



**HAL**  
open science

# L'huperzine A : un nouvel inhibiteur des cholinestérasés pour la maladie d'Alzheimer

Frédéric Pilotaz

► **To cite this version:**

Frédéric Pilotaz. L'huperzine A : un nouvel inhibiteur des cholinestérasés pour la maladie d'Alzheimer. Sciences pharmaceutiques. 1998. dumas-01633872

**HAL Id: dumas-01633872**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01633872>**

Submitted on 13 Nov 2017

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

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

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1 exemplaire

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

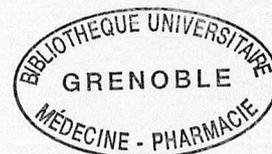
Année : 1998

N° D'ordre : 7045

**L'HUPERZINE A :**  
**UN NOUVEL INHIBITEUR DES CHOLINESTÉRASES**  
**POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER**

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ÉTAT

PILOTAZ Frédéric  
[Données à caractère personnel]



THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 OCTOBRE 1998 À 17 HEURES  
DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Madame le Professeur Anne-Marie MARIOTTE, Président du jury

Madame Jacqueline RIONDEL, Maître de conférence

Monsieur Patrick MASSON, Pharmacien-Chimiste en Chef du Service de Santé  
des Armées

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 1998

N° D'ordre : 7045

**L'HUPERZINE A :**  
**UN NOUVEL INHIBITEUR DES CHOLINESTÉRASES**  
**POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER**

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ÉTAT

PILOTAZ Frédéric

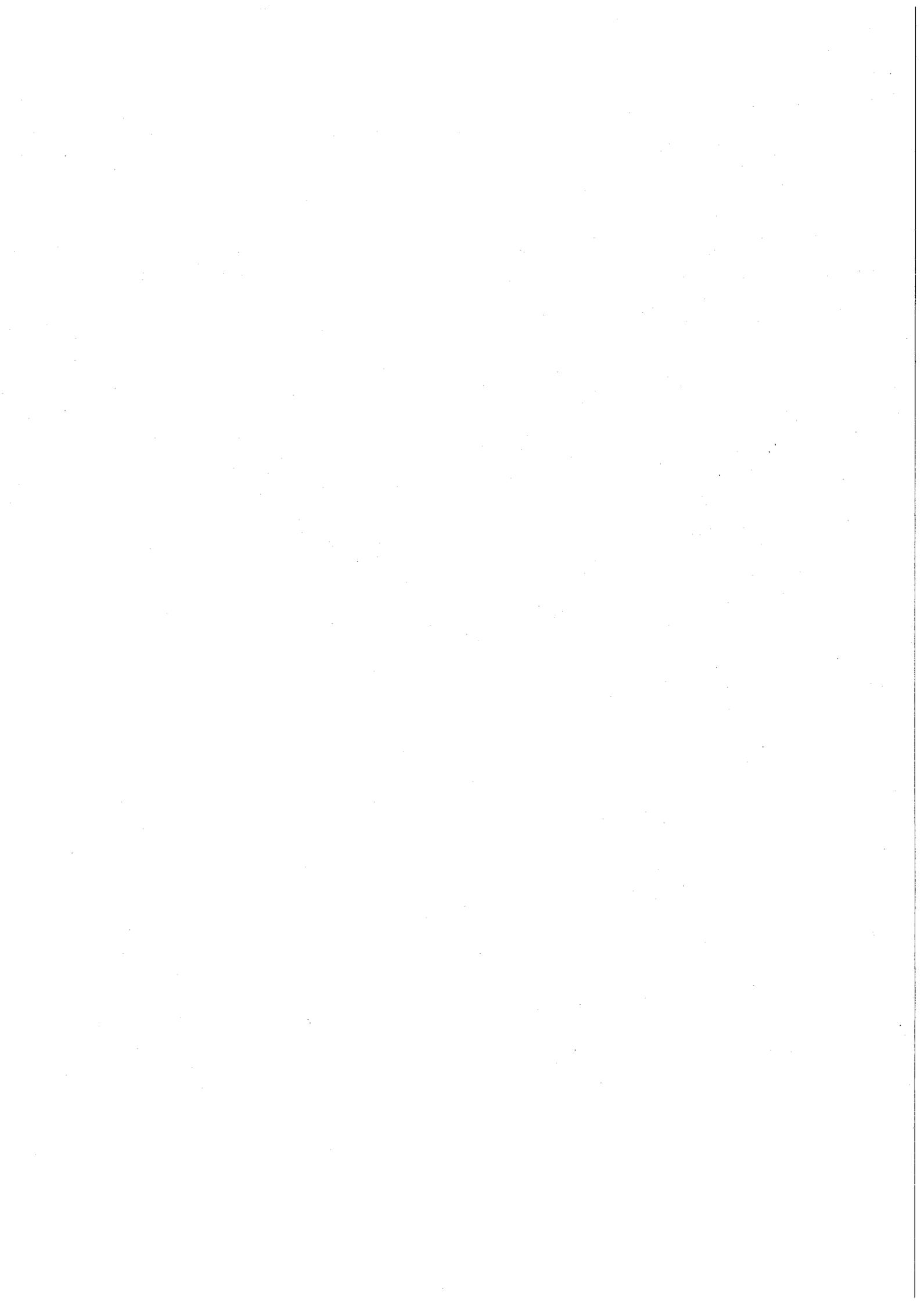
[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 OCTOBRE 1998 À 17 HEURES  
DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Madame le Professeur Anne-Marie MARIOTTE, Président du jury

Madame Jacqueline RIONDEL, Maître de conférence

Monsieur Patrick MASSON, Pharmacien-Chimiste en Chef du Service de Santé  
des Armées



Merci à mes parents et à ma grand-mère, pour leur soutien pendant mes études et leur aide pour la réalisation de ma thèse.

Merci à Raphaëlle, merci à ma sœur Valérie ainsi qu'à toute ma famille pour leur soutien affectif.

Merci à Monsieur LALLEMENT et à Monsieur DORANDEU du Service de Neurotoxicologie du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, pour leur contribution à ce travail.

Merci à Madame le Professeur MARIOTTE pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant mes études de Pharmacie et, de m'avoir transmis le goût de l'étude des composés d'origine naturelle.

Merci à Madame RIONDEL pour sa disponibilité et son aide précieuse, tout au long de mes études de Pharmacie.

Merci à Monsieur le Colonel MASSON pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant mon service national et, pour avoir placé l'huperzine sur mon chemin.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

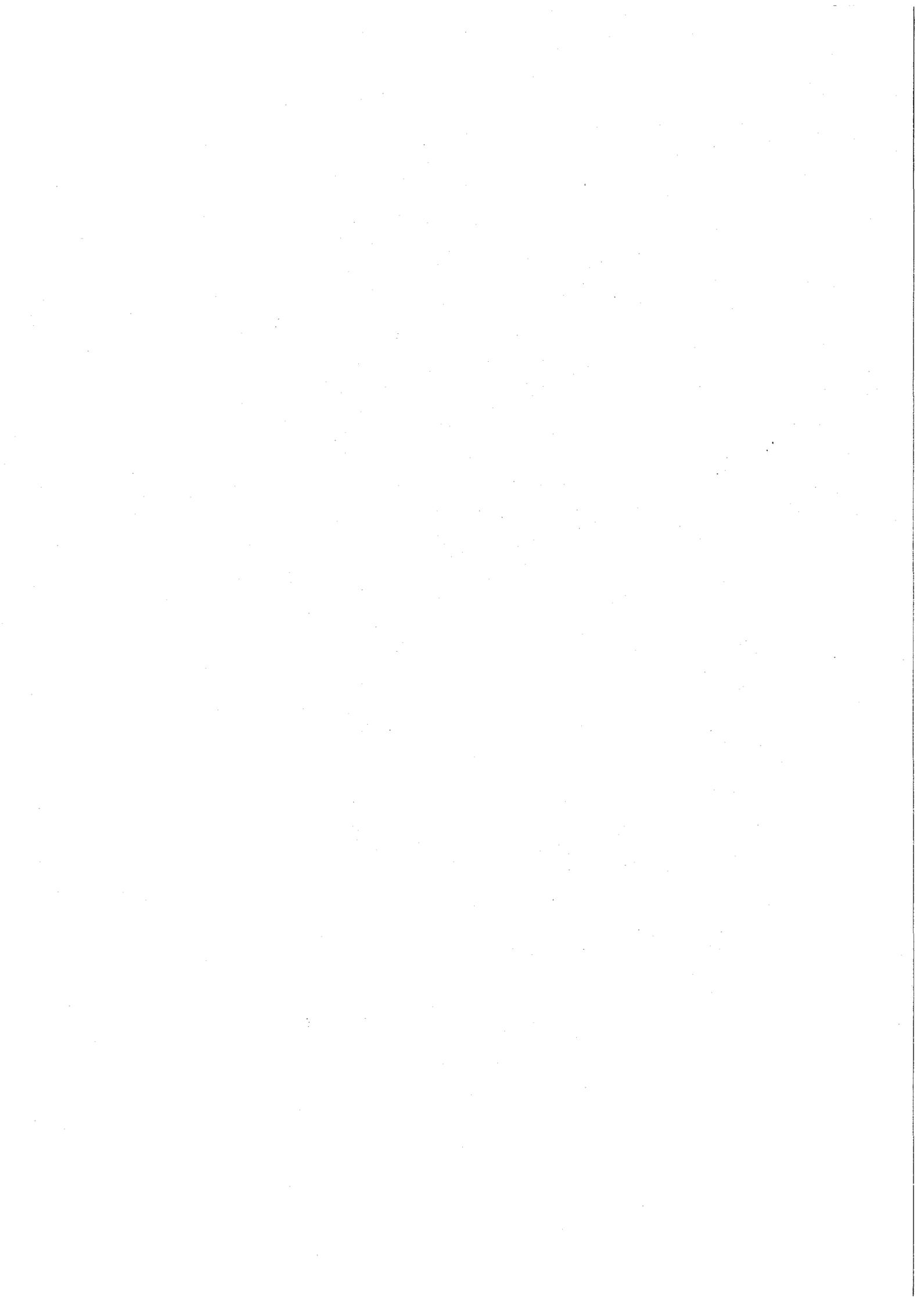
M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
ROCHAT	Jacques	Hygiène environnement Droit et Economie Pharmaceutiques
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique



**SOMMAIRE :**

*Première partie*

**I - LE POINT SUR LA MALADIE D'ALZHEIMER :**

1) La maladie d'Alzheimer :	16
1-1) Définition :	16
1-2) Historique :	16
2) Symptômes et signes de la maladie :	17
2-1) Les troubles cognitifs :	17
2-2) Les troubles non cognitifs :	18
2-3) Histologie :	19
3) Épidémiologie :	21
3-1) Prévalence et incidence :	22
3-2) Les facteurs de risques :	24
4) Diagnostic de la maladie :	24
5) Étiologie :	26
6) Les différents traitements :	29
6-1) Traitements des troubles du comportement :	29
a) Dépression et troubles affectifs :	30
b) Irritabilité et agressivité:	30
c) Délires et hallucinations:	30
d) Agitation, comportement de déambulation et fugues:	31
6-2) Traitements des troubles cognitifs :	31
6-3) Autres essais thérapeutiques :	32
7) La voie cholinergique :	34
7-1) L'acétylcholine et son cycle :	34
7-2) Stratégie cholinergique dans la maladie d'Alzheimer:	36
7-3) Les cholinestérases :	40
7-4) Structure de l'acétylcholinestérase :	42

*Deuxième partie*

**II - LES INHIBITEURS DES CHOLINESTÉRASES :**

1) Présentation :	46
1-1) Les différentes molécules :	46
1-2) Les composés organophosphorés :	50
2) Application dans la maladie d'Alzheimer :	52
2-1) Les médicaments commercialisés :	52
2-2) Limites de ces traitements :	55
3) Applications phytosanitaires :	57

4) Applications militaires :	60
4-1) La menace chimique :	61
4-2) Les agents létaux neurotoxiques organophosphorés :	63
a) Présentation :	63
b) Effets cliniques :	66
c) Traitements :	66

### *Troisième partie*

## III - L'HUPERZINE A

1) De la médecine traditionnelle chinoise à l'huperzine A :	70
1-1) Introduction:	70
1-2) Apport de la phytothérapie dans la médecine traditionnelle chinoise:	71
1-3) Notions de médecine traditionnelle chinoise:	73
1-4) Approche de la démence en médecine traditionnelle chinoise:	77
1-5) L'huperzine A dans la médecine traditionnelle chinoise:	78
2) L'huperzine A:	82
2-1) Origine :	82
a) Les lycopodes:	82
b) <i>Huperzia serrata</i> :	84
2-2) Caractéristiques:	85
3) Extraction / Synthèse :	87
3-1) Extraction :	87
3-2) Synthèses :	87
a) Synthèse racémique:	87
b) Synthèse de la (-)-Huperzine A :	90
4) Pharmacologie:	91
4-1) Activité in vitro:	91
4-2) Activité in vivo:	94
4-3) Mutagenicité:	95
4-4) Pharmacocinétique :	96
5) Mode d'action :	96
6) Études précliniques:	100
6-1) Action de l'huperzine A sur la mémoire:	100
a) Études chez la souris :	100
b) Études chez le rat :	101
6-2) Aspects neuroprotecteurs de l'huperzine A:	103
7) Essais cliniques :	105
7-1) Phase I :	106
7-2) Phase II :	106

## - CONCLUSION

109

**- BIBLIOGRAPHIE**

---

113

**- ANNEXES**

---

123

- Les agents chimiques toxiques d'usage militaire : 123
- La protection contre les intoxications aux organophosphorés phytosanitaires: 124
- L'intoxication par les organophosphorés : 132

## LISTES DES ABRÉVIATIONS :

ACh : Acétylcholine  
AChE : Acétylcholinestérase  
BuChE : Butyrylcholinestérase  
ChAT : Choline acétyltransférase  
DSTA : Démence sénile de type Alzheimer  
i.m. : Intra-musculaire  
i.p. : Intra-péritonéal  
MA : Maladie d'Alzheimer  
MTC : Médecine traditionnelle chinoise

**INTRODUCTION :**

## - INTRODUCTION :

La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des démences dégénératives. Identifiée au début du siècle, elle présente encore aujourd'hui de nombreux mystères pour les scientifiques. La population touchée par cette pathologie va s'élever de façon exponentielle dans les années à venir avec des conséquences humaines et économiques dramatiques. L'arrivée sur le marché de médicaments inhibiteurs des cholinestérases a donc fait naître un grand espoir pour tenter d'enrayer ce phénomène. C'est dans ce contexte où réside une forte pression de la part des familles des patients et des organismes sociaux que vont se présenter dans les mois prochains, de nouvelles molécules. L'huperzine A fait partie de celles-ci.

Les inhibiteurs des cholinestérases, sont connus depuis longtemps pour leurs applications agricoles et militaires. Si leur usage tend à disparaître dans les pays industrialisés, ils restent très répandus dans le reste du monde où ils représentent autant de danger. Cette classe de produits chimiques a pourtant démontré son efficacité dans la maladie d'Alzheimer, mais également ses limites. Il est donc impératif de poursuivre la recherche et la mise au point de nouvelles molécules innovantes.

Issu de la pharmacopée chinoise qui dévoile tous les jours un peu plus de ses secrets à l'occident, l'huperzine A pourrait donc s'affirmer comme un produit majeur dans cette terrible maladie, du fait de ses nombreuses qualités et de sa très faible toxicité démontrée par un usage ancestral.

**PREMIÈRE PARTIE :**

## I - LE POINT SUR LA MALADIE D'ALZHEIMER:

### 1) La maladie d'Alzheimer:

#### 1-1) Définition:

La maladie d'Alzheimer est une affection neurologique chronique, d'évolution progressive, caractérisée par une altération intellectuelle irréversible aboutissant à un état démentiel. Cette maladie se traduit par une dégénérescence nerveuse d'évolution inéluctable, causée par une diminution du nombre de neurones avec atrophie cérébrale et présence de "plaques séniles". (Larousse, 1995)

#### 1-2) Historique : (GENTY, 1997)

Neurologue et psychiatre allemand, Aloïs Alzheimer est le fondateur de l'école de neuropathologie de Munich ; il est nommé professeur à Breslau en 1912. Clinicien avant de devenir pathologiste, il mit clairement en évidence les facteurs déterminant un ensemble clinique, en particulier dans la sénilité.

En 1906, il décrit des altérations anatomiques observées sur le cerveau d'une patiente de 51 ans atteinte de démence, d'hallucinations et de troubles de l'orientation. Depuis on définit la maladie comme une démence présénile (pouvant apparaître avant l'âge de 65 ans). La communauté scientifique réunit aujourd'hui sous l'appellation "démence de type Alzheimer" la maladie d'Alzheimer stricto sensu et les démences séniles.

## 2) Symptômes et signes de la maladie : (ROQUIER-CHARLES, 1998 ; BLARD, 1996)

Le début de la maladie est généralement discret, marqué par des symptômes banals. Leur expression varie beaucoup d'une personne à l'autre. Leur importance augmente généralement avec le temps.

### 2-1) Les troubles cognitifs:

- Les troubles de la mémoire constituent le premier symptôme de la maladie dans 75% des cas. Ils peuvent être isolés et durer plusieurs mois ou plusieurs années. Les malades n'arrivent plus à retrouver le nom d'une personne ou d'un lieu pourtant bien connus. Ces troubles peuvent rester longtemps isolés ou s'associer rapidement à l'atteinte d'autres fonctions cognitives. Ils portent d'abord sur des faits récents. Le sujet a des difficultés à mémoriser de nouvelles informations, pose plusieurs fois les mêmes questions. La mémoire des faits anciens est plus longtemps préservée, ce qui amène parfois le patient à vivre dans le passé et à évoquer de vieux souvenirs, ce qui rassure à tort l'entourage qui l'interprète comme un élément rassurant. C'est donc plus tardivement que les troubles de mémoires touchent les faits anciens (incapacité du malade à évoquer les faits marquants de sa vie), les connaissances acquises lors de la scolarité ou de la vie professionnelle et le bagage culturel. Très vite, les troubles de la mémoire s'aggravent et une désorientation temporelle apparaît (qui touche successivement le jour, le mois, l'année puis la saison) ainsi qu'une désorientation spatiale (par exemple le sujet ne retrouve plus sa chambre). Les souvenirs anciens ne tardent pas à devenir déficients : progressivement, les repères personnels et socioculturels s'effacent.

- Les troubles du langage (Aphasie) passent parfois inaperçus au début de la maladie. L'aphasie est le symptôme le plus fréquent après le déficit mnésique. Elle serait observée dans 40% des formes débutantes de la maladie. Il y a atteinte du langage oral et atteinte du langage écrit.

L'atteinte du langage oral se manifeste au début par des difficultés, au cours d'une conversation, à trouver le mot juste ou le nom d'un objet. La crainte de ne pas trouver le mot juste amène le sujet à s'exprimer le moins possible. Le manque du mot dans le langage

spontané explique l'emploi de périphrases ou de mots "passe-partout" comme "truc", "machin"... Il est souvent interprété à tort comme un trouble de la mémoire. Il doit en être distingué. Peu à peu, les troubles du langage oral augmentent : le discours spontané devient peu informatif, marqué par des digressions. La fluidité verbale est très déficitaire. Petit à petit, la production linguistique se réduit à l'émission de formules automatisées, puis évolue vers un mutisme terminal.

Le langage écrit est atteint le plus souvent avant le langage oral : dysorthographe, dysgraphie, altération des capacités narratives...

- L'**Apraxie** (perturbation gestuelle) est constante dans les démences de type Alzheimer mais, elle n'est pas considérée comme un marqueur de la maladie. On assiste, par exemple, à une incapacité de réaliser des imitations, des gestes bimanuels sans signification, de distinguer la droite de la gauche, de dessiner des figures géométriques, de s'habiller correctement (erreur dans l'ordre des habits, dans leur position ou dans leur utilisation), de réaliser les gestes de la vie courante qui conduisent à leur abandon. Toute cette dérégulation gestuelle contribue à réduire l'autonomie d'une personne malade de façon importante.

- L'**Agnosie** est classiquement tardive, essentiellement visuelle et observée dans 30% des cas environ. Le patient a du mal à reconnaître les images d'objet, puis les objets eux-mêmes, ceci en l'absence de tout déficit visuel. Peu à peu, il a des difficultés à reconnaître les visages familiers (prosopagnosie) et même son propre visage dans un miroir ou sur une photographie.

- L'**Anosognosie** (non-conscience que les patients ont de leurs troubles) est un facteur de mauvais pronostic pour l'adaptation sociale du patient et pour l'évolution de sa maladie.

## 2-2) Les troubles non cognitifs:

- Les troubles du comportement moteur se manifestent par une difficulté à effectuer des gestes pourtant très quotidiens (s'habiller, tenir une fourchette...) alors qu'il n'y a pas de paralysie.

- Les troubles du comportement sont eux aussi, relativement précoces mais peuvent n'être remarqués que tardivement. Une indifférence, une réduction de l'activité sont souvent constatées ; elles représentent une réaction du malade à ses troubles de mémoire, mais témoignent parfois aussi d'un syndrome dépressif. Des troubles du caractère et de l'humeur (dépression, irritabilité, idées de persécution) peuvent également apparaître. Il est donc très difficile de les distinguer.

- Les troubles de la personnalité et du comportement sont de différents types. On peut trouver une réduction d'activité, une perte de motivation, des comportements stéréotypés, des comportements d'agressivité, voire d'agitation, pouvant poser d'importants problèmes de prise en charge...

Plus rarement des troubles variés sont constatés d'ordre psychotique, comme des idées délirantes ou des hallucinations, des troubles du sommeil tendant vers une inversion nyctémérale, ou des troubles de la conduite alimentaire allant de la perte d'appétit ou plus rarement, de boulimie.

Parfois, la maladie débute par un état confusionnel spontané ou déclenché par une prise de médicament (anticholinergiques en particulier), une maladie ou un choc affectif (disparition d'un proche, déménagement,...).

L'évolution de la maladie est donc très progressive. Dans la phase la plus avancée, le malade a perdu toute autonomie et doit être assisté dans tous les actes de la vie quotidienne tels que marcher, se lever, manger ou faire sa toilette. Une incontinence totale est souvent inévitable.

### 2-3) Histologie : (SCHORDERET, 1998 ; GENTY, 1997)

L'examen peut-être effectué sur un prélèvement chirurgical (biopsie corticale) ou sur des prélèvements effectués après le décès du malade (cas général). Deux lésions principales sont présentes en grand nombre: les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire.

- *La plaque sénile* est un dépôt extracellulaire de peptide  $\beta$ A4 entouré de prolongements nerveux. Ce peptide est un fragment d'une protéine normale de l'organisme (le précurseur du peptide  $\beta$ A4 ou APP) dont la fonction n'est pas encore connue. Les molécules de peptide s'accumulent pour des raisons mal comprises, précipitent et s'entassent en adoptant une forme particulière  $\beta$ -plissée. La conformation  $\beta$ -plissée est reconnue sur les prélèvements examinés au microscope par des colorants qui ne se fixent que sur les protéines ou les peptides accumulés sous cette forme. Les produits qui fixent ces colorants sont dits amyloïdes. Les prolongements nerveux qui entourent le peptide  $\beta$ A4 (amyloïde) sont surtout des axones. Il n'est toujours pas démontré que ces protéines soient indubitablement neurotoxiques in vivo. Il semble toutefois que sous une forme anormale ou dégradée, elles se concentrent surtout dans les plaques séniles et les microvaisseaux cérébraux. Paradoxalement, ces événements surviennent en principe plusieurs années avant l'apparition des troubles cognitifs. De surcroît, une corrélation stricte entre ces dépôts de protéine  $\beta$ A4, qui sont disséminés un peu partout dans le système nerveux central, et la neurodégénération n'est pas démontrée de manière univoque. Enfin, des dépôts qualitativement et quantitativement identiques de  $\beta$ A4 sont facilement décelables dans le cerveau de sujets qui ne sont pas atteints par la maladie d'Alzheimer. Malgré ces réserves, il est admis de façon consensuelle que la libération par voie protéolytique de  $\beta$ A4 à partir de la séquence transmembranaire précurseur APP est un événement déterminant.

- *La dégénérescence neurofibrillaire* correspond à l'accumulation dans le cytoplasme du neurone, autour de son noyau, de protéines qui se disposent en double hélices, visibles au microscope électronique. La protéine tau, composant principal de la dégénérescence neurofibrillaire, est normalement présente dans le neurone. Elle joue un rôle dans le maintien du cytosquelette, un ensemble de protéines rigides qui permettent de maintenir la forme de la cellule. Dans la maladie d'Alzheimer, elle serait excessivement phosphorylée sur l'un de ses segments (protéine A68), anomalie qui pourrait affecter la stabilisation des microtubules, perturber le transport axonal et réduire la viabilité neuronale. La mort et la disparition des neurones sont probablement secondaire au développement des dégénérescences neurofibrillaires : elles sont responsables de la diminution du volume du cortex cérébral (atrophie corticale).

Les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires sont présentes seulement dans certaines parties du cerveau : l'hippocampe -région du cortex cérébral qui intervient dans la faculté de former de nouveaux souvenirs, l'amygdale temporale -une autre région qui joue un rôle dans l'émotion et l'affectivité, ainsi que les régions les plus évoluées du cortex, où sont traitées les informations nécessaires au langage, aux gestes, à la reconnaissance des images et des sons. Elles sont aussi présentes dans des noyaux (amas de neurones) situés dans la profondeur du cerveau et qui synthétisent des médiateurs nécessaires à son fonctionnement: le noyau basal de Meynert (acétylcholine), le locus coeruleus (noradrénaline), les noyaux du raphé (sérotonine).

Les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires sont également présentes dans le cerveau de personnes âgées, mais elles sont peu nombreuses et seulement dans quelques-unes des régions qui viennent d'être mentionnées. Il peut être difficile de distinguer les effets de l'âge de ceux de la maladie d'Alzheimer et les rapports entre l'un et l'autre sont encore mal compris.

### **3) Épidémiologie: (RITCHIE, 1996)**

La maladie d'Alzheimer est la plus courante des démences. Sa fréquence globale, après 65 ans, varie entre 1 et 5,8 %. Elle augmente avec l'âge, atteignant 10 % après 85 ans. Cette maladie risque de devenir avec l'augmentation continue de l'espérance de vie, un véritable problème social. Malgré les efforts accomplis pour multiplier les centres d'accueil, ceux-ci sont en nombre insuffisants pour héberger les personnes privées de leur autonomie et qui ne peuvent être soignées par leur proches.

La difficulté majeure des études épidémiologiques dans cette pathologie réside dans la différenciation des malades et des non-malades. Le problème est donc entièrement lié à celui du diagnostic que nous aborderons plus tard.

De plus, ces études sont gênées du fait de l'hétérogénéité des fonctions cognitives chez la personne âgée, à laquelle s'ajoute la fréquence élevée des pathologies associées.

### 3-1) Prévalence et incidence: (RITCHIE, 1996)

Depuis la publication des algorithmes diagnostiques de la démence sénile dans les années 1980, on a assisté à une amélioration de la cohérence des résultats dans les études épidémiologiques. Actuellement, la prévalence de la démence dans la population âgée de plus de 65 ans est estimée entre 4 et 6 %. Le taux de la démence sénile de type Alzheimer (DSTA) semble augmenter avec l'âge d'une manière exponentielle entre 65 et 85 ans, doublant tous les 4,2 ans. Les études les plus récentes montrent une réduction dans l'accroissement de la prévalence après 85 ans. L'incidence de la DSTA semble tripler tous les 10 ans après 65 ans.

La fréquence d'apparition de la maladie passe de 0,4 %, pour les individus des deux sexes âgés de 55 à 59 ans, à 43 %, pour ceux qui atteignent l'âge de 95 ans ( OTT, 1995).

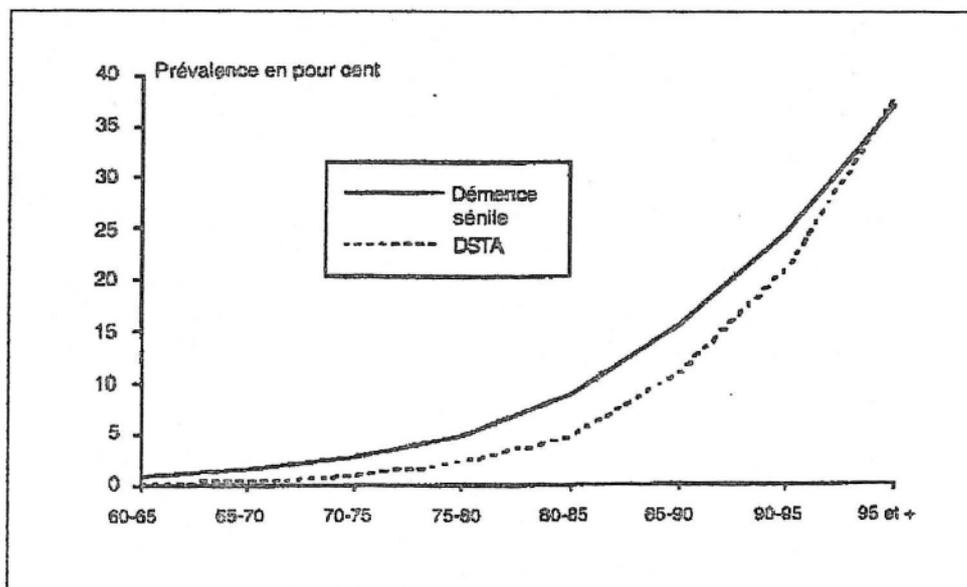
D'après un modèle dérivé d'une méta-analyse appliqué à la population française en 1990, on estime que 460 043 personnes de plus de 60 ans souffraient de démence sénile à cette date. Parmi celles-ci, 248 167 auraient la maladie d'Alzheimer. D'après des estimations, ce chiffre est en augmentation croissante pour atteindre 824 062 cas d'Alzheimer en l'an 2020 ( BLARD, 1996).

Les groupes d'âge plus élevés sont ceux qui préoccupent le plus les responsables des services de santé car ils sont plus susceptibles d'avoir des pathologies multiples, et moins susceptibles d'avoir de la famille proche suffisamment jeune pour les soigner à domicile. On estime que 162 379 personnes de plus de 85 ans souffraient de démence sénile en France en 1990 (RITCHIE, 1992).

Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer représentent moins de 10 % du nombre total des cas. Elles découlent de mutations génétiques situées, pour les formes précoces, sur les chromosomes 1 (gène de la préséniline-2), 14 (gène de la préséniline-1) ou 21 (gène de la protéine  $\beta$ /A4); pour les formes tardives, sur le chromosome 19 (gène ApoE, allèle  $\epsilon$ 4), et probablement sur un gène du chromosome 12 (SCHORDERET, 1998).

