

L'intérêt du spilanthol en odontologie

Arnaud Soupene

► **To cite this version:**

Arnaud Soupene. L'intérêt du spilanthol en odontologie. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01812581

HAL Id: dumas-01812581

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01812581>

Submitted on 11 Jun 2018

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.



THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

présentée par

Arnaud SOUPENE

né le 27 septembre 1988 à Vannes

**L'intérêt du
spilanthol en
odontologie**

**Thèse soutenue à Rennes
le 11 mai 2017**

devant le jury composé de :

Pr Olivier SOREL

PUPH /président du jury

Dr Faustine OBRY

AHU /directeur de thèse

Dr Hervé PRIGENT

MCU /examineur

Dr Yann Loïg TURPIN

MCU /examineur

L'intérêt du spilanthol en Odontologie

Table des matières

Introduction.....	3
Partie I: Généralités sur la plante, botanique et toxicité.....	4
1. Généralités et botanique (5-6-7-8-9-10).....	4
1.1 Généralités sur la plante : Spilanthès acmella.....	4
1.2 Utilisations en médecine traditionnelle.....	5
1.3 Botanique.....	6
Avant le XVII ^{ème} siècle il n'existait pas de règle universelle pour nommer et classer les plantes, les descriptions étaient purement utilitaires (comestible, médicinale, etc), souvent incomplètes et parfois fantaisistes avec peu d'ouvrages. A partir du XVII ^{ème} siècle, plusieurs scientifiques tentent de mettre en place une classification et une nomenclature universelle. En 1753, Charles Linné, un botaniste suédois, publie <i>Species Plantarum</i> qui marque le début de la nomenclature botanique spécifique.....	6
2. Toxicité.....	8
2.1 Test de dépistage Hippocratique et toxicité aiguë (17).....	8
2.2 Mesure de l'activité locomotrice (17)	8
2.3 Résultats de l'étude.....	9
Partie 2 : Effet anesthésique	9
1 Étude de l'efficacité en tant qu'anesthésique topique d'un extrait de Spilanthès acmella (23)	10
1.1 Introduction.....	10
1.2 Matériels et méthodes.....	10
1.2.1. Production d'extrait éthanolé brut de Spilanthès acmella.....	10
1.2.2 Traitement de l'extrait au charbon actif.....	10
1.2.3 Analyse du spilanthol.....	11
1.2.4 Préparation des films muco-adhésifs contenant des extraits de Spilanthès Acmella Oleraceae.....	11
1.2.5 Caractérisation des films muco-adhésifs.....	11
1.2.6 Étude in vitro de la perméabilité de la muqueuse buccale au spilanthol.....	12
1.2.7 Efficacité anesthésique In vivo.....	13
1.3 Résultats.....	14
1.3.1 Préparation des extraits.....	14
1.3.2 Caractérisation des films muco-adhésifs.....	14
1.3.3 Tests de perméabilité in vitro.....	15
1.3.4 Tail-flick test.....	16
1.3.5 Lien entre tests in vitro et tests in vivo.....	17
1.4 Discussion.....	18
1.5 Conclusion.....	18
2 Effets anti-nociceptifs d'un extrait éthanolé de fleurs de Spilanthès acmella oleraceae sur des souris (17).....	19
2.1 Introduction.....	19
2.2 Matériels et méthodes.....	19
2.2.1 Tests orofaciaux de la nociception des rats.....	19
2.2.1.1 Nociception induite par une injection orofaciale de formaline.....	19
2.2.1.2 Nociception induite par une injection orofaciale de capsaïcine ou cinnamaldéhyde.....	20
2.2.2 Hyperalgésie thermique induite par la capsaïcine.....	20
2.3 Résultats.....	21
2.3.1 Nociception induite par une injection orofaciale de formaline.....	21
2.3.2 Nociception induite par une injection orofaciale de capsaïcine ou cinnamaldéhyde.....	22
2.3.3 Réduction par le spilanthol de l'hyperalgésie thermique induite par la capsaïcine.....	22
2.4 Discussion	22
2.5 Conclusion.....	23
Partie 3 : effet anti-inflammatoire.....	24
1. Introduction.....	24

2 Matériels et méthodes.....	25
2.1 Extraction et isolation	25
2.2 Culture cellulaire	26
2.3 DPPH Neutralisation des radicaux libres=Test de réduction du radical stable.....	26
2.4 Mesure de la capacité inhibitrice d'extraits de <i>Spilanthes acmella</i> sur la production d'oxyde nitrique.....	28
2.5 Viabilité des cellules.....	28
2.6 Western blot.....	28
2.7 Mesures concernant les cytokines.....	29
2.8 Dosage immuno-enzymatique de NF- κ B p65 activé.....	29
2.9 Analyse statistique.....	30
3. Résultats.....	30
3.1 Cytotoxicité des extraits.....	30
3.2 Capacité inhibitrice d'extraits de <i>Spilanthes acmella</i> sur la production d'oxyde nitrique (NO)	30
3.3 Effet inhibiteur du spilanthol sur la production de NO induite par les LPS.....	30
3.4 Effet inhibiteur du spilanthol sur la production de iNOS et COX-2.....	31
3.5 Effet inhibiteur du spilanthol sur la production de cytokines pro-inflammatoires.....	32
5. Conclusion.....	35
Partie 4 Effet sialogogue, anti-microbien et antifongique.....	35
1. Effet sialogogue.....	35
2. Effet microbien.....	36
3. Effet anti-fongique.....	37
Conclusion.....	37

Introduction

Vivre implique forcément d'être malade un jour. Depuis des temps immémoriaux l'homme s'efforce de soigner des affections avec ce dont il dispose. Ainsi l'utilisation de plantes remonte à la préhistoire (1). Une étude récente s'est intéressée à l'analyse microscopique et à l'étude par spectrométrie du tartre fossilisé d'hommes préhistoriques. L'hygiène bucco-dentaire étant absente, de fines particules s'y emprisonnent et se fossilisent, ce qui apporte de nombreuses informations concernant les habitudes alimentaires du groupe étudié. Ce groupe est composé de 13 néandertaliens fossilisés, provenant du site d'El Sidron, au nord de l'Espagne. Dans le tartre de ces ancêtres de l'homo sapiens, âgés de 50 000 ans environs, a été retrouvé des traces d'*Achillea millefolium* et de camomille, des plantes médicinales, ce qui suggère leur utilisation et en ferait le

plus ancien soin par les plantes connu à ce jour (2). Après des siècles d'utilisation d'extraits de plantes, la pharmacologie moderne s'est tournée vers les molécules synthétiques qui semblaient avoir une efficacité accrue de part leur spécificité et l'apparente infinité de molécules pouvant être synthétisées en laboratoire. La pratique du soin par les plantes a donc lentement diminué dans les pays occidentaux pour devenir presque inexistante aujourd'hui (Tyagi et Delanty, 2003). Néanmoins nous assistons actuellement à une augmentation du nombre d'études concernant les extraits végétaux et ce pour plusieurs raisons: la recherche de nouvelles molécules synthétiques est lente et très onéreuse, leur utilisation présente des risques d'empoisonnement pour les hommes et les animaux et ces molécules sont parfois responsables de pollutions environnementales associées. Le fait que les extraits végétaux puissent être obtenus à partir de ressources renouvelables associé au développement lent des résistances dû à la présence de plusieurs agents actifs et leur dégradation rapide, amoindrissant leur risque pour l'environnement, sont des aspects en faveur de l'utilisation de ces composés (3). Ce document s'intéresse au spilanthol, un N-alkylamide provenant de *Spilanthes acmella* (Ramsewak et al. 1999). Plusieurs études seront rapportées afin de réfléchir à de possibles applications en odontologie.

Partie I: Généralités sur la plante, botanique et toxicité

Le spilanthol peut être obtenu par extraction selon différents procédés à partir de *Spilanthes acmella*. Afin d'évaluer l'intérêt du spilanthol en odontologie il convient tout d'abord de s'intéresser aux plantes dont il peut provenir puis d'en évaluer la toxicité.

1. Généralités et botanique (5-6-7-8-9-10)

1.1 Généralités sur la plante : *Spilanthes acmella*

Figure 1 : Photo de *Spilanthes acmella*



Spilanthes acmella est une plante d'origine amazonienne que l'on retrouve dans la plupart des zones tropicales et subtropicales de la planète (Afrique, Amérique du sud, Bornéo, Inde, Sri Lanka et Asie) (Ramsewak et al. 1999, Sahu et al., 2011). Elle est cultivée tout au long de l'année comme plante ornementale, médicinale et alimentaire. Elle est annuelle ou brièvement pérenne, mesure de 40 à 60 centimètres et pousse dans les régions humides (Sahu et al., 2011- Wongsawatkul et al. 2011). Ses fleurs et ses feuilles ont un goût piquant ce qui explique pourquoi elles sont utilisées comme épices dans certains pays comme Madagascar, qui en ont fait une spécialité nationale, le «romazava», ou au Japon (Leng et al., 2011). Une fois mâchée le goût piquant est accompagné de fourmillements et d'un engourdissement de la muqueuse buccale (Wongsawatkul et al. 2008).

1.2 Utilisations en médecine traditionnelle

Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle depuis des siècles comme traitement des stomatites, infections herpétiques (Prachayasittikul et al. 2013), douleurs dentaires (Ramsewak et al. 1999) en plus d'être utilisée comme analgésique et anesthésique local. En effet plusieurs études ont montré son caractère anesthésique, antalgique, sialogogue (Rios, 2012), anti-inflammatoire, antibactérien (Ratnasooriya et al. 2004, Prasad et Seenaya 2000) et antifongique (Sharma et al. 2012). Cette plante, à la culture facile et au rendement élevé, est également une arme de choix dans la lutte contre le paludisme en Afrique, le spilanthol ayant montré son efficacité sur la prolifération du *plasmodium falciparum*. Voilà pourquoi il entre dans la composition du malarial 5 (4), un anti-paludéen très utilisé en Afrique du fait de son faible coût de production.

Les différentes propriétés rapportées par plusieurs études ont été regroupées dans le tableau suivant :

Health care	Treatment	Plant extract	References
Medical	Rheumatism, fever Diuretics Flu, cough, rabies diseases, Tuberculosis, antimalarials, Antibacterials	leaves, flowers	Bunyapraphatsara and Chokechareunporn, 1999; Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992 Yadav and Singh, 2010 Haw and Keng, 2003
	Antifungals, skin diseases Immunomodulatory Antiscorbutic Local anesthetics Digestive	leaves	Tiwari et al., 2011 Sahu et al., 2011 Leng et al., 2011; Sahu et al., 2011 Tiwari et al., 2011 Leng et al., 2011; Sahu et al., 2011
	Obesity control (lipase inhibitor)	flowers	Yuliana et al., 2011
	Snake bite	whole plant	Tiwari et al., 2011
Dental	Toothache	leaves, flower	Haw and Keng, 2003; Tiwari et al., 2011
	Toothpaste	leaves	Savadi et al., 2010
	Periodontal disease	flower heads, roots	Abascal and Yarnell, 2001; Sahu et al., 2011; Shimada and Gomi, 1995
	Recurrent aphthous stomatitis	leaves	Abascal and Yarnell, 2010
Beauty care cosmetics	Fast acting muscle relaxant Anti wrinkle	whole plant	Belfer, 2007 Demarne and Passaro, 2009; Schubnel, 2007

Tableau 1 : Utilisation traditionnelle de *Spilanthes acmella*

1.3 Botanique

Avant le XVII^{ème} siècle il n'existait pas de règle universelle pour nommer et classer les plantes, les descriptions étaient purement utilitaires (comestible, médicinale, etc), souvent incomplètes et parfois fantaisistes avec peu d'ouvrages. A partir du XVII^{ème} siècle, plusieurs scientifiques tentent de mettre en place une classification et une nomenclature universelle. En 1753, Charles Linné, un botaniste suédois, publie Species Plantarum qui marque le début de la nomenclature botanique spécifique.

Avant Linné, les plantes étaient nommées par polynômes, additionnant les différentes caractéristiques de la plante étudiée, ce qui en faisait une addition de noms complexes difficiles à utiliser et non universels. Linné a introduit la nomenclature binomiale : une plante est nommée à l'aide de 2 noms, le premier pour l'espèce avec première lettre en majuscule et le second pour le genre en minuscules avec parfois une initiale pour terminer (nom du découvreur) et tout en italique :

Bellis perennis L.

