

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par
Boris ZONFRILLO

Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 2011

Le bacopa,
***Bacopa monnieri* L.**

Président : Mme Nicole GRIMAUD, Maître de Conférences de Pharmacologie

Membres du jury : Mme Claire SALLENAVE-NAMONT, Maître de
Conférences de Botanique et de Mycologie

Mme Bernadette MASSONNET, Docteur en Pharmacie

Table des matières

Table des matières	2
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations et symboles	17
 Introduction	 23
 Partie 1 : la plante	 26
I. Une plante de la médecine ayurvédique.....	27
I.1. L’Ayurvéda.....	27
I.1.1. Origines.....	27
I.1.2. Principes de base.....	31
I.1.2.1. Théorie des Panchamahâbhûta	31
I.1.2.2. Théorie des <i>Tridosha</i>	32
I.1.2.3. Théorie des <i>Septadhatu</i>	33
I.1.2.4. Théorie des <i>Trimala</i>	33
I.1.2.5. Théorie des <i>Guna</i>	34
I.1.3. La maladie.....	34
I.1.4. La thérapeutique.....	35
I.1.4.1. Gérontoprophylaxie.....	35
I.1.4.2. Thérapie du panchakarma	37
I.1.4.3. Les médicaments	38

I.1.5.3. Les phytomédicaments ayurvédiques.....	39
I.1.5.4. Nomenclature ayurvédique du bacopa	41
I.2. Usages traditionnels du <i>Bacopa monnieri</i>	42
I.2.1. Propriétés traditionnelles	42
I.2.2. Préparations traditionnelles.....	43
I.2.3. Préparations d’inspiration traditionnelle.....	48
II. Etude botanique	54
II.1. Classifications	55
II.1.1. Taxinomie.....	55
II.1.1.1. Place selon Linné	55
II.1.1.2. Place selon Cronquist.....	55
II.1.1.3. Place selon l’APG	56
II.1.2. Ordre des <i>Lamiales</i>	59
II.1.3. Famille des <i>Plantaginaceae</i>	59
II.1.4. Genre <i>Bacopa</i>	61
II.2. Description de la plante	62
II.2.1. Habitat	63
II.2.1.1. Le sol.....	63
II.2.1.2. Distribution géographique	64
II.2.2. Appareil végétatif	65
II.2.2.1. Tiges.....	65
II.2.2.2. Feuilles.....	66
II.2.2.3. Racines	67
II.2.2.4. Influence des saisons sur la croissance végétative.....	68
II.2.3. Appareil reproducteur.....	69
II.2.3.1. Fleurs.....	69
II.2.3.2. Fruits	71

II.2.4. Noms vernaculaires à travers le monde	72
II.2.5. Confusion avec <i>Centella asiatica</i>	73
II.2.6. Une espèce en danger	75
III. Composition.....	77
III.1. Découverte chronologique des constituants.....	77
III.2. Les saponosides	79
III.2.1. Structure	79
III.2.1.1. Pré-requis.....	79
III.2.1.2. Les saponosides du bacopa.....	81
III.2.2. Réactions de caractérisation	87
III.2.2.1. Test de mousse ou « froth test »	87
III.2.2.2. Test de Liebermann-Burchard	87
III.2.2.3. Réaction de Molisch	88
III.2.3. Décomposition chimique.....	88
III.2.3.1. Hydrolyse acide	88
III.2.3.2. Hydrolyse alcaline ou dégradation Smith-de-Mayo	89
III.3. Autres constituants.....	89
III.3.1. Les flavonoïdes	89
III.3.2. Les alcaloïdes	90
III.3.3. Divers autres constituants.....	90
III.4. Les méthodes analytiques	93
III.4.1. Les méthodes chromatographiques	93
III.4.1.1. Pré-requis.....	93
III.4.1.2. Analyse chromatographique du bacopa.....	95
III.4.2. Les méthodes spectroscopiques	98
III.4.2.1. Pré-requis.....	98
III.4.2.2. Analyse spectroscopique du bacopa	99