Âge (années) :	Démence sénile :	DSTA :
62,5	0,9	0,2
67,5	1,6	0,4
72,5	2,8	0,9
77,5	4,9	2,1
82,5	8,7	4,7
87,5	15,5	10,8
91,5	24,5	21,0
95,0	36,7	37,4

**Tableau I :** Taux estimés de prévalence (en %) de la démence sénile et de la DSTA pour des tranches d'âge spécifiques. (RITCHIE, 1992)



**Schéma n°1 :** Taux de prévalence des démences séniles et de la DSTA en fonction de l'âge.

(RITCHIE, 1992)

Rmq: - *Prévalence:* proportion d'une population qui, à un moment donné est atteinte d'une maladie.

- *Incidence:* nombre de nouveau cas d'une maladie dans une population pour un intervalle de temps donné.

### 3-2) Les facteurs de risques: (RITCHIE, 1996)

L'âge et les antécédents familiaux de DSTA sont les seuls facteurs de risques confirmés. La trisomie 21 est un facteur de risque significatif des lésions neurobiologiques de type DSTA mais pas de la détérioration cognitive.

Les traumatismes crâniens, le sexe féminin et les antécédents de trisomie 21 semblent être liés avec la survenue de la DSTA d'une manière qui est toujours discutée. Toutefois chez les femmes, la plupart des études rapportent des incidences plus élevées que chez les hommes, ce qui laisse penser que la prévalence de DSTA dans cette partie de la population n'est pas seulement due aux différences d'espérance de vie mais aussi à un risque plus grand.

D'autres facteurs de risques sont toujours à l'étude mais les preuves sont encore insuffisantes pour affirmer leur implication de façon certaine. On trouve entre autre : l'apnée du sommeil, l'aluminium dans l'eau, les hémopathies malignes, l'âge des parents, les anesthésies, la malnutrition, l'exposition aux solvants, des facteurs socio-économiques...

Enfin plusieurs facteurs de risques ont été totalement exclus : le contact avec des animaux, le diabète, les infections herpétiques, la consommation de viande crue, le tabagisme, les maladies thyroïdiennes, les interventions chirurgicales et les analgésiques.

### 4) Diagnostic de la maladie: (ROQUIER-CHARLES, 1998 ; BLARD, 1996)

C'est souvent à un stade avancé de la maladie que les patients consultent pour la première fois leur médecin et que leur entourage commence réellement à s'inquiéter. A l'examen le médecin détecte d'important troubles de la mémoire avec, notamment, l'oubli quasi immédiat d'une consigne ou de l'idée que le patient voulait exprimer s'il interrompt sa phrase. Des tests psychologiques font apparaître une diminution des capacités intellectuelles.

En l'absence de marqueurs biologique ou radiologique de la maladie d'Alzheimer, le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments. Il faut avant tout s'assurer que le patient n'est pas atteint d'une affection donnant des symptômes proches de ceux de la maladie d'Alzheimer : hypothyroïdie, syphilis, anémie de Biermer, déficit en vitamine B12 ou en folates, tumeur cérébrale, hématome sous-dural ou lésions vasculaires cérébrales, infection par le VIH, maladie de Creutzfeldt-Jakob... Le scanner et l'imagerie par résonance magnétique montrent une atrophie cérébrale. Si celle-ci n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer (elle s'observe chez nombre de sujets normaux), son aggravation entre deux scanners successifs et sa prédominance dans la région pariéto-occipitale ont une certaine valeur diagnostique. Mais seule l'étude au microscope d'un fragment de cortex cérébral prélevé chirurgicalement peut apporter une certitude. Il est facilement imaginable que de telles biopsies ne sont pratiquées que très exceptionnellement. On voit donc ici toute la difficulté qui réside dans le diagnostic de cette maladie.

Depuis quelques années, de gros efforts ont été faits pour obtenir des critères de définition clinique. Il s'agit des critères du DSM-IV (critères diagnostiques de l'American Psychiatric Association) et de ceux du NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke / Alzheimer Disease and Related Disorders Association), beaucoup plus détaillés et sélectifs. Ces critères sont sans doute imparfaits mais ils proposent un abord pragmatique et rationnel et ont été adoptés par la plupart des équipes médicales. L'utilisation de ces critères a renforcé la crédibilité des études épidémiologiques et a permis une certaine uniformisation des résultats depuis une dizaine d'années.

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer comporte deux étapes : le diagnostic de la démence d'une part, puis celui de la démence de type Alzheimer.

Le diagnostic de la démence repose sur l'interrogatoire de l'entourage du patient, sur l'examen clinique, ainsi que sur l'exploration neuropsychologique du patient. Ce diagnostic est d'autant plus aisé que le sujet présente une détérioration évoluée, qui répond aux critères du DSM-IV. Différents tests permettent une évaluation globale du fonctionnement cognitif, du degré de sévérité de la démence et de son évolution.

Le diagnostic de démence est plus difficile à poser dans les formes débutantes où les troubles restent discrets et prédominent sur une fonction cognitive.

Une fois ce diagnostic de démence posé, il faut comme nous l'avons vu précédemment éliminer toute autre cause de démence.

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer du vivant du patient est un diagnostic de probabilité, reposant sur l'analyse clinique. Le clinicien bénéficie heureusement des critères du NINCDS-ADRDA, qui permettent d'effectuer le diagnostic de cette maladie avec une fiabilité établie par vérification anatomopathologique à 80-90 %.

### **5) Etiologie: (ROQUIER-CHARLES, 1998 ; SCHORDERET, 1998)**

Les causes de la maladie demeurent inconnues. De nombreuses théories ont été formulées, mais aucune d'entre elles ne sont pleinement satisfaisantes ou complètement vérifiées. Dès lors, rappelons les hypothèses classiques formulées à ce jour :

- L'hypothèse neurochimique repose sur une diminution des taux de plusieurs neuromédiateurs au niveau cérébral. Bien que différents systèmes de neurotransmission soient touchés dans cette pathologie (voir le tableau résumant ces phénomènes page suivante), l'axe cholinergique est le plus atteint. Ce déficit entraînerait une diminution de l'acétylcholine, et de ce fait une baisse de la transmission de l'influx nerveux. Toutefois cette hypothèse n'explique pas la dégénérescence nerveuse.

TRANSMETTEURS	CHANGEMENTS OBSERVES DANS LA MA
<i>Acétylcholine</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution importante dans le cortex et dans l'hippocampe</li> <li>- Diminution modérée des récepteurs nicotiniques et muscariniques M<sub>2</sub>, mais pas M<sub>1</sub> dans les aires corticales de l'hippocampe</li> <li>- Effet plus précoce chez les patients ApoE<sub>4</sub></li> </ul>
<i>Somatostatine</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Diminution nette dans le cortex et dans l'hippocampe</li> <li>-Diminution modérée des récepteurs SRIF-1 dans les aires corticales et l'hippocampe</li> </ul>
<i>Galanine</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Augmentation modérée de l'immunoréactivité dans le noyau basal de Meynert et ses aires corticales de projections</li> </ul>
<i>Sérotonine</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Diminution dans le cortex et dans l'hippocampe, chez un sous-groupe de patients</li> <li>-Diminution importante des récepteurs 5-HT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>2</sub> dans les aires corticales et dans l'hippocampe</li> </ul>
<i>Noradrénaline</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Diminution dans le cortex et dans l'hippocampe chez un sous-groupe de patients</li> <li>-Diminution des récepteurs α<sub>2A</sub> dans le cortex, le cervelet et l'hypothalamus</li> </ul>
<i>Dopamine</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Diminution modérée, corticale et striatale, observée dans quelques cas</li> </ul>

<i>CRF (Substance P)</i>	-Diminution possible des peptides et de leurs récepteurs corticaux dans des études isolées
<i>Neuropeptide Y et acides aminés excitateurs</i>	-Pas de consensus jusqu'à présent. Des augmentations et des diminutions ont été décrites
<i>CCK, Neurotensine, peptides opioïdes, VIP</i>	-Pas de modification nette
<i>GABA, Glycine, Taurine</i>	-Pas de modification nette

**Tableau II :** *Résumé des modifications neurochimiques observées dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les neurotransmetteurs et les neuropeptides sont présentés dans l'ordre décroissant d'importance de l'atteinte.*

(BESSON, 1997)

- Les hypothèses génétiques reposent sur des études épidémiologiques relevant l'existence d'antécédents familiaux de la maladie chez 10 % des sujets atteints. Dans ces familles, on constate également une augmentation de la probabilité de naissance d'un enfant porteur d'une trisomie 21, sans que l'on ait déterminé les raisons de cette association.
- Une hypothèse virale est émise par analogie avec la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Toutefois, s'il existe un agent infectieux responsable de la maladie d'Alzheimer, il aurait besoin d'un certain contexte génétique, immunitaire ou toxique pour s'exprimer.
- Une hypothèse immunologique repose sur la diminution globale du nombre de lymphocytes circulants et la présence accrue d'auto-anticorps. Cependant, ces perturbations sont fréquentes avec l'âge en dehors de toute démence.

- Les hypothèses vasculaire et métabolique sont étayées par une réduction du débit sanguin cérébral, de l'oxygénation du sang et de sa capacité à capter le glucose. Il faut toutefois noter que ces déficits peuvent être la conséquence et non la cause de la détérioration cérébrale.

- Une hypothèse toxique repose sur l'augmentation des taux d'aluminium dans le cerveau. Mais des concentrations cinq fois supérieures à la normale, observées chez les dialysés, ne produisent pas de dégénérescence nerveuse.

- Une hypothèse impliquant les radicaux libres repose sur le fait que le vieillissement est dû, en partie, aux effets destructeurs de ceux-ci. Cette dernière hypothèse fait actuellement l'objet de nombreuses recherches.

## 6) Les différents traitements : (ALLAIN, 1996 ; HAUW, 1997)

Plusieurs possibilités d'actions thérapeutiques doivent être distinguées dans la MA.

Le plus simple tout d'abord est de dépister et de traiter efficacement les affections qui aggravent la démence (traiter la cause d'un syndrome confusionnel ou une dépression...). Il faut en second lieu juguler les troubles du comportement et, enfin, tenter d'améliorer les troubles cognitifs par des médicaments substitutifs.

### 6-1) Traitements des troubles du comportement:

Deux points sont importants à retenir pour envisager ce type de thérapie.

Le premier est de rechercher systématiquement le facteur déclenchant ou entraînant ces troubles comportementaux de façon à pouvoir éventuellement agir directement sur celui-ci.

Le deuxième est d'éviter tous les médicaments anticholinergiques ou possédant une composante de ce type.

### a) Dépression et troubles affectifs:

En pratique, le traitement d'une dépression est impératif et peut sensiblement améliorer les fonctions cognitives. Les antidépresseurs non anticholinergiques pourront être utilisés.

Les antidépresseurs de type noradrénergiques ou dopaminergiques sont d'avantage adaptés aux cas de "déficit affectif" où l'on note chez le patient un certain repli, de l'indifférence, et l'absence de plaisirs ou d'émotions.

Au contraire les patients présentant une certaine "incontinence émotionnelle" se caractérisant par des sanglots, des changements brutaux d'humeurs et des réactions de panique face aux difficultés seront traités par des antidépresseurs sérotoninergiques.

### b) Irritabilité et agressivité:

Les neuroleptiques sont fréquemment prescrits mais ils sont peu efficaces dans ces indications, sauf lorsque le trouble est dû à une activité psychotique.

Les molécules sérotoninergiques sont de possibles alternatives thérapeutiques mais elles n'ont pas été évaluées par des essais contrôlés. Les antidépresseurs actifs par inhibition de la recapture de la sérotonine, la bupépridone et la trazodone pourraient être des traitements d'avenir. D'autres études ont montré un effet bénéfique possible de la carbamazépine, du valproate de sodium et des bêtabloquants.

### c) Délires et hallucinations:

Dans le traitement des hallucinations, les neuroleptiques retrouvent pleinement leur indication. Les nouveaux neuroleptiques dits "atypiques" (clozapine, rispéridone, zacopride) suscitent des espoirs du fait d'effets indésirables plus faibles. Toutefois, le recul dans l'utilisation de ces produits semble encore insuffisant.

La prescription à l'avenir de produits cholinergiques pourrait modifier cette situation de quasi-monopole thérapeutique. En effet, l'amélioration de la transmission cholinergique pourrait réduire la fréquence des troubles psychotiques.

La possible réaction épilepsie-hallucination incite à instituer un traitement anti-épileptique chaque fois que cela paraît légitime.

d) Agitation, comportement de déambulation et fugues:

Les neuroleptiques et les benzodiazépines sont souvent prescrits, mais leurs effets paraissent limités sauf quand l'agitation semble directement liée à une production hallucinatoire ou délirante.

Les thérapeutiques médicamenteuses sont habituellement peu efficaces sur les comportements de déambulation.

6-2) Traitement des troubles cognitifs:

Deux classes principales de médicaments peuvent être proposées à ce jour : la classe des inhibiteurs des cholinestérases dont c'est l'indication, et d'autres produits qui ont été amenés à cette pathologie, mais dont l'utilité principale n'est pas la maladie d'Alzheimer.

Les seuls traitements ayant reçu l'autorisation de mise sur le marché français pour cette maladie sont le COGNEX® (tacrine) et l'ARICEPT® (donepezil). Ce sont deux anticholinestérasiques, visant à compenser les déficits cholinergiques cérébraux des patients. Nous allons revenir plus largement sur l'approche cholinergique dans les paragraphes suivants.

Les autres traitements proposés jusqu'à présent, souvent sur des bases empiriques, peuvent aussi être regroupés en deux classes : les produits à visée vasculaire et les agents nootropes.

- Les molécules à visée vasculaire sont nombreuses. Aucun effet manifeste n'a jamais été formellement démontré. Paradoxalement d'ailleurs, les études effectuées avec une méthodologie correcte sont très peu nombreuses.

- Les médicaments nootropes, dont le but est de favoriser le fonctionnement neuronal, pourraient être plus intéressants. On trouve ici par exemple le piracétam, des alcaloïdes de

l'ergot de seigle ou bien encore, des principes actifs extraits de *Gingko biloba*. Nombre de ces produits appartiennent à la classe des "activateurs cognitifs". De la même manière, aucun de ces médicaments n'a démontré une efficacité quelconque dans la maladie d'Alzheimer.

### 6-3) Autres essais thérapeutiques: (ALLAIN, 1996)

De nombreux articles font actuellement le point sur des molécules présentant un intérêt certain dans la maladie d'Alzheimer. Il serait vain d'en faire un recensement exhaustif tant ces produits sont nombreux et les hypothèses sur lesquelles ces traitements reposent sont hasardeuses. Nous ne citerons ici que les cas les plus prometteurs au vue de plusieurs raisons :

- pour l'instant, seule deux molécules, la tacrine et le donepezil, ont obtenu une autorisation de mise sur le marché, dans quelques pays, dont la France et les USA.
- les molécules en développement sont très nombreuses, appartenant à des classes chimiques et pharmacologiques très diverses.
- l'objectif thérapeutique à terme (correction d'un symptôme ou ralentissement d'un processus physiopathologique) n'est pas toujours clair, *a priori*.
- les cibles neurochimiques des principaux médicaments actuellement en évaluation clinique ne correspondent pas aux processus les plus caractéristiques de l'affection (DNF, protéine bêta-amyloïde...).
- peu de médicaments ont été évalués dans le cadre de phases III méthodologiquement acceptables contrastant avec la multiplicité des études considérées comme "pilotes" sur des échantillons trop faibles.
- l'inadéquation du stade de la maladie à la sensibilité des outils de mesure est classique malgré le fait admis d'une évolution lente en début de maladie (et par conséquent de la difficulté de mettre en évidence de faibles variations) et d'une accélération des signes dans les formes modérées.
- l'absence quasi constante des étapes dites de pharmacologie clinique (recherche de doses, évaluation des effets indésirables ; détection d'actions psychométriques autres que mnésiques, interactions (nourriture/médicaments)).

- **Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS):** l'approche est originale car elle repose initialement sur des données épidémiologiques montrant l'association inverse entre consommation d'AINS et la survenue de la maladie d'Alzheimer. Manifestement, les AINS ralentissent le processus évolutif de la maladie (NOURHASHEMI, 1998). Toutefois la rationalité de cette démarche tient compte de l'identification dans le cerveau de patients décédés, d'une série de marqueurs indicatifs d'une réaction immunologique de phase aiguë, souvent associés aux dépôts de protéine amyloïde. Si l'AINS a la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique, il devrait être en mesure d'inhiber la cascade de réactions inflammatoires et immunologiques qui provoquent ou accompagnent la maladie d'Alzheimer (SCHORDERET, 1998). Il faudra toutefois tenir compte du rapport bénéfice / risque de ce type de médicaments, dont les effets indésirables à long terme et chez les personnes âgées sont loin d'être tolérables.

- **L'hormonothérapie substitutive post-ménopausique** pourrait également s'avérer protectrice. Le rôle bénéfique de l'oestrogénothérapie dans la MA repose sur un faisceau d'arguments. Les récepteurs cérébraux des oestrogènes présentent une distribution similaire à celle des lésions histologiques de la maladie (télencéphale basal, cortex cérébral et hippocampe). Les oestrogènes renforceraient la synthèse des récepteurs du NGF. Le 17-béta-oestradiol favoriserait le catabolisme non amyloïdogénique de l'APP. Certaines études rétrospectives ont pu montrer que les femmes ménopausées ayant bénéficié d'une oestrogénothérapie substitutive ont un risque moindre de développer la maladie. De plus, parmi les patientes atteintes, celles ayant bénéficié d'une oestrogénothérapie substitutive présentent une dégradation cognitive moins marquée (ALLAIN, 1996).

- **Les antioxydants:** la littérature est très abondante, plaidant en faveur du rôle des radicaux libres, dans la mort cellulaire programmée (apoptose) des cellules nerveuses et de leur interaction avec d'autres composés délétères tels le glutamate, le fer et le calcium. Les arguments en faveur de cette théorie radicalaire dans la maladie d'Alzheimer sont pourtant fragiles et toujours indirects. Cette pauvreté de preuves contraste avec le nombre élevé de composés chimiques qui s'opposent à cette surproduction radicalaire, notamment la série des aminostéroïdes (les lazaroides) et l'alpha-tocophérol (vitamine E) ou d'autres molécules classées dans les "activateurs cognitifs" (ALLAIN, 1996).

- On peut encore citer la sélégiline (inhibiteur de la monoamine oxydase de type B), la nimodipine (antagoniste calcique de type dihydropyridine) ou des molécules agissant en limitant ou bloquant la neurotransmission glutamatergique, comme produits présentant un fort potentiel de développement dans le traitement de cette pathologie.

## 7) La voie cholinergique :

### 7-1) L'acétylcholine et son cycle: (GENTY, 1997 ; KATZUNG, 1996)

L'acétylcholine est le premier neurotransmetteur à avoir été caractérisé comme tel en 1921 par Otto LOEWI (biochimiste et physiologiste allemand, 1873-1961, prix Nobel en 1936). Cette découverte, historique devait avoir une portée considérable dans le monde des biologistes.

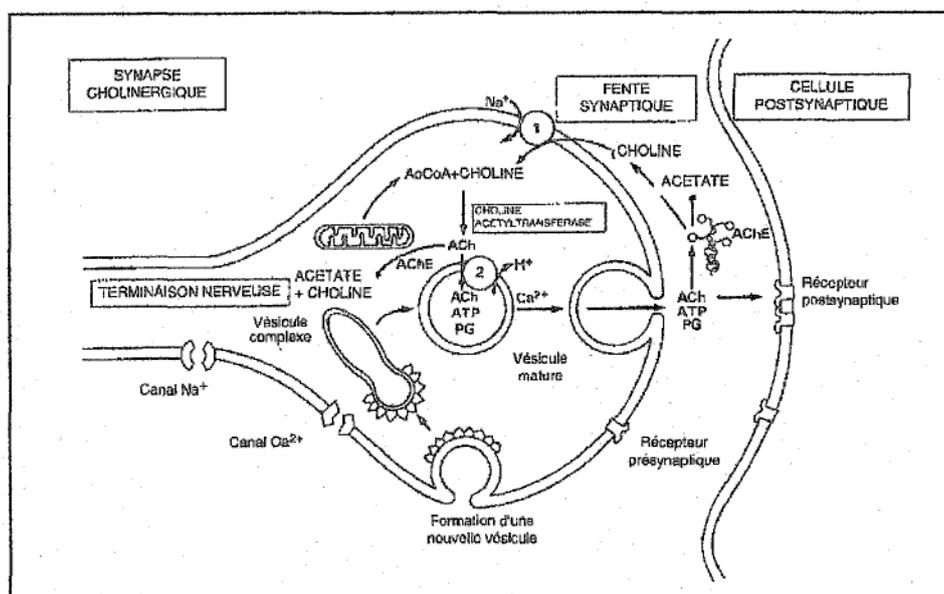
On trouve des synapses cholinergiques dans le système nerveux central (différents circuits cérébraux) ainsi que dans le système nerveux périphérique (neurones pré-ganglionnaires sympathiques et parasympathiques, neurones post-ganglionnaires parasympathiques, jonction neuro-musculaire).

L'acétylcholine est synthétisée dans les terminaisons pré-synaptiques des neurones cholinergiques, à partir de choline et d'acétyl-coenzyme A sous l'action de la choline acétyltransférase (ChAT).

Dans le cas de la jonction neuro-musculaire, l'ACh, libérée dans la fente synaptique, se fixe sur des récepteurs post-synaptiques spécifiques, dits nicotiques, qui sont des protéines canaux dont elle déclenche l'ouverture. Cette fixation peut être contrariée par le curare. La molécule d'ACh est ensuite inactivée par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE).

Au niveau des synapses cholinergiques des systèmes nerveux sympathique et central, l'ACh peut aussi se fixer sur des récepteurs, dits muscariniques, qui sont des récepteurs liés aux protéines G.

Le fonctionnement de la synapse cholinergique est généralisée dans le schéma suivant :



**Schéma n° 2 :** *La synapse cholinergique* (KATZUNG, 1996)

Deux structures cellulaires, la terminaison du nerf cholinergique (à gauche) et la cellule post-synaptique (à droite), sont séparées par la fente synaptique.

La choline est transportée dans la terminaison nerveuse par un transporteur à haute affinité (1) qui transporte également l'ion sodium, en utilisant le gradient de sodium comme énergie. Ce transport peut être inhibé par l'hémicholinium. A l'intérieur de la terminaison nerveuse, la choline s'associe à l'acétyl-coenzyme A (AcCoA), au cours d'une réaction catalysée par la choline-acétyltransférase, pour former l'acétylcholine (ACh).

La formation des vésicules de stockage est initiée par le dépôt de molécules de clathrine à la surface interne de la membrane terminale (représentée par la structure en forme de palissade de la nouvelle vésicule). Expulsé de la surface par pincement, un "complexe vésiculaire" est formé, qui va éventuellement donner naissance à une vésicule de stockage mature. L'ACh est transportée dans la vésicule de stockage sous l'action d'un transporteur (2) qui utilise l'efflux de protons comme source d'énergie. De l'ATP et du protéoglycane sont également stockés dans la vésicule. La libération du médiateur survient lorsqu'un potentiel d'action, transporté le long de l'axone sous l'effet des canaux sodiques dépendant du voltage, arrive dans les terminaisons nerveuses. Les canaux calciques sensibles au voltage de la membrane terminale sont ouverts, permettant un influx de calcium. On pense que l'augmentation du calcium intracellulaire provoque la fusion des vésicules avec la membrane cellulaire, entraînant une expulsion par

exocytose de l'ACh, de l'ATP et du protéoglycane dans la fente synaptique. Cette étape est bloquée par la botuline.

L'ACh atteignant les récepteurs pré- et post-synaptiques modifie la fonction de la cellule correspondante.

Le médiateur diffuse également au contact de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme polymérique qui scinde l'ACh en choline et en acétate.

### 7-2) Stratégie cholinergique dans la maladie d'Alzheimer:

Nous avons vu que la maladie d'Alzheimer est marquée par de multiples anomalies cérébrales en neurotransmetteurs. Le déficit en acétylcholine est le plus net et le plus constant. L'importance des circuits cholinergiques dans les processus mnésiques a été démontrée depuis les années 70. Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre la sévérité du syndrome démentiel et l'intensité du déficit en acétylcholine (DAVIES, 1976). L'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer confirme les résultats de plusieurs études post-mortem et les analyses de biopsies. A l'heure actuelle, il y a deux explications à ce phénomène. On a : soit une diminution de l'activité de l'enzyme choline acétyl-transférase dans différentes régions du cortex, soit une surexpression du transporteur à haute affinité de la choline dans ces mêmes régions. On a également constaté une réduction de la libération de l'acétylcholine et de son métabolisme, ainsi qu'une perte de récepteurs muscariniques.

La pertinence des altérations du système cholinergique dans la maladie d'Alzheimer est justifiée en outre par le fait que la neurotransmission cholinergique module l'apprentissage, la mémoire et l'attention, comme cela a été démontré :

- il y a corrélation entre le déficit cortical de la choline acétyltransférase, les plaques séniles et les déficits cognitifs dans cette maladie.
- Le déficit cognitif lorsqu'il est induit par des agents anticholinergiques actifs au niveau central (scopolamine) chez l'humain normal, comme chez les animaux de laboratoires, rappelle mais sans l'expliquer, les déficits obtenus dans la maladie d'Alzheimer (BENZI, 1998).

La diminution de la transmission cholinergique cérébrale serait donc la cause des déficits cognitifs dans cette maladie.

## LES SYSTÈMES CHOLINERGIQUES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

### Résumé des connaissances actuelles:

(BESSON, 1997)

#### NÉOCORTEX:

- ChAT:**
- activité diminuée de 30 à 90 % suivant les études, accompagnée d'une baisse de la recapture et d'une baisse de la synthèse de l'ACh; activité diminuée en biopsie
  - activité diminuée dans toutes les couches corticales, surtout dans les couches II et IV
  - activité plus fortement diminuée dans les cas de maladie d'Alzheimer à début précoce et chez les patients porteurs de l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E
  - présente dans les plaques séniles et dans certains neurones contenant des DNF
  - diminution de l'activité corrélée avec le déficit intellectuel, la densité des plaques séniles et des DNF et le déficit somatostatinergique dans le cortex frontal
  - pas de corrélation entre diminution d'activité et perte neuronale du noyau basal de Meynert

- AChE:**
- activité diminuée de 20 à 90 % suivant les études
  - activité diminuée dans toutes les couches corticales
  - présente dans les plaques séniles et dans certains neurones contenant des DNF
  - pertes des fibres immunoréactives

- Site de liaison:**
- Nicotinique: densité normale ou diminuée
  - Muscarinique: densité normale ou diminuée

#### HIPPOCAMPE:

- ChAT:**
- activité diminuée de 30 à 90 % suivant les études
  - présente dans les plaques séniles
  - pertes des fibres immunoréactives

- AChE:**
- activité diminuée de 60 à 90 % suivant les études

- Site de liaison:**
- Nicotinique: densité normale ou diminuée
  - Muscarinique: densité normale ou diminuée

#### NOYAU BASAL DE MEYNERT :

- ChAT:**
- activité normale ou diminuée de 60 à 80 % suivant les études
  - diminution de l'expression des ARNm
  - diminution du nombre de neurones de 18 à 80 % suivant les études

- AChE:**
- activité diminuée de 50 à 60 % suivant les études

### BANDELETTE DIAGONALE DE BROCA :

- ChAT:*
- activité diminuée de 60 %
  - diminution du nombre de neurones de 20 à 90 % suivant les études

### SEPTUM :

- ChAT:*
- activité diminuée de 45 à 55 % suivant les études
  - diminution du nombre de neurones de 20 à 60 % suivant les études

### STRIATUM :

- ChAT:*
- dorsal: activité normale ou diminuée; pas de diminution du nombre de neurones
  - ventral: activité diminuée de 50 à 90 % suivant les études; diminution du nombre de neurones

### THALAMUS :

- ChAT:*
- activité normale ou abaissée
  - perte de fibres immunoréactives

Il est donc logique de proposer des traitements augmentant le taux de ce neurotransmetteur dans le cerveau en choisissant plusieurs modes d'actions :

- pré-synaptique: apport en précurseur
- synaptique: inhibition des cholinestérases
- post-synaptique: apport d'agonistes (muscarinique ou nicotinique)

*L'approche pré-synaptique* n'a pas abouti à des résultats convaincants ; elle consistait en l'apport de choline ou de lécithine. Ce fut l'une des premières stratégies thérapeutiques qui a été mise au point dans le traitement de cette maladie, pour augmenter la synthèse de l'acétylcholine. Cette approche fut inspirée par l'emploi de précurseurs de la dopamine dans la maladie de Parkinson. Cette stratégie n'est plus considérée comme intéressante à l'heure actuelle (BECKER, 1988).

L'approche post-synaptique semble prometteuse mais encore au stade de l'étude. Toutefois certaines études cliniques sont très avancées. (ALLAIN, 1996)

*Les agonistes muscariniques M1:* L'idée d'agir directement sur les récepteurs post-synaptiques muscariniques (les récepteurs de type M1) semble logique et pharmacologiquement plus simple que le recours aux inhibiteurs d'enzymes. Le produit actuellement en phase III aux USA, la xanoméline, semble des plus prometteur. Deux produits français, la miraméline et le SR 46559 A sont en phase II ; ce dernier produit possède 6 fois plus d'affinité pour les récepteurs M1 que pour les M2, et, ne semble pas exposer le patient au risque de "syndrome cholinergique". En pharmacologie préclinique, de nombreuses substances agonistes M1 sont à l'étude, et toutes se sont révélées efficaces sur les modèles animaux de troubles cognitifs ; c'est le cas de l'AF 102 B, dérivé de la quinuclidine. Le SB202026 représente également un agoniste partiel puissant des récepteurs M1 (40 fois plus puissant que le RS 86) utilisable chez l'homme à des doses quotidiennes situées entre 100 et 150 µg.

*Les agents nicotiniques:* Malgré une connotation très négative, la nicotine est connue comme exerçant des effets positifs sur la mémoire, l'attention, l'anxiété et même la dépression. En pharmacologie clinique, l'amélioration de nombreuses performances cognitives a été démontrée. L'absence de phénomène de tolérance est prouvée; de tels résultats ont pu être reproduits chez des patients atteints de la MA, avec amélioration du rappel verbal de l'attention et de la vitesse de traitement de l'information.

La nicotine stimule les récepteurs nicotiniques centraux. Elle agit également sur d'autres systèmes à neurotransmission: élévation de l'activité de la tyrosine hydroxylase, augmentation du relargage de la noradrénaline dans l'hippocampe. La cinétique de ces effets est étonnante, puisque les modifications induites persistent au-delà de l'interruption du traitement. Si l'administration de nicotine à des malades pose des problèmes, cette voie de recherche a le mérite de déboucher sur des composés dénués des effets indésirables de la nicotine elle-même. Ces substances sont qualifiées de "cholinergic channel activators".

Les agonistes nicotiniques représentent un champ très actif de la pharmacologie du système nerveux central, d'autant que les propriétés neuroprotectrices ont été clairement mises en évidence. Ces faits sont à rapprocher des résultats des épidémiologiques permettant de

suggérer un effet protecteur du tabagisme vis-à-vis de la MA elle-même. Une discussion récente est lancée concernant le risque de MA, le tabagisme et certains génotypes.