Quelle que soit la langue utilisée, le nom des plantes doit être écrit en nomenclature binomiale.

Concernant la classification systématique on place l'organisme étudié dans des taxons (cette science est appelée taxonomie).

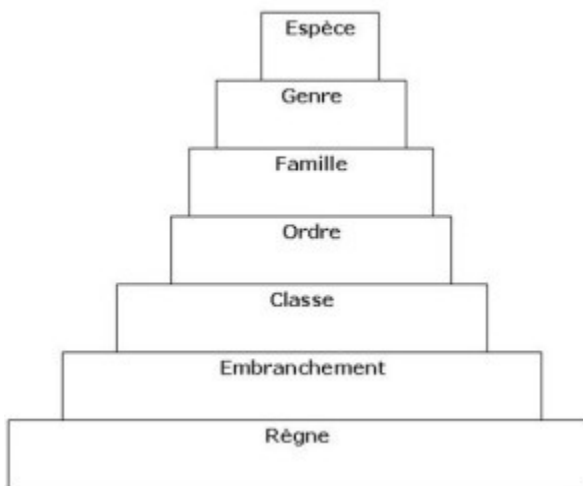


Figure 2 : Groupes de classements des êtres vivants

A ces taxons s'additionnent des sous groupes comme les sous-embranchements, sous classes, tribu, sous tribu, etc.

Ainsi *Spilanthès acmella* appartient:

- au règne végétal
- à l'embranchement des Spermaphytes (plantes à graines)
- au sous-embranchement des Angiospermes (plantes à fleurs)
- à la classe des Dicotylédones (2 cotylédons: feuille primordiale apparaissant à la germination)
- à la sous-classe des Gamopétales (pétales soudés en un tube)
- à l'ordre des Synanthérales (anthère: partie terminale de l'étamine, organe mâle de la fleur, qui produit et renferme le pollen. Ici les anthères sont soudées autour du style)
- à la famille Asteraceae (plante herbacée avec une multitude de petites fleurs regroupées en capitules)
- à la tribu des Hélianthées (grands capitules jaunes, comme le tournesol)
- au genre *Spilanthès*.

Plusieurs auteurs ont décrit cette plante sous différents noms. Ainsi de nombreux synonymes sont retrouvés dans la littérature (11). Il semblerait que selon les continents où se rencontre la plante plusieurs dénominations soient utilisées dont (11 , 12) :

- *Spilanthes acmella* en Asie: Inde, Indonésie.
- *Spilanthes uliginosa* S.W. en Afrique: Soudan, Cameroun, Mali.
- *Spilanthes oleraceae* Jacq. en Amérique du Sud (Brésil, Pérou) et en Indonésie.

Les nombreux noms donnés à l'espèce seraient dus aux nombreuses localisations de l'espèce mais aussi et surtout à quelques variations morphologiques de la plante (différence de taille et de couleur des organes) (13). Les noms vulgaires de la plante sont: brède mafane, cresson de para ou encore jambu (14, 15, 16).

2. Toxicité

Le grec Hippocrate fut le premier à observer que selon la dose et le mode d'administration, une substance passe du remède au poison : « la dose fait le poison ». Afin d'être utile en odontologie, le Spilanthol doit présenter une toxicité faible à des doses efficaces.

2.1 Test de dépistage Hippocratique et toxicité aiguë (17)

Dans le but d'étudier les effets d'un extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* sur le comportement général d'animaux conscient (18), des souris subissent un jeûne d'une nuit (12h) avec un libre accès à l'eau avant une injection intrapéritonéale avec une dose unique de l'extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* (5, 50, 500 et 5000 mg/kg). Les signes et symptômes provoqués par l'administration de l'extrait sont observés sur des animaux ayant la liberté de mouvement à 0, 30, 60, 120, 180, 240 et 300 minutes après l'injection puis une fois par jour sur 7 jours. Le nombre de survivants est noté à la fin de l'expérience.

Ainsi l'effet toxicologique est évalué sur la base de la mortalité, exprimée par la dose requise en mg/kg pour causer la mort de 50% des animaux testés (LD50 : lethal dose 50) d'après la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

2.2 Mesure de l'activité locomotrice (17)

Le comportement exploratoire et l'activité locomotrice sont testés en utilisant le test en champ ouvert (open field test) comme précédemment décrit par Rodrigues et al. (2012). Une solution saline (10mL/kg) ou avec un extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* (10, 30 et 100 mg/kg) est injectée au niveau du péritoine des souris et 30 minutes après, les animaux sont placés au milieu d'un espace circulaire (42 cm de diamètre et 24 cm de hauteur).

Figure 3: Open field test circulaire à 19 cases



Ce disque est séparé en 19 zones: au centre, au milieu et en dehors du cercle afin de laisser la liberté de mouvement à la souris. Le nombre de secteurs explorés avec toutes les pattes est noté pendant 5 minutes.

2.3 Résultats de l'étude

Concernant la toxicité aiguë, l'injection d'une dose unique d'un extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* à des doses de 5, 50 et 500 mg/kg n'a causé aucun changement visible, pas de signes ou de symptôme de toxicité. De plus, aucune mort n'a été enregistrée pour ces doses jusqu'au 7ème jour d'observation. Par contre, l'injection unique d'une dose de 5000 mg/kg a causé des troubles respiratoires et des convulsions, aboutissant à la mort de tous les animaux traités en moins de 3 minutes. La valeur du LD50 calculé est de 889,14 mg/kg avec un intervalle de confiance de 95%. Selon la classification de Loomis et Hayes, une substance présentant un LD50 compris entre 5 et 15g.kg⁻¹ est considérée comme presque non toxique. Le LD50 du spilanthol se situe bien en dessous, ce qui en fait une substance très peu toxique. Les organes internes de toutes les souris traitées n'ont montré aucun signe inhabituel et apparaissent normaux en forme et en couleur. Concernant l'étude en champ ouvert, le traitement des animaux avec un extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* (10, 30 et 100 mg/kg) n'a pas affecté l'activité locomotrice en comparaison avec le groupe témoin. *Spilanthes acmella oleracea* est classée comme sûr (GRAS # 3783) par la « Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA) » (19) et « l'autorité de sûreté alimentaire européenne » (EFSA) (20). Elle présente une toxicité faible (31, 35, 36) et une utilisation répandue.

Partie 2 : Effet anesthésique

L'une des premières caractéristiques avancée par les consommateurs de *Spilanthes acmella* est un engourdissement et un picotement des muqueuses buccales lors de la mastication de cette plante, cuite ou crue et qui seraient dus à la présence de spilanthol. Ayant une faible toxicité, ce dernier pourrait être intéressant en tant qu'anesthésique local, si ses caractéristiques anesthésiques se

confirment.

1 Étude de l'efficacité en tant qu'anesthésique topique d'un extrait de *Spilanthes acmella* (23)

1.1 Introduction

Près d'un tiers de la population ressent de l'anxiété avant une anesthésie locale car ils pensent avoir mal au moment de l'injection (24-25). En effet ces procédures douloureuses ont significativement réduit la demande de soins pour certains patients (26-27).

Le coût élevé des topiques synthétiques commerciaux les rendent viables sur de faibles surfaces. De plus certains rapports mettent en avant le côté neurotoxique et cardiotoxique induit par la lidocaïne et d'autres anesthésiques locaux (28-29) ce qui justifie le développement de nouveaux substituts.

Le spilanthol, un N alkylamide, est un composant bio actif de *Spilanthes acmella*, utilisé comme épice, condiment, dans certains chewing-gums et dentifrices. Quant il est ingéré il provoque des fourmillements et des engourdissements (30-31).

En considérant le manque de substances adéquates en anesthésie topique de la muqueuse buccale, l'extrait de *Spilanthes acmella* semble être un bon candidat à des tests cliniques.

L'étude présentée s'intéresse au développement et à l'évaluation d'un nouveau film muco-adhésif contenant un extrait d'*Acmella oleracea* pour anesthésie topique de la muqueuse buccale.

1.2 Matériels et méthodes

1.2.1. Production d'extrait éthanolé brut de *Spilanthes acmella*

La plante utilisée dans cette étude est tirée du champ de culture expérimental du centre de recherche de chimie, de biologie et d'agriculture de l'université de Campinas situé à Paulinia (état de Sao Paulo, Brésil). La provenance, la qualité et l'identification de la plante est confirmée par Le Dr John F. Pruski du jardin botanique du Missouri, USA. La plante (sans ses racines) est séchée et broyée. L'extraction est réalisée dans de l'éthanol à 95% sous agitation mécanique dans un réservoir en acier inoxydable pendant 90 minutes. On retire les résidus par filtration et le procédé est renouvelé 2 fois. Le composé final est de nouveau filtré, homogénéisé et concentré sous vide puis lyophilisé. Ce lyophilisat est utilisé pour déterminer la masse sèche finale par pesée afin de calculer le rendement. Le rendement du processus est déterminé par le rapport entre la masse de plante utilisée et la masse finale de lyophilisa obtenu. La concentration de spilanthol dans l'extrait est estimée à 3%. Il est stocké au réfrigérateur à 8°C avant le traitement au charbon actif.

1.2.2 Traitement de l'extrait au charbon actif

L'extraction est renouvelée afin de confirmer la reproductibilité de la procédure mais sans la phase

de séchage. Les extraits obtenus sont mélangés et filtrés puis additionnés de 4% de charbon actif. La mixture obtenue est mélangée et traitée en utilisant du charbon actif particulaire (29). L'extrait est concentré sous vide, lyophilisé et stocké au réfrigérateur à 8°C avant la prochaine utilisation.

1.2.3 Analyse du spilanthol

L'analyse de l'extrait et des films muco-adhésifs est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse.

1.2.4 Préparation des films muco-adhésifs contenant des extraits de *Spilanthus Acmella*

Oleraceae

Le chitosane ou chitosan est utilisé comme agent formant le biofilm du fait de sa biocompatibilité, de son caractère biodégradable et non toxique. De plus chitosan interagit avec les ions chargés négativement de la surface épithéliale. Il est produit par désacétylation chimique ou enzymatique de la chitine, un composant de l'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calmars).

Le chitosan est dilué dans 1% d'acide acétique avec l'aide d'un homogénéisateur mécanique et la solution est versée dans des moules en polystyrène.

La phase finale de la production de films muco-adhésifs est réalisée par séchage à l'étuve à 40°C pendant 30 heures.

Les extraits éthanolés de *Spilanthus Acmella* à des concentrations de 10% (avec traitement au charbon actif ou non) et 20% avec 0,1% de méthylparabène et 5% de transcutool sont mélangés avec le gel de chitosan préparé préalablement.

Ce qui nous donne 3 films muco-adhésifs à tester :

- avec 10% d'extrait brut de *Spilanthus acmella*
- avec 20% d'extrait brut de *Spilanthus acmella*
- avec 10% d'extrait brut de *Spilanthus acmella* traité avec 4% de charbon actif

1.2.5 Caractérisation des films muco-adhésifs

La caractérisation physico-chimique des films est réalisée en considérant différents paramètres : l'uniformité de poids et d'épaisseur, le pH, la concentration en spilanthol et la stabilité du composé.

Les films muco-adhésifs sont coupés, la masse est mesurée à l'aide d'une balance analytique et l'épaisseur mesurée à l'aide d'un pachymètre et ce afin de normaliser les résultats.

La stabilité physico-chimique des films est évaluée en emballant les produits dans de l'aluminium étanche doublé de plastique avec des fermetures hermétiques et stockés à 40+/-1°C pendant 120 jours (pas de contrôle de l'humidité car le produit est stocké hermétiquement). Les échantillons sont

analysés à 0 et 120 jours, en considérant leurs aspects, leurs pH et leurs concentrations en spilanthol. Ce test est réalisé sur 3 échantillons de chaque film.

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre à température ambiante.

Le calcul de la concentration en spilanthol des films mucoadhésifs est réalisé par un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse.

1.2.6 Etude in vitro de la perméabilité de la muqueuse buccale au spilanthol

L'étude de la perméabilité de la muqueuse buccale au spilanthol est réalisée à l'aide d'une cellule de diffusion appelée cellule de Franz. Ce test est communément utilisé pour évaluer la perméabilité de la peau ou d'une muqueuse à différents composés (32). Les tests sont menés sur de la muqueuse œsophagienne de porc provenant d'un abattoir local.

