Antarctica. *Science of The Total Environment* 407: 250-262.

Kaila K, Ruusuvuori E, Seja P, Voipio J, Puskarjov M. (2014). GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol*, 26: 34-41.

Kalemba D. & Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.

Kataoka H, Lord HL et Pawliszyn J (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 2 juin, 880(1–2): 35-62. DOI 10.1016/S0021-9673(00)00309-5.

Kato T, Lijima H, Ishihara K, Kanek T, Hirai K, Naito Y, Okuda K (1990). Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 31(4): 301-307.

Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S., Polissiou M.G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Alliumsativum*). *Ultrason Sonochem*, 13: 54-60

King A.J., Readman J.W., Zhou J.L (2004). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 523: 259-267.

Kouamé-Bi K.F.P (2012). Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de doctorat, chimie organique, Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. 180 p.

Koutroumanidou E, Kimbaris A, Kortsaris A, Bezirtzoglou E, Polissiou M, Charalabopoulos K, et al. (2013). Increased seizure latency and decreased severity of pentylenetetrazol-induced seizures in mice after essential oil administration. *Epilepsy Res Treat*, **2013**: 532657.

Kupferberg H.J., Schmutz M. (1998). Screening of new compounds and the role of the pharmaceutical industry, in: J. Engel, T.A. Pedley (Eds.), *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, Lippincott-Raven, Philadelphia,

Lasoń W, Chlebicka M, Rejdak K. (2013). Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep*, 65(4): 787-801.

Lempérière T. (2006). Psychiatrie de l'adulte. 2ème édition, Masson, Paris, , 555.

Lignelet R. L'épilepsie et son traitement par les médicaments antiépileptiques. Master 2 Biologie Gestion-Marketing, Université de Rennes 1 – UFR SVE, 2010-2011.

Llompart M., Li K., Fingas M (1998). Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile and semi-volatile pollutants in water and air. *Journal of Chromatography A* 824: 53-61.

Lord H., Pawliszyn J (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* 885: 153-193.

Loscher W., Schmidt D. (1988). Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations, *Epilepsy Res*, 2 145–181.

Luan T., Fang S., Zhong Y., Lin L., Chan S.M.N., Lan C., Tam N.F.Y (2007). Determination of hydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully automated solid-phase microextraction derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1173: 37-43.

Macdonald RL (1988). Anticonvulsant drug actions on neurons in cell culture. *J Neural Transm*, 72:173-183.

Macdonald RL (1989) Antiepileptic drug actions. *Epilepsia* 30 Suppl 1:S19-28;discussion S64-18.

Macdonald RL, Kelly KM (1995) Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia*, 36 Suppl 2:S2-12.

Matsushima S, Lshiguro S et Sugawara S (2014). Composition Studies on some Varieties of Tobacco and their Smoke: I. Major Components in Smoke Condensate. *Beitrag zur Tabakforschung / Contributions to Tobacco Research*..10(1): 31–38.

Mazarati, A. M., Halaszi, E. and Telegdy, G. (1992) Anticonvulsant effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-induced seizures syndrome in rats. *Brain Res*. 589, 164-166.

Mbarek L.A., Mouse H.A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R0., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Zyad A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, 40: 839-847.

Meinardi H, Scott RA, Reis R, Sander JW. (2001). The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. *Epilepsia*, 42(1):136-49.

Mester Z, Sturgeon R et Pawliszyn J (2001). Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 29 mars.56(3): 233-260. DOI 10.1016/S0584-8547(00)00304-9.

Mester Z et Sturgeon R.(2005). Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. octobre.60(9–10) : 1243-1269. DOI 10.1016/j.sab.2005.06.013.

Michat L (2006). De l’or en bouteille, les huiles essentielles de Madagascar Eds Médicis, Paris, 63-196.

Millogo-Rasolodimby J. (1991). Myrothamnaceae, Famille 94, In: *Flore de Madagascar et des Comores*, pp. 81-85.

Monti D., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M0, Sactton M.F. & Boldrini E. (2002). Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 237: 209-214.

More SV, Koppula S, Kim IS, Kumar H, Kim BW, Choi DK. (2012). The Role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth. *Molecules*, 17(6):6728-53.

Morrow P.A. and Fox L.R. (1980). Effet of variation in Eucalyptus essential oil yield in insect growth and grazing damage. *Oecologia* 45: 209-219.

Moulin M. (1998). Abrégé Pharmacologie, Masson, Paris. 449-545.

Muster D, Valfrey J, Kuntzman H. (2005). Psychotropic drugs in stomatology and odontology. *EMC – Stomatol.*, 1: 175-192

Nébié R.H.C., Yaméogo R.T, Bélanger A. & Sib F.S. (2004). Composition chimique des huiles essentielles d’*Ageratum conyzoides* du Burkina Faso. *Comptes Rendu de Chimie*, 7: 1019–1022.

Newton CR, Garcia H. **Epilepsy in poor regions of the world.** (2012). *Lancet*, 380: 193-201.

Ngoungou EB et al. (2006). Épidémiologie de l’épilepsie en Afrique subsaharienne:

une revue de la littérature. *Epilepsies*, 18 (1): 25-40.

Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG (2004). Is the persistent sodium current a specific target of anti-absence drugs? *Neuroreport* 15:1049-1052.

Obara Y, Aoki T, Kusano M, Ohizumi Y. (2002). β -eudesmol induces neurite outgrowth in rat pheochromocytoma cells accompanied by an activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 301: 803-811

Orsini J-C, Pellet J. (2005). Introduction biologique à la psychologie. 2ème édition, Editions Bréal, , 552.

Oussou K.R. (2009). Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.

Pandey SK et Kim K (2010). Determination of Hazardous VOCs and Nicotine Released from Mainstream Smoke by the Combination of the SPME and GC-MS Methods. *The Scientific World Journal*, 10: 1318-1329.

Panayiotopoulos CP (2005a) Idiopathic generalized epilepsies: a review and modern approach. *Epilepsia* 46 Suppl 9:1-6.
999999999999

Panayiotopoulos CP (2005b) Syndromes of idiopathic generalized epilepsies not recognized by the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 46 Suppl 9:57-66.

Paradiso B, Marconi P, Zucchini S, Berto E, Binaschi A, Bozac A, Buzzi A, Mazzuferi M, Magri E, Navarro Mora G, Rodi D, Su T, Volpi I, Zanetti L, Marzola A, Manservigi R, Fabene PF, Simonato M. (2009). Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(17): 191-196.

Parker RJ, Hartman NR, Roecklein BA, Mortko H, Kupferberg HJ, Stables J, Strong JM (2005). Stability and comparative metabolism of selected felbamate metabolites and postulated fluorofelbamate metabolites by postmitochondrial suspensions. *Chem Res Toxicol*, 18:1842-1848.

Pawliszyn J. (1999). Applications of Solid Phase Microextraction. *Royal Society of Chemistry*,. ISBN 978-0-85404-525-9.

Pawliszyn J.(2000). Theory of solid-phase microextraction. *Journal of chromatographic Science*. 38 (7): 270-278. Doi 10.1093/chromsci/38.7.270. Pmid: 10901412

Pawliszyn J. (2011). *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier,. ISBN 978-0-12-391449-1.

Perrier de la BATHIE H (1923) Le santal malgache. *Bulletin Economique de Madagascar*, 1er trim., 187.

Perucca E.(2001) Clinical pharmacology and therapeutic use of the new antiepileptic drugs. *Fundam Clin Pharmacol*.15:405-417.

Perucca E, French J, Bialer M (2007) Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 6:793-804.

Petrie KA, Schmidt D, Bubser M, Fadel J, Carraway RE, and Deutch AY. (2005). Neurotensin Activates GABAergic Interneurons in the Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*, 25: 1629-1636.

Popp P., Bauer C., Möder M., Paschke A (2000). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in waste water by off-line coupling of solid-phase microextraction with column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 897: 153-159.

Prikryl P et Sevcí JGK. (2008). Characterization of sorption mechanisms of solidphase microextraction with volatile organic compounds in air samples using a linear salvation

energy relationship approach. *Journal of Chromatography A*. 25 janvier.1179(1): 24-32. DOI 10.1016/j.chroma..10.016.

Quet F, Guerchet M, Pion SD, Ngoungou EB, Nicoletti A, Preux PM. (2009). Meta-analysis of the association between cysticercosis and epilepsy in Africa. *Epilepsia*, 51: 830-837.

Rakotovao LH, Randrianjohany E (1996) Origine et répartition bioécologique des plantes aromatiques de Madagascar, *Biogéographie de Madagascar*, 187-194.

Ramisiray G. (1901). Pratiques et croyances médicales des Malgaches. *Thèse de Doctorat en Médecine, Faculté de Médecine de Paris, Maloine Ed. Paris*, 112 p.

Rasoanaivo P, De La Gorce P (1998) Essential oils of economic value in Madagascar: present state of knowledge, *Herbalgram*, 43: 31-39, 58-59.

Rasoanaivo P, Ralaibia BE, Maggi F, Papa F, Vittori S, Nicoletti M. (2012). Phytochemical investigation of the essential oil from the ‘resurrection plant’ *Myrothamnus moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. *Journal of Essential Oil Research*; 24(3): 299-304.

Ratsimbazafy V, Andrianabelina R, Randrianarisona S, Preux PM, Odermatt P. (2011). Treatment gap for people living with epilepsy in Madagascar. *Tropical Doctor*, 41: 38-39.

Razafindrambao R (1971). Contribution à l’inventaire des plantes médicinales des Hauts Plateaux. Documents de l’ORSTOM, tome III, p. 85.

Rho, J.M. and R. Sankar (1999). The pharmacologic basis of antiepileptic drug action. *Epilepsia*, 40(11): p. 1471-83.

Rianawati E., Balasubramanian R (2009). Optimization and validation of solid phase micro-extraction (SPME) method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and stormwater. *Physics and Chemistry of the Earth* 34: 857-865.

Roberts DD, Pollien P, Milo C (2000). Solid-Phase Microextraction Method Development for Headspace Analysis of Volatile Flavor Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 juin.48(6):2430-2437. DOI 10.1021/jf991116l.

Robinson JL (2007). Programme National de Santé Mentale. Ministère de la Santé du Planning Familial de la Protection.

Rogawski MA, Loscher W (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med* 10:685-692.

Roulier G (1992). Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie: propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Edt. Dangles. France.

Salzer U.J. (1977). The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings-acritical review. *C.R.C Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 9: 345-373.

Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans F.J. & Reglero G. (2005). Chemical composition activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*. 68: 790-795.

Scharfman HE (2002). Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist*; 8(2):154-73.

Schmidt D, Elger CE (2004) What is the evidence that oxcarbazepine and carbamazepine are distinctly different antiepileptic drugs? *Epilepsy Behav*, 5:627-635.

Schwartz R, Davis R, Hilton TJ (1992). Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. *Am. J. Dent.*5(3): 147-150.

Scott P. (2000). Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany*, 85: 159-166.

Shinomiya M, Kawamura K, Tanida E, Nagoshi M, Motoda H, Kasanami Y, Hiragami F, Kano Y (2012). Neurite outgrowth of PC12 mutant cells induced by orange oil and d-Limonene via the p38 MAPK pathway. *Acta Medica Okayama* 66(2): 111-118.

Siani A.C., Ramos M.F., Menezes-de-Lima O.J.R., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares R.O., Rosas E.C., Susunaga G.S., Guimaraes A.C., Zoghbi M.G. & Henriques M.G.C.(1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from leaves and resin of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 57-69.

Silva AD, D'Elia E, Bizzo HR, Cardozo-Filho L, Antunes AC (2007) Electrochemical oxidation of limonene. *Ciencia & Engenharia*, 16: 41–45.

Simpson BS (2013). Dioecy in plants--is it an important factor for phytochemists to consider? *Planta Med*, May;79(8):613-615.

Sourai P.G (1989). Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry: a review *Odontostomatol. Proodos*. 43(5): 399-408.

Stashenko EE et Martinez JR (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 10 mars;70(2):235-242. DOI 10.1016/j.jbbm.2006.08.011.

Stolle A, Ondruschka B, Hopf H. (2009). Thermal rearrangements of monoterpenes and monoterpenoids. *Helvetica Chimica Acta*; 92: 1673-1719.

Sutula TP, Hagen J, Pitkänen A (2003). Do epileptic seizures damage the brain? *Curr Opin Neurol*. Apr; 16(2):189-95.

Thomas P, Arzimanoglou A. (2000) *Épilepsies*. 2ème ed. Masson Paris. p262.

Tikhtman R (2013). "Approaches to mental illness in Madagascar: a case for reconciling reason with faith" *Independent Study Project (ISP) Collection*. Paper 1629.

Tolman JA, Faulkner MA (2009) Vigabatrin: a comprehensive review of drug properties including clinical updates following recent FDA approval. *Expert Opin Pharmacother*, 10:3077-3089

.

Tomi F & Casanova J. (2006). ¹³C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae* - a review. *Acta Hort.* 723: 185-192.

Umez T. (1999). Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64: 35-40.

Unlu M., Daferera D., Donmez E., Polissiou M., Tepe B. & Sokmen A. (2002). Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achilla setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 117-121.

(US), Centers for Disease Control and Prevention, (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion et (US), Office on Smoking and Health. **Chemistry and Toxicology of Cigarette Smoke and Biomarkers of Exposure and Harm** (2010). In : *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease*. Atlanta,. ISBN 13: 978-0-16-084078-4.

Vas G, Vékey K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39: 233-254.

Viljoen AM, Klepser ME, Ernst EJ, Keele D, Roling E, van Vuuren SF, Demirci B, Baser KHC, van Wyk BE (2002) The composition and antimicrobial activity of the essential oil of the resurrection plant, *Myrothamnus flabellifolius*. *South African Journal of Botany* 68: 100-105.

Vohora D, Saraogi P, Yazdani MA, Bhowmik M, Khanam R, Pillai KK (2010). Recent advances in adjunctive therapy for epilepsy: focus on sodium channel blockers as third-generation antiepileptic drugs. *Drugs Today (Barc)* 46:265-277.

White HS (2005) Molecular pharmacology of topiramate: managing seizures and preventing migraine. *Headache* 45 Suppl 1:S48-56.

White, H.S. (1997). Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 38 Suppl 1: p. S9-17.

WHO-AFRO (2004). Epilepsy in the WHO African region: bridging the gap. The global campaign against epilepsy«Out of the shadows.»

Willmore LJ, Abelson MB, Ben-Menachem E, Pellock JM, Shields WD (2009) Vigabatrin: 2008 update. *Epilepsia*, 50:163-173.

Yang J, Wetterstrand C, Jones RS. (2007). Felbamate but not phenytoin or gabapentin reduces glutamate release by blocking presynaptic NMDA receptors in the entorhinal cortex. *Epilepsy Res*, 77:157-164.

Zhao R.J., Koo B.S., Kim G.W., Jang E.Y., Lee J.R., Kim M.R., Kim S.C., Kwon Y.K., Kim K.J., Huh T.L., Kim D.H., Shim I., Yang C.H. (2005). The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28: 2323-2326.

Zona C, Avoli M (1997). Lamotrigine reduces voltage-gated sodium currents in rat central neurons in culture. *Epilepsia*, 38:522-525.

ANNEXES

Essential-Oil Polymorphism in the Resurrection Plant *Myrothamnus moschatus* and Associated Ethnobotanical Knowledge

by Emmanuel Randrianarivo^{a)}, Philippe Rasoanaivo^{a)}, Marcello Nicoletti^{b)},
Solofoniaina Razafimahefa^{a)}, Manon Lefebvre^{a)}, Fabrizio Papa^{c)}, Sauro Vittori^{d)},
and Filippo Maggi^{*d)}

^{a)} Institut Malgache de Recherches Appliquées, Antananarivo, Madagascar

^{b)} Department of Environmental Biology, La Sapienza University, IT-Rome

^{c)} School of Science and Technology, University of Camerino, IT-Camerino

^{d)} School of Pharmacy, University of Camerino, IT-Camerino

Gas chromatography/mass spectroscopy analysis (GC/MS) of essential oils obtained from populations of the resurrection plant *Myrothamnus moschatus*, growing in different areas of Madagascar, allowed identification of three main chemotypes in the species. The first one was provided by plants with a high content of *trans*-pinocarveol and pinocarvone; the second one involved plants with high percentages of limonene, *cis*- and *trans*-*p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol, and *b*-selinene; and the third chemotype was characterized by plants with high levels of oxygenated sesquiterpenes such as caryophyllene oxide and *a*- and *b*-isomers of caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-ol. Chemical data were supported by chemometric technique as the principal component analysis. Furthermore, the relationship between the dioecy and phytochemistry within one population was also considered. Finally, correlations between chemical variations and ethnobotanical data were assessed.

Introduction. - Approximately 100 million years ago, Madagascar separated from the African continent. The plants on the island subsequently evolved in complete isolation from the mainland. This has resulted in the unique forms of many plants in Madagascar. More than three-fourth of the native species occur nowhere else in the world. Furthermore, Madagascar is characterized by East-West dissymmetry, with the western side following a progressive slope, while the eastern side displays a sharp 1500-m-high escarpment. This has resulted in dissymmetry in the bioclimate and subsequent occurrence of several ecosystems ranging from the eastern rainforests to the semi-arid region of the South. Such ecosystem diversity is probably reflected in the chemical characteristics and behavior of many plant species, as well as the ethnobotanical knowledge associated with them.