III.4.3. Le couplage des techniques analytiques.....	100
III.4.4. Nomenclature IUPAC des principaux constituants.....	101
III.4.5. Les tests immunologiques	103
III.4.5.1. Test ELISA	103
III.4.5.2. Test immunochromatographique sur bandelette.....	105
III.4.6. Validation des méthodes analytiques	106
III.5. Etude quantitative du bacoside A et de ses constituants.....	107
III.5.1. Facteurs de variation	107
III.5.1.1. La provenance de la plante	107
III.5.1.2. La période de récolte	109
III.5.1.3. La partie de la plante	109
III.5.3. Standardisation phytochimique	110
III.5.3.1. Intérêt.....	110
III.5.3.2. Drogues végétales du bacopa	111
IV. Culture	113
IV.1. La sélection massale	113
IV.1.1. Diversité phénotypique	113
IV.1.2. Diversité génotypique	114
IV.2. Culture en plein champ	115
IV.3. Culture <i>in vitro</i>	116
IV.3.1. Principes.....	116
IV.3.2. Matériels et méthodes	117
IV.3.2.1. Milieu de culture	117
IV.3.2.2. Hormones de croissance	119
IV.3.3. La régénération	122
IV.3.3.1. L'organogénèse	122
IV.3.3.2. L'embryogénèse somatique.....	124

IV.3.4. Culture cellulaire en suspension	125
IV.3.5. Symbiose	126
IV.3.6. Intégrité génétique.....	126
IV.4. Transformation génétique	128
IV.4.1. Transformation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	129
IV.4.2. Transformation par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	130
IV.5. Polyploïdisation	130
 Partie 2 : Activités biologiques	 133
I. Etudes préliminaires	134
II. Propriétés antioxydantes	137
II.1. Pré-requis	137
II.1.1. Les radicaux libres.....	137
II.1.1.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	137
II.1.1.2. Marqueurs biologiques du stress oxydant.....	142
II.1.1.3. Monoxyde d'azote	146
II.1.1.4. Sources des radicaux libres	149
II.1.1.5. Systèmes de défense antioxydants	152
II.1.1.6. Stress oxydant	156
II.2. Mécanisme d'action antioxydant du bacopa	159
II.3. Protection contre le stress oxydant.....	165
II.4. Discussion	172
III. Propriétés neuropsychopharmacologiques	176
III.1. Effets cognitifs et implications physiopathologiques	176
III.1.1. Effets facilitateurs sur l'apprentissage et la mémoire	176
III.1.1.1. Pré-requis	176
III.1.1.2. Effets pro-mnésiques	179

III.1.2. Effets anti-amnésiants et neuroprotecteurs.....	186
III.1.3. Le bacopa et la maladie d'Alzheimer.....	196
III.1.3.1. Pré-requis.....	196
III.1.3.2. Effets en rapport avec la maladie d'Alzheimer	198
III.2. Effets dans l'épilepsie	205
III.2.1. Effets anticonvulsivants	206
III.2.2. Effets sur l'épileptogenèse	209
III.2.2.1. Système GABAergique	209
III.2.2.2. Système glutamatergique.....	212
III.2.2.3. Système sérotoninergique.....	213
III.2.2.4. Métabolisme périphérique	214
III.2.3. Effets cognitifs dans l'épilepsie	215
III.3. Effets tranquillisants	216
III.3.1. Effet anxiolytique	216
III.3.2. Effet antidépresseur.....	218
III.4. Discussion	220
IV. Autres propriétés	224
IV.1. Propriétés adaptogéniques	224
IV.2. Propriétés hépatoprotectrices.....	230
IV.3. Propriétés anticancéreuses	234
IV.3.1. Etudes <i>in vitro</i>	234
IV.3.2. Etudes <i>in vivo</i>	240
IV.4. Propriétés anti-inflammatoires.....	244
IV.4.1. Mécanisme d'action anti-inflammatoire	244
IV.4.2. Effets dans l'arthrite expérimentale	247
IV.5. Propriétés immunomodulatrices	251
IV.6. Propriétés cicatrisantes	253