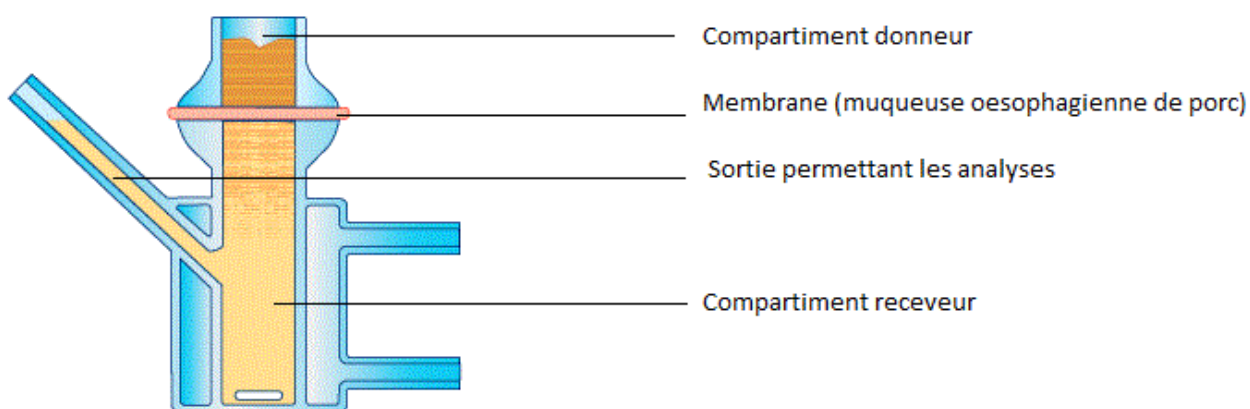


Figure 4 : Schéma d'une cellule de diffusion de Franz

Selon la méthode décrite par Diaz de Consuelo en 2005(33), la muqueuse œsophagienne de porc est considérée comme équivalente à l'épithélium de la muqueuse buccale car elle a des caractéristiques histologiques, une perméabilité et une composition épithéliale similaire (33-34). De plus cette muqueuse présente certains avantages comme une surface disponible plus importante, l'absence de dommages causés par la mastication et une préparation aisée.

Deux heures après l'abattage du porc, la muqueuse œsophagienne est séparée délicatement du tissu sous-jacent à l'aide d'un scalpel. Les muqueuses avec le moindre dommage visuel sont écartées. L'épithélium est séparé du tissu conjonctif après immersion dans de l'eau dé-ionisée à 60°C pendant 2 minutes et utilisé immédiatement. Cette température est incapable d'altérer l'intégrité et la perméabilité du tissu (33, 35, 36).

Le film est appliqué sur la muqueuse, elle même fixée sur une membrane. Le tout est clampé entre la chambre donneuse et la chambre receveuse de la cellule de diffusion de Franz. La chambre

réceptrice est remplie d'une solution saline de méthanol afin de maintenir des conditions efficaces. L'expérience est réalisée à 37°C pendant 5 heures sous agitation magnétique (400 tours/min). Des échantillons de 0,3mL sont périodiquement prélevés du compartiment récepteur et immédiatement remplacés par le même volume de solution initiale en tenant compte de la dilution. Les échantillons sont alors transférés dans des ampoules de chromatographie et stockées au réfrigérateur jusqu'à l'analyse chromatographique en phase gazeuse et spectrométrique de masse afin d'évaluer la quantité de spilanthol présente dans le compartiment récepteur. Cette expérience est reproduite 6 fois.

1.2.7 Efficacité anesthésique *In vivo*

L'expérience est réalisée sur des souris mâles (25 à 40g) maintenue à 25+/-2°C, avec des cycles jour/nuit de 12 heures et vivant dans des cages pendant 7 jours avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Les animaux sont divisés en groupes de 5 à 6 et utilisés une seule fois pour l'expérience. L'étude de l'efficacité anesthésique est menée à l'aide du «Tail Flick test» (test des mouvement de queue). Ce test est particulièrement adapté à l'étude des propriétés analgésiques de substances pharmacologiques. Il peut être utilisé sur les rats et les souris. L'animal est maintenu immobile dans un cylindre de verre tandis que sa queue est soumise à une source de chaleur provenant d'une lampe à incandescence (55°C). Lorsque l'animal ressent un inconfort il réagit par un mouvement brusque de la queue qui arrête automatiquement la stimulation et le chronomètre mesurant le temps de latence de la réaction.



Figure 5 : Souris dans l'appareil de Tail Flick test

La valeur de référence est enregistrée pour chaque animal avant le début de l'expérience. Les animaux réagissant avant 4 secondes seront les seuls à être utilisés dans l'expérience. L'intervalle d'exposition à la chaleur est fixé à un maximum de 10 secondes afin d'éviter les dommages tissulaires. Les 3 films mucoadhésifs préparés selon les méthodes décrites préalablement seront comparés à l'EMLA (150mg/animal ce qui correspond à 7,5mg d'anesthésique) comme contrôle

positif et à un contrôle négatif avec un film mucoadhésif de chitosan sans extrait éthanolé de *Spilanthès acmella*. L'EMLA (prilocaine et lidocaïne) a été choisit pour son efficacité à réduire la douleur produite par l'injection lors des anesthésies locales (37-38).

Les films mucoadhésifs et l'EMLA sont appliqués à 2cm de la base de la queue jusqu'à son extrémité à l'aide d'une bande adhésive pendant 2 minutes. Ces substances sont alors enlevées et la source de chaleur est appliquée sur la même région. Les mesures sont réalisées immédiatement après le nettoyage de la queue puis toutes les 15 minutes jusqu'à ce que la réaction de l'animal revienne à sa valeur de référence.

Il sera considéré comme une analgésie efficace un temps de réaction supérieur à 50% de la valeur de référence.

Les données seront exprimées comme un pourcentage de l'effet maximal pouvant être attendu (Maximum Possible Effect : MPE = hauteur maximale de la courbe à un instant t (39) en utilisant la formule suivante :

$$\%MPE = \frac{\text{latence expérimentale} - \text{latence de référence}}{\text{arrêt de sécurité} - \text{latence de référence}} \times 100$$

1.3 Résultats

1.3.1 Préparation des extraits

$$\text{rendement} = \frac{\text{masse de plante utilisée}}{\text{masse du lyophilisat obtenu}}$$

Le rendement des extraits bruts de *Spilanthès acmella* est de 7,7+/-0,08% alors que celui des extraits de *Spilanthès acmella* traité avec du charbon actif est de 4,0+/-0,03%. Cette diminution du rendement pour les extraits traités au charbon actif ne diminue pas la concentration en spilanthol. En fait elle augmente, les pigments verdâtres dépourvu de spilanthol étant enlevés par ce procédé.

1.3.2 Caractérisation des films muco-adhésifs

Le tableau suivant montre les valeurs moyennes d'épaisseur, de poids, de pH et de concentration en spilanthol obtenues pendant les tests de stabilité.

Extraits	Epaisseur en mm (n=7)	Poids en g (n=7)	PH (n=3)		Contenu en spilanthol (mg/g)	
			Jour 0	Jour 120	Jour 0	Jour 120
10% extrait brut	0,45 ± 0,02	0,13 ± 0,01	5,3 ± 0,03	5,4 ± 0,24	17,6 ± 1,41	16,7 ± 0,21
20% extrait brut	0,53 ± 0,01	0,14 ± 0,01	5,1 ± 0,02	5,1 ± 0,05	35,9 ± 5,59	36,2 ± 2,62
10%extrait brut+4% charbon actif	0,52 ± 0,01	0,14 ± 0,01	4,9 ± 0,02	5,3 ± 0,05	22,9 ± 3,39	25,0 ± 0,85

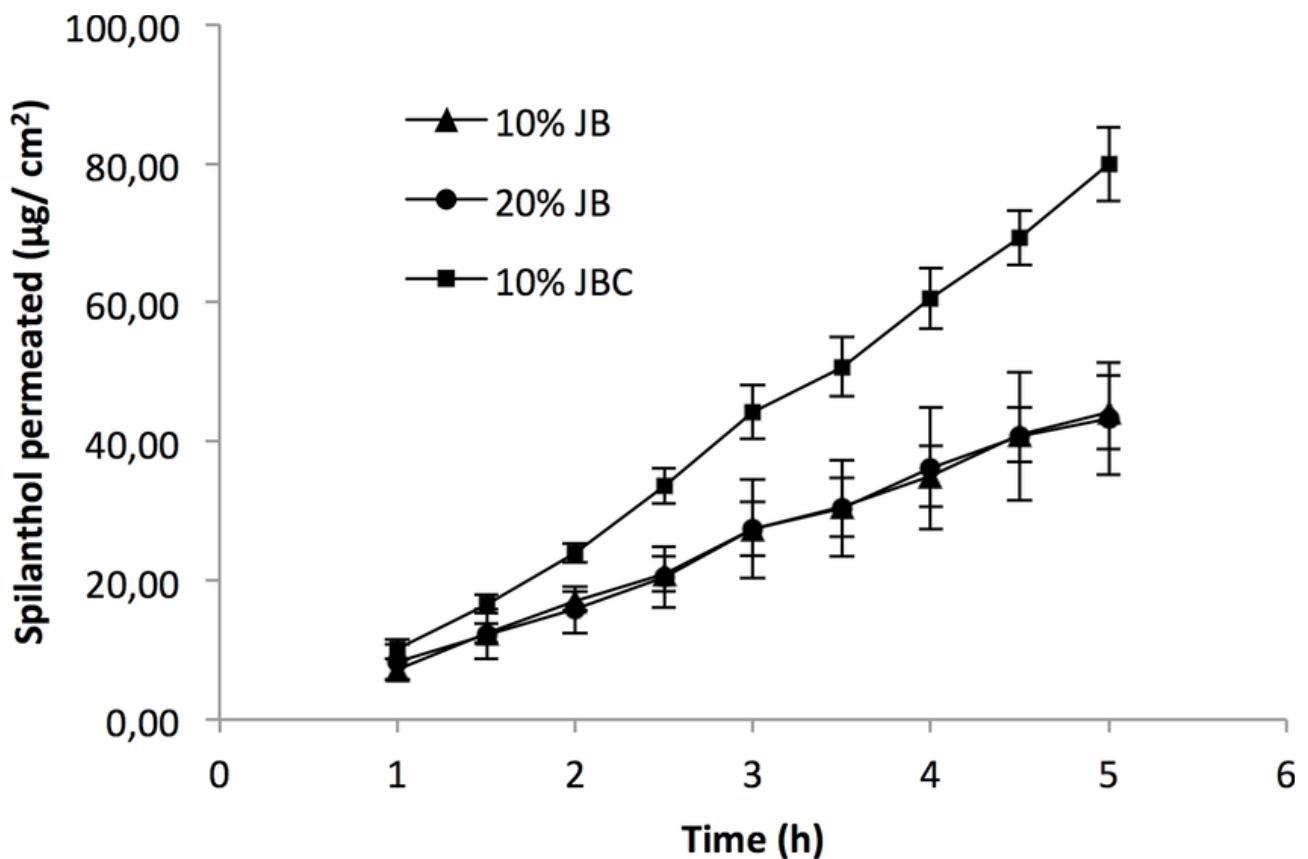
Tableau 2 : Caractéristiques (épaisseur, poids, pH et contenu en spilanthol des trois biofilms

Après 120 jours de stockage à 40°C, l'étude montre qu'il n'y a pas de dégradation significative du contenu en spilanthol dans les films muco-adhésifs. Le pH est resté stable avec des changements non significatifs avec un intervalle de confiance de 95% (p=5%).

1.3.3 Tests de perméabilité in vitro

Le graphe montre les différences de perméabilité de la muqueuse œsophagienne de porc vis à vis des films muco-adhésifs testés.

Figure 6 : perméabilité de la muqueuse œsophagienne de porc pour les 3 films muco-adhésif testés



La régression linéaire ($p < 0,0001$) montre une perméabilité supérieure pour l'extrait éthanolé à 10% d'extrait brut additionné de 4% de charbon actif (JBC) comparativement aux extraits éthanolés bruts à 10% et 20% (10%JB et 20%JB). Ces derniers ne diffèrent pas l'un de l'autre avec $p = 0,474$ malgré la différence de concentration de spilanthol variant du simple au double.