The Myrothamnaceae family comprises one genus, *Myrothamnus* Welw. (from *myron* ¼ aromatic and *thamnos* ¼ bush), which comprises two species: *M. flabellifolia* Welw. from arid mountains in Sub-Saharan Africa, and *M. moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. These are called resurrection plants, due to the remarkable ability to survive complete desiccation in severely drought stressed areas by remaining quiescent for considerable periods of time before resuming photosynthetic activity and growth at the first rainfall [1]. The Myrothamnaceae family is exceptional, because the two species belong to the ca. 40 desiccation-tolerant dicotyledons, while the

vast majority of the estimated 1,300 desiccation-tolerant vascular plants are monocotyledons and pteridophytes [2].

M. moschatus (syn. *Myosurandra moschata* Baillon) is a small dioecious small shrub of ca. 0.5-m height. The leaves, emitting a pleasant and characteristic balsamic odor, are fan-shaped and possess a typical parallel venation allowing a reversible, drought-induced, accordion-like contraction; in the dry state, they are folded around the stem and have a brownish color; after rehydration they turn green and unfolded from the stem (Fig. 1, a) [3]. The plant grows on rock outcrops and is subjected to drought during the dry winter months [4].

In Malagasy ethnomedicine, the dried leaves are smoked like a cigar for the treatment of asthma and are also used in infusion to treat coughs [4]. In the late 1960s, this plant was reported as psychoactive, as the people of the southern regions of Madagascar smoked it as marijuana [5]. In the central highlands, the decoction of leaves is used against vomiting, and the leaves are burned for magical rituals [6].

While most of phytochemical investigations were focused on *M. flabellifolia* [7 - 9], *M. moschatus* was less explored. Previously, we investigated the essential-oil composition from samples growing in Ifandàna, Isalo region [10], as well as their biological activities [11].



Fig. 1. a) *Myrothamnus moschatus* during the rain season. b) Collection sites of the investigated Malagasy populations of *M. moschatus*.

The aim of the present work was to investigate, in the Island, the presence of chemical variability of the volatile composition of the species depending on geographic origin of the samples (Fig. 1, b).

As mentioned above, *M. moschatus* is a dioecious plant. Dioecy is dominant in woody species growing in tropical environments (ca. 35%) [12]. Especially for woody species, it may be observed that male plants grow taller and faster than their female counterparts as a result of prioritizing resources to vegetative growth, whereas females spend more resources towards reproduction and chemical defence [13]. Therefore, we were interested in investigating if dioecy might influence the phytochemical properties within one population of *M. moschatus*.

Parallel to the chemical work, we recorded the ethnobotanical data during our field work and conducted a comparative analysis (Table 1). Herein, we report the relevant results.

Table 1. Main Informations on the Investigated Populations of *Myrothamnus moschatus*

Locality	GPS	Altitude (m.a.s.l.) ^{a)}	Vernacular name (ethnic groups)	Ethnomedical uses
Ifandana (Isalo region)	S/22800'39'' E/46823'03''	883	Maharoaky (Bara)	Treatment of cough and asthma; smoke is used to expel bad spirit in the body
Ambohiboroana (Ambalavao region)	S/21853'45'' E/46845'51''	1048	Fanalalahy Tsima-harofy (Betsileo)	Smoke is used to expel bad spirit in the body; treatment of migraines
Ambondromisotra (Soavina region)	S/20819'60'' E/46855'00''	1123	Harify (Betsileo)	No ethnomedical uses
Angavokely (Caryon region)	S/18855'01'' E/17843'58''	1447	Maimbelona (Merina)	Vague ethnomedical data
Ambatofotsy (Antananarivo Atsimondrano)	S/19806'08'' E/47831'32''	1308	Maimbelona (Merina)	Vague ethnomedical data
Betroka, Ivohibe, Beraketa	Not prospected	Not prospected	Somorum-bato Ria-driatra (Antandroy)	Leaves smoked for narcotic effects [5]

^{a)} m.a.s.l., m above sea level.

Results and Discussion. - 1. Chemical Analysis of Essential Oils. The essential-oil compositions of Malagasy populations of *M. moschatus* are compiled in Table 2. A total of 94 volatile components, accounting for 67.4 - 98.8% of the total compositions, were identified in the five Malagasy populations.

In the central-northern populations, namely, Ambatofotsy, Angavokely, and Soavina, oxygenated sesquiterpenes represented the major fraction of the oils, accounting for 51.3, 47.6, and 54.9%, respectively. Main representatives of this fraction were caryophyllene oxide (10.2, 19.0, and 21.9%, resp.) and caryophylla-4(12),8(13)-dien-5b-ol (6.0, 8.7, and 10.4%, resp.). A minor contribution was provided by sesquiterpene hydrocarbons (35.2, 23.0, and 10.5%, resp.), with d-cadinene (14.8, 4.1, and 0.9%, resp.), b-elemene (1.4, 5.1, and 0.4%, resp.), and b-selinene (1.4, 3.7, and

Table 2. Essential-Oil Compositions in Different Malagasy Populations of *M. moschatus*

Component ^{a)}	RI ^{b)}	RI (Lit.) ^{c)}	[%] ^{d)}						ID ^{e)}
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	Ambohiboroana		Ifandàna	
						Female	Male		
a-Thujene	925	924						Tr ^{f)}	RI, MS
a-Pinene	938	939	0.3	0.3	0.1	0.5	0.4	7.9	Std
Camphene	954	954				Tr	Tr	0.3	Std
Thuja-2,4(10)-diene	960	960						0.1	RI, MS
Benzaldehyde	961	960						Tr	Std
b-Pinene	979	979	Tr	Tr		Tr	Tr	0.5	Std
Myrcene	992	990						0.1	Std
trans-Dehydroxylinalool oxide	992	991	Tr	0.1					RI, MS
cis-Dehydroxylinalool oxide	1007	1006	Tr	0.1					RI, MS
p-Cymene	1021	1020	Tr	0.1	Tr	3.0	4.6	1.2	Std
Limonene	1024	1024	0.1	0.3	0.1	11.7	15.2	1.4	Std
1,8-Cineole	1026	1026				Tr	Tr	0.5	Std
Lavender lactone	1034	1034			Tr				RI, MS
m-Cymenene	1082	1082				1.3	1.5		RI, MS
Hotrienol	1089	1089 ^{g)}		0.1	Tr				RI, MS
p-Mentha-1,3,8-triene	1108	1108						0.4	RI, MS
trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1119	1119				4.9	5.6	0.7	RI, MS
a-Campholenal	1122	1122						0.7	RI, MS
cis-Limonene oxide	1132	1132				Tr	Tr		RI, MS
cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1133	1133				5.2	5.2		RI, MS
trans-Pinocarveol	1135	1135	Tr		0.5	Tr	Tr	34.1	Std
trans-Limonene oxide	1138	1137				0.4	0.3		RI, MS
Pinocarvone	1161	1160	Tr		0.2	1.1	0.7	14.2	RI, MS
Borneol	1165	1165						Tr	Std
cis-Pinocamphone	1172	1172						0.1	RI, MS
Terpinen-4-ol	1174	1174						0.1	Std
cis-Pinocarveol	1182	1182						Tr	RI, MS
trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1186	1187				13.2	15.8	4.4	RI,MS
a-Terpineol	1186	1186						0.1	Std

Table 2 (cont.)

Component ^{a)}	RI ^{b)}	RI (Lit.) ^{c)}	[%] ^{d)}					ID ^{e)}	
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	Ambohiboroana			Ifandàna
						Female	Male		
Myrtenal	1194	1194				0.4	Tr	1.2	Std
Myrtenol	1195	1195						1.7	RI, MS
trans-Caran-4-one	1195	1196				0.4	0.7		RI, MS
cis-Caran-4-one	1199	1200				3.4	4.3		RI, MS
trans-Carveol	1216	1215				4.9	6.2	1.3	RI, MS
cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1227	1227				10.9	13.3		RI, MS
cis-Carveol	1225	1226				0.9	1.0	0.8	RI, MS
(Z)-Ocimenone	1226	1226				0.9	1.0	0.4	RI, MS
Cumin aldehyde	1238	1238						0.1	RI, MS
Carvone	1239	1239				3.2	3.6	0.5	Std
Perilla aldehyde	1269	1269						0.3	RI, MS
p-Menth-1-en-7-al	1272	1273				0.7	0.6		RI, MS
Isobornyl acetate	1282	1283				0.5	0.5	0.3	Std
p-Cymen-7-ol	1289	1289						Tr	RI, MS
trans-Sabinyl acetate	1290	1289						Tr	RI, MS
Perilla alcohol	1295	1294						0.3	RI, MS
trans-Pinocarvyl acetate	1298	1298						0.3	RI, MS
Myrtenyl acetate	1324	1324						0.4	Std
a-Terpinyl acetate	1346	1346				Tr	Tr		RI, MS
a-Cubebene	1345	1345	1.6	0.3	Tr				RI, MS
a-Copaene	1374	1374	2.3	1.2	0.6	Tr	Tr		RI, MS
b-Cubebene	1387	1387	1.1	0.2	Tr				RI, MS
b-Elemene	1389	1389	1.4	5.1	0.4	Tr	0.1		RI, MS
Cyperene	1398	1398			0.1				RI, MS
(E)-Caryophyllene	1418	1417	0.7	3.6	0.2		0.1	0.2	Std
p-Cymen-7-ol acetate	1422	1421						Tr	RI, MS
Perillyl acetate	1434	1436	0.5	2.0	1.1	2.6	1.1	8.3	RI, MS ^{h)}
cis-Muurolo-3,5-diene	1448	1448	1.3	Tr					RI, MS
a-Humulene	1452	1452	Tr	0.7	Tr				Std

Table 2 (cont.)

Component ^{a)}	RI ^{b)}	RI (Lit.) ^{c)}	[%] ^{d)}					ID ^{e)}
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	Ambohiboroana		Ifandàna
						Female	Male	
Rotundene	1457	1457			Tr			RI, MS
allo-Aromadendrene	1458	1458	0.9	0.7	0.5			RI, MS
cis-Cadina-1(6),4-diene	1461	1461	0.5					RI, MS
trans-Cadina-1(6),4-diene	1475	1475	2.0	0.4				RI, MS
g-Muurolene	1478	1478	3.1	0.8				RI, MS
b-Selinene	1488	1489	1.4	3.7	3.7	22.7	12.3	12.2
Epicubebol	1491	1493	4.6	1.0	Tr			RI, MS
d-Selinene	1492	1492			1.6			0.2
a-Muurolene	1499	1500	1.1	0.7	0.3			RI, MS
a-Bulnesene	1507	1509	0.2		0.3			RI, MS
Cubebol	1513	1514	4.3	0.7				RI, MS
g-Cadinene	1513	1513			Tr			RI, MS
trans-Calamenene	1520	1521	Tr	Tr	0.9	0.1	0.1	RI, MS
d-Cadinene	1521	1522	14.8	4.1	0.9	0.1	0.1	RI, MS
trans-Cadina-1,4-diene	1532	1533	1.7	0.4				RI, MS
a-Calacorene	1543	1544	1.0	0.8	0.7			RI, MS
(E)-Nerolidol	1563	1561	0.5	3.0	0.9			Tr
Palustrol	1567	1567	0.8					RI, MS
Caryophyllene oxide	1583	1582	10.2	19.0	21.9	0.9	1.1	0.1
Glenol	1587	1586	1.3	0.6				RI, MS
b-Copaen-4a-ol	1589	1590	1.3	Tr	1.2	Tr		RI, MS
Viridiflorol	1591	1592	2.9	1.9	3.1	0.2		Std
b-Oplopenone	1609	1607	1.6	1.5	2.9			RI, MS
1-Epicubenol	1626	1627	4.6	1.1	Tr			RI, MS
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5a-ol	1637	1639	2.3	2.8	4.0	0.4	0.2	RI, MS
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5b-ol	1639	1639	6.0	8.7	10.4	0.7	0.5	RI, MS
a-Muurolol	1644	1644	1.3					RI, MS
Cubenol	1645	1645	2.0	0.6	0.3			RI, MS
Pogostol	1651	1651	4.1	0.7	3.9			RI, MS

Table 2 (cont.)

Component ^{a)}	RI ^{b)}	RI (Lit.) ^{c)}	[%] ^{d)}					ID ^{e)}	
			Ambatofotsy	Angavokely	Ambondromisotra	Ambohiboroana			Ifandàna
						Female	Male		
Selin-11-en-4a-ol	1657	1658			1.7				RI, MS
(Z)-14-Hydroxy-9-epicaryophyllene	1667	1666	0.7	1.0	1.7				RI, MS
(E)-14-Hydroxy-9-epicaryophyllene	1668	1668	1.6	2.0	3.0				RI, MS
Cadalene	1676	1675	0.2	0.2	0.4				RI, MS
Eudesma-4(15),7-dien-1b-ol	1686	1687	0.3						RI, MS
Nerolidyl acetate	1714	1716	0.9	2.7					RI, MS
Fukinanolide	1798	1798 ^{e)}						0.8	RI, MS
Total identified [%]			87.3	73.6	67.4	95.1	96.0	98.8	
Grouped compounds [%]									
Monoterpene hydrocarbons			0.3	0.7	0.2	16.1	21.7	11.7	
Oxygenated monoterpenes			0.5	2.3	1.8	53.5	59.8	65.1	
Sesquiterpene hydrocarbons			35.2	23.0	10.5	22.8	12.7	20.7	
Oxygenated sesquiterpenes			51.3	47.6	54.9	2.1	1.7	0.2	

^{a)} Compounds are listed in order of their elution from a HP-5MS column. Their nomenclature was in accordance with Adams [14].^{b)} Linear retention index on HP-5MS column, experimentally determined using homologous series of C₈ - C₃₀ alkanes.^{c)} Linear retention index taken from [14].^{d)} Percentage values are means of three determinations, with a RSD% for the main components below 5% in all cases.^{e)} ID, Identification: Std, based on comparison with authentic compounds; MS, based on comparison with Wiley, Adams, and NIST 08 MS databases; RI, based on comparison of RI values with those reported by Adams.^{f)} Tr, traces (mean value below 0.1%).^{g)} Linear retention index taken from NIST 08 [15].^{h)} Retention index and MS taken from Brophy et al. [16] and Silva et al. [17].

3.7%, resp.) as the most abundant constituents. Scarce was the level of monoterpenes (in all cases < 2.3%) in these populations. From our morphological measurements, these plants have leaves of ca. 1–2-cm size.

On the other hand, the southern populations, namely, Ambohiboroana and Ifandàna, were characterized by high levels of oxygenated monoterpenes (53.5–59.8% in the former, 65.1% in the latter), followed by sesquiterpene hydrocarbons (12.7–22.8% in the former, 20.7% in the latter), and monoterpene hydrocarbons (16.1–21.7% in the former, 11.7% in the latter). However, their chemical profiles were significantly different. In the case of population from Ambohiboroana, female and male individuals were compared: the major volatile constituents were b-selinene (12.3–22.7%), *trans*-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol (13.2–15.8%), limonene (11.7–15.2%), and *cis*-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol (10.9–13.3%). There has been no distinction observed between the phytochemistry of male and female plants. Indeed, only quantitative differences were detected, with the male individuals being richer in monoterpene hydrocarbons (21.7 vs. 16.1%, resp.) and poorer in sesquiterpene hydrocarbons (12.7 vs. 22.8%, resp.). In the population from Ifandàna, the major components were transpinocarveol (34.1%), pinocarvone (14.2%), b-selinene (12.2%), perillyl acetate (8.3%), and α -pinene (7.9%). This composition was consistent with that previously reported from plants growing in the same region [10]. Morphologically, the plants from southern populations were a bit different, with leaves smaller than those of the centralnorthern individuals (ca. 0.5–1 cm in size).

Multivariate analysis of essential-oil constituents revealed that the Malagasy populations of *M. moschatus* can be grouped in three different chemotypes. The 2D graphical representation of principal-component analysis (PCA) is shown in Fig. 2, and represents 69.3% of the total variance in the data set.

The variability of data was generated mostly by the content of oxygenated monoterpenes such as *trans*-pinocarveol, *cis*- and *trans*-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol (values of eigenvectors of (18.6; 26.0), (10.3; 10.6), and (15.5, 9.5), resp.), and by that of mono- and sesquiterpene hydrocarbons such as limonene and b-selinene (values of eigenvectors of (12.4; 10.8) and (22.7; 7.0), resp.). The population on the upper right-hand side of the PCA score plot was that from the Isalo region (Ifandàna) (Fig. 2, a); it was positively correlated with components in similar position of the loading plot (Fig. 2, b) such as *trans*-pinocarveol and, to a minor extent, pinocarvone. The population from Ambohiboroana was on the lower right-hand side of the same score plot influenced by the content of *cis*- and *trans*-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol, limonene, and b-selinene. Noteworthy was a significant higher content of the sesquiterpene b-selinene in female individuals compared to that of male ones. Finally, three correlated populations on the left-hand side of the PCA score plot (Fig. 2, a) were those from Ambatofotsy, Angavokely, and Ambondromisotra, which were characterized mainly by components in the same position of the loading plot (Fig. 2, b), notably sesquiterpenes such as caryophyllene oxide, the α - and β -isomers of caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-ol and, to a minor extent, by d-cadinene.