*L'approche synaptique:* l'action inhibitrice sur les cholinestérases s'est révélée jusqu'ici la plus intéressante; elle a favorisé les premiers résultats positifs sur les troubles de la mémoire.

La portée de cette intervention se trouve pourtant limitée, car les déficits en plusieurs neurotransmetteurs sont observés dans la maladie d'Alzheimer, et il faut également tenir compte des lésions neuronales du cortex cérébral. Toutefois, comme les résultats obtenus jusqu'à présent avec ce type d'interventions sont encourageants, cette voie thérapeutique est en plein essor.

### 7-3) Les cholinestérases:

Ce sont des enzymes présentes chez les vertébrés en général et chez l'homme en particulier. L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7., AChE) et la butyrylcholinestérase (EC 3.1.1.8., BuChE) sont deux enzymes qui hydrolysent rapidement les esters de choline.

L'AChE est particulièrement importante au niveau des jonctions neuromusculaires, puisque son principal rôle physiologique est d'hydrolyser l'acétylcholine libérée dans la synapse cholinergique, permettant ainsi la restauration de l'excitabilité de la membrane post-synaptique. La présence de l'enzyme dans des tissus dépourvus de synapses cholinergiques et sa répartition au cours de l'embryogenèse et de la différenciation cellulaire suggèrent cependant que, l'enzyme pourrait être impliquée dans d'autres fonctions (BALASUBRAMANIAN, 1993). En revanche, aucune fonction physiologique n'a encore été attribuée à la BuChE, qui est exprimée dans de nombreux tissus, notamment le foie d'où elle est sécrétée dans le plasma.

Composées de sous-unités catalytiques glycoprotéiques dont les masses molaires s'étalent généralement de 70 à 80 kDa, les cholinestérases (ChE) présentent un polymorphisme moléculaire complexe. On a mis en évidence des formes monomériques, homo ou hétéro-oligomériques, globulaires hydrophiles ou amphiphiles, jusqu'à des structures en grappes à queues collagéniques incluant douze sous-unités catalytiques (MASSOULIE, 1993).

La résolution de la structure tridimensionnelle de l'AChE extraite du poisson torpille (*Torpedo californica*) (SUSSMAN, 1991) a permis de préciser l'ensemble des connaissances structurales et catalytiques de ce type d'enzyme.

Présentant des propriétés catalytiques voisines, les ChE agissent selon le mécanisme général des estérases à sérine. L'AChE est une des enzymes les plus rapides que l'on connaisse, puisque la vitesse d'hydrolyse de l'acétylcholine approche de la limite théorique fixée par la diffusion du substrat (QUINN, 1987). La vitesse de catalyse de la BuChE est par contre beaucoup plus faible. Ces ChE possèdent dans leur site actif une sérine qui peut être phosphorylée par des inhibiteurs organophosphorés par exemple. Ce sont des hydrolases à sérine, dont le mécanisme catalytique est semblable à celui d'autres estérases, lipases ou protéases. On peut décomposer la réaction catalytique en trois étapes:

- la liaison du substrat semble s'accompagner d'un réarrangement conformationnel qui permet le déroulement des étapes chimiques ultérieures (ROSENBERRY, 1975).
- la deuxième étape consiste en une attaque nucléophile de l'acétylcholine par la sérine du site actif, qui libère la choline et produit une acétyl-enzyme.
- dans la troisième étape, l'acétyl-enzyme est hydrolysé et l'enzyme active est régénérée.

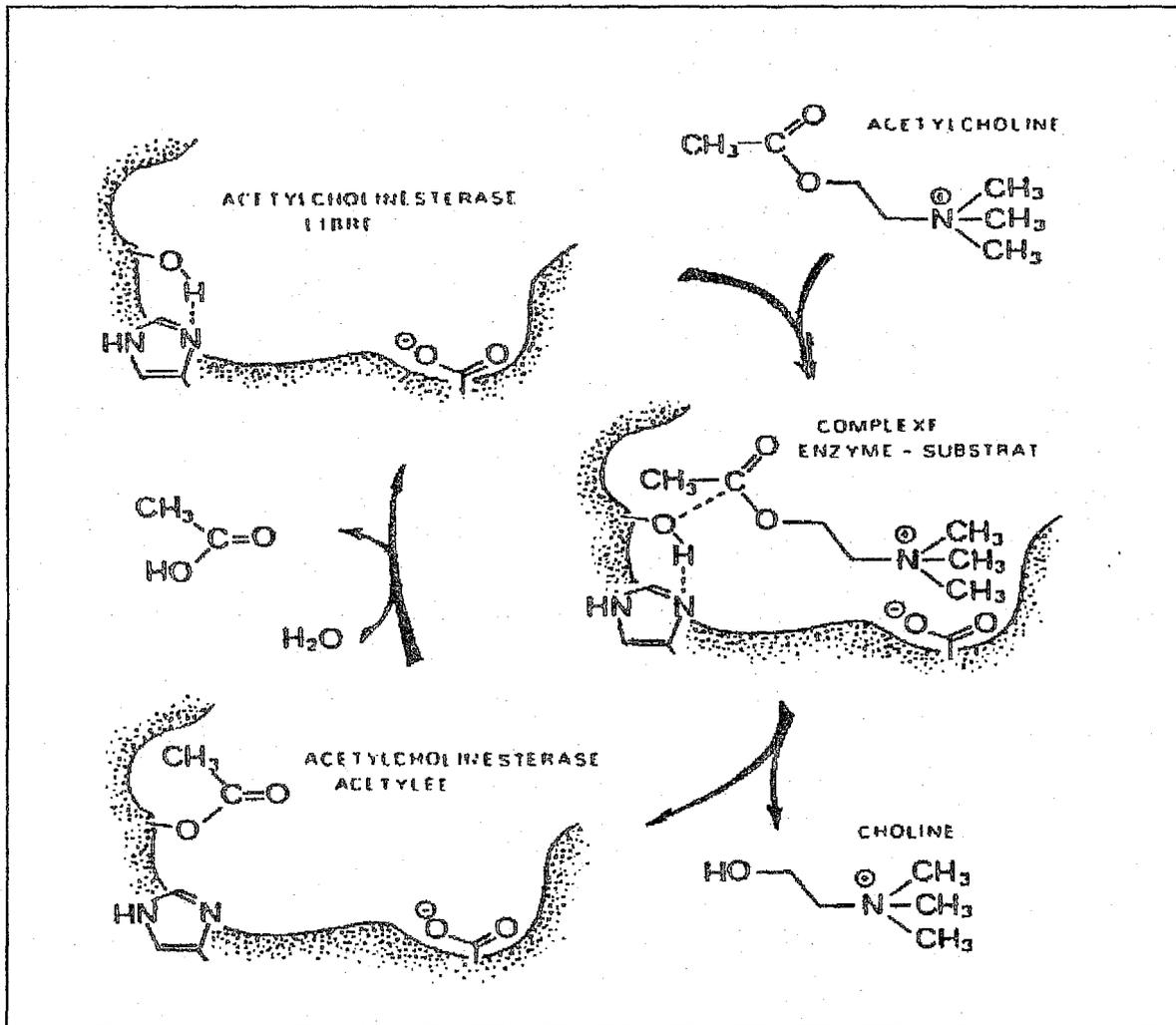


Schéma n° 3 : Fonctionnement de l'acétylcholinestérase. (CHAMP, 1986)

L'AChE est une enzyme "parfaite", selon l'expression de QUINN (1987), car les énergies d'activation des différentes étapes sont pratiquement égales, de sorte que la vitesse catalytique ne dépend pas d'une seule étape limitante.

#### 7-4) Structure de l'acétylcholinestérase:

La détermination de la structure tridimensionnelle de l'acétylcholinestérase de torpille par diffraction des rayons X a été réalisée en 1991 par SUSSMAN et ses collaborateurs. Cette enzyme appartient à la classe des protéines  $\alpha/\beta$  et sa structure est constituée par un ensemble de 12 feuillets  $\beta$  entouré de 14 hélices  $\alpha$ . Cette équipe de chercheurs a visualisé pour la

première fois, le site de liaison de l'acétylcholine au niveau atomique. Ce site est localisé non à la surface de la protéine, mais près de son centre, au fond d'une étroite cavité, profonde de 20 Angströms. Il est constitué par une triade catalytique sérine (200), histidine (440), glutamate (327). C'est le premier exemple d'une triade catalytique comprenant un glutamate au lieu d'un aspartate. Les parois de la gorge sont tapissées par les noyaux aromatiques de 14 résidus phénylalanine, tryptophane ou tyrosine, qui représentent environ 40% de sa surface.

La modélisation de la molécule d'acétylcholine en conformation trans, dans cette structure, montre que le groupe quaternaire de la choline est en contact étroit avec le noyau imidazole du tryptophane 84, ce qui confirme la présence de ce résidu dans le sous-site "anionique". On constate que la liaison des ammoniums quaternaires est plutôt due à leur interaction avec les électrons  $\pi$  des noyaux aromatiques, qu'avec des charges négatives.

D'autres études complémentaires nous amènent à penser que l'acétylcholine se lierait tout d'abord au site périphérique, qui jouerait le rôle d'un terrain d'atterrissage à la surface de la protéine, puis glisserait comme sur un toboggan, le long des résidus aromatiques disposés sur les parois de la gorge, jusqu'au site catalytique où elle est hydrolysée. Il est possible que ce transfert du substrat du site périphérique au site catalytique corresponde à la première étape conformationnelle de la catalyse, qui précède les étapes chimiques d'acétylation et de désacétylation de l'enzyme. Les liaisons faibles avec les noyaux aromatiques accéléreraient l'accès de l'ACh au site catalytique en la confinant à la surface de la gorge: c'est le "guidage aromatique". La disposition des charges électriques dans la protéine semble également créer un champ qui peut entraîner les molécules de substrat vers le site catalytique (MASSOULIE, 1993).

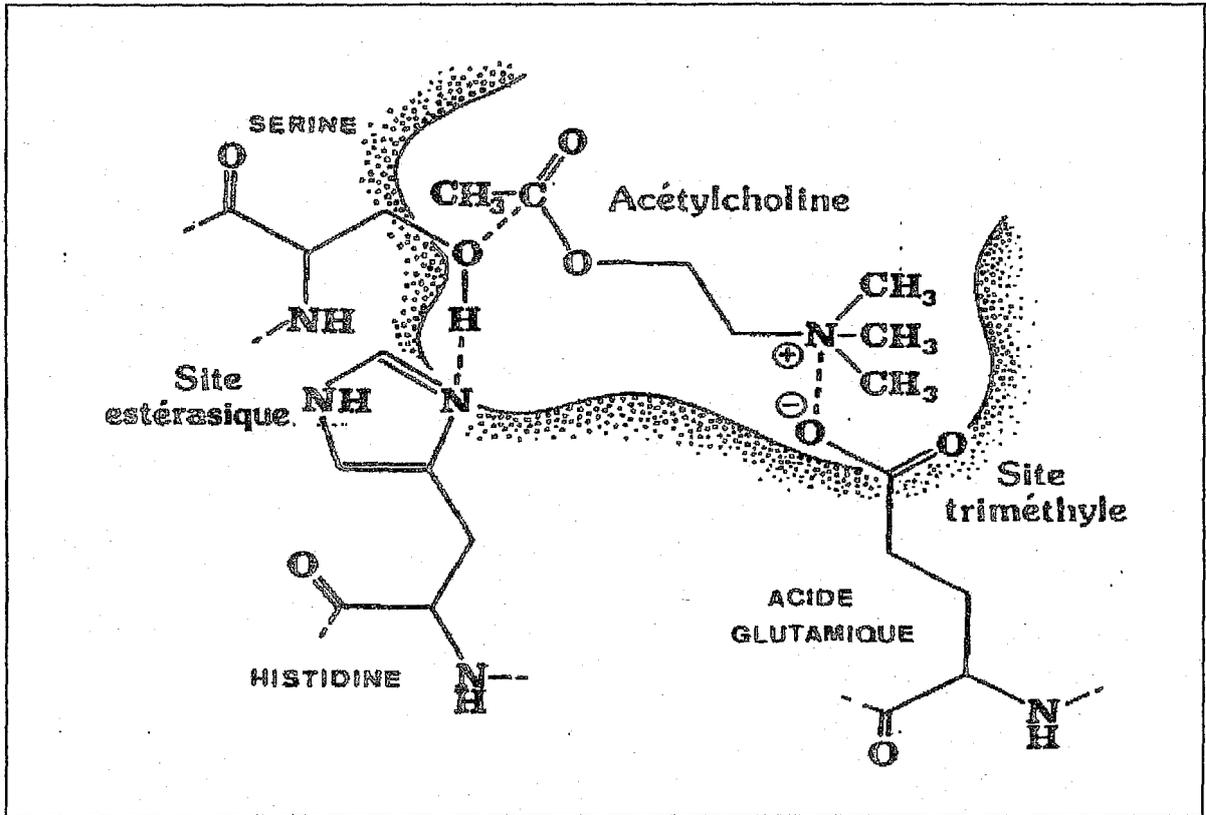


Schéma n° 4 : *L'acétylcholinestérase*. (CHAMP, 1986)

**DEUXIÈME PARTIE :**

## II - LES INHIBITEURS DES CHOLINESTÉRASES :

### 1) Présentation :

L'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer a conduit à une thérapeutique courante et majeure. Cette approche est basée sur la tentative de correction du déclin cognitif par une manipulation de la neurotransmission cholinergique. Dans les possibles stratégies pour augmenter l'activité cholinergique cérébrale, l'inhibition des cholinestérases est celle qui est la plus utilisée. L'usage d'agonistes des récepteurs de l'acétylcholine pourrait conduire à une alternative mais il n'est toujours pas d'actualité. Les inhibiteurs des cholinestérases peuvent augmenter l'efficacité de la transmission cholinergique en évitant l'hydrolyse de l'acétylcholine dans l'espace synaptique et fournissant ainsi davantage de médiateurs au niveau des récepteurs post-synaptiques. La tacrine et la physostigmine (ésérine) ont été les molécules les plus largement étudiées. L'évaluation de l'usage à long terme du donepezil est en cours.

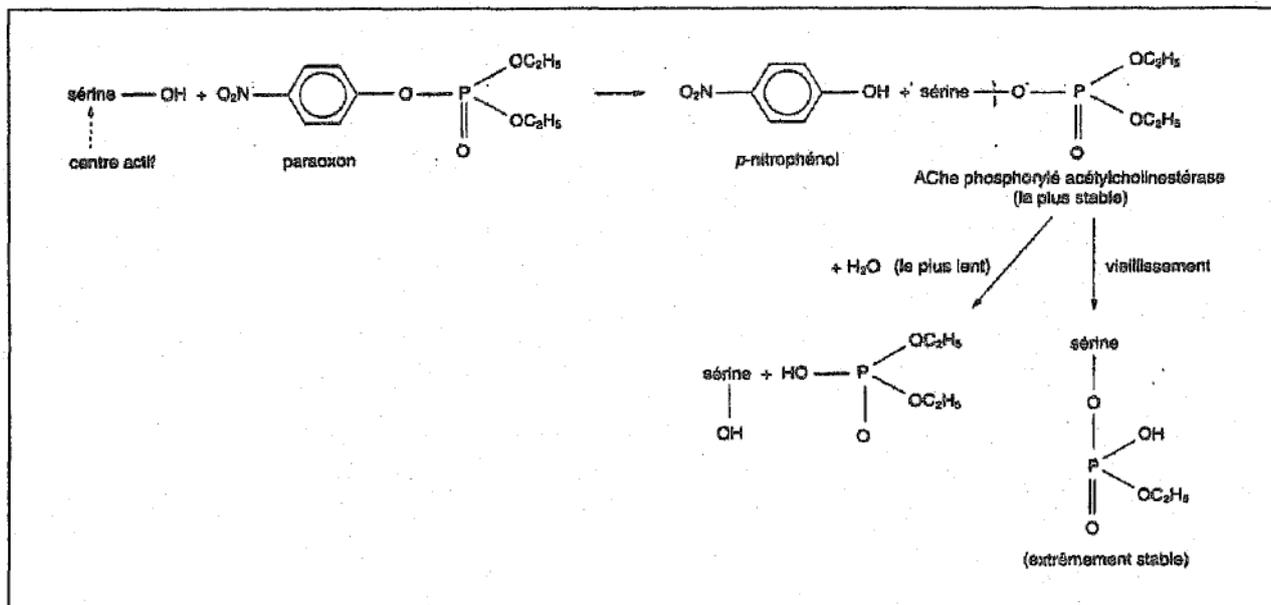
#### 1-1) Les différentes molécules : (MASSOULIE, 1993)

On peut distinguer deux types de produits :

- ceux qui réagissent de façon covalente avec la sérine active de l'enzyme,
- ceux qui se lient à l'enzyme de façon non covalente.

La réaction de l'enzyme avec les inhibiteurs de la première catégorie ressemble à la réaction d'acylation d'un substrat. Mais les dérivés produits, carbamylés, sulfonylés ou phosphorylés, ont une durée de vie plus longue que celle de l'acétyl-enzyme. L'ésérine par exemple produit un carbamyl-enzyme, qui s'hydrolyse spontanément en quelques minutes. Les composés organophosphorés, donnent un phosphoryl-enzyme, qui ne s'hydrolyse que très lentement ou pas du tout. Certains de ces dérivés peuvent être réactivés par des composés nucléophiles ayant une bonne affinité pour le site actif, comme certaines oximes. Cependant, dans certains cas, le phosphoryl-enzyme subit une réaction dite de "vieillessement", dans laquelle un groupe

alkyle lié au phosphore est éliminé. Après cette réaction de "vieillessement", l'enzyme ne peut plus être réactivé par les oximes.



**Schéma n° 5 :** Vieillessement de l'acétylcholinestérase. (PONTAL, 1997)

Pour certains organophosphorés comme le soman, cette réaction de vieillissement est très rapide. Cette réaction de vieillissement joue donc un rôle très important dans la toxicité des molécules anticholinestérasiques, car elle détermine la possibilité de les détoxifier par des agents réactivateurs. On peut noter également que la vitesse de cette réaction dépend de la nature chimique de l'inhibiteur, mais aussi de l'enzyme elle-même.

Certains inhibiteurs non covalents, comme l'édrophonium, se lient au site actif, entrant ainsi en compétition avec le substrat. Ces inhibiteurs portent généralement un groupement ammonium quaternaire, comme l'acétylcholine. Ceci a conduit à un schéma classique, selon lequel on considère que le site actif se compose d'un sous-site estérasique, où se situe la sérine active et une histidine et, d'un sous-site cationique, responsable de la liaison du groupe ammonium quaternaire de la choline ou des inhibiteurs (WILSON, 1967).

D'autres inhibiteurs non covalents de l'AChE, comme la gallamine, ne sont pas compétitifs avec le substrat (CHANGEUX, 1966). Ils agissent donc de façon allostérique sur le site de liaison des groupements ammoniums quaternaires, appelé site périphérique. Le rôle du site périphérique dans le mécanisme catalytique n'est pas clair. On pense cependant qu'il est responsable de l'inhibition par excès de substrat qui caractérise l'acétylcholinestérase (RADIC, 1991).

Plus classiquement, par leur utilisation dans la maladie d'Alzheimer, on peut diviser ces composés en quatre grandes classes par rapport à leur structure et à leur mécanisme d'action (BENZI, 1998) :

a) Les composés contenant un groupement amine tertiaire :

Ce sont des inhibiteurs réversibles, soit non compétitif comme le donepezil, ou de type mixte, comme la tacrine, qui provoquent une inhibition allostérique de l'acétylcholinestérase, par liaison à une région hydrophobe, près de son site anionique.

b) Les carbamates :

La physostigmine, la pyridostigmine et l'éptastigmine, sont des inhibiteurs pseudo-irréversibles de l'enzyme, par formation d'un complexe carbamoylé avec le résidu sérine de la triade catalytique de ce dernier. Ce complexe sera hydrolysé avec une vitesse beaucoup plus lente que la forme acylée de l'enzyme avec son substrat habituel.

c) Les composés organophosphorés :

Ce sont des inhibiteurs irréversibles de l'enzyme. Un seul de ces composés pourrait devenir un médicament pour la maladie d'Alzheimer : il s'agit du métrifonate, qui après une activation métabolique donne du dichlorvos. Ce dernier forme une liaison covalente avec le résidu sérine de l'enzyme pour aboutir à la formation d'un complexe stable.

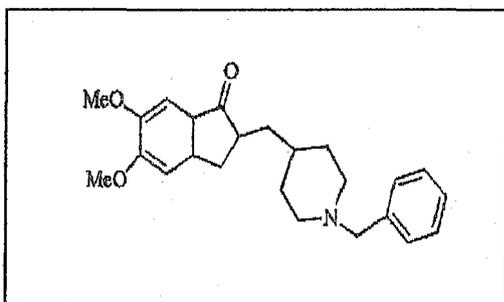
d) Les inhibiteurs sélectifs :

On classe dans cette catégorie, les composés sélectifs pour l'acétylcholinestérase par rapport à la butyrylcholinestérase comme l'ENA 713 ou le donepezil, ainsi que des molécules particulières, présentant également cette propriété, comme la galanthamine ou l'huperzine A.

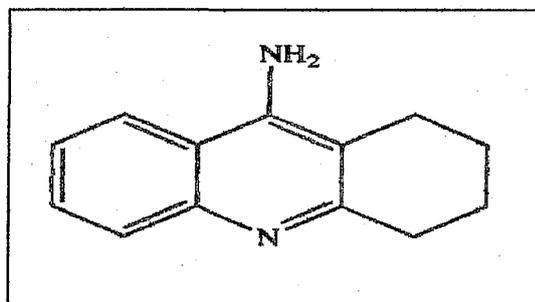
Liste des principaux inhibiteurs des cholinestérases connus:

- |                  |                  |
|------------------|------------------|
| - Ambenonium     | - Benzpyrinium   |
| - Demecarium     | - Distigmine     |
| - Donepezil      | - Echothiophate  |
| - Edrophonium    | - Eptastigmine   |
| - Hexafluorenium | - Isofluorophate |
| - Neostigmine    | - Physostigmine  |
| - Pyridostigmine | - Rivastigmine   |
| - Tacrine        |                  |

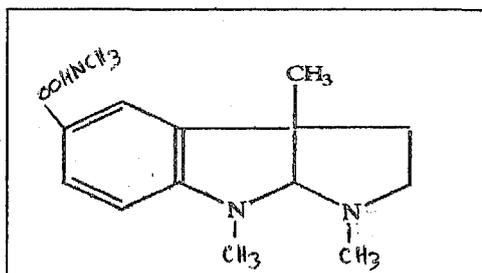
Ces inhibiteurs enzymatiques se résument jusqu'à présent aux substances anticholinergiques (physostigmine...). Les progrès de la recherche leur ouvrent aujourd'hui un nouveau débouché : celui de la maladie d'Alzheimer.



**Donepezil**



**Tacrine**



**Physostigmine (Esérine)**

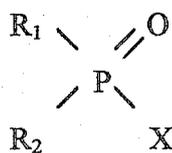
Schéma n° 6 : Formules chimiques

## 1-2) Les composés organophosphorés : (CHAMP, 1986 ; PONTAL, 1997)

### - Structure chimique et classification:

Les composés organophosphorés ont une structure chimique et un mode d'action commun.

Leur formule générale est la suivante:



Selon la nature du constituant X, quatre classes principales d'importance variable peuvent être définies :

- Classe I: X contient un ammonium quaternaire.
- Classe II: X = F.
- Classe III: X= CN, OCN, SCN ou un halogène autre que F.
- Classe IV: X= autre substituant.

La classe IV étant la plus large, elle a été elle-même subdivisée en fonction des substituants R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> : diméthoxy, diéthoxy, autre dialkoxy, trithioalkyl...

Les organophosphorés de la classe I, aussi appelés les phosphorylcholines, sont de puissants inhibiteurs des acétylcholinestérases et possèdent également une action cholinergique directe. L'un d'entre eux, l'écothioline est utilisé dans le traitement du glaucome. Il ne sont pas utilisés comme pesticides.

Les organophosphorés de la classe II sont pratiquement aussi toxiques que ceux de la classe I, ils possèdent en outre, une forte tension de vapeur. Ces deux propriétés expliquent leur utilisation prédominante comme gaz de combat (Tabun), tandis que peu d'entre eux ont été utilisés en agriculture (Dimefox).

Les organophosphorés de la classe III ont une toxicité intermédiaire entre les classes II et IV. Certains, comme le Sarin, ont été également utilisés comme gaz de combat.

Les organophosphorés de la classe IV regroupent la quasi-totalité des produits utilisés en agriculture. Dans la plupart des cas, le substituant X est fixé par une liaison P-O ou P-S, plus rarement P-N ou P-C. Ce groupe couvre aussi une vaste échelle de toxicité, allant de celle équivalente au gaz de combat, à celle de produits pratiquement atoxiques chez les mammifères.

La diversité des propriétés permet à ces organophosphorés de répondre à tous les types de besoins :

- traitements de sol, pulvérisations foliaires, protection antiparasitaire du bétail, usages domestiques, traitements de stocks...
- produits pouvant protéger une culture contre une large gamme de déprédateurs divers ou épargnant la faune auxiliaire.
- produits persistants pour assurer une protection prolongée des plantes ou produits peu rémanents limitant les problèmes de résidus.

Cette large gamme d'utilisation des organophosphorés s'explique donc par une grande diversité de structures chimiques greffées sur une fonction de base. Il en résulte tout naturellement une pluralité de propriétés physiques.

D'autres types de classifications sont utiles, notamment entre *inhibiteurs directs* et *indirects* de l'enzyme. De façon générale, les organophosphorés contenant la fonction P=S sont des inhibiteurs indirects. Leur métabolisation conduit à des dérivés P=O qui eux sont des inhibiteurs directs.

#### Propriétés physiques:

La plupart des organophosphorés sont facilement dissous dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau, mais quelques-uns sont très hydrosolubles, comme l'acéphate ou le vamidothion. Le tétrachlorvinphos est quant à lui insoluble dans l'eau et peu soluble dans les solvants organiques. Certains organophosphorés, comme le TEPP et le dichlorvos, sont très volatils, alors que d'autre, comme la phosalone, ont une tension de vapeur négligeable.

### Stabilité:

Certains produits sont très rapidement dégradés dans le sol, en raison par exemple d'une grande sensibilité à l'hydrolyse ; d'autres au contraire, y ont une persistance de plusieurs mois. De même, la persistance des dépôts sur les feuilles ou des produits véhiculés par la sève peut aller d'un ou deux jours à plusieurs mois.

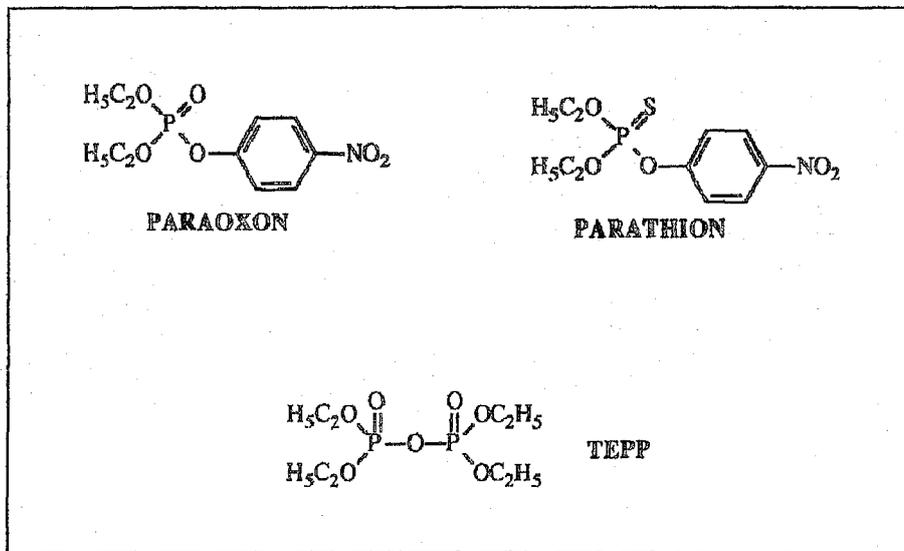


Schéma n° 7 : Formules chimiques

## 2) Application dans la maladie d'Alzheimer :

### 2-1) Les médicaments commercialisés :

Les inhibiteurs des cholinestérases représentent l'option thérapeutique la plus étudiée dans la maladie d'Alzheimer. A ce jour, ce sont les seules molécules qui ont été approuvées pour traiter cette maladie. Deux produits sont disponibles sur le marché français : la tacrine et le donepezil. Il s'agit d'un traitement symptomatique. Ces produits ralentissent la dégradation de l'acétylcholine intrasynaptique en ses deux composants, la choline et l'acétate. Ils prolongent de ce fait les effets du médiateur au niveau de la fente synaptique. Leur intérêt

réside dans l'amélioration des capacités mnésiques mais ils pourraient également posséder un effet positif sur les manifestations comportementales. Cependant, aucune évidence ne suggère que ces produits enrayeraient le processus de la maladie. C'est donc pourquoi il faudra s'assurer des potentiels effets bénéfiques à long terme, et notamment sur la mortalité associée à la maladie, avant d'institutionnaliser ce type de traitement.

Les effets obtenus avec ces molécules sont pourtant très encourageants. Elles ont ouvert une voie dans le traitement de cette terrible maladie et représentent un espoir réel. L'approfondissement des études conforte donc l'hypothèse de la voie cholinergique. Certains auteurs pensent même, que cette stimulation cholinergique pourrait inhiber la formation des dépôts de protéine amyloïde (TARIOT, 1996). On sait en effet depuis peu que l'acétylcholinestérase est capable d'induire l'assemblage du peptide  $\alpha\beta$  en fibrilles amyloïdes et que, d'autre part, l'enzyme diminuerait la solubilité de ce peptide (INESTROSA, 1996). On peut donc penser que les inhibiteurs des cholinestérases pourraient inhiber ce phénomène. Si tel est le cas, l'explication des résultats probants obtenus par ces traitements pourrait résider dans le fait que ces inhibiteurs n'ont pas qu'un effet palliatif, mais également un effet préventif sur la formation des plaques séniles.

Devant la réussite démontrée de ces produits, le développement de cette classe thérapeutique est donc tout naturellement en plein essors dans l'industrie pharmaceutique depuis quelques années, et nombre de nouvelles molécules devraient être commercialisées dans les prochains mois.