Le film muco-adhésif 10%JBC présente un flux au travers de la muqueuse œsophagienne de porc supérieure en comparaison des films 10%JB et 20%JB qui ne diffère pas entre eux :

- 10%JB et 20%JB $\implies \approx 9,35 \mu\text{g}.\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$
- 10%JBC $\implies \approx 17,70 \mu\text{g}.\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$

Le film muco-adhésif 10%JBC présente le coefficient de perméabilité le plus élevé au travers de la muqueuse en comparaison des films 10%JB et 20%JB:

- 10%JB $\implies \approx 3,86 \times 10^{-3} \text{cm}.\text{h}^{-1}$
- 20%JB $\implies \approx 1,84 \times 10^{-3} \text{cm}.\text{h}^{-1}$
- 10%JBC $\implies \approx 5,17 \times 10^{-3} \text{cm}.\text{h}^{-1}$

1.3.4 Tail-flick test

Le graphe suivant montre les résultats obtenus par le *Tail-Flick test*. Ces derniers sont exprimés en pourcentage de l'effet maximal escompté selon la formule présentée au paragraphe «matériels et

méthodes».

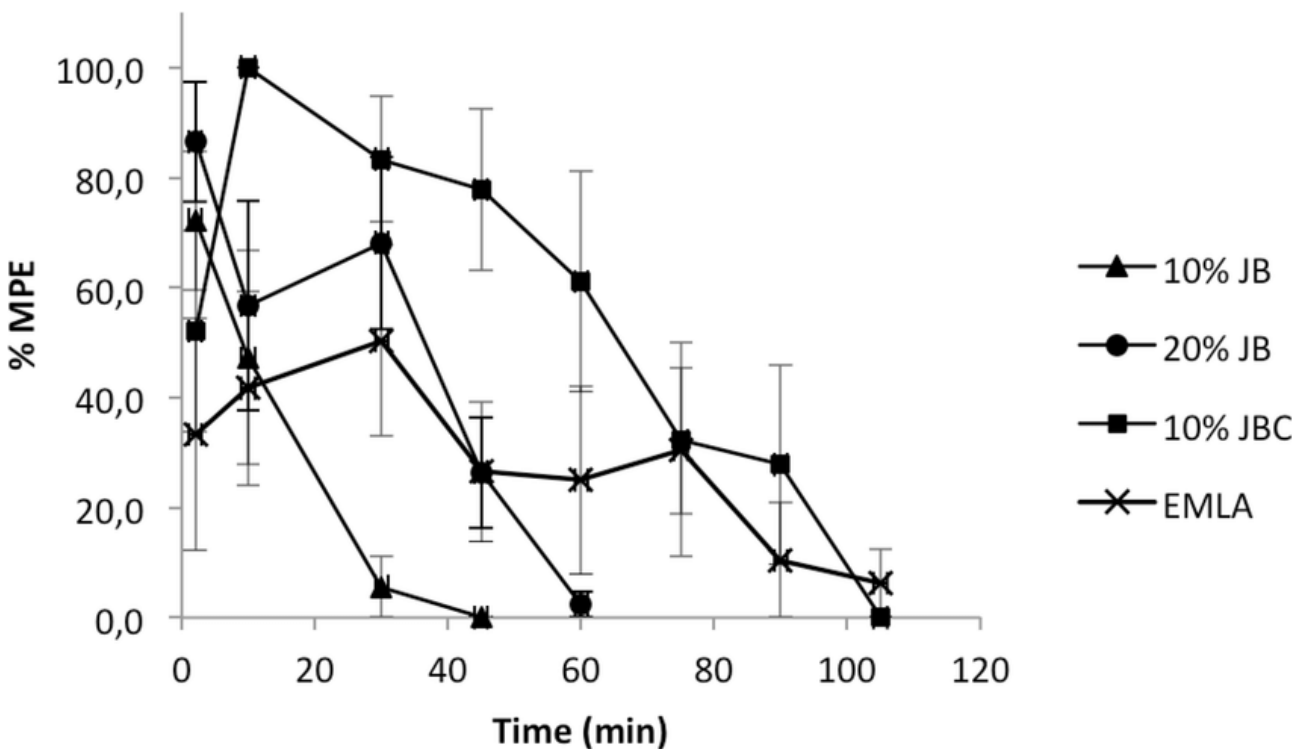


Figure 7 : effet maximum attendu («Maximum Possible Effect MPE») des films mucoadhésifs 10%JB, 20%JB, 10% JBC et EMLA en fonction du temps.

Le film muco-adhésif 10%JBC possède une aire sous courbe significativement plus importante que les autres formulations, y compris celle de l'EMLA, le topique anesthésique de premier choix en odontologie actuelle.

Comme prévu, le film muco-adhésif contenant du chitosan sans extrait de *Spilanthes acmella*, pris comme test négatif, ne révèle pas d'activité anti-nociceptive.

1.3.5 Lien entre tests in vitro et tests in vivo

Afin d'analyser la corrélation entre les résultats des tests in vitro et in vivo, le calcul du coefficient de Pearson «r» est utilisé. Ce coefficient permet de détecter la présence ou l'absence d'une relation linéaire entre deux caractères quantitatifs continus. Une relation linéaire s'observe lorsque que l'on peut exprimer la corrélation entre deux paramètres à l'aide de la formule $Y = aX + b$. Pour calculer le coefficient de Pearson « r » il faut tout d'abord calculer la covariance. La covariance est la moyenne du produit des écarts à la moyenne.

Le coefficient de corrélation linéaire de deux caractères X et Y est égal à la covariance de X et Y divisée par le produit des écarts-types de X et Y

- Si r est proche de 0, il n'y a pas de relation linéaire entre les 2 paramètres
- si r est proche de -1, il existe une forte relation linéaire négative entre les 2 paramètres.
- Si r est proche de 1, il existe une forte relation linéaire positive entre les 2 paramètres.

Une corrélation forte est retrouvée entre la durée d'analgésie et le flux au travers de la muqueuse œsophagienne de porc ($r = 0,89$). La corrélation est un peu plus faible entre la durée d'analgésie et le coefficient de perméabilité ($r = 0,7$).

1.4 Discussion

Le spilanthol présente une bonne stabilité dans les extraits éthanolés (40). De plus l'éthanol est relativement inoffensif et présente une faible toxicité et un coût dérisoire. Il est largement utilisé dans le monde afin d'obtenir des extraits végétaux(41-42). Voilà pourquoi l'éthanol a été choisit pour cette étude. Le rendement de l'extrait brut de *Spilanthus acmella* obtenu dans cette étude est comparable à d'autres études(43-44).

Le charbon actif a été utilisé afin de séparer l'extrait de sa chlorophylle et d'autres composants qui auraient pu interférer dans les mesures de colorimétrie et qui auraient pu gêner l'isolation des composants bioactifs. De plus ce dernier est extrêmement absorbant , biocompatible et ne présente pas de toxicité. Son utilisation a légèrement augmenté la concentration en spilanthol des extraits (en retirant les pigments comme la chlorophylle).

Les films muco-adhésif formulés avec du chitosan ont montré une bonne stabilité pendant 120 jours à 40°C (intégrité du biofilm, pH, concentration en spilanthol).

La corrélation entre le coefficient de perméabilité et la durée de l'analgésie observée dans cette étude est en accord avec d'autres études qui ont montré que la durée d'analgésie in vivo augmentait avec la quantité de benzocaïne ayant pénétré le tissus des oreilles de porcs in vitro (45).

La forte corrélation entre le flux et la durée d'analgésie peu s'expliquer par des taux plus élevés de spilanthol atteignant les récepteurs anti-nociceptifs.

1.5 Conclusion

Un film muco-adhésif basé sur du chitosan semble prometteur pour recevoir un extrait de *Spilanthus acmella* afin de formuler un nouveau topique anesthésique.

Une formulation à base de 10% d'extrait éthanolé brut de *Spilanthes acmella* additionné de 4% de charbon actif a montré un haut degré de perméabilité *in vitro* et un effet anesthésique similaire à l'EMLA, utilisé comme anesthésique de choix. Cette formulation présenterait donc une alternative aux anesthésiques topiques couramment trouvés sur le marché.

2 Effets anti-nociceptifs d'un extrait éthanolé de fleurs de *Spilanthes acmella oleraceae* sur des souris (17)

2.1 Introduction

Le but de cette étude est de réaliser une caractérisation chimique et d'étudier les propriétés anti-nociceptives d'une administration systémique d'extraits éthanolés de fleurs de *Spilanthes acmella* sur des modèles expérimentaux de nociception sur des souris.

2.2 Matériels et méthodes

Plante et extraction

La plante, *Spilanthes acmella* a été prélevée dans l'état d'Acre dans le nord du Brésil. L'extraction des fleurs fraîches (60g) a été réalisée dans de l'éthanol sous reflux pendant 3H (Dias et al. 2012). L'extrait éthanolé est séché sous pression réduite, remis en suspension dans l'eau puis lyophilisé avec un rendement de 2,7g pour 60g de fleurs ce qui donne un rendement de 4,5%.

Le spilanthol sera caractérisé par chromatographie en phase liquide et spectromètre de masse.

Animaux

Les expériences sont réalisées avec des souris mâles (25-35g), dont l'habitat est maintenu à 22±2°C avec des cycles jour/nuit de 12 heures avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité d'éthique local (CEUA/BIO-UFPR; autorisation n°544). Les animaux sont divisés en groupes de 5 à 8 individus.

2.2.1 Tests orofaciaux de la nociception des rats

2.2.1.1 Nociception induite par une injection orofaciale de formaline

La mesure de la nociception induite par la formaline a été réalisée comme décrite par Luccarini et al. (2006) avec quelques modifications. Après la phase d'accoutumance à l'environnement, les souris

sont divisées en 2 groupes. Le premier est pré-traité par une injection intrapéritonéale d'une solution saline additionnée de «tween 80» ou polysorbate 80 à hauteur de 10mL/kg (un excipient utilisé afin de stabiliser les formulations aqueuses avant injection, utilisé comme témoin dans cette étude). Le second groupe reçoit une injection d'un extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* (10, 30 et 100 mg/kg).

30 minutes après ces injections, chaque groupe reçoit une injection de 20 µL d'une solution de formaline à 2,5% dans la lèvre supérieure droite, en regard de l'aile du museau.

Juste après l'injection de formaline les souris sont replacées dans un cylindre de verre de 20 cm de diamètre. Le temps que met chaque animal à se gratter la zone d'injection avec les pattes avant est enregistré avec un chronomètre pour la phase neurogène (0 à 5 minutes) et la phase inflammatoire (15 à 40 minutes), ce qui sera considéré comme un index nociceptif.

2.2.1.2 Nociception induite par une injection orofaciale de capsaïcine ou cinnamaldéhyde

La procédure utilisée est similaire à la précédente. Les souris sont soit pré-traitées intrapéritonéalement par une injection saline (10mL/kg), soit par une injection d'un extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* (10, 30 et 100 mg/kg) 30 minutes avant une injection unique de 20 µL de capsaïcine (1,6 µg/lèvre) ou de cinnamaldéhyde (13,2 µg/lèvre). Les souris sont ensuite replacées immédiatement dans le cylindre de verre et le temps que chaque animal passe à se gratter la zone d'injection avec les pattes avant est enregistré pendant 5 minutes et est considéré comme un index de nociception.

2.2.2 Hyperalgésie thermique induite par la capsaïcine

L'hyperalgésie thermique induite par la capsaïcine est mesurée en utilisant un appareil constitué d'une plaque chauffante selon la méthode décrite par Garcia Martinez et al. (2002). Tout d'abord les animaux non traités sont placés sur une plaque chaude maintenue à une température de $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ et le temps entre la mise en place et le tremblement, le léchage des pattes ou la fuite du plateau est enregistré comme la latence de retrait des pattes (en secondes).

Figure 8 : Appareil permettant le test de la plaque chauffante



Les animaux restant sur la plaque environ 10 secondes furent précédemment sélectionnés sur la base de leur réactivité au test.

Ensuite les souris sont traitées comme précédemment : certaines reçoivent une injection intrapéritonéale d'une solution saline (10mL/kg), d'autres reçoivent des injections d'extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* (10, 30 et 100 mg/kg). Chaque groupe reçoit une injection de 20 μ L de capsaïcine (1,6 μ g/patte) dans la patte arrière droite.

Le temps de retrait de la patte est enregistré pour chaque animal à 0, 5, 15, 30, 60 et 120 minutes après l'injection de capsaïcine et on impose une limite de 30 secondes sur le plateau afin de prévenir les dommages tissulaires.