Some of the major constituents detected in the Malagasy populations of *M. moschatus*, such as *trans*-pinocarveol, pinocarvone, limonene, *trans*-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol, α -pinene, and b-selinene were previously reported for the most frequently studied *M. flabellifolia* Welw. from South Africa [8]

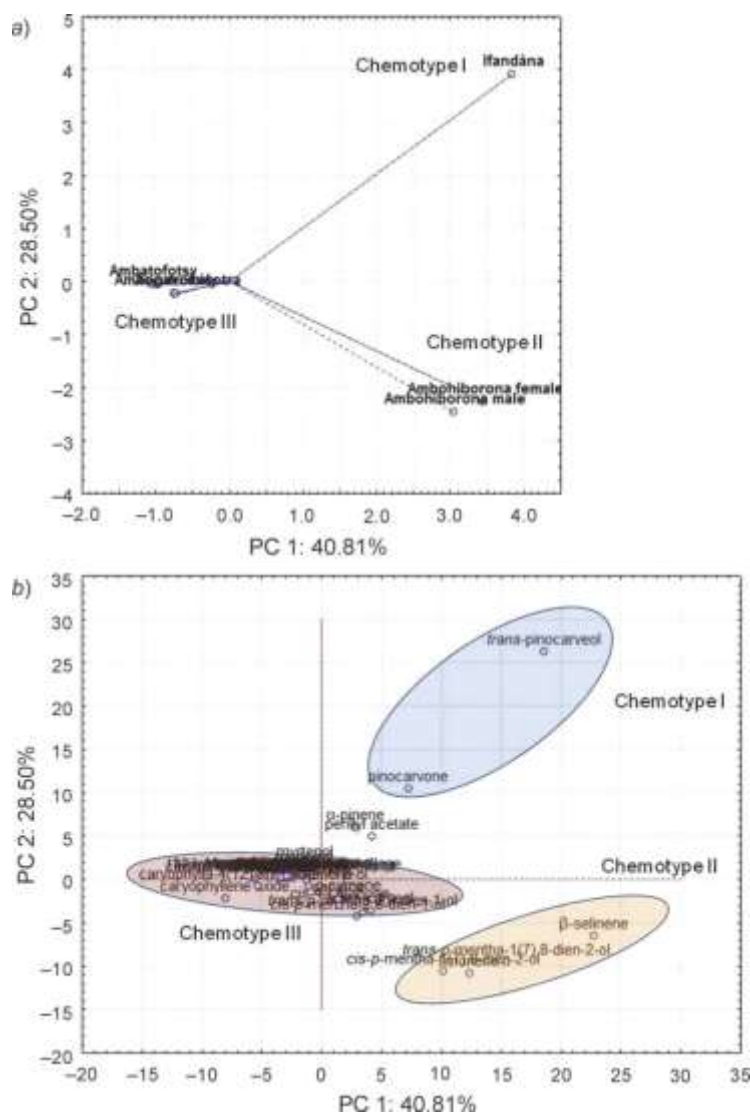


Fig. 2. a) Score plot (PCA) for main variation of volatiles among different populations of *M. moschatus*. b) The PCA loading plot for essential-oil constituents accounting for 40.81% of the variation on horizontal axis (PC 1) and 28.50% of the variation on the vertical axis (PC 2).

and Zimbabwe [7]. However, our investigation revealed the presence of new chemotypes occurring in the central-northern area and characterized by oxygenated sesquiterpenes that were never reported for *M. flabellifolia*.

The chemical variation in *M. moschatus* populations presented herein can be regarded as a significant contribution to much-needed research on phytochemistry of this desiccation-tolerant plant.

2. **Ethnobotanical Survey.** In parallel with the collecting of samples with geographical coordinates, we conducted ethnobotanical inquiries. To this end, we visited at least 40 houses in each locality and neighboring. Results are compiled in Table 1.

In Ifandàna, the plant is known under the vernacular name **maharoaka** (maha ¼ which can, and roaka ¼ expel). In the Malagasy cultural tradition, convulsions are believed to be caused sometimes by bad spirits, and the smoke of the plant is used to expel them. The dried leaves are also smoked like a cigar for the treatment of asthma and coughs, in agreement with an earlier publication [4]. Tests using the pentylenetetrazole (PTZ)-induced convulsions confirmed the anticonvulsant effects of the essential oil (unpublished results). Furthermore, it is interesting to note that **trans-pinocarveol**, the major compound of the oil detected in the previous investigation [10], is used in pharmaceutical preparations such as **Ozopulmin™** to treat respiratory-tract disorders including asthma [8].

In Ambohiboroana, the plant has **tsimaharofy** (tsy ¼ negation, and maharofy ¼ ill), and **fananalahy** (fanala ¼ action of removing, and lahy ¼ male) as vernacular names. The latter name refers to the magical use of the plant to create confusions and conflicts in married persons leading to divorce. It is used to treat migraines, and, to a lesser extent, convulsive seizures. The PTZ-induced-convulsion test confirmed the traditional use, but the effects were less potent than the essential oil from Ifandàna (unpublished results).

In Ambondromisotra, the vernacular name of the plant is **harify**, meaning casual herbaceous gramineae. It has no ethnomedical use in this locality. However, we met an elderly person in Soavina at ca. 5 km from Ambondromisotra, who told us that the plant is effective in treating asthma. We met him again and learned that he is a tradesman going regularly to Toliara (South-west part of Madagascar), and the sample he uses is collected in Ifandàna which is close to the main road.

In the central highlands of Madagascar (Angavokely and Ambatofotsy), the plant is known under the vernacular name **maimbelona** (maina ¼ dry, and belona ~ velona ¼ live). This name reflects the resurrection property of the plant. The decoction of leaves is used against vomiting, and the leaves are burned for magical rituals [6]. Betroka/Beraketa is now a very insecure region due to political turmoils. For security reasons, we did not collect samples in these localities. The plant is known there under the name **somorombato** (somorona is the common name of plants that are smoked in Madagascar for their narcotic properties, and mbato ~ vato ¼ stones). This name reflects both the narcotic properties of the species and its ecology [5]. It is assumed that the volatile constituents may contain narcotic components.

Conclusions. - The occurrence of different chemotypes in *M. moschatus* differing in volatile composition was shown. Such differences are not only due to plant variability, but also to the interaction of environment and genetic selection leading to such a segregation. The absence of relationship between dioecy and phytochemistry within one population confirms that the production of different secondary-metabolite classes within dioecious species is a rare phenomenon [13]. This study also represents a good example of the relationships between ecology, chemical variations, ethnobotanical data, and confirmation of some ethnomedical uses by scientific methods.

Experimental Part

Plant Material. Aerial parts of *M. moschatus* were collected in July/August 2012 in five different localities of Madagascar (Fig. 1 and Table 1). The plants were identified by botanists at the Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza, Antananarivo. Voucher specimens were deposited with the Herbarium of the Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA), under the accession codes MAD-0013/Ifandàna, MAD-0013/Ambohiboroana, MAD-0013/Ambondromisotra, MAD-0013/Angavokely, and MAD-0013/Ambatofotsy.

Extraction of the Essential Oils. The essential oils were obtained from freshly collected aerial parts of different *M. moschatus* populations by steam distillation for 3 h using a field alembic yielding from 0.004 to 0.05% of a yellowish oil. Three different extractions were performed on plant material for each site, so that the final product represented the intrapopulation variability. The oil yields were estimated on a dry weight basis (w/w). Before analysis, the oils were dried (Na_2SO_4), transferred into an amber glass flask, and kept at 208 before chemical analysis.

Chemicals. Standard compounds used for identification of volatiles were α -pinene, camphene, benzaldehyde, β -pinene, myrcene, p -cymene, limonene, 1,8-cineole, *trans*-pinocarveol, borneol, terpinen-4-ol, α -terpineol, myrtenal, carvone, myrtenyl acetate, (*E*)-caryophyllene, α -humulene, (*E*)-nerolidol, caryophyllene oxide; they were purchased from Sigma Aldrich (I-Milan). Viridiflorol was kindly provided by Michael Russell, Department of Primary Industries, Industry and Investment NSW, Wollongbar, NSW, Australia. For retention-index (RI) determination, a mix of hydrocarbons ranging from *n*-octane (C_8) to *n*-triacontane (C_{30}) (Supelco, USA) was used. The exper. conditions reported below were applied in order to calculate the temp.-programmed RIs of peaks in the chromatograms [18]. All compounds were of anal. standard grade. Anal. grade *n*-hexane was purchased from Carlo Erba (I-Milan); it was successively distilled by a Vigreux column before use.

GC/MS Analysis. For GC separations, an Agilent 6890N instrument coupled to a 5973N mass spectrometer was used. Volatile components were separated on a HP-5 MS cap. column (5% phenylmethylpolysiloxane, 30 m, 0.25 mm i.d., 0.1-mm film thickness) (J and W Scientific, Folsom, CA), with the following temp. program: 5 min at 608, subsequently 48/min up to 2208, then 118/min up to 2808, held for 15 min, for a total run of 65 min. Injector and detector temps. were 2808. He was used as the carrier gas, at a flow rate of 1 ml/min. Injection volume, 2 ml; split ratio, 1 : 50; acquisition mass range, m/z 29 - 400. All mass spectra were acquired in electron-impact (EI) mode with a ionization voltage of 70 eV. Essential oil samples were diluted 1 : 100 in *n*-hexane, and the volume injected was 2 ml. Quantification was computed as the percentage contribution of each compound ($n \approx 3$) to the total amount present without using correction factors. Data were analyzed by using MSD ChemStation software (Agilent, Version G1701DA D.01.00). For 21 out of 94 compounds, the identification was carried out by co-injection with authentic standards (see Table 2). Otherwise, the peak assignment was in accordance with the standard of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI, <http://www.iofi.org/>) statement [19], i.e., by combining the computer matching with the WILEY275, NIST08, ADAMS, and a home-made (based on the analyses of reference oils and commercially available standards) libraries, and comparison of the calculated RIs with those reported by Adams [16].

Multivariate Analysis. To reveal the relationship among the different populations based on compositions of essential oils, and to identify the main constituents influencing the variability, the composition data matrix of six essential oil samples (from five different Malagasy localities) was evaluated using principal component analysis (PCA) with STATISTICA 7.1 (Stat Soft Italia srl, 2005, www.statsoft.it). From all the essential-oil constituents, those with an average percentage equal to or higher than 1% in at least one sample, 50 from 94 (50 variables 6 samples \approx 300 data) were selected to be included in the multivariate analysis. Prior to the PCA, the variables were standardized for a normalized PCA; missing data were substituted for the purpose by 0.01%. Eigenvalues were calculated using a covariance matrix among 50 chemical compounds as input, and the two-dimensional PCA biplot, including both populations and compounds, was generated.

The authors are grateful to Prof. Suzanne Ratsimamanga, President of the Institut Malgache de Recherches Appliquées, for her precious support during this study. We thank the local communities of concerned regions for helping us to collect the different samples of *M. moschatus*.

REFERENCES

- [1] P. Scott, *Ann. Bot.* 2000, **85**, 159.
- [2] S. Porembski, Evolution, Diversity, and Habitats of Poikilohydrous Vascular Plants, in *Plant Desiccation Tolerance*, Series: Ecological Studies, Vol. 215, Eds. U. Lüttge, E. Beck, D. Bartels, Springer, Berlin - Heidelberg, 2011, p. 139.
- [3] N. Korte, S. Porembski, *Plant Biol.* 2012, **14**, 537.
- [4] J. Millogo-Rasolodimby, in *Flore de Madagascar et des Comores (81 - 85)*, Publications du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 1991.
- [5] P. Boiteau, *C. R. Acad. Sci., S r. D* 1967, **26**, 41.
- [6] R. Razafindrambao, Contribution à l'inventaire des plantes médicinales des Hauts Plateaux Documents de l'ORSTOM, tome III, 1971, p. 85.
- [7] L. S. Chagonda, C. Makanda, J.-C. Chalcat, *J. Essent. Oil Res.* 1999, **11**, 573.
- [8] A. M. Viljoen, M. E. Klepser, E. J. Ernst, D. Keele, E. Roling, S. van Vuuren, B. Demirci, K. H. Baser, B.-E. van Wyk, *S. Afr. J. Bot.* 2002, **68**, 100.
- [9] J. P. Moore, G. G. Lindsey, J. M. Farrant, W. F. Brandt, *Ann. Bot.* 2007, **99**, 211.
- [10] P. Rasoanaivo, E. Ralaibia, F. Maggi, F. Papa, S. Vittori, M. Nicoletti, *J. Essent. Oil Res.* 2012, **24**, 299.
- [11] M. Nicoletti, F. Maggi, F. Papa, S. Vittori, L. Quassinti, M. Bramucci, G. Lupidi, D. Petrelli, L. A. Vitali, E. Ralaibia, P. Rasoanaivo, *Nat. Prod. Res.* 2012, **26**, 2291.
- [12] K. Bawa, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1980, **11**, 15.
- [13] B. S. Simpson, *Planta Med.* 2013, **79**, 613.
- [14] R. P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th edn., Allured, Carol Stream, IL, 2007.
- [15] NIST 08, Mass-spectral library (NIST/EPA/NIH), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA, 2008.
- [16] J. J. Brophy, T. M. Flynn, E. V. Lassak, J. Pickard, *Phytochemistry* 1982, **21**, 812.
- [17] A. D. Silva, E. D. Elia, H. R. Bizzo, L. Cardozo-Filho, A. C. Antunes, *Cienc. Eng.* 2007, **16**, 41.
- [18] C.-X. Zhao, Y.-Z. Liang, H.-Z. Fang, X. N. Li, *J. Chromatogr. A* 2005, **1096**, 76.
- [19] C. Bicchi, C. Cagliero, P. Rubiolo, *Flavour Fragrance J.* 2011, **26**, 321.

Received June 6, 2013

ESSENTIAL OILS OF *MYROTHAMNUS MOSCHATUS* FOR THE PREVENTION AND/OR ADJUNCT/ALTERNATIVE TREATMENTS OF CONVULSIONS AND MIGRAINES[✕]

by

RANDRIANARIVO Emmanuel[✕], RALAIBIA Erménégilde[✕],
RAKOTOSAONA Rianasoambolanoro[✕], RASOANAIVO Philippe^{✕✕}

Fintina

Ny fanadihadiana natao tamin'ny mpitsabo nentim-paharazana no nahafantarana fa ny setroka avy amin'ny *Myrothamnus moschatus* dia hitsaboana ny fanintona sy ny aretin'andoha. Izany no nahatonga anay hanao fikarohana sy handalina io zava-maniry fanao fanafody io. Mihevitra izahay fa ao amin'ny entona no misy ny kasinga manasitrana. Noho izany dia nalainay ny lohamenaka ary notiliana tamin'ny CG/FID sy CG/MS ny kasinga simika. Rehefa izany dia natao ny analyse headspace tamin'ny lohamenaka sy ny ravina maina tamin'ny hafanana 40°C, 80°C sy 120°C. Ny kasinga simikan'ny setroka kosa dia natao fitiliana tamin'ny micro-extraction en phase solide. Ny fiasan'ny lohamenaka ara-biolojika (activités biologiques) indray dia natsapaina in vitro (antimicrobien, cytotoxicité sy antioxydant). Ny fiasany amin'ny fanintona kosa

dia natao tamin'ny voalavo notsindromina pentylenetetrazole. Ny effet neurorégénérateur indray dia nohamarinina tamin'ny fitombon'ny selan'ny ati-doha SHSY5Y. Farany dia natsapaina tamin'ny olona voan'ny fanintona 31 sy marary an-doha lava 38 ny lohamenaka. Marary mifanintona 3 sy marary an-doha lava 2 ihany no tsy nandairany. Amin'ny ankapobeny dia voamarina tamin'ny alalan'ny fikarohana sy ny andrana natao tamin'ny olona ny fitsaboana nentim-paharazana natao tamin'ny *M. moschatus*.

Teny fototra: *Myrothamnus moschatus*; Lohamenaka; ody fanintona; ody aretin'an-doha, Pentylenetetrazole; Neurorégénération; neuritogenèse; andrana natao tamin'ny olona.

Abstract

The traditional use of the smoke of *Myrothamnus moschatus* for the management of convulsions and migraines prompted us to investigate this plant. It was assumed that the bioactive substances are volatile in nature. Consequently, the essential oil was extracted by steam distillation and its chemical composition determined by GC/FID and GC/MS. Headspace analysis was then performed on the essential oil and dry leaves at 40°C, 80°C and 120°C. Thereafter, the chemical constituents of the smoke were analysed by the solid phase micro-extraction (SPME) technique. Regarding biological assays, the essential oil was submitted to a series of in vitro tests, including antimicrobial, cytotoxicity, and antioxidant assays. The anticonvulsant activity of the essential oil was

quantified by the pentylenetetrazole-induced convulsions in rats with respect to control group. The neuroregenerative effect was evaluated by the neurite outgrowth test. Finally, clinical observational studies were successfully performed on 31 patients suffering from convulsions and 38 patients having migraines. Treatment failure was observed in 3 patients with convulsions and 2 patients with migraine. Overall, laboratory work and clinical observational studies confirmed the traditional use of *M. moschatus*.

Keywords: *Myrothamnus moschatus*, Essential oil, Anticonvulsant, Anti-migraine, Pentylenetetrazole, Neuroregeneration, Neuritogenesis, Clinical observational studies

Résumé

L'utilisation traditionnelle de la fumée de *Myrothamnus moschatus* pour la prise en charge des convulsions et des migraines nous a incités à étudier cette plante. Nous avons supposé que les molécules actives seraient les constituants volatiles. En conséquence, l'huile essentielle de la plante a été extraite par distillation à la vapeur, et sa composition chimique a été déterminée par GC/FID et GC/MS. Par la suite, l'analyse «headspace» a été effectuée sur l'huile essentielle et les feuilles sèches à 40°C, 80°C et 120°C, et les constituants chimiques de la fumée ont été analysés par micro-extraction en phase solide. Concernant les activités biologiques, l'huile essentielle a été évaluée sur différents tests in vitro, à savoir antimicrobien, cytotoxicité et antioxydant. L'activité anticonvulsive a été quantifiée sur la convulsion provoquée par le pentylenetetrazole

chez le rat par rapport au groupe contrôle. L'effet neurorégénérateur a été estimé sur la croissance des cellules neuronales SHSY5Y. Finalement, l'observation clinique a été effectuée sur 31 patients souffrant de convulsions, et sur 38 patients migraineux. Seulement, 3 patients convulsifs, et 2 patients migraineux présentaient d'échecs thérapeutiques. Dans l'ensemble, les travaux de laboratoire et les observations cliniques ont confirmé le bien-fondé de l'utilisation traditionnelle de *M. moschatus*.