#### *Principaux inhibiteurs des cholinestérases en développement dans la MA:*

- Huperzine A (alcaloïde) : phase III (Chinese Acad. Sciences)
- Metrifonate (composé organophosphoré) : phase III (Bayer)
- Eptastigmine (carbamate) : phase III (Mediolanum)
- Galanthamine (alcaloïde) : phase III (Shire Pharm)
- ENA 713 (phényl-carbamate) : phase II (Novartis / Exelon®)

La tacrine (Cognex<sup>®</sup>) est la première molécule à avoir été commercialisée en 1993 aux USA. C'est un dérivé aminoacridine possédant une activité d'inhibition des cholinestérases réversible mais non spécifique. De ce fait la tacrine possède de nombreux effets indésirables de type cholinergique et notamment gastro-intestinaux qui nécessitent une répartition des prises sur la journée, et qui peut entraîner l'arrêt du traitement. Un autre problème majeur est apparu à l'usage, résidant dans son hépatotoxicité directe, visible par une élévation des aminotransférases plasmatiques (WATKINS, 1994). Bien que ce phénomène soit complètement asymptomatique, des nécroses hépatocellulaires ont été observées sur des biopsies du foie. Cette hépatotoxicité induite par la tacrine est réversible 5 à 6 semaines après l'arrêt du traitement. Une telle thérapie est donc difficile à instaurer et exige les compétences de médecins spécialisés. Le dosage régulier de l'ALAT est impératif, et alourdi de ce fait les contraintes qu'impliquent déjà la prise de ce médicament.

L'efficacité de la tacrine a été pleinement démontrée chez les patients sensibles. Chez d'autres, il faudra prendre un grand soin pour évaluer le rapport bénéfice-risque avant d'instaurer un tel traitement.

Les intérêts du donepezil (Aricept<sup>®</sup>) commercialisé cette année en France représentent une amélioration notable par rapport à la tacrine, et notamment de par sa sélectivité. Les effets indésirables de types cholinergiques (gastro-intestinaux) existent mais sont moins fréquents que dans le cas de la tacrine. Aucune hépatotoxicité n'a été démontrée jusqu'à présent et une prise unique quotidienne suffit au patient, du fait d'une longue biodisponibilité. Le donepezil a démontré son efficacité dans deux essais cliniques pivots se référant aux différentes recommandations des agences d'enregistrements (effet cognitif et effet clinique global pour la FDA, effet cognitif, clinique global et effet sur les activités quotidiennes pour l'agence européenne) (KELLY, 1997). Tout laisse donc à penser que cette molécule devrait très rapidement s'imposer sur le marché.

Les caractéristiques de ces deux produits sont résumées dans le tableau suivant :

DCI	TACRINE	DONEPEZIL
Nom commercial	Cognex <sup>®</sup>	Aricept <sup>®</sup>
Classe chimique	acridine	pipéridine
Sélectivité AChE/BuChE à dose thérapeutique	Inhibiteur non sélectif	Inhibiteur sélectif
Sélectivité tissu neural/tissu non neural	Inhibiteur non sélectif	Inhibiteur sélectif
Relation dose/concentration plasmatique	Variable - Non linéaire	Linéaire
Demi-vie à la dose thérapeutique	1,4 à 3,6 heures	# 70 heures
Élimination	Hépatique	Hépatique et rénale
Effet de l'alimentation sur l'absorption	Absorption diminuée de 30 %	Aucun
Analyse recommandée	Suivi ALAT	Aucune
Plan de prise	Jusqu'à 4 prises par jour	Une prise le soir
Formes	Cpr. de 10, 20, 30 & 40 mg	Cpr. de 10 & 20 mg

AChE: acétylcholinestérase

BuChE: butyrylcholinestérase

**Tableau III :** *Comparaison de la Tacrine et du Donepezil*

**2-2) Limites de ces traitements :** ( BENZI, 1998)

Bien que les intérêts cliniques de cette classe thérapeutique aient été démontrés, il faut tout de même modérer l'espoir que ces molécules pourraient susciter. Plusieurs points en effets restent obscurs dans cette maladie et dans l'usage de ces médicaments :

- Le traitement de la maladie d'Alzheimer par les inhibiteurs des cholinestérases ne donne pas de résultats homogènes dans la population traitée, du fait de l'hétérogénéité génétique, neurochimique, neuropathologique et clinique des patients. Il faudra de plus conduire des études à long terme (d'une durée supérieure à un an), pour estimer si ces médicaments sont capables d'enrayer le cours de la maladie.

- Les effets indésirables de certaines de ces molécules vont conduire à une réduction des posologies. En effet le bon usage de ces drogues repose sur une bonne tolérance des produits ; on a pu voir que ce n'était pas le cas avec la tacrine qui impliquait l'arrêt pur et simple du traitement chez certains patients du fait de l'hépatotoxicité caractérisée. Il en va de même avec les effets indésirables cholinergiques au niveau périphérique, qui peuvent être un facteur de limitation de la posologie ou contribuer à une mauvaise observance des patients.

- Il existe une difficulté non négligeable de stimuler les récepteurs post-synaptiques indépendamment du système pré-synaptique. En effet, une stimulation trop importante des autorécepteurs de la synapse cholinergique, pourrait réduire la capacité des neurones pré-synaptiques à transmettre l'influx correctement.

- La pharmacologie des cholinestérases n'est toujours pas clairement élucidée, et certains résultats sont contradictoires. On sait pourtant qu'on a une altération des cholinestérases dans certaines régions du cerveau chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

Les inhibiteurs seraient plus actifs sur certaines formes de l'enzyme que d'autres. Les conséquences bénéfiques ou néfastes de ce traitement sont donc encore inconnues.

- Il faut également mentionner que de nombreuses études s'interrogent sur des altérations de la réponse fournie par les récepteurs post-synaptiques, après leur stimulation par l'acétylcholine dans le cerveau des malades. Beaucoup d'études constatent un découplage entre le signal émis par le récepteur et sa transduction par les seconds messagers (protéine G / GTP).

- Enfin, comme nous l'avons déjà mentionné, le système cholinergique n'est pas le seul système de neurotransmission concerné par des dysfonctionnements dans la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer reste une pathologie dont l'origine est multifactorielle, ce qui en rend l'étude plus complexe, et les interprétations difficiles.

### 3) Applications phytosanitaires : (CHAMP, 1986 ; PONTAL, 1997)

En 1942, la firme BAYER mettait sur le marché le premier pesticide organophosphoré : le tétraéthylpyrophosphate ou TEPP. Ce produit était rapidement suivi par les parathions et d'autres composés phosphorés. Ainsi dans les années 1950, toutes les grandes sociétés de la chimie se mettaient à synthétiser ce type de produits. Cinquante ans plus tard, les organophosphorés représentent toujours au niveau mondial, un peu moins de la moitié des ventes d'insecticides d'usage agricole, mais plus de la moitié en France !

En raison de son large spectre d'action, de son efficacité et de ses caractéristiques physico-chimiques, le parathion est devenu l'un des organophosphorés les plus utilisés en agriculture. Il reste leader dans de nombreux pays, bien qu'il tende à être remplacé par d'autres produits de la même famille, mais moins toxiques. Le parathion est l'insecticide le plus souvent impliqué dans les intoxications fatales par pesticides.

Comme tous les pesticides, les organophosphorés sont réglementés aussi bien au niveau national qu'international par le *Joint meeting on pesticides* (JMP), recouvrant l'ancien *Joint meeting on pesticides residues* (JMPR) en charge de fixer la dose journalière admissible (DJA) et le Codex alimentarius qui fixait les limites maximales de résidus (LMR). Le respect des LMR impose dans certains cas un délai minimal entre la dernière application du produit et la récolte, de façon à permettre une décroissance suffisante des résidus. Dans certains états, comme la Californie aux USA, des temps avant ré-entrée sont également fixés, pour éviter les intoxications par contact avec les végétaux traités présentant une quantité importante de résidus délogeables en surface. Par ailleurs, l'Europe et d'autres pays ont commencé à établir des doses quotidiennes acceptables pour les opérateurs.

**Tableau IV :** Doses journalières admissibles (DJA) et intervalles avant récolte pour les principaux organophosphorés vendus en France (PONTAL, 1997) :

Noms	DJA (mg/Kg de poids. Jours)	Délais avant récolte
Acéphate	0,03	15 à 21 jours
Bromophos	0,04	7 à 15 jours
Carbophénouthion	0,005	
Chlorfenvinphos	0,0005	15 jours
Chlorpyriphos	0,01	
Chlorothion	pas de DJA	
Crufomate	0,01	
Cyanofenphos	pas de DJA	
Demeton	pas de DJA	
Dialiphos	pas de DJA	
Diazinon	0,002	15 à 21 jours
Dichlorvos	0,004	2 à 5 jours
Diméthoate	0,01	7 à 21 jours
Disulfoton	0,0003	
Edifenphos	0,003	
Ethephon	0,05	
Ethion	0,002	
Ethoprophos	0,0003	
Fenamiphosa	0,0005	
Fenclorphos	0,01	
Fenitrothion	0,005	15 à 30 jours
Fensulfothion	0,0003	

Fenthion	0,007	15 à 21 jours
Isofenphos	0,001	
Leptophos	pas de DJA	
Malathion	0,02	
Méthamidophos	0,004	15 jours
Méthidathion	0,001	15 jours
Mevinphos	0,0015	7 jours
Monocrotophos	0,0006	21 jours
Parathion	0,003 à 0,004	15 jours
Phorate	0,0005	
Phosalone	0,001	15 à 21 jours
Phosphamidon	0,0005	21 jours
Profenophos	0,01	
Pyrazophos	0,004	
Terbuphos	0,0002	
Thiometon	0,003	21 jours
Trichlorfon	0,01	7 jours
Vamidothion	0,008	

*Remarque :* voir en complément les remarques sur la protection contre les intoxications lors de l'usage de ces produits (annexes).

Ces produits sont utilisés essentiellement comme insecticides, nématicides ou acaricides. Dans cet usage, on retrouve principalement des produits de la classe IV avec des composés R-diéthoxy et diméthoxy. D'autres types d'activités et d'utilisations sont possibles : défoliant (merphos), régulateur de croissance (éthéphon), fongicide (trimiphos), antihelminthique vétérinaire ou rodenticide (crufomate). Il faut cependant noter ici que le mode d'action recherché est indépendant dans certains cas de l'activité d'inhibition des cholinestérases.

D'une façon générale, ces organophosphorés sont responsables d'une part importante des intoxications humaines par pesticides, qu'il s'agisse d'accidents, de suicide ou d'expositions professionnelles. Cependant, l'imprécision de l'enregistrement de ces accidents, dans la plupart des pays, rend impossible toute statistique fiable.

Les produits phytosanitaires ont été largement utilisés dans le monde agricole depuis la fin de la seconde guerre mondiale, dans le but d'augmenter les rendements. Différents composés ont été employés et notamment des organophosphorés. On commence à s'interroger aujourd'hui sur l'influence de ces pratiques sur la santé de l'homme. D'autre part les principaux producteurs de ces produits sont représentés par une industrie chimique lourde, pour qui les risques d'incidents ou d'accident sont censés être maîtrisés. Pourtant on ne peut écarter le risque d'un incident industriel majeur, bien que la probabilité de survenue d'un tel événement soit très réduite. On notera enfin que chaque année en France des employés de l'industrie chimique ou des agriculteurs sont victimes d'une intoxication accidentelle aux organophosphorés sur leur lieu de travail. Si le cas de l'intoxication individuelle pourra être réglé en milieu hospitalier, le risque d'un accident industriel majeur à proximité d'une usine pourrait initier une réflexion chez le pharmacien. Nous pourrions en effet envisager une distribution préventive de produits protecteurs de l'intoxication chez les populations habitant une zone à risque, de la même façon que des comprimés d'iode ont été délivrés aux personnes vivant à proximité des centrales nucléaires françaises. Il faudra donc disposer pour cela du produit adéquat. L'huperzine A pourrait être celui-ci.

#### **4) Applications militaires :**

Les neurotoxiques de guerre sont des armes chimiques détenues par les armées. Redoutablement toxiques, ces produits sont d'autant plus effrayants que leur fabrication est très simple, notamment pour industriel spécialisé dans la production d'insecticides ! Ces armes sont donc largement répandues dans un grand nombre d'armées à travers le monde, certains groupuscules armés ou groupes terroristes, du fait de leur facilité de fabrication augmentée

d'un faible coût de revient. Ces neurotoxiques de guerre font partie de l'arsenal dissuasif d'un pays. Des conventions internationales ont été signées au cours de ces dernières années pour diminuer la prolifération de telles armes, mais certains états n'ont pas ratifié ces accords. D'autre part des stocks importants de chimiques demeurent disséminés sur toute la surface de la planète, représentant autant de risque.

#### 4-1) La menace chimique : (MASSON, 1998)

Les bouleversements géopolitiques survenus en Europe ces dix dernières années ont éloigné le risque d'un affrontement Est-Ouest au cours duquel l'arme chimique aurait pu être employée de façon massive. La ratification par de nombreux états de la convention d'interdiction des armes chimiques et son entrée en vigueur au printemps 1996 marque une étape importante dans l'éradication des armes. Pourtant la menace persiste. Le conflit entre l'Iran et l'Irak a en particulier été marqué par l'utilisation stratégique d'armes chimiques, par l'armée irakienne, comme l'ypérite (gaz moutarde) et les organophosphorés. D'importants stocks d'armes chimiques ont été détruits en Irak depuis la fin de la guerre du Golfe, mais ils en restent sans doute encore. Des stocks considérables existent encore aux Etats-Unis et en Russie. En Russie notamment, leur destruction trop lente fait peser un risque de dissémination, d'autant que les structures étatiques du pays sont fragilisées. Le risque de prolifération dans certain pays est également à prendre en compte sérieusement. Enfin, les risques chimiques industriels s'ajoutent aux risques auxquels les troupes françaises, appelées à intervenir hors métropole, sont susceptibles d'être confrontées. On ne peut exclure enfin le risque d'attentats chimiques frappant les populations civiles au cœur même du pays.

Parmi les toxiques de guerre, les organophosphorés demeurent les plus redoutables agents létaux. Ils pourraient être utilisés dans des conflits armés ou lors d'actes de terrorisme : les attentats perpétrés par la secte Aum en 1994 à Matsumoto et dans le métro de Tokyo en sont des exemples marquant.

Les choses semblent évoluer puisqu'en 1993 à Paris, 130 nations signent une convention d'interdiction des ces armes. Cette convention propose l'interdiction de la mise au point, de la

fabrication, du stockage et de l'emploi des armes chimiques et impose entre autre, la destruction de tout arsenal et produit en vrac. Les états en accord avec cette convention s'engagent à démanteler leur armement dans les dix ans suivant leur signature. L'entrée en vigueur de cette convention est intervenue le 29 Avril 1997 puisque 89 pays ont ratifié cet accord d'éradication des armes chimiques. Toutefois, ces armes risquent de représenter pendant de longues années encore, une menace pour certains pays et populations. En effet, de nombreux obstacles restent à surmonter pour parvenir, d'une part, à la destruction des stocks existants, et d'autre part, à contrôler et vérifier que certains pays ne parviennent pas à contourner les dispositions du traité (FROMENT, 1996 ; JACQUEMET, 1997).

Les risques demeurent donc toujours. Selon les estimations, treize pays disposeraient d'un arsenal chimique ou biologique. Cinq inquiètent particulièrement l'Office of Technology Assessment, organisme du Congrès américain chargé de l'évaluation des menaces liées à la technologie : l'Iran, l'Irak, la Libye, la Syrie et la Corée du Nord. L'Irak détiendrait 8 000 litres de solution d'anthrax, 19 000 litres de toxines botuliques, de l'aflatoxine, de l'ypérite et des gaz neurotoxiques. La Chine aurait tissé un réseau de distribution d'armes chimiques vers au moins trois pays dont l'Iran. Plus grave, des munitions chimiques issues des stocks de l'armée soviétique sont disponibles au marché noir dans six pays dont la Turquie et l'ex-Yougoslavie.

Aucune ville en France n'est aujourd'hui capable de faire face à un attentat chimique ou biologique. Face à un attentat chimique qui pourrait se solder par des milliers de victimes, l'ensemble des chaînes de décontamination disponibles dans l'hexagone ne permettrait de traiter qu'environ 400 personnes à l'heure : le nombre de masques de protection contre les vapeurs toxiques destinés aux victimes est insuffisant. Il en est de même pour les stocks d'antidotes dans le cas où ceux-ci existent ! Aucune station de métro ne dispose de détecteur de gaz toxique. D'après une étude menée en 1997 à Paris par la sécurité civile, la RATP mettrait trente minutes à donner l'alerte en cas d'attentat chimique ; un temps largement suffisant pour que les 292 ventilateurs géants du réseau diffusent un peu partout l'air empoisonné et que les personnes contaminées s'éparpillent. Le drame est qu'une victime qui se croit indemne, mais dont les vêtements ont été touchés par une seule micro-goutelette d'un neurotoxique, peut contaminer au moindre contact ceux qu'elle croise dans la rue, puis ses proches en rentrant chez elle (LABBE, 1998).

Il faut noter qu'une telle situation serait le cauchemar des sauveteurs de par la difficulté d'organisation des secours et des structures d'urgence à mettre en place mais également parce qu'ils seraient les secondes victimes d'un tel acte. En effet, les études menées par les Japonais après les attentats au gaz sarin survenus dans leur pays en 1994, ont montré que les sauveteurs et les médecins arrivés sur les lieux sans masque à gaz et sans procédure de décontamination, ont subi une contamination secondaire de l'ordre de 20% (OHBU, 1997).

#### 4-2) Les agents létaux neurotoxiques organophosphorés :

##### a) Présentation :

Il faut distinguer deux types de produits : les agents G et les agents V. Ce sont tous des composés inhibiteurs des cholinestérases. Tous ces produits sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques. Ces produits sont extrêmement toxiques, ce qui en font des armes redoutables, aussi bien sur le plan physique que psychologique.

Le tableau ci-dessous résume les données de toxicité des principaux composés organophosphorés d'usage militaire :

AGENTS	CtL <sub>50</sub> (mg / min.m <sup>3</sup> )	CtI <sub>50</sub> (mg / min.m <sup>3</sup> )	Ct <sub>50</sub> (mg / min.m <sup>3</sup> )	DL <sub>50</sub> (percutanée) (mg /h)
Tabun	200 - 400	300	2,5	1000
Sarin	100	75	1,0	1700
Soman	50 - 70	inconnue	< 1,0	50
VX	10 - 50	35	0,04	10

- Ct: produit de la concentration du toxique dans l'air par la durée d'exposition
- CtL<sub>50</sub>: Dose létale 50% par inhalation
- CtI<sub>50</sub>: Dose incapacitante 50% par inhalation
- Ct<sub>50</sub>: Dose minimum provoquant un effet chez 50% des sujets
- DL<sub>50</sub>: Dose létale 50% par voie percutanée, pour un homme de 70 Kg

Tableau V : Toxicité des neurotoxiques de guerre (DORANDEU, 1998)

- Les agents G sont des esters de dérivés des acides fluorophosphorique ou cyanophosphorique. Ce sont des liquides suffisamment volatils pour être utilisés sous forme d'aérosols. Ils agissent donc par voie respiratoire. Cependant ils peuvent avoir une action par voie percutanée (tabun et sarin). La destruction de ces produits par simple hydrolyse, explique que ces toxiques sont de type non persistant. Ils sont mis en place par des tirs d'artillerie percutants.

- *Le Tabun* (GA) ( ou diméthylaminocyanophosphate d'ethyle) est un liquide allant de l'incolore au brun foncé.

- volatilité à 25°C: 612 mg/m<sup>3</sup>
- odeur: d' aucune à fruité.
- point d'ébullition: 240°C
- point de fusion: - 49°C
- densité de vapeur: 5,63 / air

- *Le Sarin* (GB) ( ou méthylfluorophosphonate d'isopropyle) est un liquide incolore et inodore.

- volatilité à 25°C: 17 000 mg/m<sup>3</sup>
- point d'ébullition: 147°C
- point de fusion: - 36°C
- densité de vapeur: 4,8 / air

- *Le Soman* (GD) ( ou méthylyfluorophosphonate de pinacolyl) est un liquide incolore.

- volatilité à 25°C: 3 000 mg/m<sup>3</sup>
- odeur: de fruité à camphré
- point d'ébullition: 167°C
- point de fusion: - 70°C
- densité de vapeur: 6,3 / air

- Les agents V sont quant à eux des esters de l'acide thiophosphorique appartenant à la famille des pesticides Amitons. Ces agents sont des liquides peu volatils dont l'utilisation vise une pénétration percutanée principalement. Ces agents présentent du fait d'une moindre volatilité par rapport aux agents G, une plus grande résistance à l'hydrolyse. Ce sont donc des agents

persistants. Ils sont mis en place par des tirs d'artillerie fusants ou par épandage aérien à faible altitude.

- A<sub>4</sub> (VX) ( ou méthylthiophosphonate de O ethyle et S [(β diisopropylamino)éthyl]) est un liquide incolore et presque inodore.

- densité de vapeur: 9,2
- volatilité à 20°C: 8 à 10 mg/m<sup>3</sup>
- point d'ébullition: 300°C
- point de fusion: - 39°C

- A<sub>2</sub> (ou thiophosphate de O,O diéthyl et de S [ (β diéthylamino)éthyle] ) est un liquide allant de l'incolore au sabré.

- densité de vapeur: 9,3
- point d'ébullition: 110°C

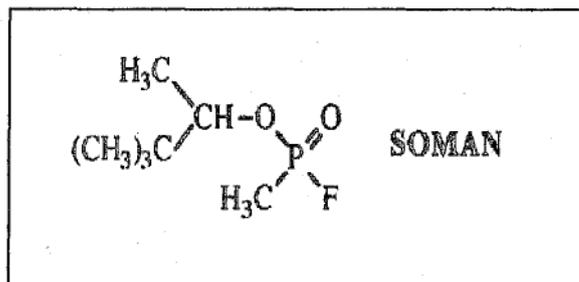
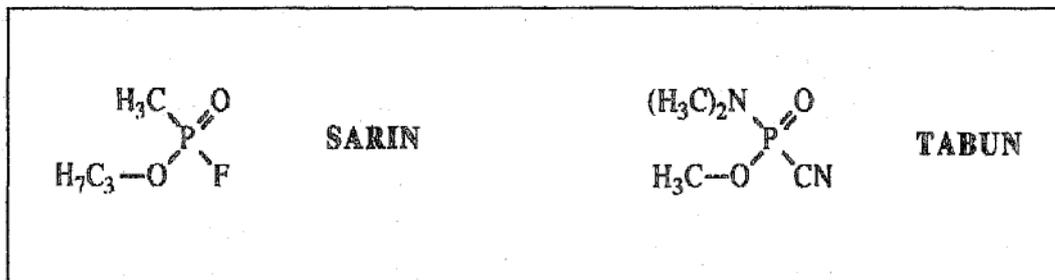


Schéma n° 8 : Formules chimiques

b) Effets cliniques : (BLANCHET, 1995)

Les symptômes résultent d'une importante accumulation d'acétylcholine. Ces symptômes varient selon la dose absorbée et le type de produit concerné. Ils apparaissent dans un délai allant de quelques minutes à deux ou trois heures. Leur durée s'échelonne de quelques heures à neuf jours. Dans le cas d'une intoxication fatale, le délai qui sépare du décès varie de moins de cinq minutes à 24 heures, en fonction de la voie d'introduction, de la nature et de la quantité du toxique. Des symptômes localisés à l'endroit de l'exposition peuvent être constatés en l'absence de signe d'absorption systémique.

L'intoxication aiguë est caractérisée par deux grands syndromes :

- un syndrome respiratoire et
- un syndrome convulsif d'origine périphérique et/ou centrale, dont l'apparition est toujours de mauvaise augure.

La mort survient par paralysie respiratoire.

c) Traitements : (BLANCHET, 1995)

La France comme la plupart des autres pays, a mis au point un traitement d'urgence à la disposition des soldats. Il consiste en une seringue auto-injectable à trois compartiments. Cette seringue contient du sulfate d'atropine (2 mg), du méthylsulfate de pralidoxime (350 mg) et du diazépam (7,5 mg). L'injection est renouvelée 10 minutes plus tard en cas de persistance des symptômes de l'intoxication. Ce traitement du premier quart d'heure a pour but de lutter contre la toxicité aiguë des agents neurotoxiques et vise donc à améliorer le pronostic vital. Ce traitement précède l'évacuation vers un centre médicalisé où la suite du traitement classique sera effectuée (décontamination et stabilisation du patient). Ce traitement de l'urgence est laissé à l'initiative du combattant, ce qui sous-entend que celui-ci a été formé d'une part à l'usage de la seringue qu'il s'injecte dans la cuisse à travers sa tenue de soldat, et d'autre part à la reconnaissance des signes de l'intoxication (rhinorrhée, salivation...).

Sur ordre du commandement et à titre préventif, les soldats évoluant dans un secteur à risque, seront pré-traités à la pyridostigmine.

En effet, ce carbamate est capable d'inhiber environ 30 % des cholinestérases après la prise pour une posologie de 3 comprimés de 30 mg par jour. Cette inhibition est réversible spontanément ou peut être facilement levée par l'administration d'une oxime. Si la victime a été au contact du soman, on conçoit qu'il restera au moins 30 % d'activité enzymatique "récupérable".

L'ensemble de ces traitements présente toutefois certaines limites sur les convulsions.

De nombreuses études expérimentales montrent que des associations du type carbamate / atropine + oxime sont efficaces au plan de la survie pour des doses de neurotoxiques correspondant à plusieurs fois la dose létale 50 %. Mais ces associations n'offrent aucune protection contre les crises convulsives. Or nous savons que ces crises s'accompagnent de lésions cérébrales qui entraîneraient chez les survivants des déficits moteurs ou cognitifs très invalidants. C'est la raison pour laquelle on doit impérativement inclure une molécule anticonvulsivante dans la thérapeutique.

L'incidence de la pyridostigmine et de la pralidoxime (deux agents antilétaux efficaces) sur les décharges électriques cérébrales est nulle car ces composés ne sont pas capables de franchir la barrière hémato-encéphalique.

Celle de l'atropine est très réduite pour deux raisons :

- cette molécule pénètre assez lentement dans le cerveau, bien plus lentement que les organophosphorés,
- la concentration cérébrale d'atropine qui résulte de l'injection de deux seringues auto-injectables actuelles (2 x 2 mg) est inférieure à la concentration thérapeutique anticonvulsivante.

Reste le diazépam (2 x 7,5 mg). Pour des raisons de pharmacocinétique, la voie intramusculaire n'est pas recommandée dans l'état de mal épileptique. Dans la mesure du possible, les produits doivent être administrés uniquement par voie intraveineuse. L'injection intramusculaire, dictée par l'urgence, est certainement un handicap. Néanmoins, le diazépam est une benzodiazépine qui, une fois dans le torrent circulatoire, pénètre facilement le cerveau.

Un autre problème est lié à la nature du produit. En raison de sa forte liposolubilité, le diazépam est rapidement redistribué dans les autres tissus gras, ce qui entraîne une chute

rapide des concentrations cérébrales et sériques. Par conséquent, l'état de mal épileptique peut récidiver si seul le diazépam est utilisé pour arrêter les convulsions.

D'autres molécules doivent donc être recherchées dans l'anticonvulsion. De par ses propriétés intrinsèques et parce qu'elle franchit facilement la barrière hémato-encéphalique, l'huperzine A pourrait être l'une de ces molécules.

*Remarque* : Complément d'informations en annexes :

- Les agents chimiques toxiques d'usage militaire
- L'intoxication par les organophosphorés

**TROISIÈME PARTIE :**

### III – L'HUPERZINE A :

Parmi les anticholinestérasiques dont le développement s'inscrit dans l'approche cholinergique de la thérapeutique de la maladie d'Alzheimer, de nouvelles molécules sont apparues récemment. Parmi les molécules d'origine végétale figure l'huperzine A. Cette drogue a été extraite d'un lycopode d'origine chinoise nommée *Lycopodium serratum* en 1980, mais connue sous le nom de *Huperzia serrata* (Thumb) Trev aujourd'hui. La plante était connue depuis des siècles dans la médecine traditionnelle chinoise pour ses capacités promnésiantes, d'où l'intérêt que la recherche scientifique lui a porté depuis bientôt vingt ans.

La molécule présente donc une activité inhibitrice des cholinestérasas et présente un bon potentiel dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. L'huperzine A pourrait de plus s'avérer posséder des capacités neuroprotectrices, rendant cette molécule intéressante dans la prévention des intoxications aux composés organophosphorés.

#### 1) De la médecine traditionnelle chinoise à l'huperzine A :

##### 1-1) Introduction:

Pourquoi s'intéresse-t-on aujourd'hui à d'autres cultures médicales après tant d'années d'autosatisfaction occidentale ?

En fait, les difficultés rencontrées par nos industries pharmaceutiques à développer de nouvelles molécules sont telles, aussi bien sur le plan technique que financier, que celles-ci s'orientent de nouveau vers la prospection de drogues d'origine naturelle. Cette voie avait été en effet négligée au profit d'une chimie fine et de technologie de pointe.

On a pu assister à un échec partiel du drug-design par exemple, qui a montré que les drogues de synthèse ne parvenaient pas toujours à reproduire les effets curatifs des produits naturels (ZHU, 1996). De plus, encore aujourd'hui, seule la nature et ses millions d'années d'évolution, sont capables d'élaborer des structures chimiques très complexes et variées, telles que le sont

celles des métabolites secondaires. Nos industries occidentales ont donc un regain d'intérêt vers les plantes aujourd'hui.

1-2) Apport de la phytothérapie dans la médecine traditionnelle chinoise: (GUILLAUME, 1991)

Selon une statistique de 1984, il existe plus de 300 000 praticiens de médecine traditionnelle chinoise (MTC) en Chine. Plus de 1100 hôpitaux, 23 collèges et 46 instituts de recherche sont consacrés à la MTC. Plus 95 % des hôpitaux de médecine occidentale possèdent des départements de MTC. Ces quelques chiffres montrent à quel point la MTC conserve une place importante dans le système de santé chinois qui en font, avec l'Inde, le premier pays pour l'exercice de la médecine traditionnelle.

La MTC, trésor d'expérience clinique encore incomplètement exploité par la recherche moderne, s'est continuellement développée, en théorie comme en pratique, pendant les deux mille ans passés et est encore utilisée à vaste échelle à coté de la médecine dite occidentale comme nous venons de le voir. Ses méthodes thérapeutiques qui tendent à augmenter les défenses naturelles de l'organisme, à restaurer ses fonctions normales, offrent un vaste champ d'investigations à la recherche chinoise sur les médicaments. Elle n'en est encore qu'à ses débuts, et sa tentative de combiner harmonieusement la médecine traditionnelle et la médecine occidentale moderne offre des perspectives encourageantes. L'expérience traditionnelle des plantes médicinales, accumulée, depuis des siècles, sert de base fondamentale à la recherche de nouveaux médicaments dans la Chine moderne.

Ce qu'on appelle pharmacopée chinoise traditionnelle, c'est l'ensemble des substances médicinales issues de produits naturels, au premier rang desquels se situent les herbes médicinales. En raison de l'immensité du territoire chinois qui recouvre plusieurs nationalités, les remèdes peuvent être classés, selon leurs différents usages, en trois catégories principales :

- les *remèdes chinois traditionnels* "Zhong Yao" dont l'emploi répond à des règles spécifiques, énoncées dans la MTC,
- les *remèdes des minorités nationales* "Min zu yao" utilisés par les médecins du Tibet, de la Mongolie... dont la diffusion reste bien souvent limitée à certaines régions,

- les *remèdes populaires* "Cao yao" d'usage souvent empirique, dont les prescriptions peuvent être tenues secrètes et se transmettent dans les familles.