IV.7. Propriétés anti-ulcérogéniques.....	254
IV.8. Propriétés spasmolytiques	256
IV.9. Effets cardiovasculaires et sur l'ischémie-reperfusion	260
IV.9.1. Effets généraux cardiovasculaires.....	260
IV.9.2. Effets protecteurs dans l'ischémie-reperfusion.....	261
IV.10. Effets dans le diabète	263
IV.11. Protection des effets indésirables des opiacés	266
IV.12. Effets protecteurs dans le tabagisme.....	271
IV.13. Propriété antalgique	275
IV.14. Propriété hyperthyroïdienne potentielle	276
IV.15. Discussion.....	277
 Partie 3 : efficacité thérapeutique et sécurité d'emploi.....	 279
I. Etudes toxicologiques	280
I.1. Toxicité aiguë	280
I.2. Toxicité par administrations répétées.....	282
I.3. Toxicité génique	283
I.4. Repro-toxicité	287
II. Essais cliniques	289
II.1. Etudes d'innocuité et de tolérance	290
II.2. Etudes d'efficacité thérapeutique	292
II.2.1. Troubles neuropsychiatriques.....	292
II.2.2. La cognition.....	293
II.2.2.1. Chez l'adulte jeune	293
II.2.2.2. Chez l'enfant.....	297
II.2.2.3. Lors du vieillissement.....	299
II.2.3. Le syndrome de l'intestin irritable.....	302

II.3. Discussion	303
III. Sécurité d'emploi.....	306
III.1. Effets indésirables	306
III.2. Contre-indications.....	306
III.3. Interactions médicamenteuses	307
III.4. Recommandations posologiques.....	309
III.5. Aspects réglementaires	311
III.5.1. Les plantes médicinales.....	311
III.5.2. La nutrivigilance	314
Conclusion.....	316
Glossaire	319
Bibliographie	323
Bibliographie électronique	347

Liste des figures

Figure 1 : planche botanique de <i>Bacopa monnieri</i> (Blanco, Flora de filipinas 1883, wikipedia.fr).	22
Figure 2 : origines divines de l'Ayurvêda [1].	28
Figure 3 : représentation de <i>Brahmâ</i> (alokapari.fr).	29
Figure 4 : représentation de la quadruple tête de <i>Brahmâ</i> du Musée Guimet (wikipedia.fr)..	29
Figure 5 : représentation de Charaka (Ayur-vedas.com).....	30
Figure 6 : représentation d'un tradipraticien utilisant des plantes médicinales (dentalveda.com).	40
Figure 7 : plante séchée de <i>Bacopa monnieri</i> (indiawebmall.com).	44
Figure 8 : visuel d'une préparation <i>Brahmi</i> à base de <i>ghee</i> (ayurvediccenter.com).	45
Figure 9 : visuel du Protandim [®] (lifevantage.com).	53
Figure 10 : planche botanique de <i>Bacopa monnieri</i> (eFlora.org).....	54
Figure 11 : place des <i>Lamiales</i> dans la classification de l'APG III [60].	58
Figure 12 : l'espèce <i>Bacopa monnieri</i> (helpfulhealthtips.com).	62
Figure 13 : le <i>Bacopa monnieri</i> sur un sol sablonneux (wikimedia.org).	63
Figure14 : le <i>Bacopa monnieri</i> en milieu aquatique (sport-sante.com).	64
Figure 15 : un « tapis » de <i>Bacopa monnieri</i> (helpfulhealthtips.com).	65
Figure 16 : parties aériennes de <i>Bacopa monnieri</i> (ayurvedaherbalmedicine.com).	66
Figure 17 : feuilles obovales de <i>Bacopa monnieri</i> (hallandsbotan.org).	67
Figure 18 : représentation de <i>Bacopa monnieri</i> (tropica.com).....	68
Figure 19 : fleur de <i>Bacopa monnieri</i> aux pétales violacés (mon-herboristerie.com).	69
Figure 20 : fleur de <i>Bacopa monnieri</i> (florabase.fr).	70
Figure 21 : photographie de <i>Bacopa monnieri</i> (helpfulhealthtips.com).....	71
Figure 22 : capsules de <i>Bacopa monnieri</i> (eol.org).....	72
Figure 23 : graines de <i>Bacopa monnieri</i> (eol.org).....	72
Figure 24 : feuilles de <i>Centella asiatica</i> (helpfulhealthtips.com).	74
Figure 25 : inflorescences de <i>Centella asiatica</i> (lepidoptera.butterflyhouse.com).	74
Figure 26 : planche botanique de <i>Centella asiatica</i> (lepotager-demesreves.fr)	75