Mots-clés: *Myrothamnus moschatus*, Huile essentielle, Anticonvulsif, Anti-migraine, Pentylenetetrazole, Neurorégénération, neuritogenèse, Observation clinique

★Paper presented at the Plenary Session on 23rd April 2015.

⊗Institut Malgache de Recherches Appliquées, Fondation Rakoto Ratsimamanga, Avarabohitra Itaosy, lot AVB 77, Antananarivo, Madagascar.

⊗⊗ Full Member. Basic Sciences Section.

Introduction

Epilepsy, convulsive seizures and headaches are the most common chronic neurological disorders affecting respectively 5 to 10 and 15 to 30 out of every 1000 persons. This has a heavy socio-economic impact in terms of both lost productivity and burden to health care systems. Nearly 80% of people with these diseases reside in developing countries, where they remain a major public health problem, not only because of their health implications but also for their social, cultural, psychological, and economic consequences [1]. The prevalence of epilepsy in sub-Saharan Africa seems to be higher than in other parts of the world, with 10 million people affected directly according to WHO estimates [2]. However, it was argued that estimates vary substantially for unknown reasons [3]. Patients are of all ages, but especially within childhood, adolescence and the ageing population. In the central highlands of Madagascar, an epidemiological study on epilepsy showed that the prevalence of the disease was estimated to be 27‰ [4]. In addition to environmental and genetic factors, sequels of central nervous system infections, especially cerebral malaria and neurocysticercosis are the main causes of seizures and acquired epilepsy in Sub Saharan Africa [5, 6].

There are several types of headache such as tension headaches, migraine, cluster headaches and the chronic daily headache syndromes. Yet, throughout the world, headache has been and continues to be underestimated in scope and scale, and headache disorders remain under-recognized and under-treated everywhere. In Africa, about 56 million people suffer from migraine [7]. In Madagascar, an epidemiological study conducted in 496 persons interviewed showed that the prevalence of migraine was reported to be 19% with specific rates of 26.8 for women and 9.4 for men [8]. By virtue of mainly afflicting the younger working-age group, migraine does not only cause high medical disability but also greater socio-economic consequences.

One serious problem in low-income countries is the poor availability and high cost of medication. The epilepsy and convulsive seizures treatment gap is defined as the proportion of people who require but are not receiving treatment [9]. With an average gap of approximately 75% for low-income countries and the poorest in Africa having a gap of more than 90%, the situation is quite alarming. In Madagascar, the treatment gap was estimated to be 92%. However, given the sociological, economic and sanitary conditions of the country, it was stated that the true treatment gap is even higher than the reported estimate [10]. On the other hand, headaches in Africa are mostly self-treated due to limited availability of primary care, neurologic consultations, imaging facilities, and related investigations. Due to the high costs of conventional drugs that must be taken daily or by attachment to cultural traditions; herbal remedies are also used.

To this end, local populations in Madagascar use the smoke of *Myrothamnus moschatus* to expel bad spirits entering the body, which are believed to be responsible for convulsions. Smoke is also used to treat migraines. We have brought this culturally accepted empirical treatment into a validated scientific value and therapeutic applications for the accessible and affordable management of these two conditions. This paper presents the results of laboratory experiments and clinical observational studies.

1. Malagasy beliefs on convulsions and headaches and their traditional treatments

All the Malagasy peoples have traditionally accepted the existence of a supreme God, known commonly as Zanahary (God Creator) or Andriamanitra (Perfumed Lord). They also believe in the immortality of the soul (fanahy) which is manifested in various forms: (i) an individual can have a good or a bad fanahy; (ii) ambiroa or avelo which is the soul of the person after death, (iii) lolo which is the soul of a recently deceased person, and is said to be harmless but feels homesick for its old surroundings and often appears in the form of a moth or a butterfly, (iv) angatra or matoatoa, ghosts of the unknown dead, are often malevolent and frighten people at night. Based on the immortality of the soul, a firm belief in the existence of close connection between the living people and the deceased ancestors constitutes the most basic of all traditional beliefs, and the foundation for Malagasy religious and social values. Ancestral veneration known as «culte des ancêtres» is therefore the characteristic of the Malagasy traditional culture. 46% of the Malagasy people embrace traditional beliefs. The remaining 54% are spiritually divided as Roman Catholics, Protestants, Muslims, and other faiths. These religious associations do not exclude the possibility that many Christians or Muslims uphold certain traditional Malagasy beliefs and practices.

The aetiology of mental diseases and some brain disorders is often attributed to witchcraft (mosavy), possession by evil spirits, not carrying out duties to the ancestors, or transgression of taboos (fady)» [11]. Serious illness and spirit possession may thus result from violation of spiritual structures.

To the best of our knowledge, the first document dealing with ethnomedical beliefs and practices of the Malagasy populations was published in a medicine dissertation in 1901 [12]. According to these traditional beliefs, epilepsy (androbe, meaning disease occurring right in daytime) and convulsive seizures (fanintona) are caused by bad spirits entering the body. They are the manifestation of an evil possession. They are believed to be contagious, and the disease is transmitted through saliva. To prevent epilepsy, a crow's feather and a stem of Hazotokana (*Brachylaena ramiflora*) are burned, and the ash is swallowed with water.

Headache (aretin'andoha) is believed to be caused by excess blood in the brain. To remove the excess blood, the healer gently hits the head until blood comes out through the nose. At this point, it is worthwhile to mention that in 1672, the father of neurology, Thomas Willis, proposed that dilatation of blood vessels in the head was the cause of migraines. Then in the late 1770s, Erasmus Darwin, believing that headaches were caused by vasodilatation, proposed the theory of treatment by centrifugation, spinning the patient around in a centrifuge to force the blood from the head to the feet. Additionally in traditional treatments of headaches in Madagascar, various aromatic plants are put or burned on the head, namely Rambiazina (*Helichrysum bracteiferum*, *Helichrysum gymnocephalum*), Romba (*Ocimum gratissimum*), Sakamalaho (*Zinziber officinale*). Tongotramboabe (*Geranium sinensis*), Moita (*Cyperus articulatus*).

In our ethnobotanical field work, we learned that dry leaves of *Myrothamnus moschatus* are smoked like a cigar and the smoke is gathered in a rice bag. The convulsing patient then inhales the smoke to expel bad spirits entering its body. We also learned that the dry leaves are used similarly for the treatment of migraines with nose bleeds. In the literature, it was reported that smoke is used to treat asthma and as in infusion against cough [13]. It is also employed as a psychoactive plant in the South region of Madagascar, near Betroka, Ivohibe and around Beraketa [14]. In the central highlands, the decoction is used against vomiting and the leaves are burned for magical rituals [15]. *Myrothamnus moschatus* is known under several Malagasy vernacular names which reflect its traditional uses:

- Maimbeloma (Merina): maina=dry, belona velona=alive- this name reflects the resurrection property of the species;
- maharoaka, maroaky, maharoaky, (Antandroy): maha=capable of, roaka mandroaka= expelling- this name refers to the magical ethnobotanical use of the plant capable of expelling the devil; another meaning is to facilitate divorce;
- somorombato (Bara): somorona is the common name of plants that are smoked in Madagascar for their narcotic properties, mbato_vato=stones; this name reflects both the narcotic properties of the species and its ecology;
- radiatra (Antanosy) from riatra, that means making noise if burned;
- fanalalahy, fanalahy (Betsileo): fanala=action of removing, lahy=male, this name designates the use of the plant as a magical philtre to create problems and confusions among married persons, leading to divorce;
- tsimaharofy (Betsileo): tsimaha: which prevents, rofy = chronic diseases.

2. Laboratory investigation of *Myrothamnus moschatus*

The uses of the fumes of *Myrothamnus moschatus* to treat convulsions and migraines attracted our attention. We assumed that the volatile constituents might be responsible for the biological activities of the species. We have therefore investigated phytochemically and pharmacologically the essential oil of the species.

2.1. Botany

The Myrothamnaceae family comprises one genus, *Myrothamnus*, and two species: *M. flabellifolia* indigenous to Southern Africa, and *M. moschatus* (synonym *Myosurandra moschata* Baillon) endemic to Madagascar. It is a small shrub about 0.5 m in height and grows on shallow granitic soils and is subjected to drought during the dry winter months [16]. It belongs to the resurrection plants. Resurrection species are a group of land plants that can tolerate extreme desiccation of their vegetative tissues during harsh drought stress. The desiccated plant can remain alive in the dried state for several years. However, upon watering the plants regain normal physiological and metabolic functions and are fully functional within 48 hours [16].

2.3. Phytochemical work

Freshly collected aerial parts of *M. moschatus* (250 kg) were extracted by steam distillation for 4 hours yielding 0.73% of yellowish oil for the batch collected in January (rainy season), and 0.67% for the batch collected in May (cold, dry season). Before analysis, the oil was dried with anhydrous sodium sulphate, transferred into an amber glass flask and kept at a temperature of -20°C.

The essential oil was analysed by GC/FID and GC/MS using a HP-5 capillary column. A total of 40 volatile components were identified in essential oils obtained from the two different batches of the plant, corresponding to 98.2-98.6% of the total compositions [17]. The chromatogram profile is given in Fig. 1. The major components, accounting together for 80.6-83.1% of the oils, were the bicyclic monoterpenoids trans-pinocarveol (35.6-36.3%) and its oxidation product pinocarvone (19.8-20.0%). Other constituents detected in significant levels were α -pinene (5.8-10.5%), β -selinene (8.5%) and perillyl acetate (6.0-12.7%). Structures of major compounds are given in Fig. 2. No qualitative differences were noticed comparing the compositions obtained for the two different biological forms of the plant. From a quantitative point of view, in the desiccation period, there was only a decrease in

the α -pinene content (from 10.5% to 5.8%) and a corresponding increase in that of perillyl acetate (from 6.0% to 12.7%), whereas the other major compounds remained constant. Thus, we can assume

that, in a specific area, environmental conditions did not qualitatively influence the biosynthesis of the major volatiles of the plant.

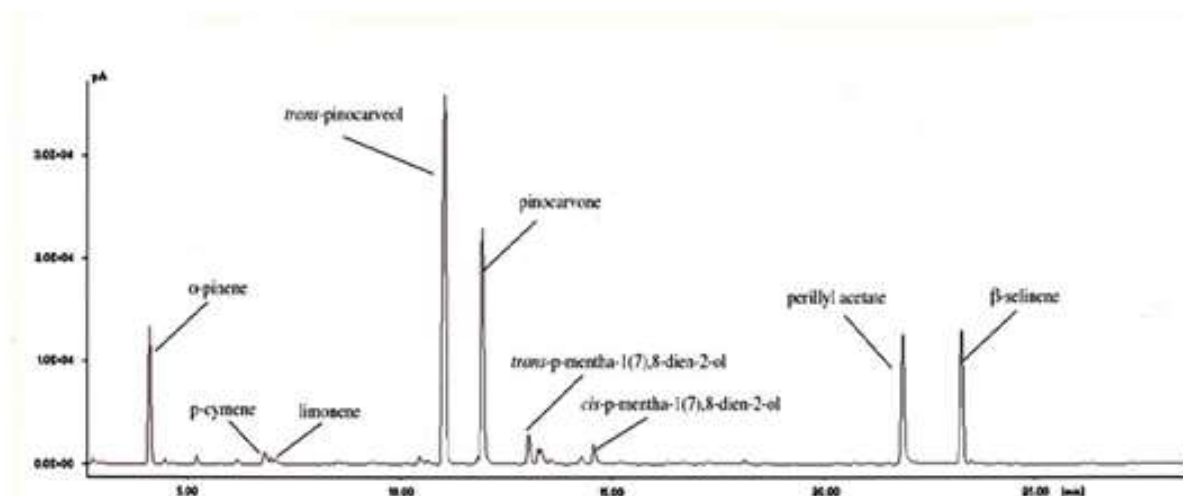
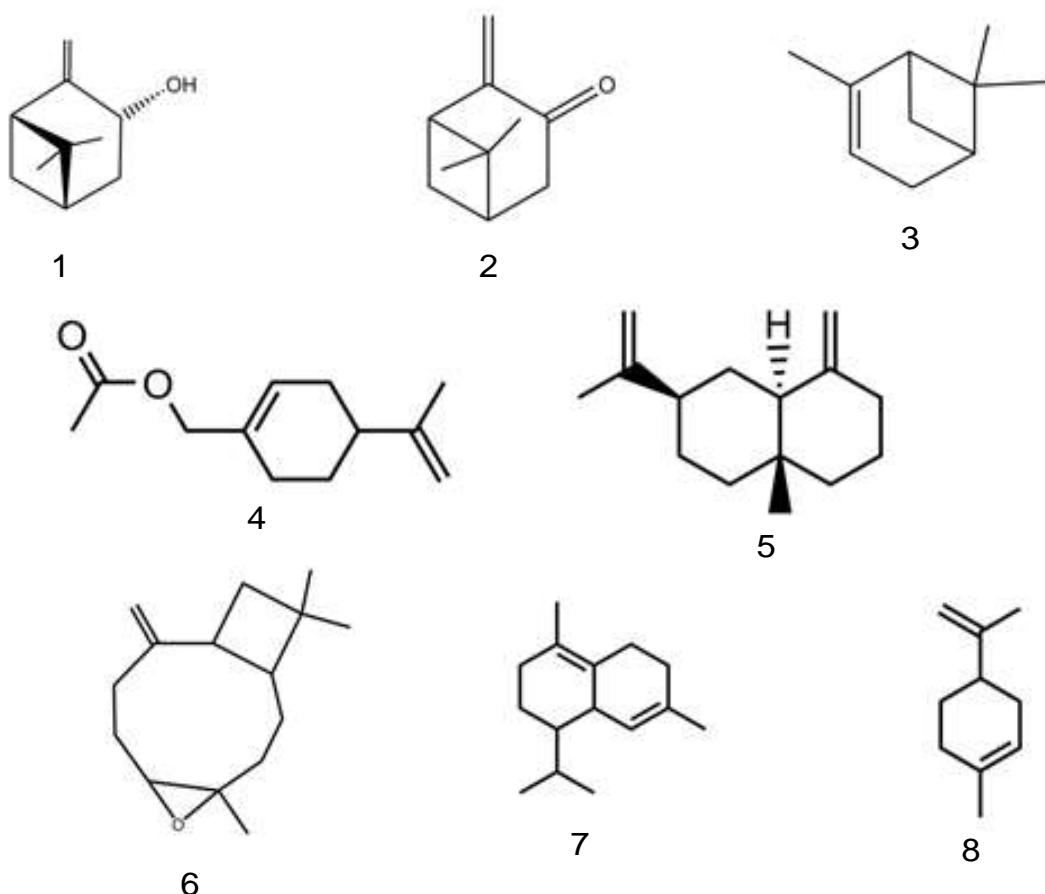


Figure 1: Chromatogram profile of the essential oil of *M. moschatus* collected in Isalo



1: trans-pinocarveol, 2: pinocarvone, 3: α -pinene, 4: perillyl acetate, 5: β -selinene, 6: caryophyllene oxide, 7: β -cadinene, 8: limonene

Figure 2: Structures of the major compounds of the essential oil of *M. moschatus* chemotypes (table 1)

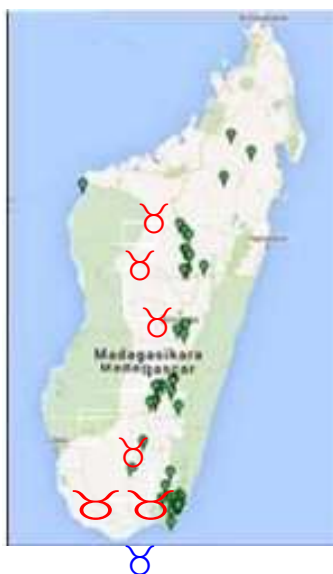


Fig. 3 showing the geographical distribution of *M. moschatus* indicates that this species is found growing wild in different ecological regions of Madagascar. We therefore investigated the presence of chemical variability of the volatile composition of the species depending on geographic origin of the samples (represented by red circles in the map), along with the traditional uses. Results are given in Table 1. Five distinct chemotypes were identified [18]. The essential oil composition of *M. moschatus* is very susceptible to ecological factors, with significant qualitative and quantitative variations. Importantly, the variation of the chemical composition is associated with variations in the ethnobotanical uses of the samples. Sample in the South-East (represented by blue circles in the map) was reported to have narcotic effects [14]. Unfortunately, we did not collect samples from this part of Madagascar because of the alarming insecurity.

Fig. 3. Map showing geographical distribution of *M. moschatus*

Table 1: Major constituents, chemotypes and traditional uses of *M. moschatus* according to the phytogeographical origin.