2.3 Résultats

2.3.1 Nociception induite par une injection orofaciale de formaline

Une injection intrapéritonéale d'un extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* (10, 30 et 100 mg/kg), administrée 30 minutes avant l'injection de formaline à 2,5% dans la lèvre supérieure droite a significativement inhibé la phase neurogénique, respectivement de 34 \pm 6%, 35 \pm 3% et 41 \pm 8%. De plus toutes les doses testées d'extrait de *Spilanthes acmella* ont significativement réduit la nociception en phase inflammatoire avec une valeur de ID50 (avec un intervalle de confiance de 95%) de 28,6 mg/kg (20,6-39,7 mg/kg) et des inhibitions de 19 \pm 9%, 47 \pm 7% et 92 \pm 4% respectivement.

2.3.2 Nociception induite par une injection orofaciale de capsaïcine ou cinnamaldéhyde

Les animaux ayant reçu une injection orofaciale d'une solution saline comme témoin (10mL/kg) ont été observé pendant 5 minutes et ont gratté la zone d'injection avec les pattes avant pendant $9,4 \pm 1,7$ s.

Les animaux ayant reçu une injection orofaciale de capsaïcine ont montré des signes comportementaux de nociception pendant $42,3 \pm 3,3$ s tandis que ceux ayant reçu une injection de cinnamaldéhyde ont réagit pendant $62,7 \pm 7,2$ s.

Le traitement intrapéritonéal avec l'extrait de *Spilanthus acmella* (30 et 100mg/kg) a réduit le temps de nociception induit par la capsaïcine de $65 \pm 9\%$ et de $69 \pm 6\%$ respectivement.

Le traitement intrapéritonéal avec l'extrait de *Spilanthus acmella* (30 et 100mg/kg) a réduit le temps de nociception induit par le cinnamaldéhyde de $50 \pm 6\%$ et de $70 \pm 9\%$ respectivement avec une valeur de ID50 de 39,7 mg/kg (25,5-62,0mg/kg).

2.3.3 Réduction par le spilanthol de l'hyperalgésie thermique induite par la capsaïcine

L'hyperalgésie est caractérisée par un abaissement du seuil de déclenchement de la douleur. Au bloc opératoire, les anesthésistes sont confrontés à ce phénomène lors de l'utilisation de dérivés morphiniques. En effet certains patients voient leur seuil de déclenchement de douleur diminuer lors de l'injection prolongée de sufentanil. Cet effet est inhibé par l'injection préventive de kétamine: on parle d'antihyperalgésie.

En physiologie expérimentale, les animaux ayant reçu une injection intraplantaire de capsaïcine ont développé une hyperalgésie thermique caractérisée par une diminution significative du temps de réaction à la chaleur à 15 et 30 minutes ($11,1 \pm 2,4$ s au temps de référence contre $4,8 \pm 0,7$ s à 15 minutes) : la douleur est ressentie plus rapidement.

Le traitement des souris avec un extrait de *Spilanthus acmella* est capable d'augmenter le temps de latence avant retrait des pattes de 140%, 221% et 257% à 5, 15 et 30 minutes: le spilanthol a augmenté le seuil à partir duquel une stimulation est ressentie comme douloureuse. On peut donc ici parler de l'effet antihyperalgésiant du spilanthol.

2.4 Discussion

Cette étude semble confirmer les propriétés analgésiques de la plante des «maux de dent», ainsi que de l'extrait éthanolé de fleurs qui contiennent du spilanthol, un composant relativement abondant parmi les autres N-alkylamides, qui induit des paresthésies et un engourdissement chez les humains. Les effets analgésiques sur la nociception orofaciale semblent être dus à la modulation ou le blocage des récepteurs TRPV1 et la sous famille des TRPA1(17). De plus les effets anti nociceptifs du genre *Spilanthus* ont été expliqués par différents processus, incluant l'inhibition de la synthèse

des prostaglandines (Ratnasooriya et al. 2004), l'activation d'opioïdiques (Ong et al. 2009), de sérotoninergiques et du système GABAergique (Acosta et al., 2009). L'activité anesthésique a été expliquée par le blocage des canaux Na^+ (Chakraborty et al. 2010).

L'étude augmente et confirme d'anciens articles avançant que *Spilanthes acmella* possède des propriétés antinociceptives contre la douleur induite par la formaline et les canaux agonistes TRPS dans la région orofaciale des souris, renforçant la crédibilité de son utilisation traditionnelle afin de combattre les douleurs dentaires.

L'autre information importante que cette étude avance est que de fortes doses d'extrait éthanolé de *Spilanthes acmella* provoquent un effet anti-hyperalgésique.

2.5 Conclusion

Des études cliniques seraient intéressantes afin de confirmer ces propriétés sur l'homme et sur différentes douleurs comme les douleurs parodontales, post-chirurgicales ou des douleurs infectieuses (candidose).

Partie 3 : effet anti-inflammatoire

1. Introduction

Une réaction inflammatoire est caractérisée par 4 points : érythème, chaleur, gonflement et douleur.



Figure 9 : abcès dentaire

Les réponses inflammatoires sont initiées par une invasion de pathogènes ou une lésion tissulaire. Des processus spécifiques agissent en concomitance avec des réponses cellulaires non spécifiques et génèrent des signaux chimiques sous la forme de médiateurs dérivés du plasma et des cellules.

La plupart des médiateurs cellulaires comme les dérivés d'acide arachidonique (prostaglandines et leucotriènes), les cytokines, lymphokines, monokines, facteur d'activation plaquettaire, histamine et kinines sont produits par les cellules de la lignée blanche.

Les médiateurs dérivés du plasma comprennent le système du complément et les interférons.

Parmi les réponses cellulaires, l'activation des macrophages est essentielle à l'initiation et à la continuité des réactions immunitaires. Une fois stimulés par les pathogènes, les macrophages libèrent de l'oxyde nitrique (NO), des prostaglandines E_2 (PGE_2), $TNF-\alpha$, interleukines IL1, 6 et 12 et d'autres cytokines pro-inflammatoires afin d'améliorer les capacités défensives(48-49).

Une exposition chronique à de fortes doses d'acide nitrique (NO) conduit à des maladies inflammatoires comme l'athérosclérose, certaines pathologies intestinales, arthrose rhumatoïde, la glomérulonéphrite et des chocs septiques(50-51).

Au niveau des cellules des mammifères, l'oxyde nitrique est produit par 3 oxyde nitrique synthases (NOS).

Une minorité de la synthèse du NO est catalysée par les NOS endothéliales et neuronales tandis que la majorité de la synthèse est catalysée par iNOS, une forme induite présente dans les neutrophiles, les macrophages, les cellules des muscles lisses et les cellules endothéliales. Comme iNOS, la cyclooxygénase 2 (COX-2, ou prostaglandine endopéroxyde synthase 2) peut être induite pendant l'inflammation afin de catalyser la formation de prostaglandines.

Des études antérieures montrent que les facteurs de transcription de la famille du facteur nucléaire KB (NF-KB) déclenche la transcription de iNOS et COX-2 et d'autres médiateurs pro-inflammatoires comme IL1, 6 et TNF- α (52-53). Cette famille joue un rôle important dans la signalisation cellulaire comme l'expression de gènes codant pour les chimiokines (e-g, IL8, MIP 1 α , MCP1, RANTES et eotaxine), pour les molécules d'adhésion (comme ICAM,VCAM et sélectine E), pour le facteur de croissance, les protéines de phase aiguë et les récepteurs immunitaires.

Cette famille (NF-KB) est également un point critique de convergence de nombreux signaux de transduction incluant les réponses immunitaires innées et acquises, le développement cellulaire, la migration cellulaire et l'apoptose(54-55). NF-KB est retenue dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I κ B- α . La dégradation de I κ B- α par phosphorylation et ubiquitination permet la translocation de NF- κ B jusqu'au noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles. I κ B- α phosphorylée = p- I κ B- α .

La libération de médiateurs inflammatoires contre les pathogènes envahisseurs est essentiel pour l'immunité innée et favorise l'activité du système immunitaire spécifique. Ces médiateurs sont nécessaires à la réparation tissulaire(56) et sont indispensables à la survie de l'hôte. Cependant, une production excessive de médiateurs provenant des macrophages peut aboutir à la lésion des cellules normales(57), ce qui peut être mortel en cas de réaction systémique(58). Le contrôle de la quantité de médiateurs libérés est important dans le développement de médicaments anti-inflammatoires. Des agents anti-inflammatoires issus de plantes ont été découverts et nombre d'entre eux sont considérés comme agissant au niveau de (NF-KB) (59).

Cette étude isole le spilanthol, un composant actif anti-inflammatoire de *Spilanthus acmella*. Une lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264,7 est utilisée afin d'étudier la caractéristique bioactive du spilanthol.

2 Matériels et méthodes

2.1 Extraction et isolation

Des fleurs sèches de *Spilanthus acmella* sont achetées dans un marché local de Taïwan. Des échantillons sont déposés à l'université de Chi Nan. Les fleurs lyophilisées sont moulues et plongées dans de l'éthanol à 85% pendant une nuit, à température ambiante, afin d'obtenir l'extrait éthanolé.

Les résidus sont retirés de l'extrait par traitement à l'hexane. Ensuite 4 composés sont synthétisés :

- un uniquement après traitement à l'hexane
- un avec traitement à l'hexane puis au chloroforme
- un avec traitement à l'hexane puis à l'éthyl acétate
- un avec traitement à l'hexane puis au butanol

Chacun de ces extraits est étudié afin de mesurer leur effet inhibiteur sur la production d'oxyde

nitrique (NO) par les macrophages LPS activés, les cellules RAW 264.7.

L'extrait chloroformé a montré la plus grande activité parmi tous les extraits et est donc utilisé pour poursuivre l'étude. Le fractionnement de l'extrait chloroformé a été réalisée par chromatographie sur gel de silice en utilisant de l'hexane avec de niveaux augmentés d'éthyl acétate et finalement avec de l'éthylacétate et méthanol comme solvants d'élution. 9 fractions (de A à I) ont été recueillies et soumises aux essais. La fraction C a été sélectionnée du fait de son fort potentiel d'inhibition sur la production de NO. Le spilanthol a été purifié par chromatographie de la fraction C et identifié en comparant ses données spectrales.

2.2 Culture cellulaire

Une lignée cellulaire de macrophages de souris RAW 264.7 a été obtenue du «Culture Collection and Research Center (CCRC)» de Taïwan et cultivée avec 10% de sérum fœtal bovin, 2mM de glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 1mM de pyruvate, 100 unités/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine. Les cellules sont maintenues dans un incubateur humide avec 5% de CO₂ à 37°C.

2.3 DPPH Neutralisation des radicaux libres=Test de réduction du radical stable

DPPH : 1-diphényl-2- picrylhydrazyle

Le DPPH est un radical stable et coloré, qui est centré sur l'azote. Cette méthode relie la quantité de radicaux piégés avec celle de l'antioxydant utilisé. La réduction du radical par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) et au radical (A°).



Figure 10 : formule du test de réduction du radical stable

Le DPPH possède une absorbance maximale entre 515 et 517nm et constitue une référence :
 $A(\text{DPPH})_{517\text{nm}}=1,159$

Le DPPH-H étant incolore il possède une absorbance nulle. L'absorbance résultante est donc due au DPPH restant.

Le pourcentage de réduction de DPPH [Pr(DPPH)] par le composé à tester est donné par la formule :

$$\text{Pr(DPPH)} = \frac{\text{Absorbance(antioxydant)}}{\text{Absorbance(DPPH)}} \times 100$$

Le composé à tester est ajouté à une solution de DPPH. Après 10 à 30 minutes dans l'obscurité, l'absorbance du DPPH à 517 nm est mesurée par spectroscopie UV-visible.

Dans cette étude 0,5mL de la solution d'extrait dissout dans 80% d'éthanol est mélangé avec 0,25mL de DPPH à 0,5mM éthanolé et 0,5mL de solution tampon d'acétate à 100mM (pH=5,5). La diminution d'absorbance des radicaux stable DPPH à 517nm par spectrophotomètre. La capacité à piéger les radicaux de DPPH est calculée par la formule :

$$\frac{(\text{Acontrôle}-\text{Atest})}{\text{A test}} \times 100$$

Acontrôle= absorbance du DPPH

A test= absorbance de la solution décrite ci dessus.

La capacité de piégeage des radicaux est exprimée comme valeur médiane de concentration efficace (EC50) afin de diminuer de 50% l'absorbance des radicaux DPPH. Ces données seront alors comparées à la vitamine C.