Figure 27 : structure d'une unité isoprénique, d'un triterpène tétracyclique et d'un triterpène pentacyclique (chemIDplus.fr).....	80
Figure28 : structure de la jujubogénine et de la pseudojujubogénine[126].....	81
Figure 29 : caractérisation erronée du bacoside A et du bacoside B (bacopin.com).....	82
Figure30 : caractérisation définitive du bacoside A [116].	83
Figure 31 : structure des bacosides A ₁ , A ₂ et A ₃ [126].	84
Figure32 : structure des bacopasaponines A, B, C, D, E, F et G [126].....	85
Figure 33 : structure des bacopasides II, III, III, IV et V [126].....	86
Figure34 : structure des bacopasides N1 et N2 [126].....	87
Figure35 : structure de la lutéoline, de l'apigénine et de la quercétine (chemidplus.fr).	90
Figure36 : structure du bacostérol-3-O-β-D-glucopyranosyl et de la bacosine [126].....	91
Figure37 : structure des monnierasides I, II et III et du plantainoside B [126].....	92
Figure38 : représentation schématique d'un chromatogramme obtenu par CCM (chimix.com).	94
Figure 39 : chromatogramme d'un extrait méthanolique de bacopa obtenu par CLHP [136].	96
Figure40 : chromatogramme d'un extrait hydro-éthanolique de bacopa obtenu par CLHP micro-analytique [138].	97
Figure 41 : chromatogramme d'un extrait hydro-méthanolique de bacopa obtenu par CLHP [117].	98
Figure42 : principe du test ELISA par compétition développé pour le dosage du bacopaside I [142].	105
Figure 43 : test immunochromatographique sur bandelette des saponosides à pseudojujubogénine du bacopa[143].....	106
Figure 44 : photographie de <i>Bacopa monnieri</i> (pharmacie-fleurentin.fr).	116
Figure45 : développement de bourgeons adventifs à partir d'explants foliaires de bacopa[155].....	118
Figure 46 : influence des concentrations relatives d'auxines et de cytokinines sur l'organogenèse (biotech-ecolo.net).	120
Figure47 : étapes d'une culture <i>in vitro</i> de <i>Bacopa monnieri</i> [157].	121
Figure48 : comparaison du nombre de bourgeons adventifs obtenus à partir d'explants d'entre-nœuds de bacopa [84].	123
Figure49 : plantes de <i>Bacopa monnieri</i> obtenues par rhizogenèse [79].....	124
Figure50 : embryon somatique de <i>Bacopa monnieri</i> obtenu à partir d'un cal [79].	125
Figure 51 : culture <i>in vitro</i> de <i>Bacopa monnieri</i> [161].....	127