Regions	Major constituents (%)	Chemotypes	Traditional uses
Ambatofotsy	δ -cadinene (14,8) caryophyllene oxide (10,2) caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-ol (6,0) 1- epi-cubenol (4,6) epi-cubebol (4,5) cubebol (4,3) pogostol (4,1)	δ -cadinene	Vague ethnomedical data
Angavokely	caryophyllene oxide (19,0) caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-ol (8,7) δ -cadinene (4,1) longipinocarvone (4,0)	caryophyllene oxide	Vague ethnomedical data
Ambondromisotra (Soavina)	caryophyllene oxide (21,9) caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-ol (10,4) caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- α -ol (4,0)	caryophyllene oxide	No ethnomedical uses
Ambohiborona (Ambalavao)	β -selinene (22,0) trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol (12,8) Limonene (11,4) cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol (10,5)	β -selinene	Treatment of mi- graines; Smoke is used to expel bad spirit in the body;
Ifandraha	trans-pinocarveol (35,6) pinocarvone (20,0) α -pinene (10,5) β -selinene (8,5) perillyl acetate (6,0)	trans- pinocarveol	Treatment of cough and asthma; smoke is used to expel bad spirits in the body

We were surprised to note that the chemical composition of the essential oil from sample collected in Ambohiborona which is not geographically distant from Ifandraha contained only small amounts of trans-pinocarveol and pinocarvone. We therefore analysed the chemical composition of volatile substances in the hydrosol/hydrolate. To this end, we extracted the aqueous phase with hexane, and the organics phase was decanted, dried over sodium

sulphate and evaporated to dryness at 30° C under reduced pressure. The chromatogram profile is depicted in Fig. 4. Trans-pinocarveol (56.9%) and pinocarvone (20.1%) were the two major compounds identified; they remained in the aqueous phase during the steam distillation.

We carried out headspace analysis at different temperatures of the essential oil and dry leaves of

M. moschatus collected at Ifandana using Agilent 7694E headspace sampler coupled with the gas chromatograph (publication in progress). This instrument permits the capture of the headspace volatiles without selectivity. Results are presented in Fig. 5. It is clear that the changes in levels of the main volatiles (α -pinene, trans-pinocarveol, pinocarvone, perillyl acetate and β -selinene) depend on the temperature. It seems that at a temperature similar to that of the human body (40°C) α -pinene and pinocarvone

dominated the volatile fraction analyzed by the instrument (the former in the oil, the latter in the dry leaves). On the other hand, these volatiles decreased with the increase of temperature (80°C and 120°C), leaving the major role in characterizing the volatile fraction to trans-pinocarveol. The latter exists only in very small quantities in the headspace of dry leaves and essential oil of *M. moschatus* at low temperature.

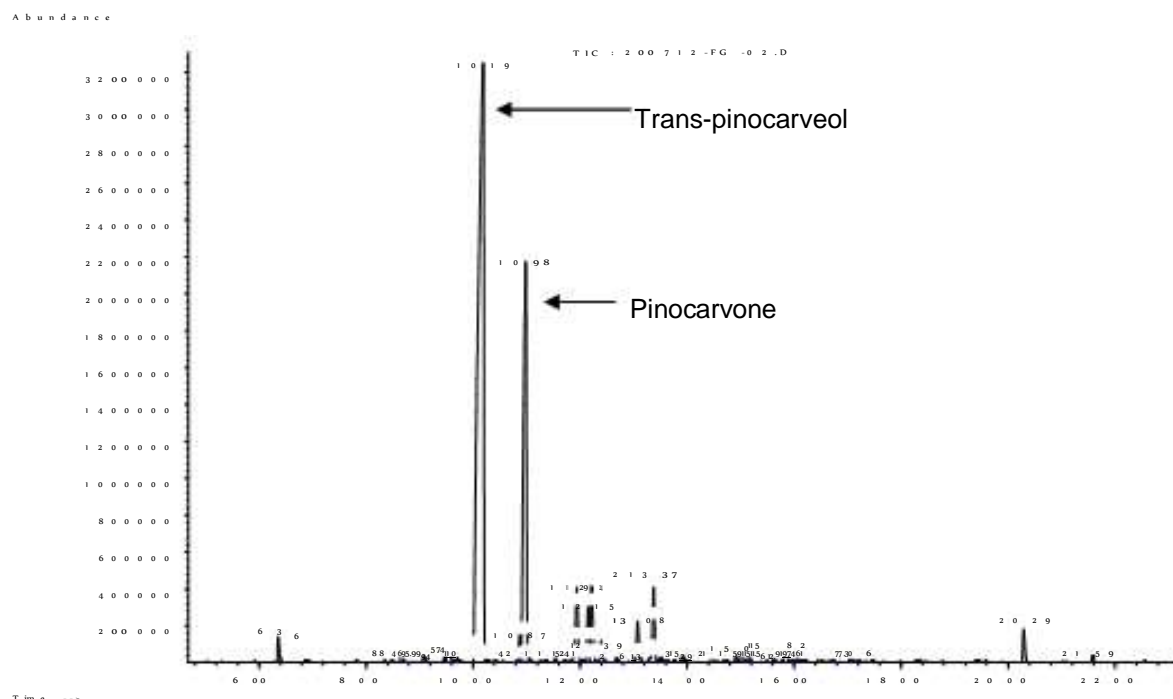


Fig. 4. Chromatogram profile of the volatiles extracted from hydrosol/hydrolate of *M. moschatus* sample collected in Ambohiborona

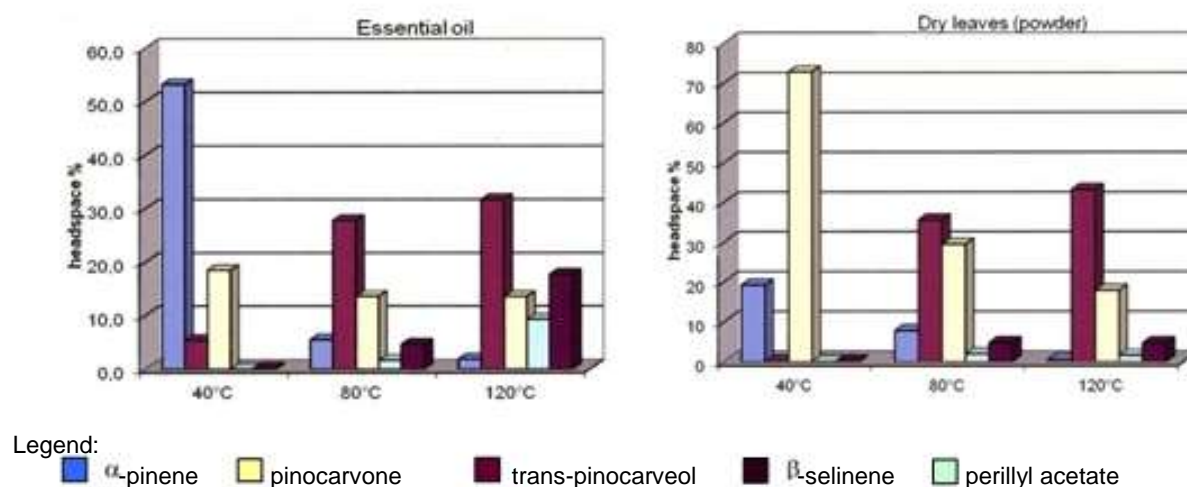


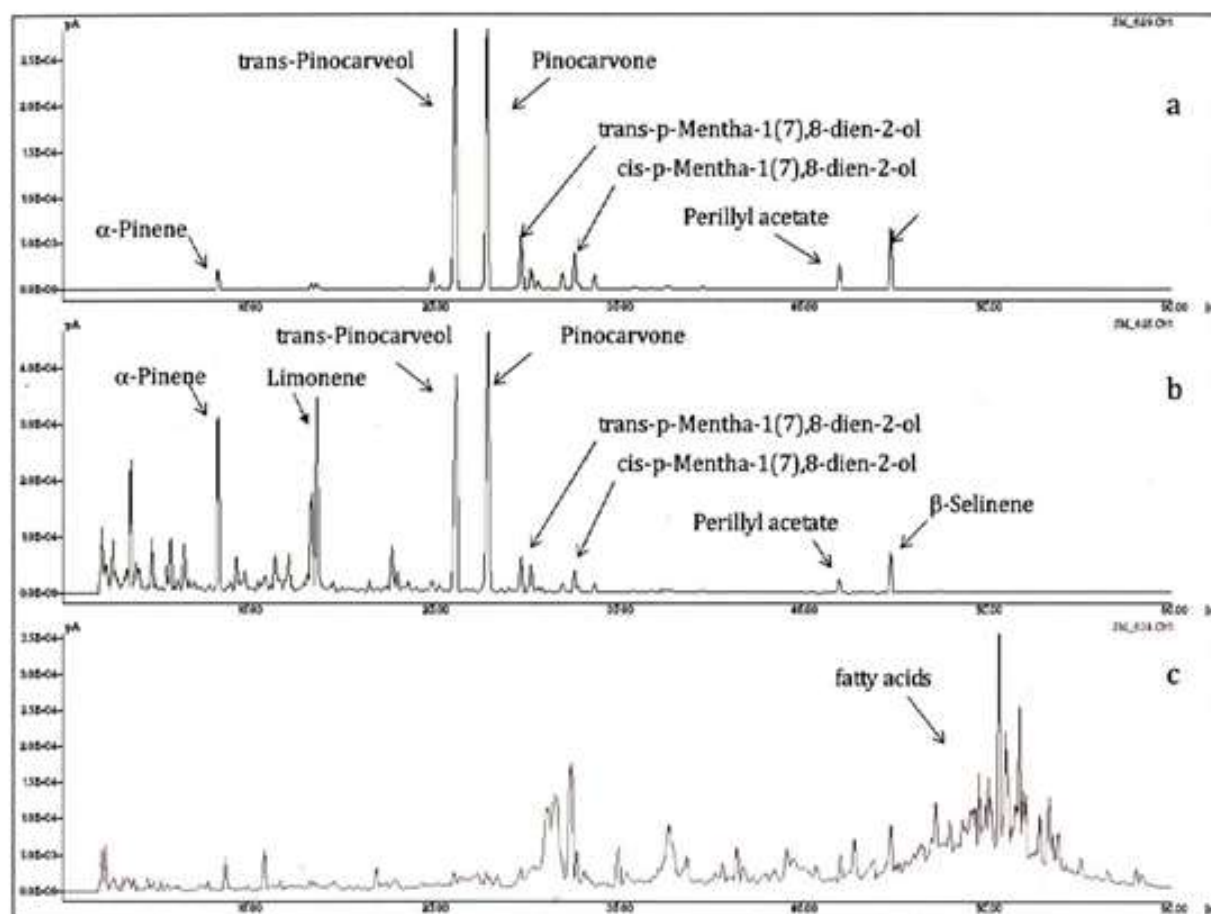
Fig. 5: Headspaces analysis of the essential oil and dry leaves of *M. moschatus* at 40°C, 80°C and 120°C

We also performed the analysis of the chemical composition of active and passive smoke using the solid phase micro-extraction (SPME) technique

(publication in progress). Relevant results are outlined in Table 2, and chromatogram profiles are depicted in Fig. 6.

Table 2. Comparative percentage of the main constituents from essential oils, dry leaves and active smokes by SPME analysis.

Components	Essential oil (dry season)	Essential oil (rainy season)	Dry leaves at 37°C	Smoke
α -Pinene	5.8	10.5	1,3	4,8
p-Cymene	0.9	1.6	-	4.6
Limonene	0.4	2.3	0,5	6,6
trans-Pinocarveol	36.3	35.6	35,5	12,2
Pinocarpone	19.8	20.	30,5	15,1
trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	2.8	3.3	5,9	
cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	2.3	2.1		
Perillyl acetate	12.7	6.0	2,6	0,6
β -Selinene	8.5	8.5	5,2	1,3



a) Volatile profile of leaves at 37°C

b) Volatile profile of direct smoke released from burning leaves (simulation of smoke actively inhaled by a cigarette)

c) Volatile profile of passive smoke released from burning leaves (simulation of smoke passively inhaled)

Fig. 6. SPME-GC-FID chromatograms:

The most striking difference was the presence of limonene in the smoke of *M. moschatus* while it was found in small quantities in dry leaves and essential oil of the plant. Apart from this difference, the qualitative chemical composition of essential oil (Fig. 1), volatiles from dry leaves and active smoke of *M. moschatus* are practically similar.

2.3. Pharmacological work

We first tested the essential oil on a series of in vitro tests, namely antimicrobial, cytotoxicity and antioxidant. The oil strongly inhibited MDA-MB 231 (human breast adenocarcinoma) cells, with an IC_{50} of 15 μ g/ml, and the growth of *Candida albicans*, with an inhibition diameter of 18 mm, while its antioxidant activity, measured by DPPH and ABTS assay, proved to be negligible [19].

After that, we tested the anticonvulsant effects of the essential oil using the pentylenetetrazole (PTZ) method in rat models [20]. We used subcutaneous injection using decreasing dosages of the oil (0.8 ml/kg, 0.4 ml/kg, 0.2 ml/kg). Diazepam at the dose

of 5mg/kg was used in intra-peritoneal injection as a positive control. Animals that did not convulse within 60 min were considered as protected. In unprotected animals, the latency to first convulsion and the durations of convulsions were recorded. The animals were observed for mortality for 24 h after administration of PTZ. We observed a clear dose-response effect. At 0.8 ml/kg and 0.4 ml/kg, the convulsive effects of PTZ were completely inhibited, without any toxicity at the highest dose used. No sedative effect was observed. With the dose of 0.2 ml/kg, the extract demonstrated a significant increase in seizure latency and a significant reduction in seizure duration compared with the control group. Oil from the hydrosol/hydrolate did not show any anti-convulsive activity.

We then investigated the ability of the essential oil to promote neurite outgrowth also called neuritogenesis. To this end, we assessed the effect of the extract on the neurite outgrowth of neuronal culture SHSY5Y cells. The picture (Fig. 7) shows SHSY5Y cells, a neuroblastoma cell line.

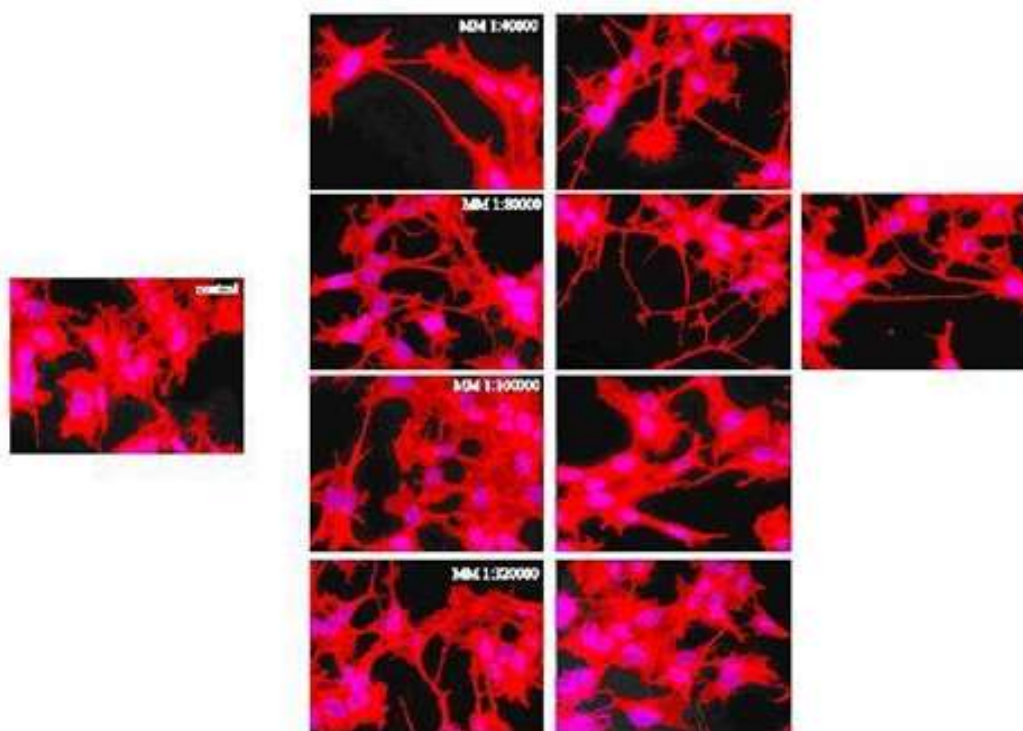


Fig. 7. Neurites outgrowth observed at different concentrations of the essential oil of *M. moschatus*.

These cells were treated with different dilutions of the extract as indicated on the photos (1:40000-1:80000 etc). After 48 hours of treatment, cells were fixed and processed for actin microfilaments staining. F-actin is a component of the cell cytoskeleton, which has a pivotal role in neuronal cell morphology and physiology. The staining was performed with phalloidin, a compound that selectively binds filamentous actin (F-actin), linked to a fluorescent probe. The pictures clearly show that

control cells have an epithelial-like morphology, that is a polygonal shape, with no or very few cell protrusions (neurites). By contrast, cells treated with the extract show a typical «neuronal» morphology. In fact, cells developed a huge number of neurites that connect cells one with other, thus forming a neuronal network. This effect was dose-dependent and became most prominent with higher doses (1:40000 and 1:80000) and decreases at the lower ones.

3. Clinical observational studies

Based on successful laboratory validation of the traditional recipe, we carried out clinical observational studies for patients suffering from convulsions and/or migraines. Each patient signed a prior informed consent. We targeted two types of patients: patients who cannot afford to buy conventional drugs (essential oil as a primary treatment), and those

who are refractory to existing medications (essential oil as an adjunctive treatment). Overall, 31 patients suffering from convulsions and 38 patients having migraines were enrolled in the studies. Additionally three unexpected emergency convulsion cases were successfully treated with the essential oil. The route of administration is by simple inhalation. Results are outlined in Table 3.

Table 3: Clinical observational studies of the essential oil of *M. moschatus* in convulsive and migraineous patients.