2.4 Mesure de la capacité inhibitrice d'extraits de *Spilanthes acmella* sur la production d'oxyde nitrique

La capacité inhibitrice des extraits de spilanthol sur la production d'acide nitrique (NO) est déterminée en utilisant la réaction de Griess. Cette méthode permet de mesurer la quantité de nitrite, un indicateur de la synthèse de NO. Le surnageant des cultures de cellule LPS induite RAW 264.7 est mélangé avec un volume équivalent de réactif de Griess (1% de sulfamide et 0,1% de naphthylenediamine dans 5% d'acide phosphorique). L'absorbance à 550nm est mesurée les concentrations sont calculées en comparaison avec la courbe de référence du sodium nitrite.

2.5 Viabilité des cellules

Une inhibition de la synthèse de NO par inhibition de la croissance des macrophages ou leur mort ne serait pas une caractéristique en faveur du spilanthol dans la régulation des processus inflammatoires. Il convient donc d'évaluer la réaction de ce type de cellules en contact avec le spilanthol.

L'inhibition de la croissance des cellules RAW 264.7 par les extraits de spilanthol est évaluée par le test MTT. Ce test est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. Ce test d'évaluation de la prolifération cellulaire est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT, de couleur jaune, en son métabolite le bleu de formazan (de couleur violette) (60).

A la fin de la période de culture des cellules, du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) à 0,5% est ajouté. La solution obtenue est incubée à 37°C pendant 4 heures. Au terme de ce traitement, les cellules vivantes produisent, à partir du MTT mis en leur présence, des cristaux de formazan. Ces cristaux dissous dans du DMSO produisent une solution violette qui est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm. Son intensité est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes (60).

2.6 Western blot

Les cellules RAW 264.7 sont cultivées jusqu'à confluence sur une boîte de Pétri de 10cm de diamètre puis traitées avec du LPS (1µg/mL) seul ou du LPS additionné de spilanthol. Après

incubation les cellules sont lavées et récupérées dans du PBS froid et lysées dans le tampon RIPA.

Pour l'analyse de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylée (p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), les extraits cellulaires lysés sont fractionnés à l'aide d'un kit de fractionnement subcellulaire (NE-PER™ « Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents »).

Les fractions obtenues sont séparées sur un gel polyacrylamide 10% SDS-PAGE :

cette méthode permet de séparer les protéines grâce à un champ électrique en fonction de leur poids moléculaire.

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose puis bloqué dans une solution de TBS-Tween 0,5% lait 5% et incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires.

Anticorps utilisés :

- anticorps monoclonal anti-iNOS de souris
- anticorps monoclonal anti-COX-2 de souris
- anticorps monoclonal anti p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ de souris

Les échantillons sont nettoyés avec du TBST à 0,5% et incubés pendant une heure à 4°C avec des anticorps secondaires de lapin anti IgG de souris conjugués à la peroxydase de raifort. Les bandes immuno-réactives sont visualisées à l'aide du système de détection ECL (Enhanced ChemiLuminescence).

2.7 Mesures concernant les cytokines

Afin d'étudier l'effet anti-inflammatoire du spilanthol, la quantité de cytokines pro-inflammatoire TNF- α , IL-1 et IL-6 est mesurée grâce au test ELISA.

2.8 Dosage immuno-enzymatique de NF- κ B p65 activé.

Les cultures sont traitées au spilanthol pendant 10 heures avant l'ajout de 1 μ g/mL de LPS pendant 30 minutes. Les protéines nucléaires sont préparées avec du réactif NE-PER et congelés à -70°C jusqu'à leur utilisation(61). La capacité de fixation est mesurée par le test de colorimétrie du facteur de transcription NF- κ B p65.

2.9 Analyse statistique

Les analyses statistiques sont menées à l'aide du test de student t. Les résultats avec $p < 0,05$ seront considérés comme significatifs.

3. Résultats

3.1 Cytotoxicité des extraits

Les effets cytotoxiques des extraits de *Spilanthes acmella* sur les macrophages ont été déterminés par le test MTT à différentes concentrations. Après 24 heures d'incubation, les extraits hexanés et chloroformés (80µg/mL) ont réduit le nombre de cellules vivantes à 75 et 81% ($p < 0,05$) de la quantité initiale, respectivement tandis que les extraits à l'éthyl acétate et au butanol n'ont pas significativement altéré la viabilité cellulaire (91% et 93% de cellules vivantes respectivement). Ces résultats montrent un effet cytotoxique à des concentrations élevées.

3.2 Capacité inhibitrice d'extraits de *Spilanthes acmella* sur la production d'oxyde nitrique (NO)

Les macrophages murins comme la lignée cellulaire RAW 264.7 sont très souvent utilisés afin d'explorer les réponses inflammatoires(76). Les macrophages produisent du NO comme médiateur quant ils sont activés par les LPS. Les cellules RAW 264.7 activées par les LPS (1µg/mL) avec ou sans traitement avec les extraits sont incubés pendant 24 heures afin d'étudier comment les extraits de *Spilanthes acmella* inhibent la production de NO. Les résultats indiquent que, à 80µg/mL, les extraits avec hexane et chloroforme diminuent fortement la production de NO à 28 et 15% respectivement. De l'autre côté, les extraits à l'éthyl acétate et au butanol réduisent moins la production de NO, 64% et 77% de la production initiale respectivement. Le déclin de la production de NO est peut être du à la diminution de iNOS au niveau des ARNm ou des protéines.

Des investigations transcriptionnelles et translationnelles sur iNOS sont alors mises en place. Les extraits chloroformés sont sélectionnés car ils ont montré un fort pouvoir inhibiteur de la synthèse de NO.

3.3 Effet inhibiteur du spilanthol sur la production de NO induite par les LPS

Afin d'obtenir des composants bioactifs, l'extrait chloroformé est fractionné par fractionnement par bioactivité guidée. Comme mentionné au paragraphe Matériel et méthodes *S. acmella* est tout d'abord extrait avec de l'éthanol à 85%, suivit d'une partition séquentielle liquide avec de l'hexane, du chloroforme, de l'éthyl acétate et du butanol. L'extrait ayant montré le plus fort potentiel d'inhibition de la production de NO, l'extrait chloroformé a été utilisé pour obtenir du spilanthol.

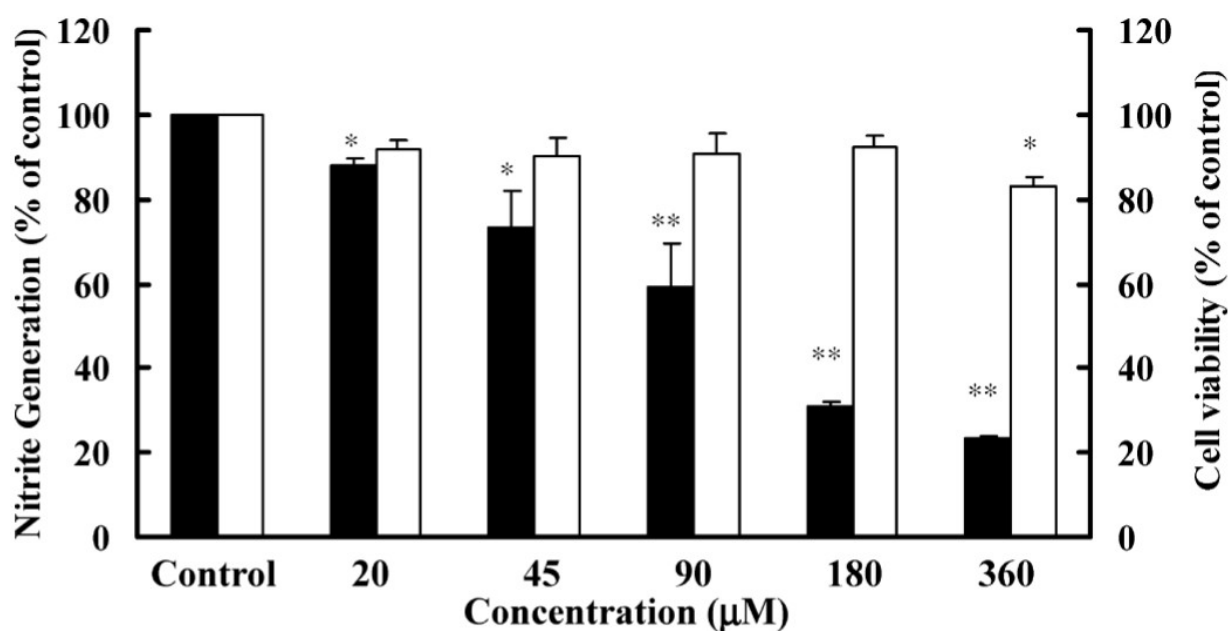


Figure 11: viabilité des cellules (en %) et production d'acide nitrique (% du contrôle) en fonction de la concentration de la concentration en spilanthol

Comme l'on peut lire sur le graphique ci-dessus tiré de l'étude, le spilanthol inhibe, à dose dépendante, la production de NO sans toxicité significative (plus de 90% des cellules sont vivantes à une concentration de 180µM).

A l'analyse microscopique on constate que les macrophage sont ronds sans stimulation par LPS et ont des formes irrégulières avec formation de pseudopodes après activation par les LPS. L'ajout de spilanthol réduit l'irrégularité de forme et la formation des pseudopodes, ce qui montre un retour au repos des cellules.

3.4 Effet inhibiteur du spilanthol sur la production de iNOS et COX-2

L'analyse par Western blot a été réalisée sur la totalité des lysats cellulaires. Ce test a montré que la production de la protéine iNOS a été considérablement réduite pour des concentrations en spilanthol

supérieure à 180 μ M. Cette donnée indique que l'expression de la protéine iNOS diminue avec l'augmentation de la concentration en spilanthol. En plus de iNOS, la protéine induite COX-2 est fortement exprimée pendant une réaction inflammatoire, catalysant la synthèse d'acide arachidonique afin de synthétiser de la prostaglandine E₂ (PGE₂) un médiateur crucial de la sensibilisation à la douleur inflammatoire(63). L'étude montre également que l'expression de la protéine COX-2 est également fortement inhibée par 180 μ M de spilanthol. Cette inhibition est due à une diminution de la production de iNOS et COX-2 au niveau transcriptionnel et translationnel.

3.5 Effet inhibiteur du spilanthol sur la production de cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires sont principalement produites par les macrophages activés et sont impliquées dans les réactions inflammatoires. La concentration de IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le surnageant de la culture est déterminée afin d'étudier si le spilanthol peut réduire la production de ces cytokines pro-inflammatoires. Après induction avec 1 μ g/mL de LPS, les macrophages produisent des quantités importantes de ces cytokines. Ces quantités augmentent avec le temps d'induction.

L'ajout de spilanthol diminue significativement la production de ces cytokines, de façon dose-dépendante.