Au moins 80 % de la pharmacopée est d'origine botanique. Une évaluation a identifié plus de 4800 espèces de plantes qui possèdent une valeur thérapeutique. Elles se distribuent de la manière suivante :

- Thallophytes:	230
- Bryophytes	39
- Ptéridophytes	382
- Gymnospermes	55
- <i>Angiospermes:</i>	
Dicotylédones	3495
Monocotylédones	676

Dans le tableau suivant nous citons les familles botaniques qui comportent plus de 100 espèces médicinales :

Familles	Espèces	Genres
Compositae	331	89
Leguminosae	313	91
Renonculaceae	208	31
Labiataeae	189	46
Liliaceae	165	45
Rosaceae	146	28
Orchidaceae	135	45
Umbelliferae	123	34
Rubiaceae	118	35
Euphorbiaceae	104	30
Asclepiadaceae	101	29

**Tableau VI :** *Familles botaniques de la pharmacopée chinoise (GUILLAUME, 1991)*

### 1-3) Notions de médecine traditionnelle chinoise: (GUILLAUME, 1991)

Partie intégrante de la MTC, la phytothérapie ne peut se comprendre sans pénétrer quelque peu la conception chinoise de l'homme, imprégnée de taoïsme et de confucianisme, comme nous le montre l'étude des textes classiques. Nous allons donc développer quelques notions de MTC pour mieux situer notre molécule.

La théorie des oppositions est la base de toute la MTC, et de la philosophie de la vie en général chez les Chinois. Cette théorie est plus connue sous le nom de "Yin-Yang", formule de toutes les alternances dont est faite l'existence. Les jeux d'influences que se livrent les deux principes, le Yin et le Yang, dominantes à tour de rôle, commandent le comportement de tous les êtres. Le Yin, principe de l'ombre, du froid, et de la féminité invite au repli, au repos et à la passivité. Au contraire, le Yang, principe de la lumière, de la chaleur et de la masculinité invite l'individu au déploiement des énergies, à l'activité, voire à l'agressivité.

Derrière les mouvements de la naissance et de la mort, il y a une force qui préside, de l'ordre de l'invisible, que les Chinois nomment Dao. Le Dao est à la fois le principe sans nom et sans forme de l'univers, et la voie selon laquelle va l'univers, est de l'ordre de l'indicible. Appliqué à la médecine le Dao exprime l'ensemble des mouvements ordonnés de la vie.

La vie est fondamentalement mouvement. C'est grâce à ce mouvement qu'il y a des êtres et de la vie. Ce mouvement est rendu par l'alternance du Yin et du Yang.

#### - Les souffles constitutifs de l'être:

Le but de la MTC réside dans l'étude du "principe vital" à l'origine de la vie.

Le ternaire "Shen, Qi, Jing", préside à la création et à la permanence de toute existence.

- Shen:           - Principe de la vie: un agrégat matériel devient un être vivant.
- Force élaboratrice et transformatrice de la vie.
- Ils appartiennent aux instances psychiques de l'individu.
- Ils sont liés à des organes particuliers: foie, poumons, rate, reins, cœur.

- **Jing:**
  - Quintessence sur laquelle se fonde toute structure (air, aliments), et toute existence (les parents).
  - Matériau du liquide spermatique.
  - Réside dans les reins.
  
- **Qi:**
  - Energie ou souffle.
  - Concerne toute l'animation et la structure de l'être.
  - Le corps et ses fonctions ne sont qu'une seule entité englobées sous cette dénomination.

La MTC est fondée sur la notion d'énergie ou souffle. Ce souffle est un mécanisme subtil qui préside à l'éclosion de la vie et de ses manifestations. Le dérèglement des souffles est à l'origine des pathologies. La pharmacopée et l'acupuncture ont pour but de réguler et d'harmoniser ces souffles pour rétablir l'équilibre nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme.

- Les viscères:

Contrairement à notre médecine, les viscères ne sont pas des entités anatomiques. Seule la notion de fonction est prise en compte dans la culture chinoise. La MTC se chargera donc d'influencer les relations entre ces viscères. On distingue plusieurs types de viscères :

- **organes:** viscères pleins, thésaurisent les souffles et les essences. Ce sont donc un lieu de stockage (cœur, poumon, foie, rate, rein).
  
- **entrailles:** viscères creux, lieux de passage et de transformation, par opposition aux précédents (estomac, gros intestin, intestin grêle, vésicule biliaire, vessie, triple réchauffeur).
  
- **entrailles curieuses:** elles sont curieuses en ce sens que ce sont des entrailles qui assurent des fonctions d'organes (cerveau, moelle, os, les vaisseaux, la vésicule biliaire et l'utérus.)

- les méridiens:

Ils permettent les relations entre les différentes parties du corps. Le système des méridiens coordonne et régule toutes les fonctions de l'organisme, en son sein et avec le milieu extérieur. Les activités physiologiques, les pathologies, le diagnostic et la thérapeutique dépendent de ces relations.

Ce sont des vecteurs immatériels d'énergie, organisateurs et lieux de résonance de toutes les activités du corps. Il existe douze méridiens principaux qui correspondent en fait aux lignes sur lesquelles on retrouve les points d'acupuncture. C'est donc par ces méridiens que vont transiter les souffles.

- Etiopathologie en MTC:

La libre circulation des souffles (résultant d'un parfait équilibre du Yin et du Yang) définit la notion de santé en MTC. Tout dérèglement dans cette circulation est à la base de la pathologie, en créant un déséquilibre entre le Yin et le Yang. Cette circulation peut être entravée par différents facteurs :

facteurs d'origine interne:

*les sept sentiments:*

- joie
- colère
- soucis
- pensée
- tristesse
- peur
- effroi

*les productions pathogènes:*

- glaires
- phlegmes
- amas de sang
- produits anormaux dérivant d'un dysfonctionnement des viscères.

facteurs d'origine externe: (les six souffles)

- |           |             |
|-----------|-------------|
| -vent     | -froid      |
| -humidité | -sécheresse |
| -chaleur  | -feu        |

facteurs d'origine ni interne ni externe:

- |                            |                       |
|----------------------------|-----------------------|
| -erreurs alimentaires      | -fatigue et surmenage |
| -blessures et traumatismes | -parasitoses          |
| -brûlures....              |                       |

Il existe de plus une énergie perverse qui vient déséquilibrer le passage des souffles et qu'il faut éliminer. Au contraire, l'individu possède une énergie orthodoxe qui lui est donnée à sa naissance et qui va décroître jusqu'à sa mort à une vitesse plus ou moins grande, ce qui va définir sa longévité. Il lui faudra la préserver.

L'intensité de la lutte entre ces deux énergies définit la gravité des symptômes de la maladie.

- Les traitements:

Ils reposent sur des "ordonnances" de plantes adaptées aux différents types de maux. Le médecin traditionnel chinois, après avoir identifié les troubles touchant son patient, prescrit une "ordonnance" connue pour agir sur le mal déterminé.

exemple: "Ordonnance qui régularise le sang" → Décoction "Si Wu Tang"

- composition: *Rehmania glutinosa, Angelica sinensis, Ligusticum wallichii, Paeonia lactiflora.*

- propriétés: nourrit et tonifie le sang, régularise sa circulation. Elle harmonise le sang, élimine la stagnation, arrête les hémorragies.

- Indications: menace d'avortement, hémorragies utérines, ménorragies.

1-4) Approche de la démence en médecine traditionnelle chinoise: (DHARMANANDA, 1996)

- Généralités:

En accord avec les idées fondamentales de la médecine chinoise, le cerveau est une excroissance de l'organisme qui est nourrie par les reins. De ce fait, toutes les déficiences cérébrales, les détériorations neuronales peuvent être prévenues, limitées ou stoppées par l'ingestion de toniques rénaux. Les agents nourrissants riches, comme les extraits de placenta ou les essences astringentes pour les reins, comme celles d'*Astragalus* ou de *Polygonatum*, sont fréquemment recommandées pour améliorer les troubles cérébraux.

Les fonctions cognitives d'autre part, sont régulées par le cœur : "les reins fournissent les substances et le cœur régule l'activité". La mémoire, la connaissance et la sagesse seront altérées si le cœur est agité ou s'il existe un blocage des orifices connectés au cœur ou au cerveau, par un phlegme obstruant les canaux. Les herbes *Zizyphus*, *Polygala* ou *Acorus* sont considérées comme importante pour traiter les désordres cardiaques affectants la mémoire et la connaissance. Les ordonnances tonifiant le Qi, le cœur et les reins sont aussi utilisées.

- 1637 / Zhang Jingyue:

Au XVII<sup>ème</sup> siècle ce médecin chinois consacra un chapitre entier à la démence dans un de ses ouvrages. Pour lui la démence est le résultat d'un collapsus dans le qi originel et de la présence d'un qi impur dans les méridiens et les orifices du cœur. Il propose une formule pour restaurer l'équilibre du qi (*Qi Fu Yin*). Celle-ci est composée de *Ginseng*, de *Rehmannia* cuite, de *Zizyphus*, de *Polygala*, et de *Licorice* cuit. Ces herbes ont pour but d'éliminer les phlegmes qui bouchent les orifices.

- 1690 / Chen Shiduo:

Pour ce médecin, la démence provient de la dépression du qi du foie, occasionnée par des problèmes émotionnels. Cette dépression conduit à l'épuisement du qi de l'estomac. Il en

résulte que les aliments mal digérés produisent des phlegmes obstructifs. Pour lui, "traiter le phlegme c'est traiter la démence". Pour y parvenir il faut tonifier le foie et la rate. L'auteur propose donc plusieurs formules d'herbes (*Su Xin Tang*) comprenant le plus souvent : *Ginseng*, *Gardénia*, *Zizyphus*, *Aconit*, *Coptis*, *Pinellia*...

- fin XIX<sup>ème</sup> siècle / Wang Qingren:

Pour cet auteur, la démence provient d'un vide de matière dans la moelle et le cerveau en plus d'une stagnation de sang bouchant les orifices. Il propose également une formule à base d'herbes comprenant : persil, oignon, musc, jujube, pivoine. Du vin de riz est ajouté à l'eau pour la préparation d'une décoction.

- après 1950 / ère moderne:

Les changements dégénératifs des tissus sont traités par des herbes qui activent la circulation sanguine (sauge, *Carthamus*) et des toniques des organes déficients. Le cerveau est traité par des tonifiants des reins et du qi (*Rehmania*, *Ginseng*).

#### 1-5) L'hyperzine A dans la médecine traditionnelle chinoise:

La plante *Huperzia* n'est que très peu utilisée dans la médecine chinoise en temps qu'herbe crue. Une de ces applications principales réside dans le traitement des troubles sanguins causés par un traumatisme ou une affection aiguë (hématomèse de fatigue, contusions, hémorroïdes, abcès pulmonaires). La plante est également utilisée pour traiter la tension artérielle, l'hématurie, les enflures, et améliorer la mémoire. L'utilisation la plus surprenante d'*Huperzia serrata* en Chine est le traitement des fièvres et de l'inflammation, alors que les composés de cette plante sont dénués de toute activité antipyrétique et anti-inflammatoire. En plus des alcaloïdes, la plante contient des triterpènes qui pourraient avoir une action sur ces types de maux, ce qui pourrait expliquer la large plage d'utilisation de cette plante.

La plante d'origine se trouve en Chine sous le nom "Qian Ceng Ta", signifiant "pagode aux mille marcottes", en référence à l'apparence du lycopode. Cette plante est également connue

sous le nom de "Jin Bu Huan", signifiant "plus précieux que l'or", habituellement attribué aux plantes qui ont des actions analgésiques puissantes.

Remarque: Cette herbe ne doit pas être confondue avec un produit breveté en Chine, nommé "Jin Bu Huan", et qui est fabriqué à partir de tétrahydropalmatine.

L'utilisation potentielle de cette plante dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et des démences en général n'a été effectuée que récemment, avec la découverte de l'activité inhibitrice des cholinestérases de l'huperzine A, au début des années 1980. Depuis, la molécule a été utilisée en Chine pour les traitements de la myasthénie à une large échelle. Aux USA, la plante à l'état brut a été intégrée dans un produit diététique recommandé pour les troubles de la mémoire ; elle est donc disponible sur le marché depuis cette année. Il faudra toutefois attendre quelques années encore, avant de voir l'huperzine A transformée en médicament indiqué dans la maladie d'Alzheimer, puisque la molécule est en cours d'essais cliniques en Chine et aux USA.

Remarque : D'autres plantes chinoises contiennent des alcaloïdes possédant une activité inhibitrice des cholinestérases (DHARMANANDA, 1996) :

- *Lycoris radiata* (shisuan):

Cette plante de la famille des Amaryllidacées contient plusieurs alcaloïdes dont :

- lycorine
- lycoramine
- lycoréine
- galanthamine

La lycoramine et la galanthamine ont montré une activité inhibitrice des cholinestérases de type réversible. La lycoramine présente une activité plus faible que la galanthamine.

La galanthamine passe très facilement la barrière hémato-encéphalique. Elle décroît l'activité cholinestérasique dans le cortex cérébral et à fort dosage, cette propriété s'étend au thalamus.

La lycorine possède une action sédatrice marquée chez la souris et le rat, et elle prolonge la durée du sommeil chez les animaux traités avec du pentobarbital. Cette lycorine pourrait également potentialiser le pouvoir analgésique de la morphine.

**- *Macleaya cordata* (boluohui):**

Cette plante de la famille des Papavéracées contient plusieurs alcaloïdes dont :

- sanguinarine
- chelerythine
- protopine
- allocryptopine

Ces alcaloïdes sous forme de sulfates possèdent une action anesthésique plus puissante que celle de la procaine.

La sanguinarine inhibe les cholinestérases.

Cette herbe est également utilisée couramment pour traiter les infections bactériennes ou à trichomonas, et elle possède une action vermifuge. Les alcaloïdes provoquent l'excitation puis la paralysie et la mort des larves.

**- *Coptis chinenses* (huanglian):**

Cette plante de la famille des Renonculacées contient plusieurs alcaloïdes :

- berbérine
- coptisine
- worénine
- palmatine
- columbamine

La berbérine est un inhibiteur des cholinestérases. Cet alcaloïde exerce un effet dose-dépendant sur l'acétylcholine chez l'animal et leurs organes isolés. La berbérine antagonise la bradycardie, et la dépression du segment ST, induite par l'acétylcholine, chez le lapin. La tétrahydroberbérine, un dérivé de la berbérine, possède une activité analgésique, sédatrice, et

provoque la relaxation musculaire, avec un effet trois fois plus puissant que celui du méprobamate.

- *Berberis sp. (sankezhen)*:

Nombre de plantes issues de la famille des Berbéridacées sont des sources de berbérine mais également de :

- berbamine
- palmatine
- isotetrandrine
- jatrorrhizine

La palmatine est connue pour avoir une activité anticholinestérasique puissante. L'isotetrandrine antagonise les contractions iléales induites par l'acétylcholine ou l'histamine. La jatrorrhizine réduit l'activité spontanée des souris et prolonge le sommeil induit par le pentobarbital chez cet animal.

- *Securinega suffruticosa (yiyiqiu)*:

Cette plante de la famille des Euphorbiacées contient beaucoup d'alcaloïdes, dont la sécurinine et ses dérivés. La sécurinine est un stimulant du système nerveux central qui antagonise l'action inhibitrice du méprobamate. Cet alcaloïde présente une activité inhibitrice des cholinestérases mais cette dernière est plus faible que celle de la galanthamine.

- *Solanum nigrum (longkui)*:

Cette plante de la famille des Solanacées contient de la solanine et de la salasodine, ainsi que d'autres alcaloïdes. La salasodine réduit la sensibilité à la douleur chez l'animal. La solanine réduit l'activité spontanée des souris et prolonge le sommeil induit par le pentobarbital chez cet animal. La solanine possède en outre une puissante activité anticholinestérasique qui est attribuée à son aglycone solanidine.

## 2) l'huperzine A:

### 2-1) Origine:

#### a) Les lycopodes: ( BONNIER, 1990)

Les plantes de la famille des Lycopodes sont dépourvues de fleurs. Ce sont des plantes herbacées à tiges plus ou moins longuement rampantes, rameuses et le plus souvent fourchues, à rameaux redressés, à racines plus ou moins ramifiées en fourches. Les tiges sont rameuses et couvertes de nombreuses petites feuilles sans pétiole, insérées en spirale et étroitement imbriquées. Les feuilles supérieures, souvent différentes et formant alors une sorte d'épi, portent à la base et en dessus, un sac ou sporange qui s'ouvre en plusieurs valves (2 à 4 suivant les espèces). Les sporanges sont soit tous semblables et les prothalles issus de la germination des nombreuses spores produisent ensemble les organes reproducteurs (anthéridies et archégonies), puis une nouvelle plante, soit de deux sortes, les uns à nombreuses petites spores, et les autres à quatre grosses spores. Les prothalles nés des petites spores ne portent que des anthéridies, tandis que ceux qui proviennent des grosses spores donnent des archégonies et une nouvelle plante. On décrit environ 600 espèces dans cette famille qui croissent dans les deux hémisphères, dans les zones froides et tempérées, et notamment en altitude.

En Chine, mais également en Occident, les lycopodes étaient utilisés pour la propriété absorbante de leurs spores dans l'intertrigo par exemple, ou pour saupoudrer la peau des nourrissons pour éviter les gerçures. Toutefois, cette matière première a été remplacée depuis longtemps dans nos contrées! Les feuilles ont également été utilisées en infusion dans les médecines anciennes en Europe, comme diurétique, pour les troubles des reins et de la vésicule. Cependant, on ne sait toujours pas d'où provient cette activité (WICHTL, 1994).

- Classification: (CUSSET, 1997)

La division des lycophytes est composée par trois grands ensembles :

- les lycopodes,
- les sélaginelles,
- les isoètes.

Cette division regroupe environ 1300 espèces, avec un découpage en genres assez incertain. Elle correspond aux lycopodiales au sens large du terme. Ces espèces sont caractérisées par l'existence d'un sporange unique, à la base et dans le plan médian de chaque sporophylle, caractère rare chez les ptéridophytes. Leur ramification est peu fréquente et généralement pseudo-dichotome. Leur traces foliaires se rattachent à la stèle de la tige sans brèche foliaire.

- Les lycopodiopsides (= les lycopodes): (CUSSET, 1997)

Cette classe comprend près de 600 espèces, autrefois placées en un genre unique, *Lycopodium*. Actuellement, on reconnaît en plus de ce dernier, les genres *Lycopodiella*, *Diaphasiastrum*, *Huperzia* et un genre monospécifique dont on fait parfois une famille séparée : *Phylloglossum*.

Dans tous les cas, la germination de la spore aboutit à un prothalle. Si celui-ci se développe à la surface du sol, il sera chlorophyllien, au moins dans sa partie topographiquement supérieure. S'il reste endogé, il n'a pas de chloroplastes, mais possédera d'abondant leucoplastes. Il existe presque toujours un champignon endosymbiotique dans une zone périphérique du gamétophyte. Toutes les cellules sont identiques et il ne se différencie aucun tissu de conduction.

Ce prothalle a un développement et une vie très ralentie. Il faut parfois jusqu'à huit ans avant que la spore ne germe, et une quinzaine d'années avant l'apparition des premiers gamétanges. Moins il y a de tissu chlorophyllien, plus le développement est long. La première racine apparaît donc tardivement, à la base de la zone donnant la première feuille. Elle a une durée de vie très limitée et relayée par des racines adventives d'origine exogène - le rôle du champignon endosymbiotique est encore inconnu.

La croissance de la tige s'effectue par un méristème apical, pluricellulaire. La ramification est franchement latérale. La tige est toujours monostélisque et ne possède pas de cambium. Son diamètre reste constant pendant toute la vie du sporophyte, ce qui confère un aspect grêle à la plante.

Les feuilles restent de petite taille, inférieure à deux ou trois centimètres. Elles sont entières. Celles de la base de la tige sont sans nervures, les autres en possèdent une, qui est médiane. L'épiderme est pourvu de stomates sur les deux faces et le parenchyme, chlorophyllien, est lacuneux.

Les racines sont adventives, naissant sans disposition précise. Elles font un assez long parcours dans l'écorce de la tige avant d'en sortir. Encore dans l'écorce, elles se dichotomisent, ce qui épaissit l'extrême base de la "tige apparente".

Les cellules du xylème sont toutes des trachéïdes. Les sporanges naissent à l'aisselle de certaines feuilles (sporophylles), et par croissance intercalaire, sont souvent déplacées de façon à être, à l'état adulte, sur la face ventrale des sporophylles. Dans le genre *Huperzia*, toutes les feuilles sont susceptibles d'être des sporophylles ce qui permet leur différenciation des autres lycophytes.

Les sporanges proviennent d'un groupe de cellules formant rapidement un ensemble bistratifié. La strate supérieure donne la paroi du sporange. La strate interne fournit les cellules mères de sporanges qui se divisent en tétrade de spores. Les spores sont extrêmement nombreuses au moment de la déhiscence. On peut noter enfin que le nombre chromosomique dans le genre *Huperzia* est très élevé (*Huperzia selago* :  $n=264$ ).

#### **b) *Huperzia serrata*:**

- Embranchement des Ptéridophytes
- Classe des Lycopodiales
- Famille des Lycopodiacees
- Genre *Huperzia*

*Huperzia serrata* est donc un Chaméphyte herbacé de petite hauteur (5 - 25 cm). Ses tiges coriaces sont dressées, n'émettant des racines qu'à la base de la plante et bifurquant en branches d'égale longueur. Les feuilles, atteignant 8 x 12 mm sont nombreuses, vert foncé, petites,

simples, coriaces et aiguës au sommet. Des bulbilles qui naissent à la base des feuilles et se détachent aisément, assurent la multiplication végétative de la plante (PRELLI, 1992).

L'huperzine A est un alcaloïde de type quinolizidinique présent dans la plante *Huperzia serrata*. L'alcaloïde est retrouvé dans la tige et dans les feuilles de la plante. Cette plante renferme également d'autres alcaloïdes en C<sub>16</sub>-N<sub>2</sub> (flabellidanes) comme l'huperzine B, la lycodine, la serratinidine et probablement d'autres encore inconnus (BRUNETON, 1993). La plante contient 0,2 % d'alcaloïdes totaux. La plante contient enfin de faibles quantités de flavonoïdes, de l'acide caféique ainsi que des triterpènes (WICHTL, 1994). Des composés dont les structures chimiques sont proches de l'huperzine A ont été recensés à ce jour dans d'autres espèces de lycopodes, qui ont été de ce fait nommés huperzine C et D (LIU, 1994).

## 2-2) Caractéristiques:

### Identité de la molécule:

L'huperzine A a longtemps été différenciée d'un autre alcaloïde nommé sélagine, qui pourtant possède la même formule chimique et de nombreux points communs avec elle. Ce composé fut extrait à partir d'un autre lycopode (*Huperzia selago*, ex *Lycopodium selago*), en Pologne après la seconde guerre mondiale. La sélagine fut alors utilisée sous forme de collyre indiqué dans le traitement du glaucome, en remplacement de l'éserine et de la pilocarpine. Le mystère quant à l'identité de ces deux molécules a été levé il y a une dizaine d'années, grâce au perfectionnement des techniques analytiques : l'huperzine A et la sélagine ne sont qu'un seul et même composé (AYER, 1989) ! On peut donc penser que cette molécule est présente dans plusieurs espèces de lycopodes en quantité variable, puisque deux plantes sont désormais identifiées comme source de produit.

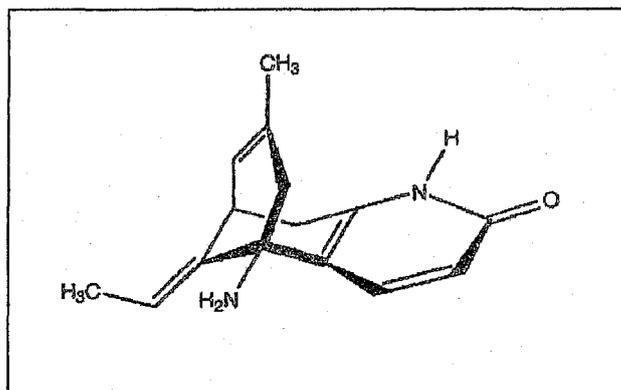


Schéma n° 9 : *Huperzine A*

(5R,9R,11E)-5-amino-11-ethylidene-5,6,9,10-tetrahydro-7-methyl-5,9-methanocycloocteno[b]pyridin-2(1H)-one

$C_{15}H_{18}N_2O$

C: 74,35 %; H: 7,49 %; N: 11,56 %; O: 6,60 %

- *Poids moléculaire:* 242 g

- L'huperzine A se présente sous la forme de cristaux légèrement jaunâtres et possédant une odeur de coniine. C'est une base amorphe qui se transforme en sels déliquescents.

- *pKa:* 7,18

- *Point de fusion:* 230°C

- *Pouvoir rotatoire:*  $[\alpha]_D^{20} = -150,4^\circ$  (c = 0,498; méthanol)

- *Spectre ultraviolet (éthanol):*

-  $\lambda_{\max} = 231$  nm (log  $\epsilon$ : 4,01)

-  $\lambda = 313$  nm (log  $\epsilon$ : 3,89)

- *Spectre infrarouge:* Quatre bandes principales :  $\nu_{\max}$  (KBr): - 3180  $cm^{-1}$

- 1650  $cm^{-1}$

- 1615  $cm^{-1}$

- 1550  $cm^{-1}$

(éléments de la monographie d'après LIU, 1986 & MERCK, 1989)

- Après une incubation de 48 heures à 24°C avec de l'acétylcholinestérase, l'huperzine A n'est pas dégradée, d'après des données de spectrophotométrie dans l'ultraviolet et d'HPLC couplée à la spectrométrie de masse. D'après ces mêmes données, la molécule n'est pas modifiée non plus, après incubation pendant 96 heures à 24°C dans l'acide chlorhydrique 0,1 N d'une part, ni dans l'hydroxyde de sodium 0,1 N d'autre part. La structure de l'huperzine A est donc d'une grande stabilité (ASHANI, 1992).

### **3) Extraction / Synthèses :**

#### **3-1) Extraction :**

L'extraction de l'huperzine A à partir d'*Huperzia serrata* se fait sur les parties aériennes de la plante sèche. L'herbe est réduite sous forme de poudre. La poudre est ensuite extraite par de l'éthanol à 95 %. Les alcaloïdes de types phénoliques sont alors éliminés par un traitement par une solution diluée d'hydroxyde de sodium. Le mélange d'alcaloïdes est porté sur une colonne contenant un gel basique de silice. L'élution de cette colonne se fait par un mélange chloroforme / méthanol.

Après évaporation de la solution éluante, on obtient un extrait sec brut. Ce dernier est recristallisé dans de l'acétone, pour obtenir enfin les cristaux d'huperzine A.

Le rendement de cette extraction est très faible puisqu'il s'approche de 0,2 ‰ (180 mg d'huperzine A par Kg de plante sèche). Cela explique alors la nécessité de développer une méthode de synthèse organique pour se procurer la molécule en quantité satisfaisante (LIU, 1986).

#### **3-2) Synthèses :**

##### **a) Synthèse racémique :**

La première synthèse totale de l'huperzine A sous forme de mélange racémique a été réalisée en 1989 par A.P. Kozikowski (XIA, 1989).

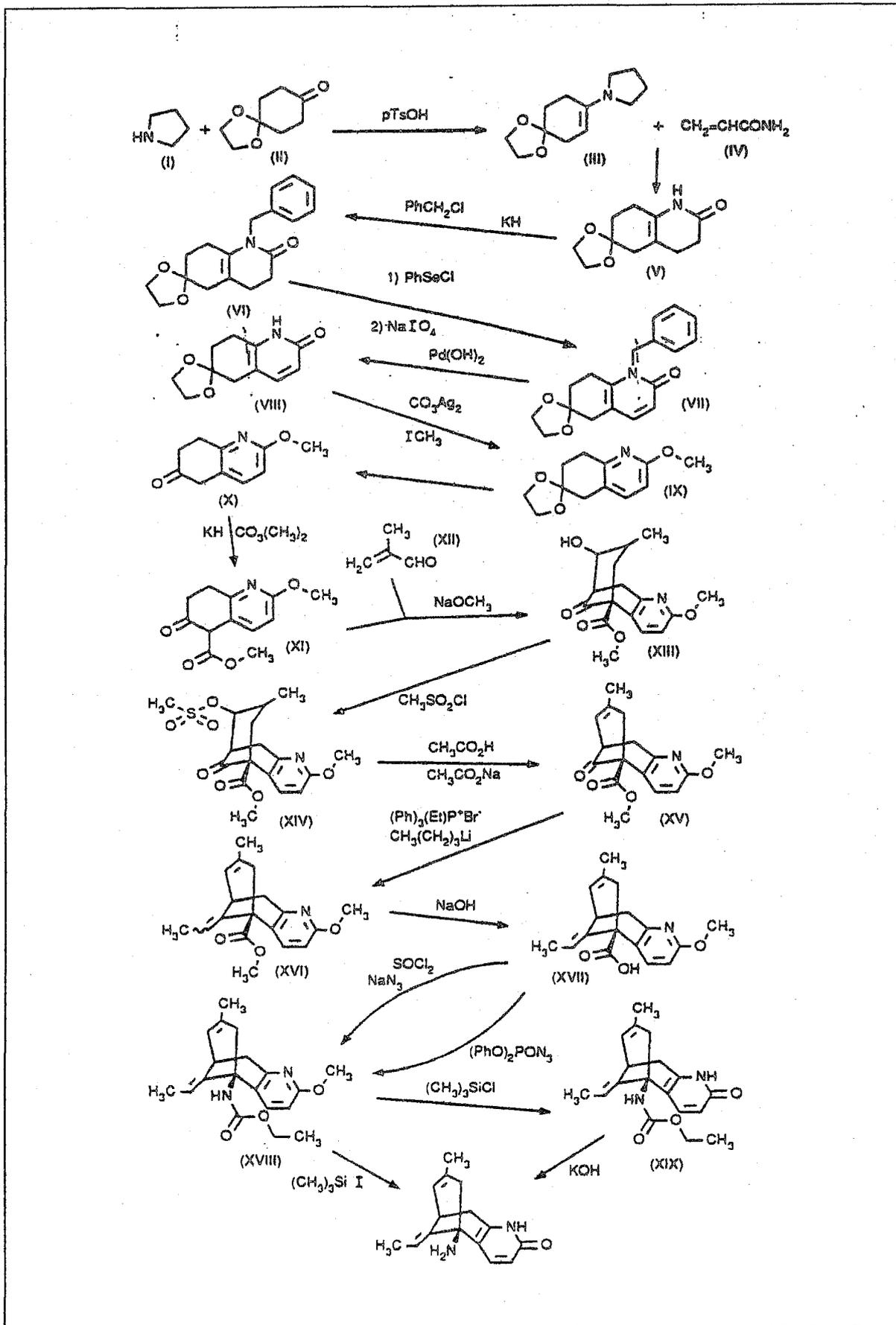


Schéma n° 10 : Synthèse chimique de l'huperzine A (XIA, 1989)

La réaction de la pyrrolidine (I) avec le cyclohexane-1,4 dione dont l'une des fonctions cétones est protégée (II) sous forme d'acétal, conduit sous l'action de l'acide paratoluène sulfonique dans du benzène sous reflux à l'énamine (III). Celle-ci subit ensuite une réaction de cyclisation à l'aide de l'acrylamine (IV) dans du dioxane sous reflux. On aboutit alors à la pyridone bicyclique (V).