CONVULSIONS: number of patients = 31, age 18months -55 years				
	Number of cases	Primary treatment	Adjunctive treatment	Treatment failure
Symptomatic epilepsy with generalized seizures	25	19	6	2 (cysticercosis)
Epilepsy with absence	2	0	2	0
Epilepsy with partial seizures	3	2	1	0
Generalized seizure accompanied by strange possessive behaviour	1	0	1	1 (unexplained)
MIGRAINES: number of patients = 38, age 12 years - 51 years				
Migraines without aura	31	19	12	2
Migraines with aura	2	0	2	0
Migraines with convulsions	5	3	2	0

21 convulsive patients did not receive any conventional treatments. The seizures were successfully managed with the essential oil as primary preventive treatment just before convulsions occurred. 10 patients were refractory to, or complaining about the toxicity of existing conventional drugs. We decreased progressively the dose of conventional drugs while using the essential oil as adjunctive therapy. Overall, we observed a significantly reduced frequency and duration of convulsions. Three treatment failures were observed, two in patients diagnosed with cysticercosis and one with unexplained causes despite repeated EEG analysis and use of several conventional drugs. The majority of patients reported that, once used, essential oil lost its effects after three months.

Regarding migraines, 22 patients did not receive any conventional treatments. They successfully used the essential oil as preventive medication. 16 patients were refractory to conventional drugs, or complained about their toxicity. In these cases, the essential oil was used as adjunctive therapy. Two treatment failures were observed.

In addition to these case studies, we used the essential oil in three emergency cases. On our way back home, we unexpectedly found a man of about 20 years old who presented severe convulsive seizures right in a public road, without health care facilities. We immediately put the flask containing the essential oil into his nostril for one minute. The seizures stopped and he recovered consciousness.

The second case concerned baby aged 18 months who suddenly presented a severe convulsive generalized tonic seizure. Her mother brought the baby to the clinical department of IMRA. While waiting for diazepam that must be bought in the closest pharmacy, we put the essential oil in her nostril. After 5 minutes, the seizures ceased. In fact it took 45 minutes to get the diazepam. The third case concerned a 28 years old patient who came for consultation in a private clinic. She was in generalized convulsive crisis with hypotension and in a very bad general state. Before transferring her to the hospital, the doctor applied a drop of the oil to her nostril. The doctor believed that she would die. Fortunately, her seizures ceased at half way to the hospital. Her family reported that, after intensive health care, she left the hospital in a good state.

4. Discussion

Overall, laboratory work and clinical observational studies confirmed the traditional uses of smoke of *M. moschatus* for the treatment of convulsions and migraines, and also confirmed our hypothesis that the active constituents are volatile substances. A review paper reported the anticonvulsant effects of essential oils extracted from 30 plant species and 30 isolated constituents [21]. Specific animal models, namely the chemoconvulsant-induced convulsions models (PTZ, picrotoxin, pilocarpine, strychnine), the maximal electroshock (MES) model, were mainly used for evaluation of anticonvulsant activity. It is in line with this trend that we evaluated the

effects of the essential oil of *M. moschatus* in PTZ model. The anticonvulsant effect was evident, without any toxicity at the highest dose tested, and without sedative effect. In addition to their anticonvulsant activities, essential oils were also reported to have various activities in central nervous system (CNS), such as anxiety, learning, memory, attention, arousal, relaxation, sedation and sleep, mood, behaviour and perception, stress, dementia and Alzheimer's disease [22]. One additional activity which deserves much attention is the neurite outgrowth induced by essential oils. It was once believed that nerve regeneration in the mammalian central nervous system was irreversible. Modern neuroscience, however, has revealed that nerves continually rearrange themselves throughout the course of life. Neural plasticity, also known as neuroplasticity, is the changing of the structure, function and organization of neurons, or nerve cells, in response to new experiences. It specifically refers to strengthening or weakening nerve connections or adding new nerve cells based on outside stimuli. Neuroplasticity sometimes may also contribute to impairment. It was suggested that the best examples for study of plasticity may be in the field of epilepsy [23]. It has also recently become apparent that damaged neurons do regenerate under chemical stimuli. At this point, d-limonene was investigated for its ability to promote neurite outgrowth in PC12m3 cells. Reported results showed that neurite outgrowth can be induced when the cells are treated with d-limonene [24]. Similarly, β -eudesmol was reported to induce neurite outgrowth in rat pheochromocytoma cells [25]. We found that the essential oil of *M. moschatus* induced neurite outgrowth of neuronal culture SHSY5Y cells. Neuritogenesis not restricted to essential oils; a review paper reported various compounds from natural sources with potential neurite outgrowth activity [26]. Neuronal regeneration can also be induced under the presence of stimulatory substances such as nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF), and this was exploited in epilepsy models. It was thus shown that delivery of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in a lesioned hippocampus reduced spontaneous seizures in an epilepsy model in adult rats [27]. Neurite loss is one of the main features of neuronal injury. Reorganization of the lost neuronal network in the injured brain is necessary for the restoration of normal physiological functions. At this point, neuronal growth may induce neuroprotection. Many patients and families affected by epilepsy ask the question 'Do epileptic seizures damage the brain?' Based on the emerging experimental and human evidence for progressive adverse consequences of repeated brief seizures, there is a strong rationale for development of neuroprotective treatments to anticipate the long-term consequences of repeated seizures, and for prompt, effective intervention that achieves complete seizure control. To this end, essential oils may offer a good choice.

We found surprisingly that the essential oil composition of the sample collected in Ambohiborona contained small amounts of trans-pinocarveol and pinocavone. We then extracted the hydrosol/ hydrolate with hexane and found the organic phase contained trans-pinocarveol and pinocavone as the major constituents amounting to 77% of all content. The two compounds therefore remained in the aqueous phase during steam distillation. The organic phase did not show any anticonvulsant effect at various dose levels. This result indicates that the major constituent(s) of an extract may not account for the biological activities of the extract. They may act in synergy with other minor compounds, or completely different constituents may be responsible for the biological activities. This result was in accordance with the loss of effectiveness of the essential oil after 2 months of use, probably due to a progressive evaporation of the bioactive volatile substances which are not related to trans-pinocarveol and pinocavone. This prompted us to carry out headspace analysis of the essential oil of *M. moschatus* and dry leaves, as well as SPME analysis of dry leaves and smokes. Smoke from dry leaves of *M. moschatus* is used to treat convulsions, migraines, asthma. The most relevant result came from the SPME analysis of active and passive smokes. SPME is a relatively new sample extraction technique that brings some unique capabilities to the chromatographic analysis of dilute solutions in difficult matrices, both liquid and gaseous [28]. We found that the most striking difference between the chemical composition of smokes, dry leaves and essential oil of *M. moschatus* was the significant presence of limonene in the fumes. We postulated that trans-pinocarveol might be one precursor of this compound during thermal rearrangement. A review paper reported the thermal rearrangements of monoterpenes and monoterpenoids [29]. It is worthwhile to mention that in the list of anticonvulsant volatiles [21], limonene is the only compound which is present in *M. moschatus*. Furthermore, this compound has neuroprotective effect [24]. For a therapeutic use of the essential oil of *M. moschatus*, it may be necessary to adjust the limonene content by adding exogenous limonene.

Aside from food, one of the earliest and often overlooked uses of plants was the production of smoke, dating back to the time of early hominid species. Plants have been burned for medicinal and recreational purposes, magico-religious ceremonies, pest control, food preservation and flavouring, and perfumes. The use of plant-derived smoke is therefore an important cultural trait. In Africa, burning plants and inhaling the emitted smoke for rituals, e.g. expelling bad spirits, or to treat respiratory diseases such as coughs, colds, infections, influenza and asthma is very common. However, this mode of administration of active compounds remains chemically and pharmacologically poorly investigated since studies on the volatile combustion products of plant species and their derivatives are relatively rare. The inhalation

therapy offers some benefits such as less invasiveness, site-specificity, ease and speeds to reach the bronchioles, lung and brain, avoidance of the first hepatic passage, less systemic exposure and adverse effects, and thus has been practiced in traditional medicine since ancient times. Usually, the combustion process produces compounds not present in any of the solvent extracts nor with standard extraction methods, e.g. steam distillation, which are normally used in phytochemical studies, and the formation of new compounds during the combustion process with respect to natural matrix may occur. In fact, during combustion, several volatile components may degrade by hydrolysis, oxidation, dehydration and pyrolysis producing derivatives which exhibit better activity than the parent molecules. On the other hand, the smoke is known to contain several toxic compounds, e.g. benzopyrenes, leading to a general cytotoxicity rather than healthy effects. It therefore remains a challenge for researchers to identify the active compounds in the complex smoke fraction emitted from burning plants used by traditional healers. To this end, the advent of SPME techniques has revolutionized the analysis of smokes.

Biological activities of the essential oil of *M. moschatus* were evaluated in a series of in vitro tests. This seems to be common feature of publications in essential oils. For the moment, we do not expect any therapeutic use from the results.

Phenotypic assays have been mainly used to assess the anticonvulsant activities of essential oils. Little has been done for complementary studies, aimed at elucidating the mechanism(s) of action of the oils or individual components. Epilepsy is commonly considered to result from an imbalance between excitatory and inhibitory process leading to inappropriately hyper-synchronous neuronal firing. Antiepileptic drug (AEDs) mechanisms of action are generally consistent with this framework, as these drugs are generally reported to antagonize receptors and channels that support excitatory processes, or enhance those supporting inhibitory processes. Antiepileptics inhibit excessive neuronal discharges or its spread in one or more of the following ways [30]:

- reducing cell membrane permeability to voltage-dependent sodium channels. Voltage-gated sodium channels are responsible for depolarisation of the nerve cell membrane and conduction of action potentials across the surface of neuronal cells. Blockade of voltage-gated sodium channels is the most common mechanism of action among currently available AEDs. AEDs acting through this mechanism include : Phenytoin, carbamazepine, lamotrigine, felbamate, topiramate, oxcarbazepine, zonisamide, rufinamide, lacosamide;
- reducing cell membrane permeability to calcium channels, resulting in the reduction of the generation of action potentials. Voltage-gated calcium channels contribute to the overall

electrical excitability of neurones, are closely involved in neuronal burst firing, and are responsible for the control of neurotransmitter release at pre-synaptic nerve terminals; AEDs acting through this mechanism include: valproate, ethosuximide;

- increasing outward positive current of K^+ . Voltage-gated potassium channels are primarily responsible for repolarisation of the cell membrane in the aftermath of action potential firing and also regulate the balance between input and output in individual neurones; AEDs acting through this mechanism include retigabine;
- enhancing the inhibitory effects of the neurotransmitter GABA, resulting in increased permeability to chloride ion which reduces neuronal excitability. GABA is the predominant inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system and is released at up to 40% of all synapses in the brain. AEDs acting through this mechanism include: barbiturates, benzodiazepines, gabapentin, levetiracetam, tiagabine, vigabatrin, topiramate, valproate;
- inhibiting excitatory neurotransmitter glutamate. Glutamate is the principal excitatory neurotransmitter in the mammalian brain. AEDs acting through this mechanism include lamotrigine.

While many AEDs can be categorised according to a single, principal mechanism of action, it is increasingly recognised that several agents have multiple primary effects at therapeutic concentrations.

Drug discovery has undergone transformations over the years, moving from in vivo models (phenotypic assays) to a 'single target one selective drug' (mechanism-based assays). Drug discovery efforts have therefore focused on identifying single selective drugs that target a single mechanism. It is now evident that the concept that one drug acts on a single receptor is not as effective as expected from the reductionism view. This philosophy of drug design has been transformed from «one drug one target» to «one drug multiple targets» coined as polypharmacology [31]. Polypharmacological phenomena include : (a) single drug acting on multiple targets of a unique disease pathway, or (b) single drug acting on multiple targets pertaining to multiple disease pathways. AEDs are a good example of polypharmacology: anticonvulsants interact with multiple ion channel and neurotransmitter targets [32], and this is summarized in Table 4. One consequence of polypharmacology is drug repositioning/ repurposing which means repositioning existing drugs for new indications. This is well illustrated by the use of AEDs for the prevention or treatment of migraines. Migraines and epilepsy are chronic brain disorders of neuronal hyper-excitability. The occurrence of migraine in people with epilepsy is greater than would be expected based on the usual prevalence of migraine. Given the likely commonalities in the underlying cellular and molecular mechanisms of the two diseases, it is not surprising that several of the

anticonvulsant medications also are effective in both the treatment of acute migraine and in migraine prevention [33]. Interestingly, the fumes of *M. moschatus* are traditionally used to treat convulsions and migraines. To the best of our knowledge, no review paper was published on the use of the essential oils for the management of migraines and headaches

with scientific validation. However, many anecdotal reports have been found from current text, journal articles, Masters or PhD dissertations, and internet resources have been utilized as important sources of information about the successful use of essential oils in headache management.

Table 4: Molecular targets of current antiepileptic drugs.

	Na ⁺ channels	Ca ⁺⁺ channels	K ⁺ channels	GABA _A receptors	GABA turnover	Glutamate receptors
Phenobarbital		⌘		⌘⌘⌘		⌘
Phenytoin	⌘⌘⌘	⌘⌘⌘		⌘⌘		⌘
Carbamazepine	⌘⌘⌘	⌘⌘⌘				
Sodim valproate	⌘⌘⌘	⌘⌘⌘			⌘⌘	⌘
Benzodiazepines	⌘⌘⌘	⌘⌘⌘		⌘⌘⌘		
Barbiturates	⌘⌘⌘			⌘⌘		⌘⌘⌘
Vagabatrín					⌘⌘⌘	
Lamotrigine	⌘⌘⌘	⌘⌘⌘				⌘⌘⌘
Felbamate	⌘⌘⌘	⌘⌘⌘		⌘⌘		⌘⌘⌘
Topiramate	⌘⌘⌘	⌘⌘⌘	⌘	⌘⌘		⌘⌘⌘
Zonisamide	⌘⌘⌘	⌘				
Retigabine			⌘⌘⌘			
Perampanel						⌘⌘⌘

⌘⌘⌘ = principal target ⌘⌘ = probable target ⌘ = possible target

The diversity of anticonvulsant targets has been exploited for their utility in disorders other than epilepsy and migraines. Anticonvulsants have thus been used in the treatment of pain, mood disorders, migraine, movement disorders, alcohol withdrawal and mania, traumatic brain injury, dysautonomia and agitation/aggression [34]. One interpretation of the overlap in efficacy between epilepsy and other diverse neurological and psychiatric disorders is that there have common or shared pathophysiological mechanisms. Therefore, it is not surprising that drugs modulating multiple targets such as anticonvulsant drugs may display clinical utility in a variety of diseases as well.

A report of hospital-based data on neurological disorders from Mahajanga in Madagascar, showed that the commonest illness encountered were epilepsy (29% of cases), chronic headaches (21%), peripheral neuropathies (14%) and stroke (11%) are the commonest illnesses encountered [35]. Unlike western countries, degenerative diseases and multiple sclerosis are comparatively rare. Overall in Madagascar, about 75% of people with convulsive seizures have little or no access to modern healthcare and are not appropriately treated. Regarding migraines, an epidemiological study in Madagascar showed a high prevalence of 19%. However, only about 28% of those diagnosed with migraine in Madagascar receive adequate treatment. Therefore, these two neurological diseases constitute a serious public health problem.

Some patients in Madagascar view epilepsy and convulsive seizures as the manifestation of an evil possession according to their traditional beliefs,

and prefer a free treatment based mainly on prayers and exorcisms [36]. The stigma behind convulsions is also common in Africa [37]. People with epilepsy in low-income countries often prefer to put their trust in traditional healers rather than in modern medical care. However, there is a progressive tendency towards natural explanations of epilepsy in Madagascar and subsequent consultations to medical health services [38].

After basic toxicity studies, we successfully conducted observational studies on the essential oil of *M. moschatus* for the management of convulsions and migraines. Particularly, the observed rapid onset of action of the essential oil in emergency cases may be attributed to its speed to reach the brain. Based on the results, we manufactured two phytomedicines: one under the commercial name ★Fanalarofy•Ⓢ (fanala= which removes, rofy = chronic diseases) for the prevention or treatment of convulsions, and another one under the trade-name Fanalanendo• (anendo= migraines) for the prevention or treatment of migraines. They are readily available at a reasonable cost. We filled an OMAPI patent in 2013, and it has now been granted [39].

5. The way forward

In conclusion, the traditional uses of *M. moschatus* have been translated into affordable therapeutic applications for the management of convulsive seizures and migraines for which the conventional drugs alone failed, and also for patients who do

not have access to conventional medications. We identified five main challenges for future plans:

- most of the pharmacological tests used to validate the anticonvulsant activity of essential oils are phenotypic assays. It is necessary to move to the elucidation of the mechanism(s) of action of the essential oil of *M. moschatus* and some isolated compounds. We are now focusing efforts on this study;
- we will investigate the role of smell and olfactory system in the effects of the essential oil,
- while commercialising the two phytomedicines, we will carry out post-marketing surveillance;
- we will explore the therapeutic usefulness of the essential oil in other brain disorders, in the context of polypharmacology and drug repositioning;
- few criteria are necessary to bring any plant-based drug discovery into useful therapeutic applications and commercialisation: safety, quality, efficacy and availability of adequate plant raw materials. A big challenge is the large scale the cultivation of *M. moschatus*. The plant grows only in rocky areas, and is susceptible to environmental factors. We are working on the cultivation of the plant to tackle this issue.

It is difficult to go against traditional beliefs which are deeply rooted in the culture. In view of the insufficiency of the modern primary healthcare provisions in Madagascar, integration of allopathic services and traditional practices may be the most promising avenue for filling the gap [40]. This implies collaborative medical doctors-traditional healers-researchers relationships, and is in line with the WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023.