Figure52 : transfert d'un fragment d'ADN d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dans le génome de la plante (snv.jussieu.fr).	129
Figure53 : comparaison de la taille et de la couleur entre la fleur tétraploïde et la fleur témoin de bacopa [164].	131
Figure 54 : description des phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique [180].	143
Figure 55 : réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique [181].	144
Figure 56 : effets sur les lipides, les protéines et l'ADN des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [182].	146
Figure 57 : effets sur l'ADN des sources radicalaires endogènes et exogènes (lanutrition.fr).	151
Figure 58 : sources cellulaires des radicaux libres [183].	152
Figure 59 : représentation du système de défense enzymatique anti-oxydant et de la peroxydation lipidique [184].	154
Figure 60 : systèmes cellulaires de défense antioxydants [183].	156
Figure 61 : effets biologiques cellulaires des espèces réactives de l'oxygène [181].	157
Figure 62 : principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant	
Figure 63 : électrophorèse sur gel d'agarose montrant l'effet protecteur d'un extrait de bacopa contre la coupure simple-brin et double-brin d'un plasmide ADN [189].	163
Figure 64 : taux d'oxydants intracellulaires au niveau des astrocytes purifiés de rats [190].	164
Figure 65 : comparaison des taux de malondialdéhyde, de glutathion réduit, d'hydroperoxydes et de groupes carbonyles des protéines chez la drosophile [194].	167
Figure 66 : incidence de la mortalité des drosophiles [194].	168
Figure 67 : microscopie à fluorescence représentant les granules de lipofuscine des cellules corticales cérébrales de rats [199].	170
Figure 68 : représentation schématique d'une boîte de Skinner (modifiée d'après maketechnologies.com)	179
Figure 69 : boîte de Skinner (bioseb.com).	179
Figure 70 : labyrinthe en Y (med-associates.com).	179
Figure 71 : labyrinthe surélevé (bioprobeshk.com).	179
Figure 72 : nombre de pressions sur le levier et nombre de chocs électriques en fonction du temps durant l'épreuve de Sidman chez le rat [22].	180
Figure 73 : expression relative des ARNm de TPH2 et SERT au niveau du cerveau de rats [218].	185

Figure 74 : visualisation de l'arborisation dendritique de neurones amygdaliens de rats [220].	186
Figure 75 : évolution du temps nécessaire pour localiser la plateforme durant les essais d'acquisition des rats [223].	189
Figure 76 : comparaison des taux de PKA, MAP kinase et pCREB au niveau du cerveau de souris [228].	192
Figure 77 : comparaison de l'activité de la caspase au niveau du cerveau de rats en condition normoxique et en condition hypoxique [233].	194
Figure 78 : embranchements dendritiques des neurones pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe des rats [233].	195
Figure 79 : schéma d'une synapse cholinergique et mode d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase [235].	198
Figure 80 : pourcentages d'inhibition <i>in vitro</i> de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du cerveau de souris [237].	200
Figure 81 : pourcentages relatifs de la viabilité des cellules corticales mises en culture [240].	202
Figure 82 : comparaison de la viabilité des cellules corticales exposées à la protéine β -amyloïde ou au glutamate [240].	203
Figure 83 : (1) microscopie optique de la densité des neurones cholinergiques de l'aire CA1 de l'hippocampe (2) comparaison de la densité des neurones cholinergiques au niveau des aires CA1, CA2, CA3 de l'hippocampe et du gyrus denté [241].	204
Figure 84 : <i>Caenorhabditis elegans</i> (medicalfacts.nl).	207
Figure 85 : effet du bacoside A sur l'intensité des crises de <i>C. elegans</i> [244].	208
Figure 86 : expression des ARNm codant pour les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 5$ et $\alpha \delta$ du récepteur GABA _A chez le rat épileptique [245].	211
Figure 87 : immunohistochimie du striatum avec visualisation des récepteurs GABA _{Aα1} chez le rat épileptique [247].	211
Figure 88 : représentation d'un rotarod (ugobasileusa.com).	217
Figure 89 : expression relative de Hsp70 dans différentes régions cérébrales des rats [261].	226
Figure 90 : régulation de l'axe corticotrope ou hypothalamo-hypophyso-surrénalien [264].	228
Figure 91 : comparaison des taux plasmatiques de cortisol des rats [263].	229
Figure 92 : comparaison des taux de glutathion réduit au niveau du foie de rats [266].	231