Figure 12 : Effets du spilanthol sur la production de cytokines pro-inflammatoires au niveau des cellules RAW 264-7 stimulées par les LPS

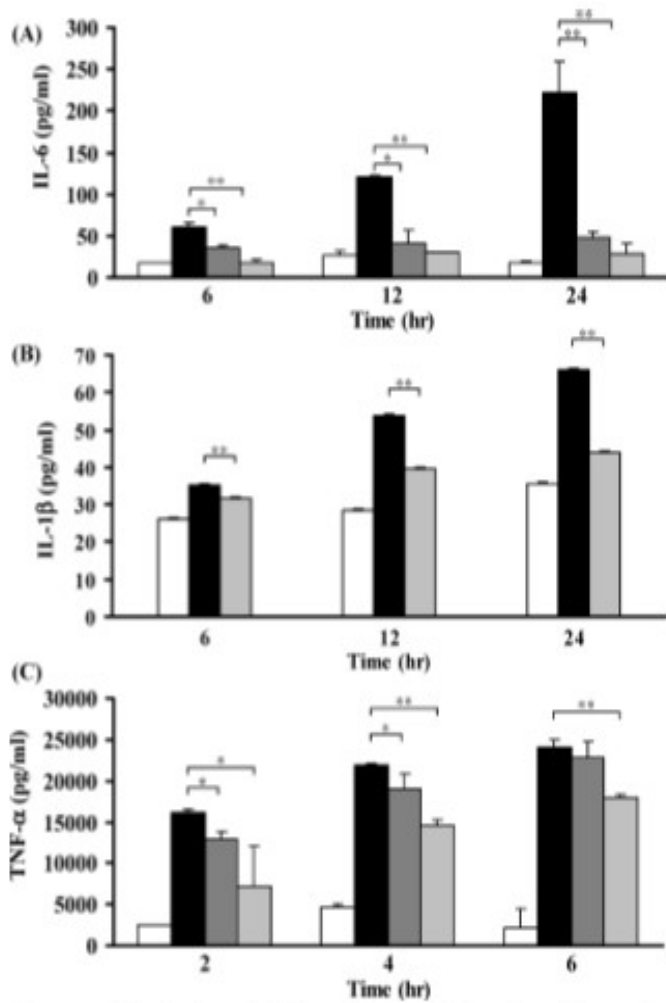


Figure 8. Effects of spilanthol on the production of proinflammatory cytokines of LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cultures were treated with (black bars) or without (white bars) LPS ($1 \mu\text{g/mL}$). For the groups treated with LPS, spilanthol concentrations of 90 (dark gray bars) or 180 (light gray bars) μM were used. Data are mean \pm SD of triplicates. The asterisk (*) indicates a significant difference from the LPS only group (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Inhibition due to spilanthol ($180 \mu\text{M}$) after 24 hours :

- concentration of IL-1 β decreased by 34%
- concentration of IL-6 decreased by 87%

The concentration of TNF- α is also decreased :

- it has decreased from $16,19 \text{ ng/mL}$ to $7,13 \text{ ng/mL}$ for a 2-hour incubation
- it has decreased from $22,12 \text{ ng/mL}$ to $17,96 \text{ ng/mL}$ for a 6-hour incubation

These results show that the addition of spilanthol significantly reduced the production of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

3.6 Effet du spilanthol sur l'activation de NF- κ B

L'expression de la plupart des cytokines, des médiateurs inflammatoires, des protéines de réponse en phase aiguë et des molécules d'adhésion est sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B. Dans cette étude, l'administration de spilanthol a significativement réduit la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) et de la protéine iNOS.

Cependant le niveau d'activation de NF- κ B doit être étudié. NF- κ B est inactif tant qu'il est lié à son inhibiteur I κ B α . La phosphorylation de cet inhibiteur entraîne la rupture du complexe NF- κ B/I κ B α et permet la translocation de NF- κ B jusqu'au noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles.

Cette étude montre que la quantité de I κ B α phosphorylée (p I κ B α) diminue avec l'augmentation de la teneur en spilanthol, ce qui augmente le nombre de complexes NF- κ B/I κ B α dans le cytoplasme et limite donc la transcription des médiateurs de l'inflammation par NF- κ B.

3.7 Activité de piégeage des radicaux par les extraits

L'attaque de radicaux libres sur les cellules peut mener à des dommages cellulaires, voir la mort cellulaire. L'activité antiradicalaire des différents extraits a été étudiée. L'extrait éthyl acétate a montré l'activité antiradicalaire la plus élevée avec des valeurs de EC₅₀ de 1,38 μ mol d'équivalent par milligramme de Vitamine C 3,32 μ mol d'équivalent par milligramme de Trolox. Les extraits chloroformés et butanolés ont montré une activité antiradicalaire similaire. Ces résultats suggèrent que ces extraits, et particulièrement la fraction éthyl acétate sont des bloqueurs de radicaux libres et peuvent modérer les réponses inflammatoires causées par ces derniers.

4. Discussion

Le spilanthol inhibe dose/dépendamment la production de NO par inhibition de l'expression de la protéine iNOS ainsi que la transcription du gène iNOS. La surexpression de iNOS est généralement accompagnée de pathologies inflammatoires dans lesquelles les cytokines inflammatoires comme IL-1 et TNF- α sont responsables de beaucoup de réponses inflammatoires aiguë et chronique pathologiques. Les cytokines pro-inflammatoires sont des médiateurs importants des réponses inflammatoires. IL-1 β , IL-6 et TNF- α servent d'agents pyrogènes endogènes qui causent la fièvre par l'initiation de changements métaboliques au niveau du thermostat hypothalamique. Ces

cytokines ont une régulation positive des réponses inflammatoires et stimulent la production des réactifs de la phase aiguë. Cette étude montre que le spilanthol réduit significativement la production des cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) au niveau des macrophages activé par les LPS ce qui peut possiblement améliorer l'inflammation. De plus le spilanthol inhibe l'expression de COX-2, réduisant la progression des réponses inflammatoires. Ces inhibitions sont en partie dues à l'inactivation de NF- κ B. Les résultats montrent que le spilanthol inhibe, à dose dépendante, la phosphorylation de I κ B dans le cytoplasme résultant en le maintien des complexes NF- κ B/ I κ B. La production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression des autres médiateurs inflammatoires comme NO, iNOS et COX-2 est ainsi réduite.

5. Conclusion

Cette étude a montré que le spilanthol exerce une activité inhibitrice sur l'activation de NF- κ B en réduisant les possibilités de phosphorylation et de dégradation de I κ B α ce qui amène à la réduction de l'expression des médiateurs de l'inflammation, incluant iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6 et TNF- α . De plus les extraits les plus antiradicalaires peuvent également contribuer aux effets anti-inflammatoires de *Spilanthus acmella*. Ces données suggèrent que le spilanthol pourrait être un inhibiteur utile des médiateurs de l'inflammation et est potentiellement applicable dans le cadre des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens COX-2 sélectifs.

Partie 4 Effet sialogogue, anti-microbien et antifongique

Outre les caractéristiques vues précédemment, le spilanthol présente des effets pouvant être utilisables en odontologie.

1. Effet sialogogue

Appartiennent aux sialogogues (ou sialogogue) les composés capables d'augmenter le débit salivaire. Ces composés sont utiles pour combattre l'hyposialie et l'asialie, conduisant aux xérostomies (sécheresse buccale).

Les étiologies de l'hyposialie et de l'asialie peuvent être :

- un dysfonctionnement des glandes salivaires
- origine médicamenteuse :
 - anorexigènes
 - anti-hypertenseurs
 - atropiniques
 - antidépresseurs
 - antispasmodiques
 - sédatifs
 - antiparkinsoniens,
 - antihistaminiques
 - diurétiques
 - anti-migraineux
 - amphétamines, méthamphétamine,
 - cannabis
- Syndrome de Goujerot-Sjögren
- dysfonctionnement immunitaire comme le SIDA
- diabète
- problèmes rénaux
- radiothérapie (pour cancer des voies aéro-digestives)
- mauvaise hygiène bucco-dentaire, prothèses inadaptées
- tabagisme
- dormir la bouche ouverte, sous l'effet de certains psychotropes.

Le spilanthol a été décrit comme sialogogue (30-31) mais aucune étude applicative n'a été menée en laboratoire concernant cette propriété.

2. Effet microbien

Les extraits à l'éthyl acétate (EtOAc) et au méthanol (MeOH) de feuilles de *Spilanthus acmella* ont montré de puissantes activités anti-microbiennes contre *Klebsiella pneumoniae* (Arora et al. 2011). L'extrait EtOAc est 2 fois plus efficace que la doxycycline, l'antibiotique de test standard, tandis que l'extrait MeOH a montré une activité comparable à la doxycycline.

Les extraits à l'éthyl acétate (EtOAc) et au méthanol (MeOH) de fleurs de *Spilanthus acmella* ont

montré une activité antimicrobienne nulle tandis qu'un extrait chloroformé (CHCL₃) de cette même fleur a montré son activité contre *Streptococcus pyogenes* avec une concentration minimale inhibitrice MIC (minimum inhibitory concentration) de 256µg/mL (Prachayasittikul et al. 2009).

3. Effet anti-fongique

Différentes parties de *Spilanthes acmella* ont été testées afin d'en analyser les propriétés antifongiques.

Les études ont montré que les extraits à l'éthyl acétate et les extraits aqueux ont une meilleure capacité antifongique que le médicament standard, le fluconazole, vis à vis du *Rhizopus arrhizus* et *Rhizopus stolonifer* (Arora et al., 2011).

Les extraits de feuilles ont aussi montré une activité plus faible vis à vis d'*Aspergillus niger* et *Penicillium chrysogenum* (Arora et al. 2011).

L'extrait chloroformé de la plante entière montre une activité contre les infections fongiques opportunistes (e.g. *Microsporium gypseum* et *Cryptococcus neoformans*) chez les patients atteints par le SIDA (Phongpaichit et al., 2005).

Les extraits éthérés ont une activité antifongique vis à vis de *A. Niger*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliformis* et *Fusarium oxysporium* (Rani et Murty, 2006).

Les extraits à l'hexane et au chloroforme de fleurs de *Spilanthes acmella* ont aussi montré leur activité vis à vis de *Charomycese cerevisiae* (Prachayasittikul et al., 2009).

L'activité antifongique des extraits de *Spilanthes acmella* semble être due à la présence de spilanthol (Nakatani et Nagashiwa 1992), de sesquiterpénoïdes et de saponines (Krishnaswami et al., 1975 ; Mukharya et Ansari, 1986).

Conclusion

Spilanthes acmella est une plante qui pousse relativement facilement en zone tropicale et subtropicale. Elle est utilisée comme ingrédient afin de confectionner des plats traditionnels et en pharmacopée traditionnelle. Le spilanthol extrait de cette dernière a été classé comme très peu toxique et semble être responsable de la plupart de ses effets biologiques. Ce N-alkylamide semble avoir de nombreuses caractéristiques intéressantes en odontologie comme anesthésique local, analgésique, anti-inflammatoire, anti-fongique, anti-microbien et sialogogue. Le spilanthol pourrait mériter des tests complémentaires comme son activité sur *Candida albicans* et son effet sialogogue car il en deviendrait un composé de choix afin de combattre les candidoses buccales.

Références :

1. Jacques Combaz. La pharmacopée. Sciences pharmaceutiques. 1985.
2. Neanderthal self-medication in context, Karen Hardy DOI: <https://doi.org/10.1017/S0003598X00049528>
3. Acaridal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae) and *dermacentor nitens* (Acari : Ixodae). Cruz PB, Barbosa AF, Zeringota V, Melo D, Novato T, Fidelis QC, Fabri RL, de Carvalho MG, Oliveira Sabaa-Srur AU, Daemon E, Monteiro CM. *Vet Parasitol.* 2016 Sep 15 ; 228:137-143. doi : 10,1016/j.vetpar.2016.08.026.
4. Gasquet, M. ; Delmas F. ; Timon-David, P. ; Keita, A. ; Guindo, M ; Koita, N ; Diallo, D. ;

Doumbo, O. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial, « malarial 5 ». *Fitoterapia* 1993, 64, 423-426.

5. ABBAYE H., des CHADEF AUD M., FERRE Y., de FELDMANN 3. Botanique, anatomie, cycles évolutifs, systématique. Ed. MASSON et Cie, PARIS, 1963
6. CARATINI R., CARATINI F. Encyclopédie universelle. Bordas IV., Ed. BORDAS, PARIS 1976.
7. EMBERGER L., CHADEF AUD M. Les végétaux vasculaires Tome III. Traité de botanique-systématique. Ed. MASSON, PARIS, 1960.
8. GUIGNARD J.L. Abrégé bota. Ed. MASSON, PARIS, 1980.
9. HOFFMAN O. In die compositae naturlitchen pflanzenffamilien, Tome IV Engler A. Prantz K. Ed. Verlagvon Wihelm. Leipzig, 1890-1894.
10. ROBINSON H. A revision of the tribal and subtribal limits of the heliantheae (Asteraceae) Smithsonian contribution to botany, 51, 1981.
11. HOSTETMANN K., MARSTON A. Plant molluscicides phytochemistry, 24, 639-652, 1985.
12. TREVISSON C. Thèse de Doct. d'Etat - Université Paul Sabatier Spilanthes aernel/a Murr., n088 Tome 3/2096, 1988
13. KOSTER J.T.H.
14. Philipson W. R. Nomenclatural changes in Spilanthes and Blainvilles with remarks and a key to the species of Spilanthes in the malay archipelago. *Busmea*, 6, 349-354, 1950.
15. ADJANOHO UN E.J., AKE ASSI L., FLORET J.J., GUINKO S., KOUMARE M., AHYR A.M.R., RAYNAL J. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Agence de coopération culturelle et technique, PARIS, 1980.