La benzylation de (V) à l'aide du chlorure de benzyle et de l'hydrure de potassium dans du THF conduit au dérivé N-benzyl (VI) qui va être déshydrogéné sous l'action du chlorure de phénylsélénium, toujours dans le même solvant. Il subit ensuite l'action du périodate de sodium dans du méthanol sous reflux pour aboutir à la pyridone protégée (VII).

La débenzylation de (VII) à l'aide du dihydroxyde de palladium dans l'acide acétique donne la pyridone libre (VIII) qui va subir une réaction d'aromatisation avec l'iodure de méthyle et le carbonate d'argent. On obtient ainsi la 2-méthoxypyridine (IX).

La déprotection de (IX) par élimination du groupement cétal avec de l'acide chlorhydrique sous reflux donne la tétrahydroquinolone (X). Celle-ci est carboxylée à l'aide de carbonate de diméthyle et de l'hydrure de potassium en ester méthylique de l'acide 2-méthoxy-6-oxo-5,6,7,8-tétrahydroquinoline-5-carboxylique (XI).

En présence de méthoxyde de sodium dans le méthanol, ou également de 1,1,3,3-tétraméthylguanidine (TMG) dans le dichlorométhane, l'ester (XI) se cyclise avec la méthylacroléine (XII). On obtient ainsi le composé tricyclique (XIII) rapidement mésylé en composé (XIV), sous l'action du chlorure de mésyle.

L'élimination du groupement mésyle du composé (XIV) à l'aide d'un mélange d'acide acétique et d'acétate de sodium sous reflux permet la création d'une double liaison (composé XV). Ce dernier subit alors une condensation de Wittig avec l'éthylidène triphénylphosphorane dans l'éther, pour aboutir au composé diéthylénique (XVI) sous forme d'un mélange d'isomères Z et E. L'isomère Z représente 90 % du mélange.

L'hydrolyse sélective de (XVI) avec de la soude dans un mélange THF/méthanol donne l'acide (XVII). Cette fois-ci, c'est l'isomère E de cet acide qui représente 90 % du mélange. Il est

alors traité par du chlorure de thionyle et de l'azide de sodium dans une réaction de Curtius modifiée ; on obtient l'uréthane (XVIII).

Enfin, l'iodure de triméthylsilyle permet les N- et O-déprotection de (XVIII) pour donner l'huperzine A sous forme de racémique précipité.

Remarque :

Une autre voie de synthèse totale a été décrite, dans l'ensemble relativement similaire (QIAN, 1989). On part de l'ester (XI) avec une suite réactionnelle commune entre les composés (XII) à (XVIII), mais en utilisant l'azide de diphenylphosphoryle à la place du chlorure de thionyle dans l'étape (XVII) à (XVIII). En finalité le clivage du méthyl éther (XVIII) par action du triméthylchlorosilane sous reflux de chloroforme, donne la pyridone libre (XIX) qui est convertie en mélange racémique d'huperzine A par un traitement avec de la soude et le 18-couronne 6-ether.

b) Synthèse de la (-)-Huperzine A :

La synthèse totale précédente conduit à un mélange racémique. Il a été montré que ce mélange présente une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase de moitié inférieure à celle de la (-)-huperzine A (KOZIKOWSKI, 1991). Il a donc fallu trouver une voie synthétique pour aboutir au composé optiquement pur d'huperzine.

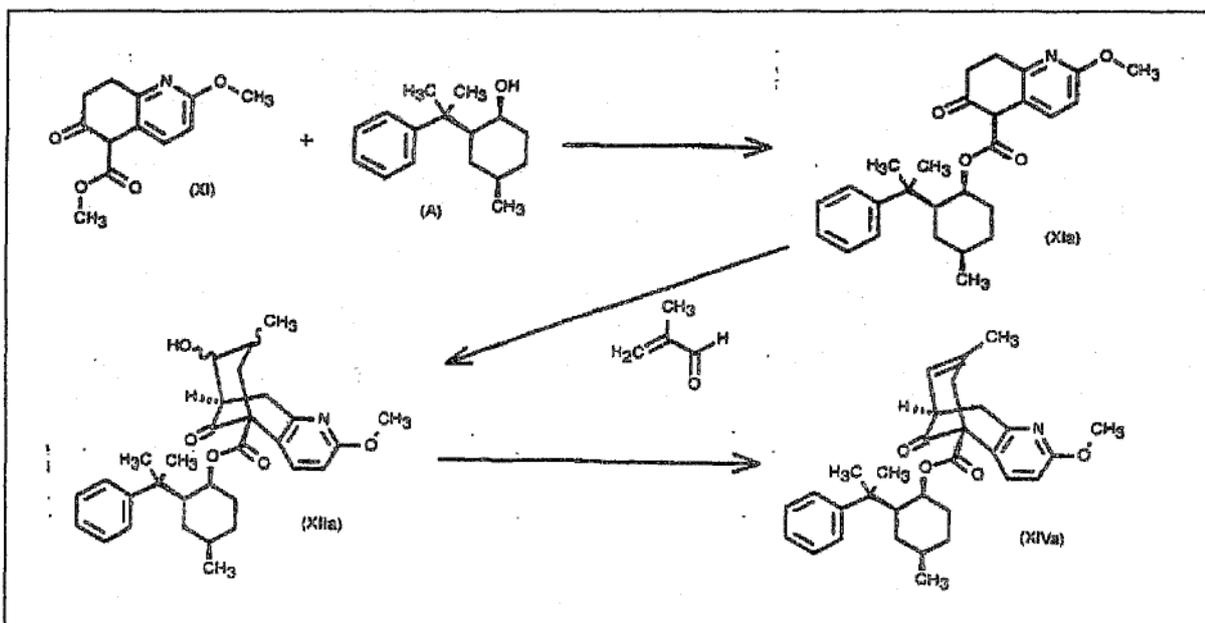


Schéma n° 11 : Synthèse chimique de la (-)-Huperzine A (KOZIKOWSKI, 1991)

Cette voie démarre au niveau de l'intermédiaire méthyl-ester (XI) de la synthèse du mélange racémique précédent. Celui-ci est transestérifié à l'aide du (-)-8-phénylmenthol (A) dans du benzène sous reflux pour former l'ester (XIa) qui va pouvoir subir alors une réaction de cyclisation. Cette cyclisation se fait de la même façon que précédemment avec la méthylacroléine. On obtient ainsi le composé tricyclique (XIIa) correspondant au composé (XII) mais avec la configuration absolue adéquate.

L'étape suivante est une réaction de déshydratation qui produit le composé (XIVa) de la même façon que dans la synthèse du mélange racémique. La suite du chemin réactionnel est le même pour donner en finalité, un composé optiquement actif de (-)-huperzine A.

#### 4) Pharmacologie:

L'huperzine A est une molécule chimique possédant la propriété d'inhiber les cholinestérases.

##### 4-1) Activité in vitro:

Cette activité anticholinestérasique a été étudiée *in vitro* (WANG, 1986). Les sources d'acétylcholinestérase (AChE) sont la membrane d'érythrocyte de rat et les cellules de noyau caudé de porc.

- pI<sub>50</sub> (membrane érythrocyte) = 7,2

- pI<sub>50</sub> (noyau caudé) = 7,9

L'effet inhibiteur de l'huperzine A sur l'enzyme est trois fois supérieur à celui de la physostigmine. Cependant la physostigmine conserve une meilleure activité inhibitrice sur la butyrylcholinestérase (BuChE) par rapport à l'huperzine A.

Cette action inhibitrice de l'huperzine A est réversible aussi bien sur l'AChE que sur la BuChE.

Du fait que la molécule est active sur les deux enzymes, on peut la qualifier d'inhibiteur mixte.

Cette propriété d'inhibition de l'acétylcholinestérase a été confirmée sur des plasmas de souris et de chiens (HAO, 1988). Cette action se révèle également puissante.

Une étude chinoise apporte des précisions sur cette inhibition enzymatique, en comparant l'alcaloïde aux deux inhibiteurs des cholinestérases majeurs que sont la tacrine et le donepezil. L'huperzine A et le donepezil présentent une inhibition de l'AChE supérieure à celle de la tacrine ; le donepezil étant le plus puissant des trois. Par contre l'huperzine A et le donepezil inhibent la BuChE à des concentrations nettement supérieures à celles qui leurs sont nécessaire pour inhiber l' AChE. Cela montre que ces deux molécules sont de puissants inhibiteurs de l' AChE.

En observant le tableau ci-dessous, on peut voir que l'huperzine A possède une action sur l' AChE plus sélective que le donepezil. Ces deux drogues agissent probablement à des sites actifs différents de l'enzyme.

La tacrine à une action inhibitrice puissante sur la BuChE. Cette action inhibitrice non sélective sur les cholinestérases pourrait être à la base de son faible index thérapeutique et à la base de certains de ses effets indésirables (CHENG, 1996).

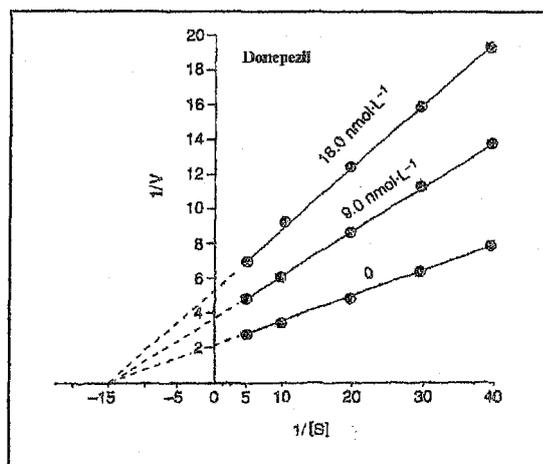
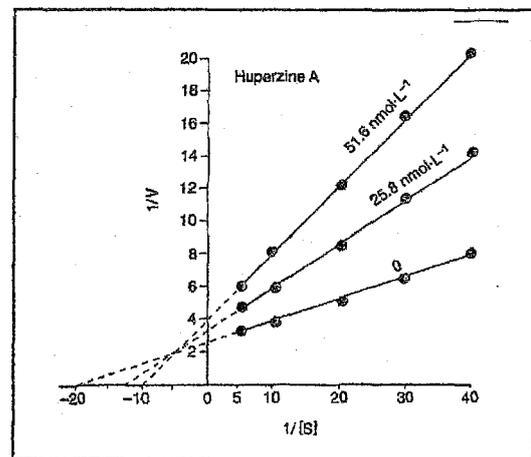
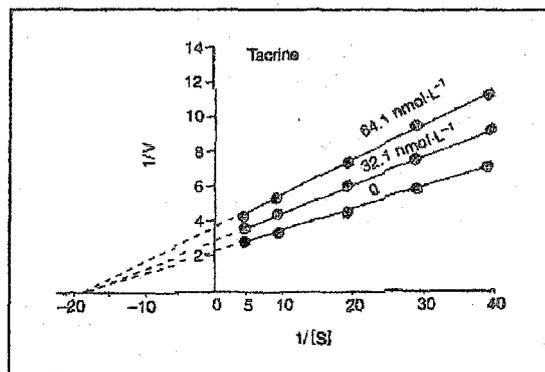
Inhibiteurs des cholinestérases	BuChE (sérum de rat)	AChE (homogénat de cortex de rat)	Ratio des CI <sub>50</sub> (BuChE / AchE)
<b>Huperzine A</b>	CI <sub>50</sub> = 58894 ,77 ± 782,90	CI <sub>50</sub> = 66,58 ± 0,51	884,57
<i>Donepezil</i>	CI <sub>50</sub> = 5012,76 ± 66,63	CI <sub>50</sub> = 10,25 ± 0,62	489,05
<i>Tacrine</i>	CI <sub>50</sub> = 74,61 ± 0,51	CI <sub>50</sub> = 93,00 ± 0,13	0,80

CI<sub>50</sub> : Concentration d'inhibiteur conduisant à une inhibition de 50 % de l'enzyme en (nM)

**Tableau VII :** Comparaison de l'effet inhibiteur de l'huperzine A, du donepezil et de la tacrine sur l'activité cholinestérasique *in vitro* (CHENG, 1996)

*Comparaison du mécanisme d'inhibition de la tacrine du donepezil et de l'huperzine A:*

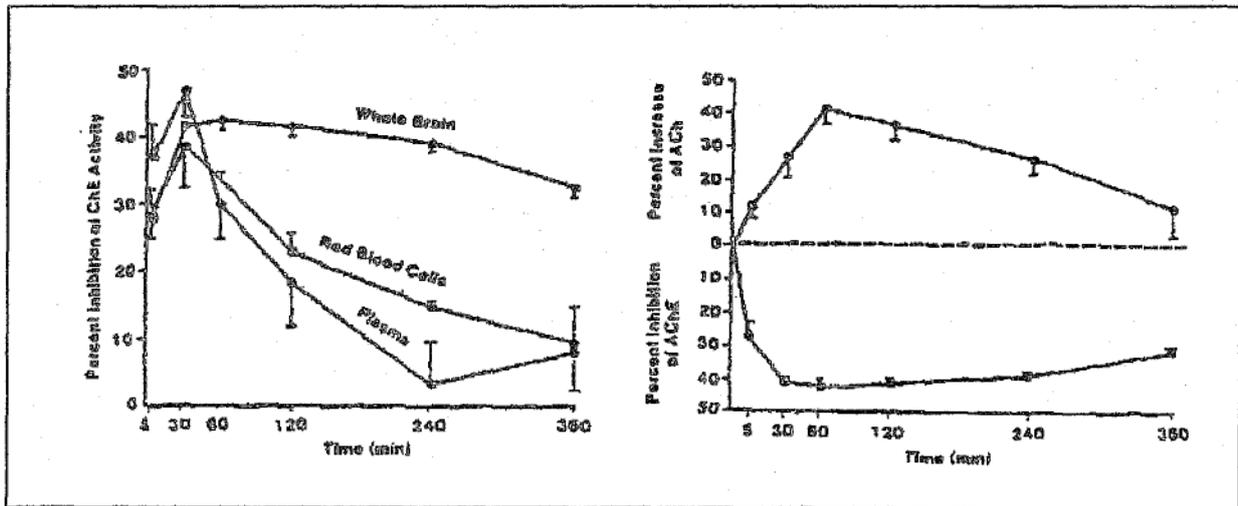
Les représentations de l'inhibition de l'ACHé provenant de la membrane d'érythrocyte de rat, par ces trois inhibiteurs enzymatiques, selon la méthode de Lineweaver-Burk, montre que l'huperzine A se distingue des deux autres produits. En effet, le mécanisme d'inhibition de cette molécule est de type mixte-compétitif alors que celui des deux autres produits est de type non-compétitif. On a vu également que le donepezil présentait une meilleure affinité pour l'ACHé que l'huperzine A alors qu'au niveau clinique, l'effet de cette dernière semble supérieur. L'explication pourrait résider dans la faible biodisponibilité du donepezil au niveau cérébral par rapport à l'huperzine A (CHENG, 1996).



**Schéma n° 12 :** Représentation selon Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'acétylcholinestérase de membrane d'érythrocyte de rat par la tacrine, le donepezil et l'huperzine A. (CHENG, 1996)

#### 4-2) Activité in vivo:

Chez le rat, l'huperzine A induit une inhibition de l'AChE d'une manière franche et prolongée dans le cerveau et au niveau des érythrocytes, ainsi qu'une inhibition de la BuChE plasmatique, après une administration i.p. ou i.m. d'une dose de 2 mg/Kg. Durant le même temps, on peut noter une augmentation significative des niveaux d'acétylcholine (ACh) cérébrale. On observe de plus, des variations régionales dans l'augmentation du taux d'ACh. Les niveaux les plus élevés d'ACh sont enregistrés dans le cortex frontal et le cortex pariétal. Cette inhibition cholinestérasique qui se normalise plus rapidement dans les érythrocytes et le plasma, est toujours présente dans le cerveau entier à un taux de 32 % après 6 heures, avec parallèlement une augmentation résiduelle du taux cérébral d'ACh de seulement 10 % (TANG, 1989).



**Schéma n° 13 :** *Activités acétylcholinestérasiques cérébrale et érythrocytaire et butyrylcholinestérasique plasmatique. Taux cérébral d'acétylcholine chez le rat après administration i.m. d'une dose de 2 mg/Kg d'huperzine A. (TANG, 1989)*

Chez la souris, l'huperzine A marquée, est retrouvée dans tout le cerveau 60 minutes après une administration i.v. d'une dose de 183 µg/Kg, avec les niveaux les plus élevés dans le cortex fronto-pariétal ainsi que dans le noyau de l'accubens, l'hippocampe et le striatum. Quasiment aucune radioactivité n'est détectée dans le reste du corps de l'animal après 12 heures (TANG, 1989).

Chez le rat, l'huperzine A, qu'elle soit d'origine synthétique ou naturelle, administrée à une dose de 0,5 mg/Kg (i.p.) provoque une augmentation du niveau d'ACh dans l'hippocampe. Dans cette même région, les niveaux de choline, de norépinephrine ou de sérotonine ne sont pas affectés. L'activité de l'AChE dans l'hippocampe est réduite 60 minutes après l'administration de doses aussi faible que 0,1 mg/Kg (i.p.) Il en est de même dans le cortex et le striatum après l'injection d'une dose de 0,25 mg/Kg (i.p.). Les huperzine A naturelle et de synthèse possèdent un profil pharmacologique similaire (HANIN, 1990).

L'action de la (-)-huperzine A (huperzine naturelle) est plus puissante que celle de la (+)-huperzine A ou du mélange racémique, dans l'inhibition de l'AChE du cortex du rat (Mc KINNEY, 1991).

Chez le rat, l'usage chronique ou aigu de l'huperzine A, diminue de façon significative l'activité acétylcholinestérasique au niveau cérébral. La molécule diminue également le transport de la choline par les récepteurs à haute affinité dans l'hippocampe. Au contraire, cette molécule n'exerce aucune action sur la choline acétyltransférase ; elle n'a donc pas d'action sur la formation du médiateur (LAGANIERE, 1991).

L'administration locale ou systémique d'huperzine A provoque une augmentation dose-dépendante de l'ACh, de la norépinephrine et de la dopamine dans le cortex du rat. Ce composé est un inhibiteur puissant des cholinestérases (ZHU, 1995).

#### 4-3) Mutagénicité :

La mutagénicité de l'huperzine A déterminée par un test d'incorporation sur *Salmonella typhimurium* est nulle, qu'il y ait eu ou non d'activation par la fraction S<sub>9</sub> de foie de rat.

Le test du micronucleus sur cellule de souris s'est également révélé négatif. L'huperzine A n'est donc pas considérée à ce jour comme un agent mutagène (ZENGHONG, 1990).

#### 4-4) Pharmacocinétique :

Chez le rat et la souris, les études pharmacocinétiques ont montré que le niveau sanguin d'huperzine A après administration veineuse ou intrapéritonéale déclinait en deux phases ; une phase de distribution et une phase d'élimination.

	Voie intraveineuse	Voie intrapéritonéale
Phase de distribution	6,6 min	10 min
Phase d'élimination	149 min	203 min

Tableau VIII : Données pharmacocinétiques (WANG, 1988)

*Distribution* : Chez la souris, 15 minutes après administration intraveineuse la radioactivité de l'huperzine A marquée est retrouvée en grande quantité dans le foie et les reins, en quantité moyenne dans la rate, les poumons et le cœur, et en faible quantité dans le cerveau.

Chez la souris enceinte, une faible quantité de radioactivité est trouvée sur les fœtus.

La liaison de la molécule aux protéines plasmatiques serait de 17 %.

*Elimination* : La majorité de la radioactivité de l'huperzine est excrétée dans l'urine (73 %) 24 heures après l'administration intraveineuse. 2,4 % de cette radioactivité est retrouvée dans les fèces. Le chromatogramme des urines retrouve une partie de l'huperzine A ainsi que plusieurs métabolites (WANG, 1988).

#### 5) Mode d'action :

L'huperzine A est un inhibiteur réversible et lent de l'acétylcholinestérase. Son activité est due principalement à une interaction avec les acides aminés aromatiques localisés dans la gorge catalytique de l'enzyme (ASHANI, 1992). L'huperzine A inhibe l'acétylcholinestérase de façon temps dépendante ( $K_i = 1.10^{-6} M^{-1}.min^{-1}$ ), et le complexe enzyme-inhibiteur se dissocie de

façon relativement lente ( $t_{1/2} = 35$  min). Ces phénomènes sont en contraste avec les autres inhibiteurs des cholinestérases connus qui se dissocient très rapidement de l'enzyme.

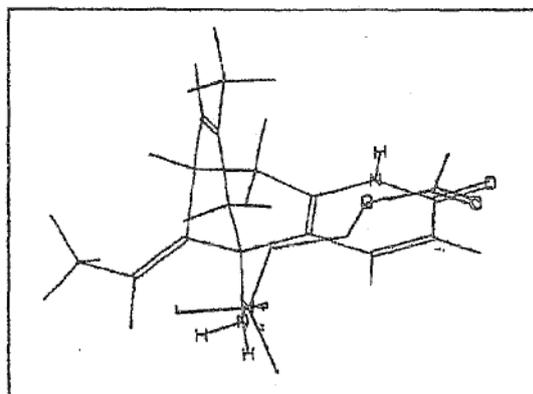
L'huperzine A est près de 1000 fois moins puissante dans l'inhibition de la butyrylcholinestérase que dans celle de l'acétylcholinestérase. D'autre part, la (-)- huperzine A possède une activité inhibitrice sur l'acétylcholinestérase 38 fois supérieure à celle de la (+)-huperzine A.

Cette étude a montré que l'huperzine A inhibe l'enzyme, quelle que soit la source de celle-ci (humaine ou animale). L'inhibition se fait par une interaction non covalente et réversible avec l'enzyme, au niveau de la région de son site actif catalytique. L'huperzine A est une molécule tricyclique rigide et une autre équipe de chercheurs (KOZIKOWSKI, 1991) a montré que certaines parties de cette structure chimique sont indispensables pour maintenir l'activité pharmacologique. Il s'agit de :

- le groupement  $-NH_2$ ,
- le cycle  $\alpha$ -pyridone,
- la liaison éthylénique exocyclique,
- le pont carboné en position 3.

C'est donc entre ces groupements de la molécule et les acides aminés aromatiques du site catalytique de l'enzyme que se font les interactions électrostatiques. La différence de nature de ces acides aminés aromatiques dans les gorges catalytiques de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, permettent d'expliquer la spécificité de l'huperzine A pour l'acétylcholinestérase. En regardant la molécule d'huperzine A sous un certain angle, on peut la comparer à celle de l'acétylcholine ; ainsi le groupement carbonyloxy de cette dernière est remplacé par le groupement amide de l'alcaloïde, alors que les azotes des deux molécules vont se superposer dans l'espace.

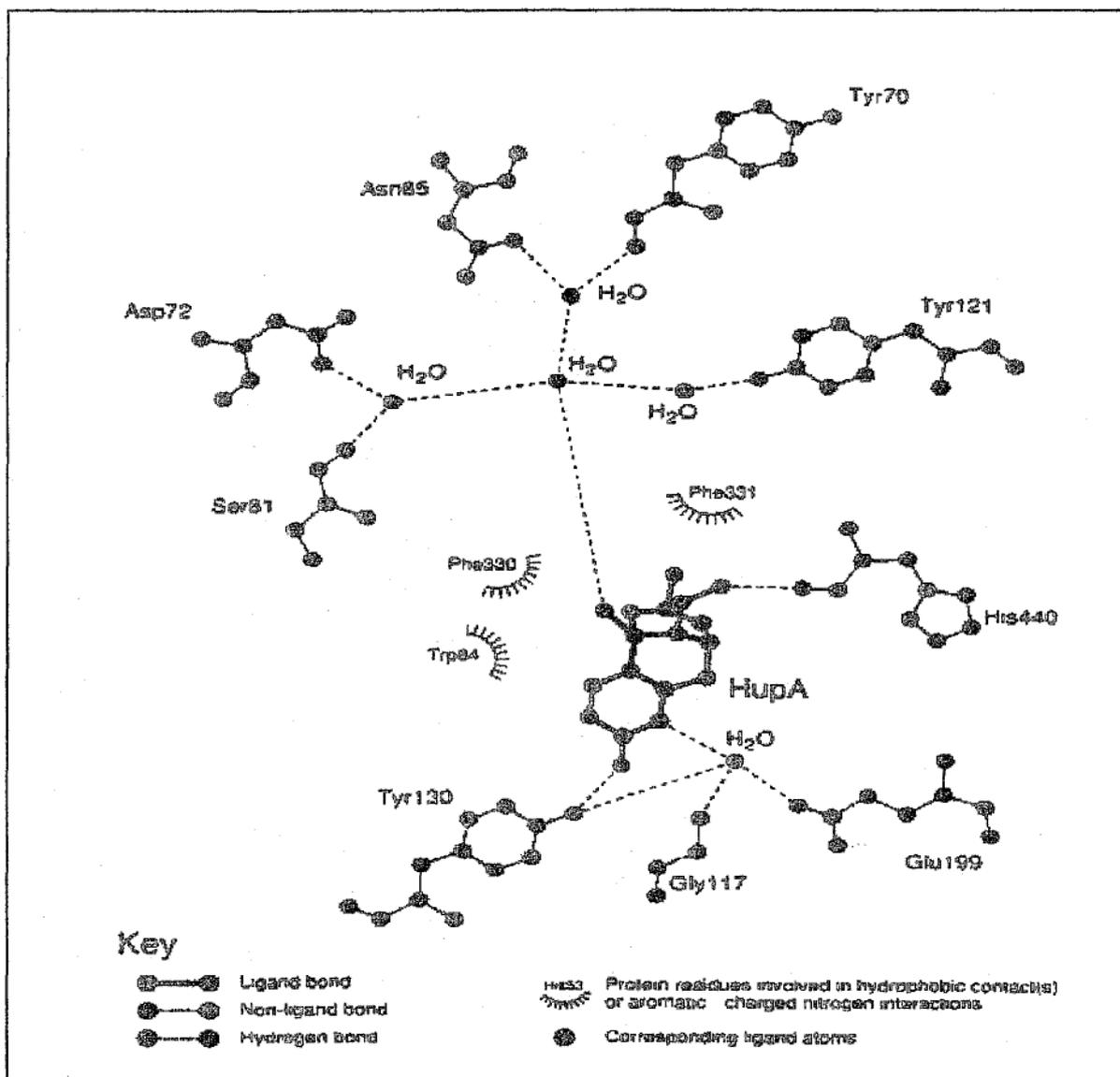
**Schéma n° 14 :**  
*Superposition dans l'espace  
de l'huperzine A et du ligand naturel :  
l'acétylcholine.*  
(KOZIKOWSKI, 1991)



L'huperzine A est un inhibiteur des cholinestérases unique, qui en contraste avec la physostigmine n'est pas modifié après l'interaction avec l'enzyme, et se dissocie lentement de ce dernier.

La nature des interactions enzyme-ligand a été complétée récemment (RAVES, 1997), grâce à des études structurales sur un cristal du complexe acétylcholinestérase (*Torpedo californica*) / huperzine A. Les liaisons entre l'alcaloïde et l'enzyme se font de la manière suivante (voir schéma n° 15 ci-après). On a :

- une forte liaison hydrogène (2,6 Å) entre le groupement carbonyle de l'huperzine A et l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle de la tyrosine 130,
- une liaison hydrogène se formant via les molécules d'eau présentes dans la gorge du site actif entre d'autres molécules d'eau d'une part ou avec les chaînes latérales de composants de la protéine comme l'oxygène du groupe carboxylique du glutamate 199 ou le groupe hydroxyle de la tyrosine 121 d'autre part,
- une interaction entre le groupe amine primaire de l'alcaloïde, qui est chargé au pH du milieu intérieur (pH = 5,8), avec les noyaux aromatiques du tryptophane 84 et de la phénylalanine 330, (Les distances entre l'atome d'azote et le centre des cycles sont de 4,8 et 4,7 Å respectivement. Cette interaction est analogue à celle observée avec le groupe amine primaire de la tacrine.)
- une courte liaison hydrogène (3 Å) entre le groupement méthyl-éthylénique de l'huperzine A et la chaîne oxygénée principale de l'histidine 440 (membre de la triade catalytique),
- plusieurs contacts hydrophobes avec le tryptophane 84, l'histidine 440, et avec les résidus glycine 118 et sérine 122.



**Schéma n° 15 :** *Interactions principales entre la protéine et le ligand*  
(RAVES, 1997)

Cette étude révèle donc la manière dont l’huperzine A va bloquer le fonctionnement de l’enzyme. L’alcaloïde glisse doucement dans le site actif de l’acétylcholinestérase où l’acétylcholine est habituellement dégradée. Puis il progresse dans ce site grâce à un grand nombre de liens chimiques subtils.

L’analyse de ce complexe enzyme-ligand semble donc confirmer les attentes des chercheurs quant à l’intérêt qu’il faut porter à l’huperzine A. Pour le Professeur J.Sussman, membre de l’équipe qui a conduit ce projet, c’est “comme si la substance naturelle avait été

ingénieusement dessinée pour s'accoupler sur le point exact de l'enzyme, où son action serait la plus efficace" (SKOLNICK, 1997).

*Remarque* : Plusieurs études ont essayé de construire des analogues structuraux de l'huperzine A ou, de faire de la chimie combinatoire à partir de cette molécule. Ces études ont permis d'affiner la théorie de fixation de l'huperzine A à l'enzyme, mais aucune d'entre elles n'ont abouti à la production d'un composé plus puissant dans son action inhibitrice.

## 6) Etudes précliniques:

### 6-1) Action de l'huperzine A sur la mémoire:

Dès l'identification définitive de l'huperzine A, des études ont démontré l'impact de cette molécule sur les capacités mnésiques du cerveau.

#### a) Etudes chez la souris :

L'huperzine A administrée oralement ou en intrapéritonéale facilite l'apprentissage et améliore la mémoire spatiale chez la souris placée dans un labyrinthe. L'huperzine A présente une activité supérieure à celle de la physostigmine. La molécule semble également inhiber les dommages induits sur l'acquisition de la mémoire par l'hypercapnie (ZHU, 1987).