6. Acknowledgements

We warmly thank Professor Marcello Nicoletti, Department of Environmental Biology, Sapienza University, Rome, Italy, and Dr Filippo Maggi, School of Pharmacy, University of Camerino, Camerino, Italy, for a fruitful collaboration. We are grateful to Doctor Merlin Willcox for useful comments and to Professor Charles Wambebe for editing the English style of the manuscript.

7. References

1. Newton CR, Garcia H. Epilepsy in poor regions of the world. *Lancet* 2012; 380: 193-201.
2. WHO-AFRO 2004. Epilepsy in the WHO African region: bridging the gap. The global campaign against epilepsy «Out of the shadows.»
3. Ngoungou EB, et al. Épidémiologie de l'épilepsie en Afrique subsaharienne: une revue de la littérature. *Epilepsies* 2006; 18 (1): 25-40.
4. Andriantseho LM, Ralaizandriny D. Prévalence communautaire de l'épilepsie chez les Malgaches. *Epilepsies* 2004; 16(2): 83-86.
5. Carter JA, Neville B, White S, et al. Increased prevalence of epilepsy associated with severe falciparum malaria in children. *Epilepsia* 2004; 45: 978-981.
6. Quet F, Guerchet M, Pion SD, Ngoungou EB, Nicoletti A, Preux PM. Meta-analysis of the association between cysticercosis and epilepsy in Africa. *Epilepsia* 2009; 51: 830-837.
7. Woldeamanuel YW, Andreou AP, Cowan RP. Prevalence of migraine headache and its weight on neurological burden in Africa: a 43-year systematic review and meta-analysis of community-based studies. *J Neurol Sci.* 2014; 342(1-2):1-15.
8. Andriantseho LM, Rafidison Y, Andriantseho OP. Prévalence de la migraine à Madagascar: résultats d'une enquête menée dans une population générale. *Afr J Neur Sci* 2005; 24(1): 13-17.
9. Meinardi H, Scott RA, Reis R, Sander JW. The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. *Epilepsia* 2001; 42(1):136-49.
10. Ratsimbazafy V, Andrianabelina R, Randrianarisona S, Preux PM, Odermatt P. Treatment gap for people living with epilepsy in Madagascar. *Tropical Doctor* 2011; 41: 38-39.
11. Robinson JL. Programme National de Santé Mentale. Ministère de la Santé du Planning Familial de la Protection Sociale. 2007.
12. Ramisiray G. Pratiques et croyances médicales des Malgaches. Thèse de Doctorat en Médecine 1901, Faculté de Médecine de Paris, Maloine Ed. Paris., 112 pages.
13. Millogo-Rasolodimby J. Myrothamnaceae, Famille 94, In: Flore de Madagascar et des Comores 1991, pp. 81-85. Publications du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
14. Boiteau P. Sur deux plantes autochtones de Madagascar utilisées à la manière du chanvre comme stupéfiant. *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris* 1967; 264: 41-42.
15. Razafindrambao R. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales des Hauts Plateaux. Documents de l'ORSTOM 1971, tome III, p. 85.
16. Scott P. Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany* 2000; 85: 159-166.
17. Rasoanaivo P, Ralaibia BE, Maggi F, Papa F, Vittori S, Nicoletti M. Phytochemical investigation of the essential oil from the 'resurrection plant' *Myrothamnus moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. *Journal of Essential Oil Research* 2012; 24(3): 299-304.
18. Randrianarivo E, Rasoanaivo P, Nicoletti M, Razafimahefa S, Lefebvre M, Papa F, Vittori S, Maggi F. Essential-oil polymorphism in the resurrection plant *Myrothamnus moschatus* and associated ethnobotanical knowledge. *Chemistry & Biodiversity* 2013; 10:1987-1998.
19. Nicoletti M, Maggi F, Papa F, Vittori S, Quassinti L, Bramucci M, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, Ralaibia E, Rasoanaivo P. In vitro biological activities of the essential oil from the 'resurrection plant' *Myrothamnus moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. *Natural Product. Research* 2012, 26(24), 2291.
20. Randrianarivo E, Maggi F, Nicoletti M, Rasoanaivo P. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Myrothamnus moschatus* in male rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (in press).
21. Almeida RN, Maria de MF, Maior FNS, Sousa DP. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules* 2011; 16: 2726-2742.
22. Dobetsberger C, Gerhard Buchbauer. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 2011; 26: 300-316.
23. Scharfman HE. Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist* 2002; 8(2):154-73.
24. Shinomiyaa M, Kawamura K, Tanida E, Nagoshi M, Moto-da H, Kasanami Y, Hiragami F, Kano Y. Neurite outgrowth of PC12 mutant cells induced by orange oil and d-Limonene via the p38 MAPK pathway. *Acta Medica Okayama* 2012; 66(2): 111-118.

25. Obara Y, Aoki T, Kusano M, Ohizumi Y. β -eudesmol induces neurite outgrowth in rat pheochromocytoma cells accompanied by an activation of mitogen-activated protein kinase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 301: 803-811.
26. More SV, Koppula S, Kim IS, Kumar H, Kim BW, Choi DK. The Role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth. *Molecules* 2012; 17(6):6728-53.
27. Paradiso B, Marconi P, Zucchini S, Berto E, Binaschi A, Bozac A, Buzzi A, Mazzuferi M, Magri E, Navarro Mora G, Rodi D, Su T, Volpi I, Zanetti L, Marzola A, Manservigi R, Fabene PF, Simonato M. Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2009; 106(17): 191-196.
28. Vas G, Vékey K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* 2004; 39: 233-254.
29. Stolle A, Ondruschka B, Hopf H. Thermal rearrangements of monoterpenes and monoterpenoids. *Helvetica Chimica Acta* 2009; 92: 1673-1719.
30. Lignelet R. L'épilepsie et son traitement par les médicaments antiépileptiques. Master 2 Biologie Gestion-Marketing, Université de Rennes 1 - UFR SVE, 2010-2011.
31. Reddy AS, Zhang S. Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2013; 6(1): 41-47.
32. Bianchi MT, Pathmanathan J, Cash SS. From ion channels to complex networks: magic bullet versus magic shotgun approaches to anticonvulsant pharmacotherapy. *Medical Hypotheses* 2009; 72(3):297-305.
33. Chronicle EP, Mulleners WM. Anticonvulsant drugs for migraine prophylaxis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Issue 3. Art. No.: CD003226. DOI: 10.1002/14651858.CD003226.pub2.
34. Moch S. Therapeutic uses of antiepileptic drugs in non-epileptic disorders. *South African Pharmaceutical Journal* 2010; 77(5): 18-27.
35. Andriantseho LM, Andrianasy TF. Hospital based study on neurological disorders in Madagascar. Data from the northwestern part of the island. *African Journal of Neurological Sciences* 1997; 16(2): 22-27.
36. Ratsimbazafy V, Rakotovo T, Marin B, Javerliat M, Preux PM. The dangers of inadequate understanding of epilepsy in Madagascar. *Lancet Neurology* 2012; 11(9): 748-749.
37. Baskind R, Birbeck GL. Epilepsy-associated stigma in sub-Saharan Africa: the social landscape of a disease. *Epilepsy & Behavior* 2005; 7: 68-73.
38. Andriantseho LM, Rakotoarivony MC. Aspects socioculturels de l'épilepsie chez le Malgache: enquête C.A.P. faite à Antananarivo. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 2000; 93(4): 235-262.
39. Rasoanaivo P, Razafimahefa S, Randrianarivo E. Composition pharmaceutique comprenant l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus* pour la prévention et les traitements des désordres du cerveau. Brevet OMAPI N° 613, 20 Octobre 2014.
40. Tikhtman R "Approaches to mental illness in Madagascar: a case for reconciling reason with faith" (2013). Independent Study Project (ISP) Collection. Paper 1629.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

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

Original article doi:

©2016 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rights reserved.

Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Myrothamnus moschatus* in convulsion induced by pentylenetetrazole and picrotoxinEmmanuel Randrianarivo¹, Filippo Maggi², Marcello Nicoletti³, Philippe Rasoanaivo^{*}¹Malagasy Institute of Applied Research, Rakoto Ratsimamanga Foundation, Avarabohitra Itaosy, lot AVB 77, Antananarivo, Madagascar²School of Pharmacy, University of Camerino, Camerino, Italy³Department of Environmental Biology, Sapienza University, Rome, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 Nov 2015

Received in revised form 22 Dec 2015

Accepted 4 Jan 2016

Available online 6 Apr 2016

Keywords:

Myrothamnus moschatus

Essential oil

Convulsions

Pentylenetetrazole

Picrotoxin

ABSTRACT

Objective: To evaluate the anticonvulsant effect of the essential oil of *Myrothamnus moschatus* (*M. moschatus*) in convulsion induced by pentylenetetrazole and picrotoxin in rodent models.**Methods:** The essential oil of the aerial parts of *M. moschatus* was extracted by steam distillation. Thereafter, it was injected subcutaneously to rats and mice at escalating doses (0.1–0.8 mL/kg). Ten minutes after drug injection, pentylenetetrazole was injected intraperitoneally to rats and picrotoxin was administered to mice by the same route. Diazepam served as the positive control. Every single animal was placed into transparent cage and observed for convulsive behavior for 30 min by using ordinary security cameras connected to a video recorder. Death occurring for a period of 24 h was also recorded.**Results:** The essential oil at 0.8 mL/kg completely arrested the pentylenetetrazole-induced convulsion without any sedative effect and delayed its appearance at lower doses, but showed moderate activities on picrotoxin-induced convulsion. For the rats treated with pentylenetetrazole alone, the mortality was 100% within 1 h, but for the rats pre-treated with the essential oil, the mortality was 0%. For the mice treated with picrotoxin, the mortality rate was also 100%, while 20% to 100% died in those that had been pre-treated with the oil.**Conclusions:** The results confirmed at least partly the traditional uses of the smoke of *M. moschatus* for the management of convulsion, and implied that the essential oil may inhibit the convulsion by GABAergic neuromodulation.

1. Introduction

Epilepsy and convulsive seizures are the most common chronic neurologic disorder that affects approximately 70 million people of all ages worldwide[1]. Nearly 80% of people with these diseases reside in developing countries, where it remains a major public health problem, not only because of its health implications, but also

for its social, cultural, psychological, and economic consequences[2]. The prevalence of epilepsy in sub-Saharan Africa seems to be higher than that in other parts of the world with 10 million people affected directly according to World Health Organization estimates[3]. In the central highlands of Madagascar, an epidemiological study on epilepsy estimated the prevalence of the disease to be 2.7%[4]. In addition to genetic and environmental factors, sequels of central nervous system infections, especially meningitis, viral encephalitis, cerebral malaria and neurocysticercosis are the main causes of seizures and acquired epilepsy in the developing world[5,6].

One serious problem in low-income countries is the poor availability and high cost of medications that must be taken daily for a long period of time. The epilepsy and convulsive seizures treatment gap is defined as the proportion of people who require but are not receiving treatment[7]. With an average gap of approximately 75% for low-income countries, and the poorest in Africa reflecting a gap of more than 90%, the situation is quite alarming.

Some patients in Madagascar, even those in well-educated families, view epilepsy and convulsive seizures as manifestations of an evil possession according to their traditional beliefs, and

*Corresponding author: Philippe Rasoanaivo, Malagasy Institute of Applied Research, Rakoto Ratsimamanga Foundation, Avarabohitra Itaosy, lot AVB 77, Antananarivo, Madagascar.

Tel: 261-340362321

Fax: 261-202230470

E-mail: rafita@moov.mg

All experimental procedures involving animals were conducted in accordance to the guidelines published in: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., 1996 and approved by the ethical committee of the University of Antananarivo under the reference N°048/VPFR/DR/13.

Foundation Project: Supported by the University Research Fund 2014/2015 of the University of Camerino under the grant number FPI000044.

The journal implements double-blind peer review practiced by specially invited international editorial board members.

prefer treatments based mainly on prayers and exorcism[8]. Herbal remedies are also used. We have learned from our ethnobotanical field work that local populations use the smoke of *Myrothamnus moschatus* (*M. moschatus*) to expel bad spirits entering the body, which is believed to be responsible for convulsions. We assumed that volatile constituents might be responsible for the anticonvulsant effects. We wish to report here the effects of the essential oil of *M. moschatus* in convulsions induced by the chemoconvulsant agents pentylenetetrazole (PTZ) and picrotoxin (PTX) in mice and rats.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and extraction

Aerial parts of *M. moschatus* were collected in the flowering period in January 2010, in the Isalo Region (Southwestern Madagascar). The plant was authenticated by taxonomists at the Botanical and Zoological Park of Tsimbazaza, Antananarivo. A voucher specimen was deposited in the herbarium of the Malagasy Institute of Applied Research, under the accession code MAD0013/RECs. The essential oil used in this study was extracted according to the method described in our previous paper[9].

2.2. Experimental animals

Wistar rats and Swiss mice bred at the animal house of the Malagasy Institute of Applied Research were used in this analysis. All the animals were kept in appropriate cages in an air-conditioned room [(22 ± 2) °C], controlled lighting on 12 h light-dark cycle, and with free access to normal food and water. The experiments took place between 13:00 and 18:00. All experimental procedures involving animals were conducted in accordance to the guidelines published in: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., 1996 and approved by the ethical committee of the University of Antananarivo under the reference N°048/VPFR/DR/13.

2.3. Chemicals

PTZ and PTX were purchased from Sigma Chemical Co. (USA), whereas diazepam was obtained at a local pharmacy. All chemicals were prepared freshly in normal saline solution (0.9%) just before use. The solutions were injected by intraperitoneal (*i.p.*) route and administered in a volume not exceeding 10 mL/kg of body weight.

2.4. PTZ-induced seizure in rats

Wistar rats of either sex (200-250 g) were used for this test. Animals were divided into six groups of four rats each. Group 1 served as the control and received olive oil at 2 mL/kg by subcutaneous (*s.c.*) injection. Group 2 served as the positive control and received diazepam at 5 mg/kg by *i.p.* administration and the other four groups were given escalating doses of essential oil (0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mL/kg) dissolved in an appropriate quantity of olive oil by *s.c.* administration. Ten minutes after administration of the test drug, diazepam or vehicle, PTZ at 60 mg/kg in normal saline solution was injected by *i.p.* route to each rat. Each animal was placed into a transparent cage and observed for convulsive behavior for 30 min post-PTZ administration using ordinary security cameras connected to a video recorder. The time of seizure onset, percentage of seizure,

occurrences of tonic-clonic seizure, seizure duration and seizure behavioral scores were recorded. Seizure behavioral scores were as follows[10]: Stage 0: no response; Stage 1: ear and facial twitching; Stage 2: myoclonic jerks without rearing; Stage 3: myoclonic jerks, rearing; Stage 4: turning over into side position, bilateral tonic-clonic seizures; Stage 5: turning over into back position, generalized clonic and tonic seizures. Mortality was also recorded for a period of 24 h. Experiments were carried out in triplicate and results were expressed as the mean ± SD of three determinations.

2.5. PTX-induced seizure in mice

Groups of five mice of either sex with a weight between 20 and 25 g were treated either with escalating doses of the test essential oil (0.1, 0.2, 0.4, and 0.8 mL/kg, *s.c.* route) dissolved in an appropriate quantity of olive oil or the standard control (diazepam, 5 mg/kg, *i.p.* route). The control group received olive oil at 2 mL/kg by *s.c.* injection. Ten minutes after administration of the essential oil or diazepam, the animals were injected with 6 mg/kg of PTX by *i.p.* route and were observed during the next 30 min for the same patterns of seizures as described above. The patterns were then classified as follows: (i) animals that did not convulse within 30 min were considered to be protected, (ii) the number of mice protected in each group was expressed as a percentage, (iii) in unprotected animals, the latency to first convulsion and the durations of convulsions were recorded. The animals were also observed for the mortality for 24 h after administration of PTX. Experiments were carried out in triplicate and results were expressed as the mean ± SD of three determinations.

2.6. Statistical analysis

Latencies to first seizure, seizure intensity and seizure duration were compared by One-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test (pb0.05). The number of animals that seized and the number that survived were calculated as percentages. Differences were considered to be statistically significant ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. PTZ-induced seizures in rats

As shown in Table 1, essential oil at the dose of 0.8 mL/kg by *s.c.* route and diazepam (5 mg/kg, *i.p.*) completely protected the rats against the seizure elicited by PTZ (60 mg/kg, *i.p.*). At lower doses (0.2 and 0.4 mL/kg, *s.c.*), significant increased latency period as well as reduced frequency and intensity of convulsion were observed. Furthermore, the essential oil at the doses of 0.2, 0.4 and 0.8 mL/kg and diazepam (5 mg/kg, *i.p.*) protected all animals from mortality, observed for 24 h post-treatment.

3.2. PTX-induced seizure in mice

Table 2 shows that in the PTX model, diazepam (5 mg/kg, *i.p.*) demonstrated 80% protection but the essential oil failed to protect the animals from seizures. However, the essential oil significantly increased seizure latency and reduced seizure duration in the unprotected animals in a dose-dependent manner. While no death was observed for diazepam, 100% death was recorded for mice treated with 0.1 and 0.2 mL/kg of essential oil, and respectively 40% and 20% death for mice treated with 0.4 and 0.8 mL/kg.

Table 1

Effect of the essential oil of *M. moschatus* on convulsion induced by PTZ.