16. KIRTIBAR K.R., BASU O.O. Indian medicinal plants, vol II Ed. International book distributions. DEHRA Dun, 1935.
17. VERYKOKIDEV VITASAROPOULOS E., BECKER H. Flavonoïde aus *Spilanthus oleraceus* Jacq. Arch. Der pharmazie, vol. 316, 815-816, 1983.
18. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. Nomura EC, Rodrigues MR, da Silva CF, Hamm LA, Nascimento AM, de Souza LM, Cipriani TR, Baggio CH, Werner MF. J Ethnopharmacol. 2013 Nov 25 ; 150(2) : 583-9. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.007.
19. Malone et Robichaud, 1962
20. States FaEMotU. Safety Assessment of Jambu Oleoresin # 3783. Washington, DC: FEMA; 2000.
21. Materials EpoFC. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 303, Revision 1 (FGE.303Rev1): Spilanthol from chemical group 30. EFSA Journal. 2015; 13(1). doi: 10.2903/j.efsa.2015.3995
22. Chakraborty A, Devi RKB, Rita S, Sharatchandra K, Singh TI. Preliminary studies on anti inflammatory and analgesic activities of *Spilanthus acmella* in experimental animals models. Indian Journal of Pharmacology. 2004 ; 36(3) : 148-50. PMID: BCI:BCI200500002249.
23. Sharma V, Boonen J, Chauhan NS, Thakur M, De Spiegeleer B, Dixit VK. *Spilanthus acmella* ethanolic flower extract : LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behaviour in male rats. Phytomedicine. 2011 ; 18(13) : 1161-9. doi : 10.1016/j.phymed.2011.06.001 PMID : WOS :000297187200010.
24. Development and Evaluation of a novel Mucoadhesive Film Containing *oleracea* Extract for Oral Mucosa Topical Anesthesia. Santana de Freitas-Blanco V, Franz-Montan M, Groppo FC, de Carvalho JE, Figueira GM, Serpe L, Oliveira Sousa IM, Guilherme Damasio VA, Yamane LT, de Paula E, Ferreira Rodrigues RA. PloS One. 2016 Sep 14 ; 11(9) : e0162850. Doi : 10.1371/journal.pone.0162850.

25. Hmud R, Walsh LJ. Dental anxiety : causes, complications and management approaches. JMID. 2009 ; 2 : 67-78

26. Gordon D, Heimberg RG, Tellez M. Ismail Al. A critical review of approaches to the treatment of dental anxiety in adults. Journal of Anxiety Disorders. 2013 ; 27(4):365-78. doi:10.1016/j.janxdis.2013.04.002 PMID : Wos:000321883000002.

27. Schuller AA, Willumsen T, Holst D. Are there differences in oral health behavior between individuals with high and low dental fear ? Community Dentistry and Oral Epidemiology. 2003;31(2):116-21. doi : 10.1034/j .1600-0528.2003.00026.x PMID : WOS:000187549400009.

28. Armfield JM. What goes around : revisiting the hypothesized vicious cycle of dental fear and avoidance. Community Dentistry and Oral Epidemiology. 2013;41(3):279-87. doi:10.1111/cdoe.12005 PMID:WOS:000318111700010.

29. FDA Public Health Advisory : Life-Threatening Side Effects with the Use of Skin Products containing Numbing Ingredients for Cosmetic Procedures. U.S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research ; 2007

30. Tran AN, Koo JY. Risk of Systemic Toxicity With Topical Lidocaine/Prilocaine : A review. Journal of Drugs in Dermatology. 2014 ; 13(9) : 1118-22. PMID : WOS :000341803600018.

31. Ley J, Krammer G, Looft J, Reinders G, Bertram H. Structure-activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkaloids related to spilanthol. Flavour Science-Recent Advances and Trends. 2006:21-4.

32. Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S. High Therapeutic Potential of Spilanthes acmella : A review. Excli Journal. 2013;12:291-312. PMID:WOS:000317815500001.

33. OECD. Test guideline 428 : Skin absorption : in vitro method. Paris : Organization for Economic Cooperation and Development, 2004.

34. Diaz del Consuelo I, Pizzolato GP, Falson F, Guy RH, Jacques Y. Evaluation of pig

- esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J Pharm Sci.* 2005;94(12);2777-88. doi:10.1002/jps.20409 PMID : 16258996.
35. Diaz del Consuelo I, Pizzolato GP, Falson F, Guy RH, Jacques Y. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch Oral Biol.* 2005;50(12):981-7. S0003-9969(05)00133-0[pii] doi:10.1016/j.archoralbio.2005.04.008 PMID:15955526.
36. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather I, Li X, Jasti B. Porcine buccal mucosa as in vitro model : effect of biological and experimental variables. *J Pharm Sci.* 2010;99(3) : 1265-77. doi:10.1002/jps.21907 PMID:19739112.
37. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather I, Li X, Jasti B. Effect of experimental temperature on the permeation of model diffusants across porcine buccal mucosa. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(2):579-86. doi:10.1208/s12249-011-9624-z PMID : 21538212 ; PubMed central PMCID : PMC3134678.
38. Hutchins HS, Young FA, Lackland DT, Fishburne CP. The effectiveness of topical anesthesia and vibration in alleviating the pain of oral injections. *Anesth Prog.* 1997 ; 44(3):87-9. PMID : 9481967 ; PubMed Central PMCID:PMDPMC2148927.
39. Meechan JG, Howlett PC, Smith BD. Factors influencing the discomfort of intraoral needle penetration. *Anesth Prog.* 2005;52(3):91-4 doi:10.2344/0003-3006(2005)52[91:FITDOI]2.0.CO;2 PMID:16252736 ; PubMed Central PMCID:PMC1586791.
40. Yu HY, Li SD, Sun P. Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2002;54(9):1221-7. doi:10.1211/002235702320402062 PMID : WOS000178617700007.
41. Bae SS Ehrmann BM, Etefagh KA, Cech NB. A validated Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Method for Quantification of Spilanthes in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. *Phytochemical analysis.* 2010;21(5):438-43. doi:10.1002/pca.1215 PMID:WOS000281460000007.

42. Rodrigues RAF, Foglio MA, Boaventura S, Santos AD, Rehder VLG. Optimization of the extraction and isolation of the antimalarial drug artemisinin from *Artemisia annua* L. *Quimica Nova*. 2006;29(2):368-72. doi:10.1590/s0100-40422006000200030 PMID:WOS:000236414600030.
43. Zhao W. Extraction and isolation of natural products. In : Rensheng X, Yang Y, Zhao W, editors. *Introduction to natural products chemistry*. 1Eded:CRC Press;2011.p.5-25.
44. Yadav R, Yadav N, Kharya M, Savadi R. Preliminary studies on diuretic effect of *Spilanthes acmella* leaves extracts in rats. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(3):245-7.
45. Dias A, Santos P, Seabra I, Junior R, Braga M, Sousa H. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical dioxide extraction. *J Supercrit fluids*. 2012;61:62-70.
46. de Araujo DR, Padula C, Saia Cereda CM, Tofoli GR, Brito RB Jr., de Paula E, et al. Bioadhesive Films Containing Benzocaine : Correlation Between In Vitro Permeation an In Vivo Local Anesthetic Effect ? *Pharmaceutical Research*. 2010;27(8):1677-86. doi:10.1007/s11095-010-0151-5 PMID:WOS:000279506100017.
47. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug delivery Reviews*. 1997;23(1-3):3-25. doi:10.1016/s0169-409x(96)00423-1 PMID:WOS:A1997WH25900002.
48. Li-Chen Wu, Nien-Chu Fan, Ming-Hui Lin, Inn-Ray Chu, Shu-Jung Huang, Ching-Yuan Hu, Shang-Yu Han. *J Agric Foog Chem*. 2008 Apr 9;56(7):2341-9. doi:10.1021/jf073057e.
49. Dinarello, C.A. Interleukin-1, interleukine-1 receptors and interleukin-1 receptor antagoniste. *Int. Rev. Immunol*. 1998, 16, 457-499.
50. Nathan, C. Natural resistance and nitric oxide. *Cell* 1995, 82, 873-876.
51. Bingham, C.O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis : pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J. Rheumatol*. 2002, 65, 3-9.

52. Tracey, K.J. Tumor necrosis factor (catechin) in the biology of septic shock syndrome. *Circ. Shock* 1991, 35, 123-144.
53. Baldwin, A.S. The NF-KB and IKB proteins : new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996, 14, 649-681.
54. Mercurio, F. ; Manning, A.M. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999, 11, 226-232.
55. Chen F. ; Casatrnova, V. ; Shi. X. ; Dermers, L.M. New insights into the rôle of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation factor in th initiation of diseases . *Clin. Chem.* 1999, 45, 7-17.
56. Wu, Z. H. ; Shi, Y. ; Tibbetts, R.S. ; Miyamoto, S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-B signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 2006, 311, 1141-1146.
57. Chen , Y.C. ; Yang, L.L. ; Lee T.J. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccarride induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor kappaB activation. *Biochem. Pharmacol* ; 200, 59, 1445-1457.
58. Glauser, M.P. The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* 1996, 52, 9-7.
59. Fenton, M.J. ; Golenbock, D.T. LPS-binding proteins and receptors. *J. Leukocytes Biol.* 1998, 64, 25-32.
60. Surh, Y.J. ; Chun, K.S. ; Cha, H.H. ; Han S.S. ; Keum, Y.S. ; Park, K.K. ; Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals : down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression on NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* 2002, 480-481, 243-268.
61. Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae) J. KOUAMÉ, C. GNOULA, E. PALÉ, H. BASSOLÉ, I. P. GUISSOU1, J. SIMPORÉ, J.-B. NIKIÉMA.
62. Cheng W.L. ; Lii, C.K. ; Chen, C.K. ; Lin, T.H. ; Liu, K.L. Contribution of conjugated

linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-KB pathway. *J.Agric. Food Chem.* 2004, 52, 71-78.

63. Lemay, S. ; Lebedeva, T.A. ; Singh, A.K. Inhibition of cytokine gene expression by sodium salicylate in a macrophage cell line through an NF-KB-independent mechanism. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999, 6, 567-572.
64. Attur, M.G. ; Patel, R.N. ; Patel, P.D. ; Abramson, S.B. ; Amin, A.R. Tetracycline up-regulate COX-2 expression and prostaglandin E₂ production independent of its effect on nitric oxide. *J. Immunol.* 1999, 162, 3160-3167.

Table des figures

Figure 1 : photographie de *Spilanthes acmella*

Figure 2 : groupes de classements des êtres vivants

Figure 3: open field test circulaire à 19 cases

Figure 4 : schéma d'une cellule de diffusion de Frantz

Figure 5 : souris dans l'appareil de Tail Flick test

Figure 6 : perméabilité de la muqueuse œsophagienne de porc pour les 3 films mucoadhésif testés

Figure 7 : effet maximum attendu («Maximum Possible Effect MPE») des films mucoadhésifs 10%JB, 20%JB, 10% JBC et EMLA en fonction du temps.

Figure 8 : appareil permettant le test de la plaque chauffante

Figure 9 : abcès dentaire

Figure 10 : formule du test de réduction du radical stable

Figure 11: viabilité des cellules (en %) et production d'acide nitrique (% du contrôle) en fonction de la concentration de la concentration en spilanthol.

Figure 12 : effets du spilanthol sur la production de cytokines pro-inflammatoires au niveau des cellules RAW 264-7 stimulées par les LPS.

SOUPENE Arnaud - L'intérêt du spilanthol en odontologie

45 f., 12 ill., graph., 1 tabl., 30 cm.- Thèse : Odontologie ; Rennes 1; 2017 ; N° 42.20.17. .

Résumé français

Cette thèse est une revue de la littérature qui se propose de regrouper les différentes propriétés chimiques et biologiques du spilanthol, un N-alkylamide présent dans *Spilanthus acmella* et pouvant être utiles en odontologie. Cette plante est présente dans la plupart des régions tropicales et subtropicales de la planète. On lui prête des propriétés antalgiques, anti-hyperalgésiques, sialogogues, anti-inflammatoires, antifongiques et antibactériennes qui seraient issues du spilanthol.

Rubrique de classement : Pharmacologie et odontologie

Mots-clés : Test de toxicité
aigüe, Essences florales, tests
nociceptifs

Mots-clés anglais MeSH : acute
toxicity test, aqueous extracts of
flowers, nociception tests

Président : Mr le Pr Olivier Sorel

JURY Assesseurs : Mme le Dr Faustine OBRY Directrice de thèse

Mr le Dr Hervé PRIGENT

Mr le Dr Yann Loïg TURPIN