Pour approfondir l'étude de l'impact de l'huperzine A sur la mémoire, plusieurs études ont testé la molécule, sur des animaux chez qui l'on a préalablement dégradé les centres cognitifs à l'aide d'artifices expérimentaux.

L'huperzine A administrée immédiatement après l'induction d'une amnésie par divers facteurs provoque une inversion du phénomène par rapport aux animaux non traités. Ces facteurs sont :

- des chocs électroconvulsifs appliqués au cerveau
- la scopolamine
- le nitrite de sodium
- le cycloheximide.

On peut obtenir dans tous ces cas, une amélioration de l'amnésie par un traitement du rat par de la physostigmine, mais elle est moindre que celle obtenue avec l'huperzine A (ZHU, 1988).

#### b) Etudes sur le rat:

Une étude a testé l'effet de l'huperzine A sur la mémorisation et l'apprentissage chez le rat placé dans un labyrinthe. Un parcours est déterminé pour atteindre le but, et des erreurs de repérage sont possibles pour l'animal. Le nombre d'erreurs est évalué. Des doses de 100 et 167  $\mu\text{g/Kg}$  (i.p.) d'huperzine A sont administrées 20 minutes avant l'entraînement. Les animaux traités rejoignent plus rapidement leur objectif. Le nombre d'erreurs d'orientation est plus élevé dans le groupe témoin. Cette facilitation de repérage dans le labyrinthe est dose dépendante entre 36 et 167  $\mu\text{g/Kg}$ . Pour les auteurs, cette propriété d'amélioration de la mémoire est due à un effet sur le système nerveux central cholinergique et plus particulièrement sur sa composante muscarinique (TANG, 1986).

D'autres études se sont intéressées à l'influence de l'huperzine A sur la mémoire, en fonction de l'âge des rats. Les résultats montrent que le processus de mémorisation est augmenté par la molécule chez le rat adulte de la même manière que chez le rat âgé. Cette indépendance de l'âge des animaux dans l'amélioration des phénomènes cognitifs induite par l'huperzine A est maintenue chez les rats traités préalablement par de la scopolamine (ZHU, 1987 ; DONG, 1996).

De la même façon que chez la souris, des expériences d'induction d'amnésie ont été menées chez le rat. Une étude récente montre que l'huperzine A est capable d'inverser les déficits de mémoire induits par la scopolamine. On utilise pour ce fait, un labyrinthe circulaire et les doses d'huperzine A vont de 0,1 à 0,4 mg/Kg (p.o.). L'effet de l'huperzine A est supérieur à celui du donepezil (0,5 à 1 mg/Kg (p.o.)) et à celui de la tacrine (1 à 2 mg/Kg (p.o.)). On peut voir dans cette étude que les trois produits entraînent le même type d'amélioration sur la mémoire des rats, mais l'efficacité de l'huperzine A est significativement supérieure à celle des deux autres produits.

De plus cette action semble profiter d'avantage à la mémoire de travail qu'à la mémoire de référence. L'huperzine A ne possède pas d'affinité pour les récepteurs muscariniques et l'effet bénéfique de cette molécule sur la mémoire semble principalement du à l'inhibition de l'acétylcholinestérase cérébrale. Notre molécule s'avère donc être la plus sélective des trois inhibiteurs testés (CHENG, 1996).

Sur le même schéma de base, des rats ont été intoxiqués avec une moutarde azotée (AF64A) qui provoque une dégradation de la mémoire spatiale chez cet animal (XIONG, 1995). L'action de ce poison se fait par une inhibition de la choline acétyltransférase dans l'hippocampe principalement. Les rats sont amenés dans un labyrinthe où plusieurs voies leurs sont proposées. Le nombre de choix corrects est évalué. L'huperzine A ( 0,4-0,5 mg/Kg (i.p) ) est administrée après l'AF64A . Les rats traités trouvent plus facilement la sortie du labyrinthe que les animaux témoins de façon significative. La molécule semble donc inverser les effets induits par le poison.

Ces résultats ont été complétés cette année par la même équipe en reproduisant des effets similaires sur la mémoire, par injection d'acide kainique dans le noyau basal magnocellulaire (XIONG, 1998). De la même manière, c'est l'activité de la choline acétyltransférase qui est concernée. Les rats traités par l'huperzine A ( 0,2 mg/Kg (i.p) ) se repèrent mieux dans le labyrinthe.

Deux études récentes ont comparé les effets bénéfiques de l'huperzine A avec ceux de la tacrine et du donepezil chez le rat placé dans un labyrinthe, après intoxication par un poison spécifique.

La première étude (WANG, 1998) utilise la scopolamine pour altérer la mémorisation des animaux. L'huperzine A ( 0,2-0,4 mg/Kg (p.o.) ; 0,1-0,4 mg/Kg (i.p.) ) possède une plus grande efficacité que le donepezil ( 0,6-0,9 mg/Kg (p.o.) ; 0,3-0,6 mg/Kg (i.p.) ) et que la tacrine ( 1,5-2,5 mg/Kg (p.o.) ; 0,3-0,6 mg/Kg (i.p.) ) sur la mémorisation des animaux. L'huperzine A est le plus efficace des composés testés et provoque la plus forte inhibition observée de l'acétylcholinestérase par voie orale. D'autre part, l'effet du donepezil s'avère similaire à celui de l'huperzine A si l'administration se fait par voie intrapéritonéale.

La seconde étude (CHENG, 1998) utilise de nouveau l'AF64A pour altérer la mémoire de travail des rats. Des doses orales d'huperzine A ( 0,5-0,8 mg/Kg ), de donepezil ( 1,0-2,0 mg/Kg ), et de tacrine (8,0 mg/Kg ) permettent d'inverser les déficits de mémoire induit par le toxique. Les trois molécules produisent une inhibition dose-dépendante de l'activité acétylcholinestérasique après l'administration. L'huperzine A par voie orale démontre une meilleure efficacité dans l'inhibition de l'acétylcholinestérase dans le cortex et l'hippocampe que les deux autres produits. La tacrine est plus efficace dans l'inhibition de la butyrylcholinestérase que dans celle de l'acétylcholinestérase cérébrale. L'huperzine A présente la meilleure biodisponibilité au niveau cérébral.

#### 6-2) Aspects neuroprotecteurs de l'huperzine A:

L'huperzine A apparaît comme possédant d'autres propriétés pharmacologiques qui en font un candidat attractif au niveau thérapeutique pour nombre d'essais cliniques.

Dans une étude sur des cultures cellulaires prélevées sur des embryons de rats (hippocampe, cervelet, cortex) des chercheurs ont montré que l'huperzine A diminuait la mort des cellules neuronales causée par des taux toxiques de glutamate (VED, 1997). Nous avons vu en outre que les fonctions glutamatergiques et GABAergiques sont également compromises dans la maladie d'Alzheimer, même si c'est en moindre proportion que la perte cholinergique.

Le glutamate est un acide aminé excitateur dont la concentration augmente lors d'événements neuropathologiques comme l'ischémie cérébrale. Le glutamate active alors les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et augmente le flux des ions calcium dans le neurone, dont la concentration excessive peut tuer la cellule. Donc ici, des cultures de neurones dérivés de trois régions cérébrales différentes sont traitées par l'huperzine A avant d'être exposées à des concentrations toxiques de glutamate. Les cultures cellulaires prétraitées par l'huperzine A montrent de façon significative une faible toxicité. Ces cellules sont caractérisées par une élévation de calcium intracellulaire induite par le glutamate plus faible que les cultures non prétraitées.

Cette étude démontre donc que les effets thérapeutiques de la molécule ne dérivent pas uniquement de son action sur la fonction cholinergique, mais également de cette capacité de

réduction des conséquences neurotoxiques de l'exposition au glutamate. Cette propriété fait de l'huperzine A une drogue potentielle pour réduire les agressions neuronales dans les ischémies cérébrales, l'épilepsie et d'autres désordres (SKOLNICK, 1997).

Une autre équipe a testé l'huperzine A comme agent prophylactique contre le soman et d'autres gaz neurotoxiques (GRUNWALD, 1994). Une longue durée d'efficacité antidotale associée à une faible toxicité, font de la molécule, un agent protecteur contre les armes chimiques prometteur. Pour évaluer la capacité neuroprotectrice de la molécule, l'huperzine A est injectée (i.p.) à des souris. Puis les chercheurs ont examiné la DL<sub>50</sub> du soman administré en sous-cutané et à différents temps. L'huperzine A permet d'obtenir un rapport de protection d'environ 2 pendant six heures après une injection unique et sans avoir recours à d'autres traitements pour maintenir les fonctions vitales. En comparaison, un prétraitement à la physostigmine donne un rapport de DL<sub>50</sub> d'environ 1,4 à 1,5 durant seulement 90 minutes. Cette équipe a renouvelé ce genre de manipulation chez le singe pour arriver à des conclusions similaires (ASHANI, 1996).

Une dernière étude a approfondie les données sur cette neuroprotection procurée par l'huperzine A lors d'une intoxication par le soman chez le cochon (LALLEMENT, 1997). Un prétraitement à l'huperzine A (0,5 mg/Kg (i.p.)) prévient la survie de tous les animaux 24 heures après l'intoxication. Les tissus de l'hippocampe de ces animaux ne montrent aucune lésions. En comparaison, tous les animaux prétraités par de la pyridostigmine présentèrent une crise convulsive et la moitié en moururent.

Des analyses complémentaires montrèrent que l'huperzine A n'a pas d'affinité pour les récepteurs muscariniques, AMPA et (GABA)<sub>A</sub>. Au contraire la molécule présente un très faible affinité pour les récepteurs NMDA.

## 7) Essais cliniques :

Les inhibiteurs des cholinestérases utilisés comme agents palliatifs dans la maladie d'Alzheimer sont les traitements les plus prometteurs dans cette pathologie. Le risque d'un agent insuffisamment sélectif pour les tissus cérébraux serait d'inhiber toute l'activité acétylcholinestérasique, et notamment systémique, entraînant ainsi les effets indésirables.

Puisque la BuChE ne semble pas impliquée dans le catabolisme cholinergique cérébral, on peut résumer les conditions que doit remplir un bon inhibiteur des cholinestérases utilisé comme traitement de la maladie d'Alzheimer :

- grande sélectivité pour l'AChE par rapport à la BuChE,
- affinité pour les tissus nerveux cérébraux (sélectivité pour l'AChE cérébrale par rapport à l'AChE systémique), ce qui limitera les effets indésirables de type parasymphatique au niveau périphérique,
- longue durée d'action,
- puissance inhibitrice supérieure ou au moins équivalente au produit de référence,
- bonne biodisponibilité par voie orale.

Ces cinq conditions sont réunies par l'huperzine A ce qui en font un très bon candidat pour une évaluation clinique. Cette évaluation est actuellement en cours (phase III).

*Remarque :* La concentration d'une molécule nécessaire pour inhiber in vitro l'acétylcholinestérase est un bon critère pour estimer son activité. Il faut toutefois prendre en compte d'autres paramètres pour passer à l'usage clinique. Les obstacles relatifs à la toxicité, au métabolisme, à la pharmacocinétique et à la biodisponibilité sont à franchir pour démontrer l'innocuité et les qualités d'une molécule. De ce fait, l'huperzine A peut être présentée comme "candidat clinique" pour le traitement de la maladie d'Alzheimer à la vue des nombreux tests que cette molécule a déjà réussi, aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

### 7-1) Phase I:

#### - Innocuité, tolérance, pharmacocinétique, chez 6 sujets jeunes et sains : (QIAN, 1995)

Aucun effet indésirable notable n'a été observé dans une gamme de dosages allant de 0.18 à 0.54 mg (p.o.).

Les niveaux sanguins d'huperzine A déterminés par HPLC, indiquent que la molécule est relativement rapidement absorbée après une administration orale, avec un  $t_{1/2}K_a$  de 12,6 minutes et un pic de concentration plasmatique moyen à 79,6 minutes. Le profil de la courbe de concentration plasmatique est conforme à un modèle à un compartiment ouvert, avec une cinétique d'absorption de premier ordre. Le pic de concentration plasmatique principal après une dose orale unique de 0,99 mg est de  $8,4 \mu\text{g.l}^{-1}$ , ce qui indique que l'huperzine A est rapidement distribué in vivo.  $T_{1/2}K_e = 288,5$  minutes ; l'huperzine A est donc éliminé avec un taux modéré.

### 7-2) Phase II:

#### - Traitement de la myasthénie:

Y.S. CHENG et ses collaborateurs (1986) ont été les premiers à rapporter les effets cliniques de l'huperzine A. 99 % des patients traités ont vu les manifestations cliniques maîtrisées ou améliorées à la suite du traitement. La durée d'action de la molécule ( $7 \pm 6$  heures) est supérieure à celle de la néostigmine. Les effets indésirables de types parasymphatomimétiques à l'exception des nausées, sont inférieurs à ceux de la néostigmine

- Essai comparatif sur la mémoire : (ZHANG, 1986)

Chez cent sujets âgés souffrants de troubles de la mémoire (âgés de 46 à 82 ans dont 17 sont atteints de la maladie d'Alzheimer), un traitement à l'huperzine A (30 µg (i.m.)) est comparé à un traitement par 600 µg d'Hydergine® (dihydroergotoxine). L'huperzine A augmente les fonctions mnésiques des sujets de 1 à 4 heures après une administration par voie intraveineuse. Des effets indésirables ont rarement été notés.

- Etude sur la mémoire : (ZHANG, 1991)

Les effets thérapeutiques de l'huperzine A sont évalués par une étude multicentrique, randomisée et en double aveugle versus placebo chez 56 patients souffrants de démence induite par des infarctus cérébraux récidivants ou de démence sénile, ainsi que 104 patients présentant des troubles séniles de la mémoire. Chaque groupe est divisé en deux sous-groupes dont l'un est traité par une solution isotonique et l'autre par de l'huperzine A (50 µg 2 fois par jour pendant un mois pour le premier groupe, et 30 µg 2 fois par jour pendant deux semaines pour le second). Les effets curatifs sont évalués par le score de Wechsler (test de mémoire). L'huperzine A améliore de façon significative le coefficient de mémoire des sujets traités dans les deux groupes ( $p < 0,01$ ). Très peu d'effets indésirables sont notés à part quelques cas de nausées et de vertiges.

- Etude sur la maladie d'Alzheimer : (XU, 1995)

Une étude multicentrique, en double aveugle, parallèle et randomisée versus placebo a été conduite en Chine sur 103 patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les malades furent inclus dans l'essai après un diagnostic de la pathologie selon les critères du DSM III R. L'évaluation des capacités mnésiques a été effectuée au moyen du score de Wechsler, du score d'Hasegawa (test de démence), du mini-mental state ainsi que de scores évaluant la qualité de vie des patients. 50 patients reçurent 0,2 mg d'huperzine deux fois par jour par voie orale. Les autres 53 patients reçurent un placebo dans les mêmes conditions. L'expérience dura deux mois.

58 % des patients traités par l'huperzine A présentèrent une amélioration significative de leur capacité mnésique, aussi bien au niveau de la mémoire que du savoir, ainsi qu'une amélioration de leur capacité à accomplir leurs activités quotidiennes ( $p < 0,01$ ). Peu d'effets indésirables sont notés.

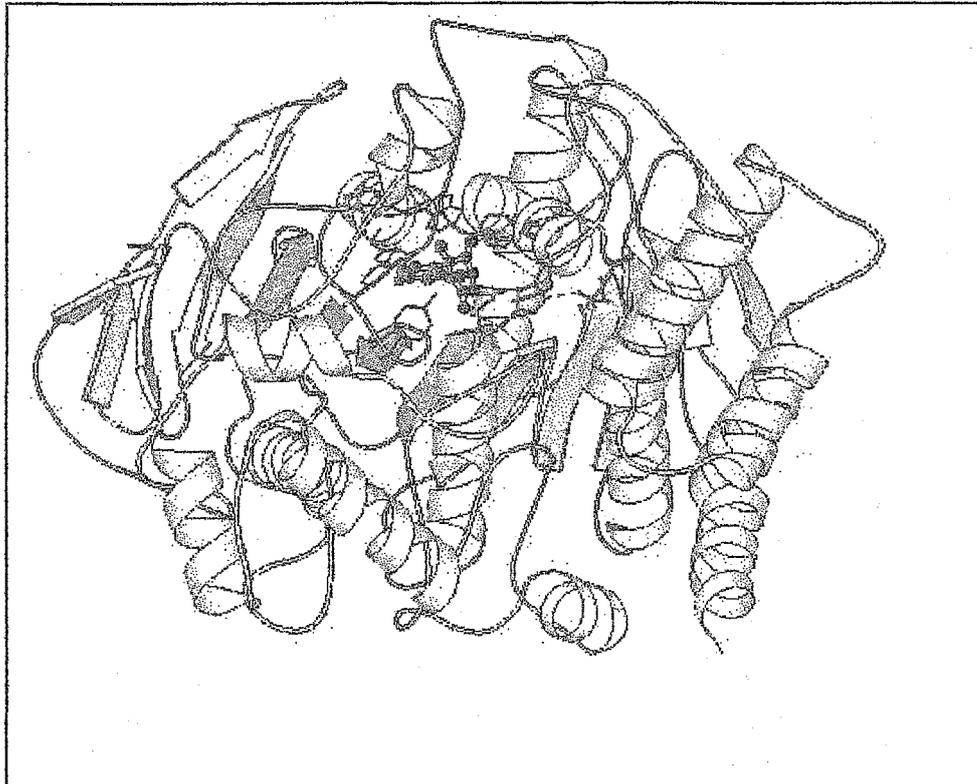


Schéma n° 16 : *Modèle assisté par ordinateur en 3-D de l'huperzine A dans l'acétylcholinestérase. (Weizmann Institute of Science., 1997, Internet)*

CONCLUSION :

THÈSE SOUTENUE PAR : Frédéric PILOTAZ

TITRE : L'huperzine A, un nouvel inhibiteur des cholinestérases pour la maladie d'Alzheimer.

CONCLUSION :

Près d'un siècle après sa découverte, les clefs de la maladie d'Alzheimer ne sont toujours pas connues. De son origine multifactorielle, à la complexité de son diagnostic, le mystère semble s'épaissir avec les progrès de la recherche scientifique. Pourtant, la nécessité de trouver les moyens de soigner une population de patients qui atteindra plus de 300 000 Français en l'an 2000, n'a jamais été aussi forte.

Les inhibiteurs des cholinestérases sont des produits connus depuis longtemps pour leurs applications militaires ou phytosanitaires. Leur utilisation dans la maladie d'Alzheimer est récente et, elle offre un réel espoir dans le monde médical, qui ne disposait d'aucune arme pour ralentir l'évolution de cette pathologie. Ils sont à ce jour, les seuls produits qui ont fourni la preuve de leur efficacité clinique, en agissant sur les symptômes de la maladie. Toutefois, leur action repose sur l'hypothèse cholinergique de la maladie, qui n'est que l'une des causes de la démence.

Trésor d'expériences cliniques, la médecine traditionnelle chinoise nous apporte aujourd'hui une molécule innovante, qui pourrait s'avérer être un produit majeur dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

L'huperzine A a répondu de façon brillante à tous les tests nécessaires à l'évaluation de son efficacité et de son innocuité. Ce composé s'avère plus efficace que les produits utilisés jusqu'à présent, du fait d'une très bonne sélectivité, d'un franchissement de la barrière hémato-encéphalique aisé et, d'effets indésirables extrêmement réduits. C'est donc pourquoi, cet alcaloïde est actuellement en cours de phase III d'essais cliniques.

Outre sa capacité à inhiber l'acétylcholinestérase, comme les autres médicaments de cette classe, ce produit pourrait développer une qualité de neuroprotection. Si ce fait est confirmé dans la maladie d'Alzheimer, l'huperzine A serait la première molécule potentiellement capable d'enrayer le mécanisme de cette pathologie. Son utilisation permettrait de développer une nouvelle génération de produits, et d'éclaircir la connaissance des mécanismes complexes qui aboutissent à cette dégénérescence.

La maladie d'Alzheimer reste à ce titre l'un des grands enjeux de la médecine du XXI<sup>ème</sup> siècle. Si l'espérance de vie continue de s'étendre comme cela est prévu dans les années futures, il s'agira de vivre mieux et non pas simplement plus longtemps. L'huperzine A sera peut-être le premier moyen d'y parvenir.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

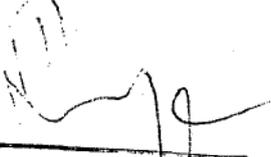
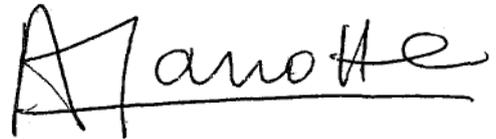
Grenoble, le : 19 octobre 1998

LE DOYEN :

LE PRÉSIDENT DE THÈSE :

Pr. Pierre DEMENGE

Pr. Anne-Marie MARIOTTE



Pr. P. DEMENGE  
Directeur UFR Pharmacie



BIBLIOGRAPHIE :

## - BIBLIOGRAPHIE :

- ALLAIN H., BENTUE-FERRER D., BELLIARD S., Traitements pharmacologiques de la maladie d'Alzheimer. *in*: HERISSON C., TOUCHON J., ENJALBERT M., *Maladie d'Alzheimer et médecine de rééducation.*, Masson, Paris, 1996 : 127-141.
  
- ASHANI Y., GRUNWALD J., ALKALAI D., COHEN G., RAVEH L., Studies with huperzine A, a new candidate in the research of prophylaxis against nerve agents., *Medical defense bioscience review*, 1996, 1 : 105-110.
  
- ASHANI Y., PEGGINS J.O., DOCTOR B.P., Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A., *Biochemical and biophysical research communications*, 1992, 184, 2 : 719-726.
  
- AYER W.A., BROWNE L.M., ORSZANSKA H., VALENTA Z., LIU J.S., Alkaloids of *Lycopodium selago*: on the identity of selagine with huperzine A and the structure of a related alkaloid., *Can. J. Chem.*, 1989, 67 : 1538-1540.
  
- BALASUBRAMANIAN A.S., BHANUMATHY C.D., Noncholinergic functions of cholinesterases., *F.A.S.E.B. J.*, 1993, 7 : 1354-1358.
  
- BECKER R.E., GIACOBINI E., Mechanisms of cholinesterase inhibition in senile dementia of the Alzheimer type : clinical, pharmacological and therapeutics aspects., *Drug Develop. Res.*, 1988, 12 : 163-195.
  
- BENZI G., MORETTI A., Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease ?, *Europ. J. Pharmacol.*, 1998, 346 : 1-13.
  
- BESSON J.M., BASSANT M.H., CALVINO B. *et al.*, De la neurophysiologie à la maladie d'Alzheimer., Solal, Marseille, 1997 : 55-66.

- BLANCHET G., CARPENTIER P., LALLEMENT G., Vulnérabilité du système nerveux central vis-à-vis des neurotoxiques organophosphorés., *Médecine et armées*, 1991, 19, 6 : 403-408.
- BLANCHET G., LALLEMENT G., BAILLE-LE-CROM V., BROCHIER G., CARPENTIER P., Epileptologie moléculaire de l'intoxication provoquée par les agents neurotoxiques de guerre., *Revue scientifique et technique de la défense*, 1995, 3 : 37-45.
- BLARD J.M., MOUTOU G., MOURAND I., HEROUM C., Aspects cliniques et diagnostiques de la maladie d'Alzheimer. *in*: HERRISSON C., TOUCHON J., ENJALBERT M. *Maladie d'Alzheimer et médecine de rééducation.*, Masson, Paris, 1996 : 31-40.
- BONNIER G., *Grande flore de Gaston Bonnier*, Belin, Paris, 1990 : 1388.
- BRUNETON J., *Pharmacognosie - Deuxième édition*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 1993 : 690.
- CHAMP P., *Mode d'action et utilisation des organophosphorés.*, Insectes Insecticides Santé, Acta Publications, Paris, 1986 : 207-223.
- CHANGEUX J.-P., Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs., *Mol. Pharmacol.*, 1966, 2 : 369-392.
- CHENG D.H., REN H., TANG X.C., Huperzine A a novel acetylcholinesterase inhibitor., *Neuroreport*, 1996, 8, 1 : 97-101.
- CHENG Y.S., LU C.Z., YING Z.L., NI W.Y., ZHANG C.L., SONG C.W., 128 cases of myasthenia gravis treated with huperzine A., *New drugs Clin. Rem.*, 1986, 5 : 197-199.
- CUSSET G., *Botanique - Les embryophytes*, Masson, Paris, 1997 : 112-125.
- DAVIES P., MALONEY A.J., Selective loss of cholinergic neurons in Alzheimer's disease, *Lancet*, 1976, 2 : 1403.

- DHARMANANDA S., Alzheimer's disease : treatment with chinese herbs., 1996, Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon : 6p., (<http://www.europa/itm/alzheim.htm>)
  
- DICTIONNAIRE LAROUSSE MÉDICAL, Larousse, Paris, 1995.
  
- DONG Z.J., LO Y.L., CHAN K.Y., HAN Y.F., Comparative studies of huperzine A and tacrine on scopolamine-induced amnesia of shuttle-box active avoidance in adult and aged rats., *Soc. Neurosci. Abst.*, 1996, 22, 1 : abst 147.11.
  
- DORANDEU F., Les composés organophosphorés inhibiteurs des cholinestérases, CRSSA / La Tronche, Publication interne, 1998, Mars : 23p.
  
- FROMENT D., La menace chimique, *L'armement*, 1996, 53 : 158-163.
  
- GENTY N., Le cerveau - Dictionnaire encyclopédique., Librairie Vuibert, Paris, 1997.
  
- GUILLAUME G., La médecine traditionnelle chinoise, *Encycl. Med. Nat.* (Paris, France), Phytothérapie, Aromathérapie, A-3-2, 1991, 64p.
  
- GUILLAUME G., La médecine traditionnelle chinoise. Historique. Apports et potentialités – Editions techniques, *Encycl. Med. Nat.* (Paris, France), Phytothérapie, Aromathérapie, A-3-1, 1991, 28p.
  
- GRUNWALD J., RAVEH L., DOCTOR B.P., ASHANI Y., Huperzine A as a pretreatment candidate drug against nerve agent toxicity., *Life sciences*, 1994, 54, 14 : 991-997.
  
- HANIN I., TANG X.C., KINDEL G., XIA Y., KOZIKOWSKI A.P., Synthetic and natural huperzine A: Comparison of their effects on rat CNS neurotransmitters in vivo., *Pharmacologist*, 1990, 32, 3 : Abst 100.
  
- HAO X.Y., GONG Z.H., QIN B.Y., Effects of huperzine A on cholinesterase isoenzymes in plasma of mice and dogs., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1988, 9, 4 : 312-316. *In. Drugs of the future*, 1989, 14, 6: 575.

- HAUW J.-J., DUBOIS B., VERNY M., DUYCKAERTS C., La maladie d'Alzheimer, John Libbey Eurotext, Paris, 1997 : 149-156.
- INESTROSA N.C., ALVAREZ A., PEREZ C.A., *et al.*, Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid  $\beta$ -peptide into Alzheimer's fibrils : possible role of the peripheral site of the enzyme., *Neuron.*, 1996, **19** : 881-891.
- JACQUEMET A., La convention d'interdiction des armes chimiques, *Armées d'aujourd'hui*, 1997, **224** : 20-23.
- KATZUNG. B.G., Pharmacologie fondamentale et clinique, Piccin Nuova Libreria, Padova, 1996 : 93.
- KELLY C.A., HARVEY R.J., CAYTON H., Drug treatments for Alzheimer's disease raise clinical and ethical problems., *Br. Med. J.*, 1997, **314** : 693-694.
- KOZIKOWSKI A.P., XIA Y., REDDY E.R., TUCKMANTEL W., HANIN I., TANG X.C., Synthesis of huperzine A and its analogues and their anticholinesterase activity., *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, **15** : 4633-4645.
- LABBE C., RECASENS O., Armes chimiques et biologiques, *Sciences et Avenir*, 1998, Mai : 62-70.
- LAGANIERE S., COREY J., TANG X.C., WULFERT E., HANIN I., Acute and chronic studies with the anticholinesterase huperzine A - Effect on central nervous system cholinergic parameters., *Neuropharmacology*, 1991, **30**, **7** : 763-768.
- LALLEMENT G., VEYRET J., MASQUELIEZ C., AUBRIOT S., BURCKHART M.F., BAUBICHON D., Efficacy of huperzine A in preventing soman-induced seizures, neuropathological changes and lethality., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1997, **11** : 387-394.
- LIU J.S., HUANG M.F., The alkaloids huperzines C and D and huperzine from *Lycopodium casuarinoides*., *Phytochemistry*, 1994, **37**, **6** : 1759-1761.

- LIU J.S., YU C.M., ZHOU Y.Z. *et al.*, Study on the chemistry of huperzine A and B, *Acta Chim. Sin.*, 1986, 44, 10 : 1035. *In. Drugs of the future*, 1987, 12, 6: 531.
- LIU J.S., ZHU Y.L., YU C.M. *et al.*, The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity., *Can. J. Chem.*, 1986, 64, 4 : 837-839.
- MASSON P., LALLEMENT G., DORANDEU F., La menace chimique: enjeux et défis biomédicaux, *Armées d'aujourd'hui*, 1998, 23 : 53-55.
- MASSOULIE J., PEZZEMENTI L., BON S., KREJCI E., VALETTE F.M., Molecular and cellular biology of cholinesterase., *Prog. Neurobiol.*, 1993, 41 : 31-91.
- Mc KINNEY M., MILLER J.H., YAMADA F., TUCKMANTEL W., KOZIKOWSKI A.P., Potencies and stereoselectivities of enantiomers of huperzine A for inhibition of rat cortical acetylcholinesterase, *Eur. J. Pharmacol.*, 1991, 203, 2 : 303-305.
- NOUIRA S., ABROUG F., ELATROUS F., BOUJDARIA R., BOUCHOUCHA S., Pronostic value of serum cholinesterase in organophosphate poisoning., *Chest.*, 1994, 106 : 1811-1814.
- NOURHASHEMI F., OUSSET P.J., REYES G. *et al.*, Les anti-inflammatoires non stéroïdiens dans la maladie d'Alzheimer., *Presse médicale*, 1998, 27, 1 : 25-28.
- OHBU S., YAMASHINA A, TAKASU N. *et al.*, Sarin poisoning on Tokyo subway., *South. Med. J.*, 1997, 90, 6 : 587-93.
- OTT A., M B BRETILER M., HARSKAMP F.V., *et al.*, Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study., *Br. Med. J.*, 1995, 310 : 970-973
- PONTAL P.G., Insecticides organophosphorés., *Encycl. Med. Chir.*, 1997, Toxicologie - Pathologie professionnelle, 16-059-A-15 : 6p.