Figure 93 : comparaison des taux des marqueurs enzymatiques sériques hépatosécifiques chez le rat [267].	232
Figure 94 : étude histologique de tissus hépatiques de rats [269].	234
Figure 95 : régulation du cycle cellulaire par les cyclines (unige.ch).	236
Figure 96 : étude de survie des cellules S-180 en fonction de la concentration et du temps d'exposition à un extrait alcoolique de plante entière de bacopa [276].	237
Figure 97 : comptage en cytométrie en flux des cellules S-180 apoptotiques [276].	238
Figure 98 : comparaison des taux des marqueurs tumoraux sériques [270].	242
Figure 99 : comparaison des pourcentages d'inhibition de l'œdème de la patte arrière des rongeurs en fonction du temps [281].	246
Figure 100 : comparaison des taux de protéine C réactive chez la souris [282].	247
Figure 101 : profils d'inhibition COX-1/COX-2 de l'extrait méthanolique de bacopa et de l'indométacine dans un modèle d'arthrite expérimentale chez le rat [24].	248
Figure 102 : les différentes étapes du processus de phagocytose [264].	249
Figure 103 : microscopie optique de sections de patte de rat [283].	250
Figure 104 : comparaison des effets du bacopa et de la nifédipine sur la contraction jéjunale provoquée par l'administration de calcium chez le lapin [293].	259
Figure 105 : photomicrographies du tissu ventriculaire de rat après une ischémie-reperfusion [297].	262
Figure 106 : photomicrographies de sections de foie de rat fixées et colorées [305].	268
Figure 107 : tracés montrant la réduction par le bacopa de l'état de manque à la morphine sur iléon isolé de cochon d'Inde [306].	269
Figure 108 : effet inhibiteur de l'extrait alcoolique de bacopa sur la tolérance à l'effet antalgique de la morphine chez la souris [307].	270
Figure 109 : migrations électrophorétiques des isoenzymes de la lactate déshydrogénase et de la créatine kinase du cerveau de rats [310].	272
Figure 110 : comparaison du nombre de cellules apoptotiques au niveau du cortex cérébral de rat [314].	274
Figure 111 : représentation schématique du test d'échange des chromatides sœurs et du test du micronoyau [321].	285
Figure 112 : représentation schématique du test d'Ames [321].	286
Figure 113 : visuel des Arkogélules® de <i>Bacopa monnieri</i> (arkopharma.fr).	310

Liste des tableaux

Tableau 1 : les cinq grands éléments de l'univers et ceux du corps humain [3].....	31
Tableau 2 : les <i>dosha</i> et leurs <i>mahâbhûta</i> respectifs [5].	32
Tableau 3 : les 7 <i>dhatu</i> et leurs <i>mahâbhûta</i> respectifs [1].....	33
Tableau 4 : les <i>mala</i> et leurs <i>mahâbhûta</i> respectifs [4].....	33
Tableau 5 : action de chaque <i>rasa</i> sur les <i>dosha</i> [5].	38
Tableau 6 : les plantes <i>medhya rasayana</i> [11].	40
Tableau 7 : description des propriétés ayurvédiques du <i>Bacopa monnieri</i> [16].	42
Tableau 8 : profil des consommateurs de plantes stimulant la mémoire et la vitalité [33].....	49
Tableau 9 : récapitulatif des différentes classifications du <i>Bacopa monnieri</i>	57
Tableau 10 : bulletin de contrôle de 100 g de feuilles de bacopa (bacopin.com).	92
Tableau 11 : nomenclature IUPAC des principaux composés du bacopa [121].....	101
Tableau 12 : comparaison des concentrations en 4 saponosides dans 3 plantes entières de bacopa d'origine différente [112].....	108
Tableau 13 : comparaison des concentrations en 4 saponosides dans 3 plantes de bacopa de même origine [130].	108
Tableau 14 : comparaison des concentrations en 4 saponosides dans les parties aériennes hautes et basses et les racines de bacopa [138].	109
Tableau 15 : comparaison des concentrations en 4 saponosides dans 3 compléments alimentaires à base de bacopa [130, 140].....	111
Tableau 16 : comparaison de la taille des feuilles, des fleurs, des tiges et des entre-nœuds entre la variété Ali INTA-JICA et un témoin [161].	131
Tableau 17 : comparaison de l'activité <i>in vitro</i> de piégeage des radicaux libres et d'inhibition de la peroxydation des lipides des poudres de feuilles de <i>Bacopa monnieri</i> et de <i>Centella asiatica</i> (résultats compilés d'après [177]).	160
Tableau 18 : comparaison de l'effet d'un extrait de bacopa et de l'imipramine sur la période d'immobilité dans un test de résignation acquise [14].	219
Tableau 19 : activité cytotoxique <i>in vitro</i> de 4 saponosides contre différentes lignées cellulaires tumorales [21].	239