Pre-treatment	Doses	Latency period of seizure (s)	Seizure protection (%)	Seizure score	Incidence of tonic-clonic seizure (%)	Duration of epileptic seizure (min)	Mortality in 24 h (%)
Olive oil	-	68 ± 5	0	4.6 ± 0.1	100	115.2 ± 10.4	50
Diazepam (mg/kg)	5	-	100	0.0 ± 0.0	0	0.0 ± 0.0	0
Essential oil (mL/kg)	0.1	115 ± 8	0	4.2 ± 0.4	75	100.7 ± 10.1	25
	0.2	147 ± 11*	0	3.2 ± 0.1*	50	85.4 ± 7.3	0
	0.4	340 ± 9**	50	2.0 ± 0.1*	0	10.2 ± 4.2*	0
	0.8	-	100	0.0 ± 0.0	0	0.0 ± 0.0	0

*, **: Refer to statistical significance in comparison with control values.

Table 2

Effect of the essential oil of *M. moschatus* on convulsion induced by PTX.

Pre-treatment	Doses	Seizure latency (s)	Seizure duration (s)	Protection (%)	Mortality in 24 h (%)
Olive oil	-	360 ± 23	74 ± 7	0	100
Diazepam (mg/kg)	5	1 684 ± 56***	8 ± 1***	80	0
Essential oil (mL/kg)	0.1	489 ± 24	68 ± 7	0	100
	0.2	658 ± 36*	51 ± 4*	0	100
	0.4	876 ± 34**	34 ± 2*	0	40
	0.8	1 369 ± 50***	33 ± 1**	0	20

*: Compared with control values (olive oil) ($P < 0.05$); **: Compared with control values ($P < 0.01$); ***: Compared with control values ($P < 0.001$).

4. Discussion

Diseases possessing a long history of existence have been associated with various kinds of beliefs and practices adopted by local populations in an attempt to abort or attenuate the severity of the disease. One of such diseases is epilepsy, which has been known for thousands of years. The characteristic features of convulsive seizures and sometimes its intensity have led local populations to believe in supernatural origins of the disease, including witchcraft, possession by evil spirits, punishment for not carrying out duties to ancestors, or transgression of taboos[11]. Various empirical practices have also been employed, among these smell and smokes, for example, the historical use of shoe-smell in India for the management of epilepsy[12]. On the other hand, one of the earliest and often overlooked uses of plants is the production of smokes, which has been used since ancient times. Plants have been burned for medicinal and recreational purposes, magico-religious ceremonies, pest control, perfumes, food preservation and flavour enhancer. The use of plant-derived smoke is therefore an important cultural trait. In our ethnobotanical field work, we learned that dry leaves of *M. moschatus* are smoked like a cigar and the smoke is gathered in a rice bag. The convulsing patient then inhales the smoke to expel bad spirits entering his body, which is believed to be responsible for convulsions. *M. moschatus* is known under several vernacular names, which are “maharoaka”, “maroaky”, “maharoaky”, “maha” (capable of) and “roaka_mandroaka” (expelling). Thus, this name refers to the magical ethnobotanical use of the plant being capable of expelling the devil. Furthermore, *Myrothamnus* derived from the Latin word *myron* meaning aromatic and *thamnus* meaning bush, and *moschatus* from the Greek word *moskhos* meaning musc. Musc was a name originally given to a substance with a penetrating odour obtained from a gland of the male musk deer. The substance has been used as a popular perfume fixative since ancient times and is one of the more expensive animal products in the world. We assumed that volatile constituents may be responsible for the anticonvulsant activity of the plant. We therefore extracted the essential oil by steam distillation and evaluated its effects on chemically-induced seizures.

PTZ is a central nervous system stimulant with epileptogenic

properties which has been widely used to study seizure phenomena and to identify extracts/compounds that may control seizures[13]. PTZ is known as a non-competitive γ -aminobutyric acid (GABA) antagonist at the GABA_A receptor, whereby it is presumed to cause its convulsing effect, but the exact molecular mode of action is not entirely understood, which includes the exact binding site of PTZ at GABA_A receptor complex and other sites of actions[14]. The GABA_A receptor is a chloride channel, which opening by GABA agonistic actions induces major inhibition of the central nervous system, causing sedation, sleep and inhibition of convulsions[15].

PTX is an another chemoconvulsant agent which has been widely used in animal convulsion paradigms. It is also a non-competitive GABA_A receptor antagonist for the GABA agonistic action on the receptor's chloride channel, acting as a channel blocker or allosteric modulator of the channel, which is thought to cause PTX's convulsive effect[16].

At the dose of 0.8 mL/kg, the essential oil of *M. moschatus* completely inhibited the convulsive effects of PTZ. No sedative effect was observed. At lower doses, it demonstrated a significant increase in seizure latency and a significant reduction in seizure duration as compared with the control group. No mortality was recorded.

In quite strong contrast to the strong inhibitory action on PTZ induced convulsions, our data from this study demonstrate that the *M. moschatus* essential oil had only moderate activity on the PTX-induced convulsion in mice.

Our previous studies show that *M. moschatus* essential oil contains a high content of *trans*-pinocarveol and pinocarvone, *cis*- and *trans*-p-mentha-1(7), 8-dien-2-ol, perillyl acetate and β -selinene[17]. It is at present not known which of these compounds is the cause of the anticonvulsive actions, but it is tempting to speculate that one or several major constituents are involved in an action directly on the GABA_A chloride channel complex.

The GABA_A channel is subject to regulation at several different binding sites. It contains two binding sites for GABA, which are also binding sites for the GABA agonists muscimol, gaboxadol, and bicuculline, an allosteric binding site for benzodiazepines that bind benzodiazepine agonists causing channel closing and benzodiazepine inverse agonists causing channel opening, as well as competitive benzodiazepine antagonists which prevent the actions of both the benzodiazepine agonists and inverse agonists. Furthermore, the GABA_A receptor contains allosteric binding sites for a number of other compounds, which include PTZ and PTX. The exact binding modes for the latter are not fully known and are presumably located spatially different from each other and involved in different modes of modulation of the receptor channel. It is known that PTX binding itself is allosterically regulated in the presence of muscimole, bicuculline, and benzodiazepine agonist and inverse agonists and combinations thereof in complex fashion[18]. It is stated that indeed components of *M. moschatus* essential oil cause an action on the GABA_A channel; the difference in efficacy against PTZ and PTX induced convulsions can be explained by a difference in the mode of

channel closing caused by the two convulsive agents and the action caused by the *M. moschatus* essential oil component(s). Admittedly, at the moment this is only speculative and must await more direct assessments of actions of the *M. moschatus* essential oil and its components on the GABA_A channel.

However, from our ethnopharmacological observations on the native use of *M. moschatus*, its smoke when inhaled seems to have a very strong action in halting convulsions in human subjects. The essential oil has a very distinctive strong conifer-like and quite pleasant smell. In fact, earlier alternative treatments reported control of seizures by olfactory stimulation[19,20]. The reception and interpretation of smell occurs in the limbic system of the brain, particularly in the temporal lobe and the site of temporal lobe epilepsy which is the most common form of epilepsy and is also often associated with pharmacoresistance. When inhaled, the essential oil stimulates smell receptors in the nose that sends chemical messages through nerves to the brain's limbic system. Animal models support a link between olfaction and seizures, as neurotransmitter deficiencies were detected in the olfactory bulb of genetically epilepsy-prone rats[21], and because olfactory stimulation is capable of attenuating the seizure threshold in amygdala-kindled rats[22]. In addition to animal studies, clinical studies in humans have demonstrated that electrical stimulation of the olfactory bulb is an effective treatment of otherwise intractable epilepsy[23]. Chemical or electrical stimulation of the olfactory system may thus attenuate or arrest convulsive seizures.

Inhalation of the essential oil of *M. moschatus* might find therapeutic applications in the prevention for oncoming convulsions because the absorption by the nose is as fast as an intravenous injection. The essential oil may also be used as adjunct therapy to the existing antiepileptic drugs in refractory epilepsy. Today, the paths of science-based and alternative medicine practices are largely parallel and independent, sometimes antagonistic, sometimes cooperative. Both paths have fostered many divergent roads. Our most significant challenge remains the creation of a meaningful dialogue and exchange of ideas and lessons across and beyond the boundaries of both approaches.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Professor Jarl Wikberg from Uppsala University for the critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr. Paul Kadetz from Xi'an Jiaotong-Liverpool University for editing the final manuscript. This work was supported by the project FAR 2014-2015 (Fondo di Ateneo per la Ricerca, FPI000044) of the University of Camerino.

References

- [1] Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sande JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 2010; 51(5): 883-90.
- [2] Newton CR, Garcia HH. Epilepsy in poor regions of the world. *Lancet* 2012; 380(9848): 1193-201.
- [3] World Health Organization. Epilepsy in the WHO African region: bridging the gap. The global campaign against epilepsy "out of the shadows". Geneva: World Health Organization; 2004. [Online] Available from: http://www.who.int/mental_health/management/epilepsy_in_African-region.pdf [Accessed on 15th October, 2015]
- [4] Andriantseho LM, Ralaizandry D. Community prevalence of epilepsy in Madagascar. *Epilepsies* 2004; 16(2): 83-6.
- [5] Carter JA, Neville BGR, White S, Ross AJ, Otieno G, Mturi N, et al. Increased prevalence of epilepsy associated with severe falciparum malaria in children. *Epilepsia* 2004; 45(8): 978-81.
- [6] Quet F, Guerchet M, Pion SDS, Ngoungou EB, Nicoletti A, Preux PM. Meta-analysis of the association between cysticercosis and epilepsy in Africa. *Epilepsia* 2010; 51(5): 830-7.
- [7] Meyer AC, Dua T, Ma J, Saxena S, Birbeck G. Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2010; 88(4): 260-6.
- [8] Ratsimbazafy V, Rakotovo T, Marin B, Javerliat M, Preux PM. The dangers of inadequate understanding of epilepsy in Madagascar. *Lancet Neurol* 2012; 11(9): 748-9.
- [9] Rasoanaivo P, Ralaibia E, Maggi F, Papa F, Vittori S, Nicoletti M. Phytochemical investigation of the essential oil from the 'resurrection plant' *Myrothamnus moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. *J Essent Oil Res* 2012; 24(3): 299-304.
- [10] Becker A, Grecksch G, Brosz M. Antiepileptic drugs--their effects on kindled seizures and kindling-induced learning impairments. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52(3): 453-9.
- [11] Baskind R, Birbeck GL. Epilepsy-associated stigma in sub-Saharan Africa: the social landscape of a disease. *Epilepsy Behav* 2005; 7(1): 68-73.
- [12] Jaseja H. Scientific basis behind traditional practice of application of "shoe-smell" in controlling epileptic seizures in the eastern countries. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; 110(6): 535-8.
- [13] Koutroumanidou E, Kimbaris A, Kortsaris A, Bezirtzoglou E, Polissiou M, Charalabopoulos K, et al. Increased seizure latency and decreased severity of pentylenetetrazol-induced seizures in mice after essential oil administration. *Epilepsy Res Treat* 2013; 2013: 532657.
- [14] Hansen SL, Sperling BB, Sanchez C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA_A receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28(1): 105-13.
- [15] Kaila K, Ruusuvuori E, Seja P, Voipio J, Puskarjov M. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol* 2014; 26: 34-41.
- [16] Lasoń W, Chlebicka M, Rejdak K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep* 2013; 65(4): 787-801.
- [17] Randrianarivo E, Rasoanaivo P, Nicoletti M, Razafimahefa S, Lefebvre M, Papa F, et al. Essential-oil polymorphism in the 'resurrection plant' *Myrothamnus moschatus* and associated ethnobotanical knowledge. *Chem Biodivers* 2013; 10(11): 1987-98.
- [18] Carpenter TS, Lau EY, Lightstone FC. Identification of a possible secondary picrotoxin-binding site on the GABA_A receptor. *Chem Res Toxicol* 2013; 26(10): 1444-54.
- [19] Efron R. The effect of olfactory stimuli in arresting uncinate fits. *Brain* 1956; 79(2): 267-81.
- [20] Betts T, Fox S, MacCallum R. Using olfactory stimuli to abort or prevent seizures: countermeasure or cue-controlled arousal manipulation? Is there something special about smell? *Epilepsia* 1995; 36(Suppl 3): S25.
- [21] Dailey JW, Mishra PK, Ko KH, Penny JE, Jobe PC. Noradrenergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia* 1991; 32(2): 168-73.
- [22] Ebert U, Löscher W. Strong olfactory stimulation reduces seizure susceptibility in amygdala-kindled rats. *Neurosci Lett* 2000; 287(3): 199-202.
- [23] Han CL, Hu W, Stead M, Zhang T, Zhang JG, Worrell GA, et al. Electrical stimulation of hippocampus for the treatment of refractory temporal lobe epilepsy. *Brain Res Bull* 2014; 109: 13-21.

PHYTOMEDICAMENT

A l'issue de cette étude sur l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus*, nous avons développé un phytomédicament sous le nom de Fanalarofy® (Fanala= qui élimine ; rofy=maladie chronique) pour la prévention et le traitement de la convulsion. Il est en vente à prix raisonnable à l'Institut Malgache des Recherches Appliquées et aux points de ventes de produits MASY®

Fanalarofy®
"Une inhalation suffit"

Un remède traditionnel amélioré pour une efficacité optimale contre les crises convulsives.



Fanalarofy est à base d'une huile essentielle extraite d'une plante aromatique malgache utilisée depuis longtemps pour la prise en charge des crises convulsives.

Un produit breveté

Les propriétés anticonvulsives et neuroprotectrices de Fanalarofy ont été suivies et démontrées dans les laboratoires de l'IMRA et en Italie. Ce produit a fait l'objet d'un brevet.

Fanalarofy n'a pas d'effets sédatifs. Aucun effet indésirable ni toxique lié à son usage n'a été relevé.

En traitement préventif : inhaler Fanalarofy à répétitions dans chaque narine 2 à 3 fois par jour. Peut aussi s'utiliser en cas de risque de survenance d'une crise.

En traitement curatif : faire inhaler Fanalarofy pendant la crise convulsive.

Etude de l'activité biologique et de la variation écologique des constituants chimiques de l'huile essentielle de *Myrothamnus moschatus*. (Myrothamnaceae)

Par RANDRIANARIVO Emmanuël

Tél : +261 34 70 33 497/ +261 33 81 28 142 E-mail : manoihany@yahoo.fr

Résumé

L'utilisation traditionnelle de la fumée de *Myrothamnus moschatus* pour la prise en charge des convulsions nous a incités à étudier cette plante. Nous avons supposé que les molécules actives seraient les constituants volatiles. Cinq stations ont été explorées en utilisant GC/FID et GC/MS pour étudier les constituants chimiques et les activités biologiques. Par la suite, l'analyse «headspace» a été effectuée sur l'huile essentielle (HE) et les feuilles sèches à 40°C, 80°C et 120°C. Les constituants chimiques de la fumée ont été analysés par micro-extraction en phase solide (SPME).

L'huile essentielle a été évaluée sur différents tests pharmacologiques chez les rats et les souris à savoir : effets anticonvulsivant et sédatif, fixation sur les récepteurs aux benzodiazépines (BZD) et neuritogénèse. L'activité anticonvulsive a été quantifiée sur la convulsion provoquée par le pentylènetétrazole (PTZ) et la picrotoxine (PTX). L'activité sédatrice a été évaluée par l'observation des comportements. Le flunitrazépam tritié et la clonazépine ont été utilisés pour le test de fixation aux benzodiazépines. L'effet neurogénérateur a été estimé sur la croissance des cellules neuronales SHSY5Y.

GC/MS nous a permis d'identifier 3 chémotypes différents de cette plante. Quand aux activités biologiques, l'HE d'Ifandana protège complètement la convulsion provoquée par le PTZ à la dose de 0,8ml/kg. Cette HE possède également un effet neuritogénèse. Par contre, l'effet de l'HE sur la convulsion induite par la PTX (0,8ml/kg), sur le test sédatif des souris et sur le test de fixation aux récepteurs des benzodiazépine est modéré.

Ces résultats confirment l'utilisation traditionnelle de cette plante et nous ont conduits à découvrir que sa composition chimique et ses activités biologiques varient en fonction de l'écologie.

Mots clés : *Myrothamnus moschatus*, huile essentielle, activité anticonvulsivante, neurorégénération, chémotypes.

Abstract

The traditional use of the smoke of *Myrothamnus moschatus* for the management of convulsions prompted us to investigate this plant. Five areas of Madagascar were studied by use of GC/FID and GC/MS for chemical. Headspace analysis was then performed on the essential oil (EO) and dry leaves at 40°C, 80°C and 120°C. Thereafter, the chemical constituents of the smoke were analysed by the solid phase micro-extraction (SPME) technique.

Essential oil was submitted to a series of pharmacological tests, including anticonvulsant, sedative, benzodiazepine receptor fixation and neurogenerative assays. The anticonvulsant activity was quantified by the pentylentetrazole and picrotoxin-induced convulsions. Sedative effect was evaluated by behavior test and benzodiazepine receptor fixation by flunitrazepam tris and clonazepin. The neurogenerative effect was evaluated by the neurite outgrowth test.

Gas chromatography/mass spectroscopy analysis (GC/MS) of essential oils obtained from populations of *Myrothamnus moschatus*, growing in different areas of Madagascar, allowed identification of three main chemotypes in the species. Pharmacological tests showed that EO from Ifandana at 0,8ml/kg allowed a complete protection against PTZ-convulsion induced. Furthermore, this EO had a neuritogenesis effect. However, EO at 0,8ml/kg was failed to protect PTX-induced seizure in mice. The sedative effect and the benzodiazepin receptor fixation were low.

These results confirmed the traditional use of this plant and conducted us to discover that chemical composition and biological activity of *M. moschatus* change with ecological regions.

Keywords: *Myrothamnus moschatus*, essential oil, anticonvulsant activity, neuroregeneration, chemotypes