- PRELLI R., BOUDRIE M., Atlas écologique des fougères et plantes alliées., Lechevalier, Paris, 1992.
- QIAN B.C., WANG M., ZHOU Z.F., CHEN K., ZHOU R.R., CHEN G.S., Pharmacokinetics of huperzine A in six volunteers., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1995, 16 : 396-398.
- QIAN L., JI R., A total synthesis of (+/-)-Huperzine A., *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 16 : 2089.
- QUINN D.M., Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states., *Chem. Rev.*, 1987, 87 : 955-979.
- RADIC Z., REINER E., TAYLOR P., Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives., *Molec. Pharmacol.*, 1991, 39 : 98-104.
- RITCHIE K., L'épidémiologie de la maladie d'Alzheimer. in HERISSON C., TOUCHON J., ENJALBERT M., Maladie d'Alzheimer et médecine de rééducation., Masson, Paris, 1996 : 4-12.
- RITCHIE K., KILDEA D., ROBINE J.M., The relationship between age and the prevalence of senile dementia: a meta-analysis of recent data., *Internat. J. Epidemiol.*, 1992, 21 : 4.
- ROQUIER-CHARLES D., La maladie d'Alzheimer., *Actualités Pharmaceutiques*, 1998, 360: 37-45.
- ROSENBERRY T.L., Acetylcholinesterase., *Adv. Enzymol.*, 1975, 43 : 103-218.
- SCHORDERET M., Pharmacologie - Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques., Slatkine, Genève, 1998 : 429-433.
- SKOLNICK A.A., Old chinese herbal medicine used for fever yields possible new Alzheimer disease therapy., *JAMA*, 1997, 277, 10 : 776.

- SUSSMAN J.L., HAREL M., FROLOW F. *et al.*, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine binding protein., *Science*, 1991, 253 : 872-879.
  
- TANG X.C., HAN Y.F., CHEN X.P., ZHU X.D., Effects of huperzine A on learning and retrieval process of discrimination performance in rats., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1986, 7, 6 : 507-511. *In. Drugs of the future*, 1987, 12, 6: 531.
  
- TANG X.C., DE SARNO P., SUGAYA K., GIACOBINI E., Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat., *J. Neurosci. Res.*, 1989, 24, 2 : 276-285.
  
- TARIOT P.N., SCHNEIDER L., Contemporary treatment approaches to Alzheimer's disease., *Consult. Pharm.*, 1996, 11, suppl. E :16-24.
  
- THE MERCK INDEX - Eleventh edition, Merck & Co. Inc, Rahway, 1989.
  
- VED H.S., KOENIG M.L., DAVE J.R., DOCTOR B.P., Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces cell death caused by glutamate., *Neuroreport*, 1997, 8, 4 : 963-968.
  
- WANG Y.E., YUE D.X., TANG X.C., Anticholinesterase activity of huperzine A., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1986, 7, 2 : 110-113. *In. Drugs of the future*, 1987, 12, 6 :531.
  
- WANG Y.E., FENG J., LU W.H., TANG X.C., Pharmacokinetics of huperzine A in rats and mice., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1988, 9 : 193-196. *In. Drugs of the future*, 1989, 14, 6, 575.
  
- WATKINS P.B., ZIMMERMAN H.J., KNAPP M.J., GRACON S.I., LEWIS K.W., Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease., *JAMA*, 1994, 271 : 992-998.
  
- WICHTL M., Herbal drugs and phytopharmaceuticals., CRC Press, 1994 : 309-310.

- WILSON I.B., Conformation changes in acetylcholinesterase., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1967, 144 : 664-674.
- XIA Y., KOZIKOWSKI A.P., A practical synthesis of the Chinese nootropic agent huperzine A : A possible lead in the treatment of Alzheimer's disease., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1989, 111, 11 : 4116.
- XIONG Z.Q., CHENG D.H., TANG X.C., Effects of huperzine A on nucleus basalis magnocellularis lesion-induced spatial working memory deficit., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1998, 19, 2 : 128-132.
- XIONG Z.Q., HAN Y.F., TANG X.C., Huperzine A ameliorates the spatial working memory impairments induced by AF64A., *Neuroreport*, 1995, 6, 16 : 2221-2224.
- XU S.S., GAO Z.X., WENG Z. *et al.*, Efficacy of tablet huperzine A on memory, cognition and behavior in Alzheimer's disease., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1995, 16, 5 : 391-395.
- ZENGHONG T., MEIYING W., Mutagenicity and comutagenicity of three nootropics: huperzine A, aniracetam and piracetam., *New drugs Clin. Rem.*, 1990, 9, 2 : 65-68.
- ZHANG R.W., TANG X.C., HAN Y.Y. *et al.*, Drug evaluation of huperzine A in the treatment of senile memory disorders., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1991, 12, 3 : 250-252. (in MEDLINE)
- ZHANG S.L., Therapeutics effects of huperzine A on the aged with memory., *New drugs Clin. Rem.*, 1986, 5 : 260-262.
- ZHU D.Y., BAI D.L., TANG X.C., Recent studies on traditional chinese Medicinal plants., *Drug Develop. Res.*, 1996, 39 : 147-157.
- ZHU X.D., GIACOBINI E., Second generation cholinesterase inhibitors: effect of (L)-huperzine A on cortical biogenic amines., *J. Neurosci. Res.*, 1995, 41, 6 : 828-835.

- ZHU X.D., TANG X.C., Facilitatory effects of huperzine A and B on learning and memory of spatial discrimination in mice?, *Yaoxue Xuebao*, 1987, 22, 11 : 812-817. In. *Drugs of the future*, 1988, 13, 6 : 575.

- ZHU X.D., TANG X.C., Improvement of impaired memory in mice by huperzine A and huperzine B., *Acta Pharmacol. Sin.*, 1988, 9, 6 : 492-497. In. *Drugs of the future*, 1989, 14, 6: 575.

ANNEXES :

## - ANNEXES :

### Les agents chimiques toxiques d'usage militaire:

On définit classiquement trois catégories d'agents chimiques toxiques utilisés en tant qu'armes chimiques:

#### - Les agents incapacitants ou neutralisants:

- Psychiques: LSD, BZ (quinuclidinol), drogues.

- Physiques: agents lacrymogènes, sternutatoires ou urticants.

#### - Les agents létaux:

##### - Toxiques:

- Neurotoxiques (organophosphorés):

- agents G: Tabun, Sarin, Soman
- agents V: A<sub>4</sub> ( ou Vx), A<sub>2</sub>

- Hématologiques: AsH<sub>3</sub>

- Cellulaires: HCN, Fluorocarbones

- Toxines: toxine botulique, mycotoxines

##### - Suffocants:

- Chlore
- Chloropicrine
- Phosgène
- Surpalite
- Chloropirrine

##### - Les agents mixtes:

Ils sont incapacitants à faible dose et létaux à dose plus élevée. Ce sont les *agents vésicants*: Ypérites, Lewisite, oximes halogénées.

## L'intoxication par les organophosphorés:

(BLANCHET, 1995 ; DORANDEU, 1998 ; PONTAL, 1997)

On peut subdiviser en trois catégories l'intoxication par des composés organophosphorés :

- des neuropathies retardées provoquées par l'usage à long terme d'insecticides par exemple.
- des neuropathies d'apparition semi-retardée si la contamination a été plus forte que dans le cas précédent.
- l'intoxication aiguë survenant lors d'un accident de type industriel ou lorsque les gaz de combat sont employés !

### 1) Mode de contamination:

Les signes cliniques et biologiques sont globalement indépendants de la voie de contamination. Cependant, celle-ci peut influencer l'ordre d'apparition des symptômes ainsi que la prédominance de l'un d'eux. Dans la plupart des cas, les intoxications surviennent après une exposition unique, en général importante. C'est le cas lors d'accidents industriels mais bien évidemment en cas d'utilisation militaire d'arme chimique de type neurotoxique.

Les signes d'intoxication peuvent cependant aussi survenir après des contacts répétés, de moyenne intensité. Ceci survient essentiellement lorsque le produit induit une inhibition des cholinestérases lentement réversible permettant ainsi l'accumulation des effets lors d'expositions répétées et rapprochées.

#### a) Voie orale:

Il s'agit le plus souvent d'accidents, en particulier chez les enfants ou à la suite du reconditionnement d'un produit dans un récipient pour usage alimentaire. Plus rarement, la prise de nourriture sur les lieux du travail avec des mains contaminées peut entraîner une intoxication symptomatique. Il peut enfin s'agir de la consommation de produits de plantes illégalement traitées par un organophosphoré (produit non autorisé sur cette plante ou surdosage ou non-respect du délai avant récolte).

#### b) Voie dermique:

Elle résulte le plus souvent d'une contamination accidentelle sur les lieux de travail. Celle-ci peut survenir lors de l'application du produit (préparation de la bouillie ou application elle-même) et correspond, en général à un non-respect des mesures d'hygiène recommandées pour ce type de produit. Elle peut également survenir à la suite du travail dans des parties récemment traitées, qu'il s'agisse de taille, d'éclaircissage ou de récolte. Il s'agit alors de transfert vers les vêtements et la peau de résidus délogeables encore présent à la surface des feuilles et des fruits. Dans ce cas, les symptômes peuvent apparaître seulement après quelques jours de travail, du fait de l'effet cumulatif ou de la lente absorption dermique au contact des vêtements souillés.

### c) Voie respiratoire:

La voie respiratoire est rarement prédominante dans les expositions professionnelles. Elle peut survenir en usine lors de la manipulation de matières actives sous forme sèche (synthèse ou formulation). Une contamination respiratoire prédominante peut également arriver lors de l'inhalation des gouttelettes de pulvérisation avec certains équipements ou lors de la manipulation de formulations solides et pulvérulentes. Les signes respiratoires peuvent dans ce cas, représenter les premiers symptômes de l'intoxication.

### d) Voie muqueuse:

La projection directe de poussière dans l'oeil peut entraîner des symptômes locaux à type de myosis serré.

## 2) Mécanisme de l'intoxication:

L'intoxication est principalement due à l'inhibition des cholinestérases, enzymes de dégradation de l'acétylcholine.

Les composés organophosphorés inhibent les cholinestérases en formant un complexe covalent extrêmement stable et résistant à l'hydrolyse. La fixation est considérée irréversible car il n'y a pas ou peu de régénération spontanée de l'enzyme. Toutefois, l'enzyme est réactivable par des réactifs nucléophiles comme l'hydroxylamine et les oximes. On peut noter que cette possibilité de réactivation décroît avec le temps, jusqu'à l'obtention d'une forme non réactivable ; c'est le phénomène du *vieillessement* de l'enzyme. Ce phénomène survient plus ou moins tôt selon le toxique utilisé.

Dans le cas des organophosphorés militaires, le composé utilisé en cas de guerre chimique sera d'autant plus dangereux pour les soldats, que sa constante de vieillissement est courte. Cette constante déterminée in vitro peut aller de  $t_{1/2} = 2$  jours pour le VX à  $t_{1/2} = 2$  minutes pour le soman.

L'inhibition de l'enzyme par un organophosphoré, que le complexe soit réactivable ou non, a pour conséquence directe, l'impossibilité, pour l'enzyme d'hydrolyser l'acétylcholine qui est alors capable d'agir pendant une longue période sur les récepteurs cholinergiques et donc de provoquer un syndrome d'hypercholinergie.

### Cas des chimiques de guerre:

L'action létale de la majorité des agents chimiques de guerre repose principalement sur l'induction d'une hypoxie puis de convulsions comme nous venons de le voir.

### 1) Exposition à des vapeurs:

Le délai d'apparition des effets va de quelques secondes à quelques minutes. La progression des effets est rapide. Des pertes de connaissance et des crises épileptiques ont été observées en moins d'une minute après l'exposition au chimique. L'absence de période de latence caractérise le contact "vapeur".

→ *exposition faible ou modérée*: On observe en général un myosis, une conjonctivite et une rhinorrhée. Des signes pulmonaires peuvent n'être révélés que par une plainte de la victime.

→ *exposition forte*: En plus des signes précédents, on peut observer des sécrétions abondantes (nez, bouches), des fasciculations généralisées, des contractions musculaires, des crises épileptiques, une perte de connaissance et une apnée. Une cyanose, une hypotension et une bradycardie peuvent être observées juste avant la mort.

### 2) Exposition au liquide:

L'exposition à une petite gouttelette de liquide sur la peau peut n'entraîner qu'assez peu de symptômes. Une hypersudation, un blanchiment de la zone et parfois des fasciculations locales peuvent être présents peu de temps après l'exposition, mais pourront avoir disparu avant l'apparition des signes digestifs. Après un contact important, les signes sont les mêmes que ceux observés après intoxication "vapeur".

Le délai d'apparition des effets va de une à trente minutes. Une grande quantité de liquide au contact de la peau va provoquer des effets dans les minutes qui suivent. Après contact avec de faibles quantités de toxique, le délai d'apparition des symptômes a pu être aussi long que 18 heures (DORANDEU, 1998). D'une manière générale, on peut dire que plus le délai d'apparition des signes est long, moins l'intoxication est sévère. Après cette période de latence, la progression des effets est assez brutale : perte de connaissance, crise épileptique, apnée, flaccidité musculaire. Lorsque le délai d'apparition est très long, les effets sont initialement d'ordre gastro-intestinal et ne compromettent pas le pronostic vital.

### 3) Effets physiopathologiques :

#### - Effets muscariniques:

Ils sont le résultat de la potentialisation de l'activité parasymphatique post-ganglionnaire sur les muscles lisses, le cœur et certaines glandes exocrines. Les signes dépendant de cet effet incluent:

- un myosis,
- un syndrome respiratoire: constriction thoracique, augmentation des sécrétions bronchiques et broncho-constriction,
- une augmentation des sécrétions salivaires, des larmes et une transpiration abondante

- un syndrome digestif caractérisé par une augmentation de la tonicité digestive avec nausées, vomissements, crampes abdominales, diarrhées, ténésme, défécations involontaires,
- des mictions involontaires,
- une bradycardie qui peut évoluer vers le bloc auriculo-ventriculaire.

**- Effets nicotiniques:**

Ils résultent de l'accumulation de l'acétylcholine au niveau de la plaque motrice et des synapses pré-ganglionnaires des systèmes sympathique et parasympathique :

- faiblesse musculaire pouvant affecter les muscles respiratoires et aggraver la défaillance respiratoire,
- fasciculations musculaires,
- tachycardie qui peut masquer la bradycardie d'origine muscarinique,
- hypertension,
- pâleur.

**- Effets sur le système nerveux central:**

Ils résultent de l'accumulation de l'acétylcholine dans le système nerveux central:

- |                 |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| - anxiété,      | - tension artérielle,       |
| - irritabilité, | - instabilité émotionnelle, |
| - cauchemars,   | - céphalées,                |
| - confusion,    | - ataxie,                   |
| - tremblements, | - langage inintelligible,   |

enfin, coma avec convulsions et dépression des centres respiratoires et circulatoires.

**- Lésions cardiaques:**

Lors des intoxications aiguës graves, des lésions cardiaques, non corrélées au niveau d'inhibition des cholinestérases, peuvent survenir. Elles se traduisent par la survenue progressive d'un choc cardiogénique ou d'un bloc atrio-ventriculaire avec possibilité de survenue brutale d'une asystolie.

**- Les neuropathies:**

*1) Neuropathie retardée:*

Initialement décrite à la suite d'intoxication par le tri-o-crésyl phosphate, un produit sans propriété insecticide, cette neuropathie a également été observée après intoxication aiguë par certains organophosphorés comme le mipafox, le trichlorphon, le phytosol ou le tamaron.

Moins d'une centaine de cas ont été recensés après intoxication par des organophosphorés utilisés comme insecticides. Son mécanisme d'action est lié à l'inhibition irréversible d'une enzyme, l'estérase neurotoxique (NTE). Cette inhibition peut survenir avec de nombreux organophosphorés et même des carbamates. Cependant, l'apparition de la neuropathie semble liée à la possibilité de désalkylation de l'enzyme phosphorylée, rendant son inhibition irréversible (comme dans le cas des cholinestérases). Histologiquement, elle est caractérisée par une dégénérescence axonale centripète atteignant principalement les fibres de faible diamètre.

La neuropathie retardée mixte sensitivomotrice peut survenir typiquement 8 à 14 jours après l'intoxication, qu'il y ait eu ou non des signes cholinergiques. Elle se caractérise par des paresthésies, une faiblesse musculaire avec fatigabilité et, des crampes apparaissant de façon systématique en commençant par les extrémités distales des membres inférieurs. Elle peut également atteindre les membres supérieurs. Les symptômes vont apparaître progressivement en commençant par les extrémités, et s'aggraver durant quelques jours, voire quelques semaines. Après quoi la phase de récupération va débiter. Elle peut aller de plusieurs mois à plusieurs années, pour aboutir à une amélioration souvent partielle des lésions.

## 2) Autres syndromes neurologiques retardés:

Ils ont été décrits expérimentalement chez l'animal, essentiellement après des expositions répétées à des inhibiteurs irréversibles de type sarin. Des cas isolés ont été rapportés chez l'homme : perturbations persistantes de l'électroencéphalogramme et signes subjectifs comme une perte de mémoire, des difficultés de concentration ou de l'onirisme.

## Remarques sur la crise convulsive :

### 1/2) La crise:

L'accumulation du neurotransmetteur dans les synapses neuro-neuronales et neuro-musculaires provoque une réponse exagérée de tous les récepteurs cholinergiques de type nicotinique et muscarinique avec toutes les conséquences physiologiques qu'elle implique. Rappelons que les récepteurs muscariniques sont majoritairement présents dans le cerveau (90 %).

L'aboutissement de cette intoxication aboutit à un état de mal épileptique qui frappe par son ampleur et sa durée. C'est le syndrome convulsif caractéristique de l'intoxication aiguë que le rencontre avec les neurotoxique de guerre.

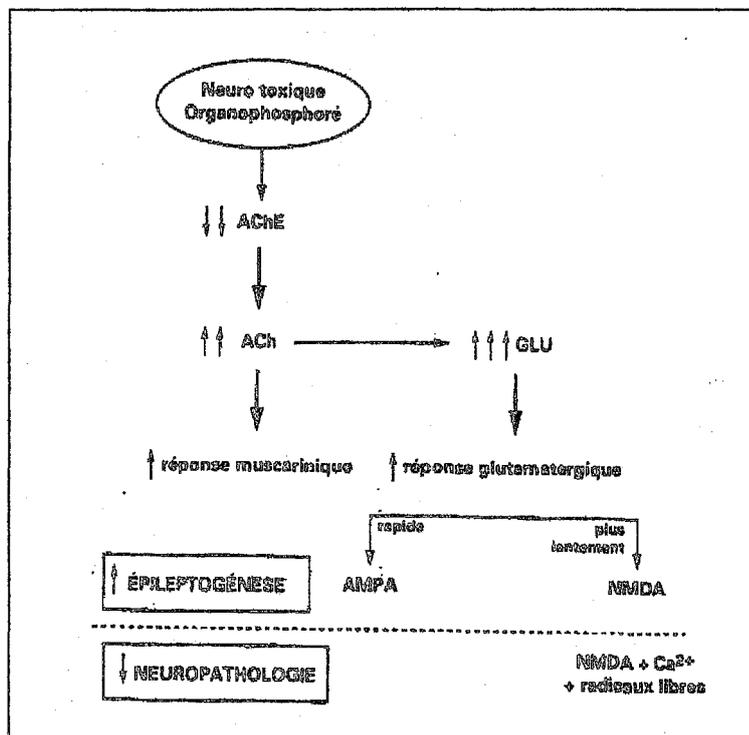
En périphérie, les convulsions motrices sont intenses, de type tonico-clonique. A l'EEG, on observe des décharges paroxystiques ininterrompues pendant des heures. Ces réponses électrophysiologiques exagérées traduisent en réalité de profondes perturbations de l'excitabilité des neurones.

En raison du stockage relativement faible de combustible énergétique dans le neurone, celui-ci est très dépendant de la fourniture en glucose.

Lorsque les convulsions se prolongent, on observe chez les survivants des lésions morphologiques touchant prioritairement les neurones, mais également les cellules gliales. Les

structures les plus atteintes sont : l'hippocampe, le cortex piriforme et le cortex entorhinal. L'encéphalopathie débute généralement par un œdème astrocytaire deux heures après l'intoxication. Les nécroses neuronales surviennent vers la quatrième ou cinquième heure et deviennent massives à 24 heures. Seuls les sujets frappés de crises convulsives présentent à l'autopsie des lésions cérébrales.

A la suite d'accidents de laboratoire, il a été observé des troubles comportementaux chez les sujets ayant respiré malencontreusement des vapeurs de neurotoxiques organophosphorés. Il a été noté : de l'irritabilité, une tendance suicidaire, des pertes de mémoire que l'on attribue généralement à la stimulation excessive des récepteurs cholinergiques dans le système limbique.



**Schéma n° 17 :** Séquence des événements neurochimiques survenant au cours du syndrome convulsif induit par les organophosphorés neurotoxiques (BLANCHET, 1995)

### 2/2) Origine de la crise:

Les mécanismes par lesquels les composés organophosphorés agissent sur le système nerveux sont loin d'être élucidés. Il est pourtant acquis que les effets de ces composés résultent d'une part de l'action de l'acétylcholine sur les synapses cholinergiques et d'autre part d'actions toxiques qu'il est encore difficile de cerner. On admet actuellement que plusieurs systèmes de neurotransmission interviennent dans l'établissement des convulsions.

Dans le cas de l'intoxication au soman par exemple, l'action du toxique se situerait au niveau du système des acides aminés excitateurs. Rappelons que dans le système nerveux central, le médiateur des synapses excitatrices est le glutamate qui peut agir sur différents types de récepteurs. Il agit d'une part sur les récepteurs canaux AMPA (kainate) perméable aux ions monovalents ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) et d'autre part sur les récepteurs canaux NMDA perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . En condition de faible stimulation, le canal récepteur NMDA intervient peu dans la transmission synaptique. En revanche, dans les conditions de fortes stimulations, comme c'est le cas dans les crises épileptiques induites par le soman, la dépolarisation va lever le blocage du canal par les ions  $\text{Mg}^{2+}$  et favoriser un flux entrant de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le neurone. Or on sait que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  favorisent la libération de neurotransmetteurs et entraînent des modifications de l'excitabilité cellulaire.

Le mécanisme de la formation des lésions neuronales est commun à celui survenant lors d'anoxie cérébrale. L'hippocampe est entre autre une région particulièrement touchée par ces phénomènes. De nombreuses données expérimentales suggèrent que la lésion anoxique des cellules de l'hippocampe est due à une libération excitotoxique de glutamate induite par l'anoxie prolongée. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  qui en résulte va induire la mort cellulaire en activant des protéases dépendantes du calcium. Ces protéases vont détruire les protéines constitutives du cytosquelette.

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent également activer des phospholipases pouvant dégrader les lipides membranaires et provoquer la formation de radicaux libres. Un tel mécanisme est proposé dans l'intoxication par les neurotoxiques organophosphorés (BLANCHET, 1991).

#### 4) Le traitement en centre médicalisé :

Le traitement de l'intoxication aux organophosphorés comprend trois phases principales :

- stopper l'absorption en entreprenant une décontamination,
- maintenir les fonctions vitales,
- traiter l'intoxication elle-même.

##### - Décontamination:

S'il n'existe pas de symptômes menaçant rapidement le pronostic vital, il faut procéder en premier lieu à la décontamination.

##### - Décontamination dermique:

- Retirer la personne de la zone contaminée.
- Déshabiller et laver rapidement, abondamment et largement la peau contaminée, si possible avec un savon alcalin qui va également accélérer l'hydrolyse du produit sur la peau.
- En cas d'atteinte oculaire, rincer abondamment avec de l'eau pendant au moins quinze minutes.
- Eviter le contact direct avec le matériel contaminé.

- Décontamination gastrique:

- Si la victime est consciente, adopter les méthodes habituelles de décontamination gastrique, qu'il s'agisse des méthodes manuelles, du sirop d'ipéca, de l'apomorphine ou si l'intoxication le justifie, du lavage gastrique, éventuellement après intubation.

- Stabilisation:

Plusieurs facteurs tendent à entraîner une hypoxie : la parésie des muscles respiratoires, la broncho-constriction, l'hypersécrétion bronchique et celle du niveau bucco-pharyngé, les vomissements chez le sujet inconscient, la dépression respiratoire centrale due à l'organophosphoré et, éventuellement au traitement.

Une prolongation du segment QT à l'électrocardiogramme doit être surveillée, car elle peut entraîner une tachycardie ventriculaire justiciable d'un choc électrique.

Non seulement cette hypoxie et les troubles de la conduction cardiaque sont responsables de la plupart des décès immédiats, mais la présence d'une hypoxie diminue l'efficacité du traitement atropinique tout en augmentant sa toxicité.

-Les moyens thérapeutiques:

S'il existe une forte suspicion d'intoxication aux organophosphorés, le traitement atropinique doit être commencé avant toute confirmation biologique de l'intoxication. La régression de certains symptômes sous l'effet de l'atropine peut même être considérée comme un critère diagnostique complémentaire. Pour la plupart des organophosphorés, il existe une importante synergie d'action entre les oximes, comme le pralidoxime (2-PAM), et l'atropine. Il est rare en effet, chez l'animal, que les oximes seules protègent contre plus de deux fois la  $DL_{50}$ . C'est le cas chez la souris traitée au paraoxon, l'atropine également administrée seule augmente la dose létale d'un facteur 2 tandis que la combinaison des deux augmente cette dose létale d'un facteur 128. En revanche, la faible pénétration de ces oximes dans le système nerveux central limite leur action à ce niveau. Il faut également noter que, du fait de leur fixation sur l'acétylcholine, les oximes à forte dose, ont également une action anticholinestérasique. Il est donc préférable de ne pas les utiliser en l'absence d'atropine.

**L'atropine:** Elle agit essentiellement sur les effets muscariniques. Elle va donc contribuer à améliorer l'hypersécrétion bronchique, l'hypersalivation, la transpiration, les nausées, les signes digestifs et la bradycardie. Elle n'a en revanche que peu d'action sur les signes neurologiques et la faiblesse musculaire. La dose exacte est fonction de la gravité de l'intoxication, du poids et de la réaction du patient au traitement. A titre indicatif on peut mentionner des doses de 2 à 4 mg par voie intraveineuse toutes les 10 à 15 minutes si besoin. L'assèchement des sécrétions montre que la dose efficace est atteinte. La mydriase est un signe d'un surdosage en atropine. Il faut cependant se souvenir qu'une dose excessive d'atropine entraîne rarement des effets graves, tandis qu'une dose insuffisante peut-être fatale.

Quand la phase critique est passée, l'atropine peut être administrée par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Cependant, même quand les symptômes sont rapidement contrôlés par le traitement, si celui-ci a été arrêté trop tôt, une rechute soudaine est possible durant au moins 48 heures.

**Le pralidoxime (2-PAM):** Il est indiqué en cas d'empoisonnement grave avec des symptômes respiratoires et/ou des convulsions et une faiblesse musculaire. Il est également indiqué en présence d'un manque d'amélioration après administration d'atropine.

Le dosage pour l'adulte est de 1 g par voie intraveineuse, sans dépasser 0,5 g par minute. Comme ce produit peut affecter le rythme respiratoire, l'injection doit être lente, et ce rythme surveillé. Si nécessaire, l'administration de pralidoxime peut être répétée 1 à 2 heures, puis 10 à 12 heures après. Dans des cas d'intoxication très sévère, la dose peut être doublée. Les injections peuvent être complétées par une perfusion lente de pralidoxime dans une solution de glucose à 5% pendant 30 à 60 minutes.

Quand l'injection intraveineuse n'est pas possible, elle peut être remplacée par une injection intramusculaire profonde.

Les oximes agissent sur les signes nicotiniques dont la faiblesse musculaire, ainsi que sur les signes neurologiques. L'administration du 2-PAM doit intervenir avant le phénomène de vieillissement du complexe cholinestérase / organophosphoré. Nous avons vu que dans le cas du soman, cette réaction est très rapide, ce qui implique une intervention immédiate. Or ceci n'est facile ! C'est pourquoi le concept du pré-traitement à la pyridostigmine a été mis au point par les services de santé des armées.

#### La protection contre les intoxications aux organophosphorés phytosanitaires:

(PONTAL, 1997)

Vu la dangerosité de ces produits, il convient d'envisager des niveaux de protection pour les personnes venant à être en contact avec ceux-ci. Comme l'ensemble des pesticides, les insecticides organophosphorés sont soumis à des réglementations précises. Ces réglementations visent à protéger les ouvriers chargés de la production, le consommateur de produit traité ainsi que l'utilisateur et son entourage. Cependant, des problèmes persistent dans de nombreux pays, en particulier tropicaux, où se conjuguent le plus souvent l'utilisation des composés les plus toxiques (car ce sont les plus anciens et donc les moins chers), une information insuffisante et un climat rendant le port de vêtement de protection efficaces difficiles à supporter.

##### *1) Protection et surveillance dans les usines:*

Elle est basée sur le respect des règles habituelles d'hygiène industrielle ainsi que des valeurs limites d'exposition quand elles existent. La surveillance du taux des cholinestérases plasmatiques et érythrocytaires permet une détection précoce des dépassements d'exposition. Ces déterminations doivent toujours être comparées à une valeur de base, avant tout contact

avec un organophosphoré. Une dépression de 30% par rapport aux valeurs de base doit entraîner une soustraction du risque ainsi qu'une révision des mesures d'hygiène industrielle. Les pathologies dues aux organophosphorés sont réparées par le tableau 34 du régime général des maladies professionnelles.

---

*2) Protection et surveillance des utilisateurs:*

L'exposition peut survenir soit lors de l'application du produit dans les champs, soit lors de la préparation de la bouillie où du produit concentré est manipulé. La bonne utilisation des protections, telle qu'elle est décrite sur l'emballage de chaque produit, doit théoriquement assurer une marge de sécurité suffisante aux utilisateurs. Actuellement, le calcul de l'exposition théorique des utilisateurs est une condition préalable à l'homologation de nouvelles formulations. Ce calcul permet aussi de définir plus précisément les protections nécessaires.

L'exposition peut aussi survenir lors de l'entrée dans une parcelle traitée pour différentes tâches comme la cueillette, l'éclaircissage... Il n'y a pas, à l'heure actuelle en France, de temps définis avant lequel la réentrée dans un champ traité est interdite. Ce type d'activité a entraîné un certain nombre d'accidents aux organophosphorés en Californie où les doses d'application sont élevées et où une main d'œuvre peu qualifiée et peu informée était fréquemment utilisée. Dans ces états, des temps avant réentrée ont été définis pour de nombreux organophosphorés. Les pathologies dues aux organophosphorés sont réparées par le tableau 11 du régime agricole des maladies professionnelles.

---

*3) Protection des consommateurs:*

Pour chaque organophosphoré sont définis une série de cultures où l'emploi est autorisé, une dose et un nombre d'applications, ainsi qu'un délai entre la dernière application et la récolte. Quand ces conditions sont respectées, les résidus contenus dans la plante ne doivent pas dépasser la LMR (limite maximale de résidus) qui assure elle-même que la quantité absorbée par un individu n'excède pas la dose journalière admissible, ces deux chiffres étant fixés par voie réglementaire.





# Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