Tableau 20 : comparaison de l'activité stabilisante mastocytaire de divers extraits préparés à partir de feuilles de bacopa et du cromoglycate disodique [283].....	253
Tableau 21 : résultats des études de toxicité aiguë (compilation personnelle).	282

Liste des abréviations et symboles

5-HT : sérotonine

5'ND : 5'-nucléotidase

β -A : protéine β -amyloïde

ACE :antigène carcino-embryonnaire

ACh : acétylcholine

AChE : acétylcholinestérase

ACTH : *Adrénocorticotrophic Hormone* ou corticotropine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADN-T : ADN de transfert

AFP :alpha-fœtoprotéine

AGEs : *Advanced Glycation End products*
ou produits de glycation avancée

AIA : acide indol-3-acétique

AIB : acide 3-indole butyrique

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

ALAT : alanine amino-transférase

AlCl_3 : chlorure d'aluminium

AMM : autorisation de mise sur le marché

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

ANA : acide naphthalène acétique

APG : *Angiosperm Phylogeny Group* ou groupe de phylogénie des Angiospermes

APP : protéine précurseur amyloïde

Ara-C : cytarabine ou cytosine-arabinoside

ASAT : aspartate amino-transférase

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : adénosine triphosphatase

BA : benzyl-6-aminopurine

B_{max} : liaison maximale ou nombre total de sites de liaison

BZD : benzodiazépine

Ca^{++} : calcium

CAT : catalase

CCl_4 : tétrachlorométhane ou tétrachlorure de carbone

CCM : chromatographie sur couche mince

CCMHP : chromatographie sur couche mince haute performance

CHC : carcinome hépatocellulaire	GABA : acide γ -aminobutyrique
CHCl ₃ : chloroforme	GAG : glycoaminoglycanes
CI ₅₀ : concentration inhibitrice médiane	Glu : glutamate
CK : créatine kinase	G6P : glucose-6-phosphatase
CLHP : chromatographie liquide haute performance	GPx : glutathion peroxydase
COX : cyclo-oxygénase	GR : glutathion réductase
CREB : <i>cAMP Responsive Element Binding Protein</i> ou élément de réponse liant l'AMPc	GSH : glutathion réduit
CRP : protéine C réactive	GSSG : glutathion oxydé
CYP450 : cytochrome P450	GST : glutathion-S-transférase
DA : dopamine	γ -GT : γ -glutamyl transpeptidase
D-GalN : D-galactosamine	HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale
DL ₅₀ : dose létale médiane	H ₂ O : molécule d'eau
DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl	H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène
EDTA : éthylène diamine tétra acétique	HPA (axe) : <i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal</i> ou hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou corticotrope
ELISA : <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> ou dosage immuno-enzymatique	Ig : immunoglobuline
ELT : <i>Escape Latency Time</i> ou temps nécessaire pour localiser la plateforme cachée	IL : interleukine
EROD : 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase	IMAO : inhibiteur de monoamine oxydase
EtOAc : acétate d'éthyle	INF γ : interféron γ
FeSO ₄ : sulfate ferreux	iNOS : <i>inductible Nitric Oxide Synthase</i> ou monoxyde d'azote synthase inductible

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée

K^+ : potassium

K_D : constante de dissociation à l'équilibre

L_B : lymphocyte B

LDH : lactate déshydrogénase

L-NNA : N_{ω} -nitro-L-arginine

$LOO\cdot$: radical peroxy

LOX : lipoxygénase

LPS : lipopolysaccharide

LSD : *Lysergic Acid Diethylamide* ou dérivé de l'acide lysergique

L_T : lymphocyte T

LTP : *Long Term Potentiation* ou potentialisation à long terme

MAP kinase : *Mitogen Activated Protein kinase* ou protéine kinase activée par le mitogène

MDA : malondialdéhyde

MDH : malate déshydrogénase

MeOH : méthanol

MES (test) : *Maximal Electrochoc Seizure* ou test de l'électrochoc maximal

Mg^{++} : magnésium

mGluR8 : récepteur métabotrope du glutamate

MMP : *Matrix MetalloProteinase* ou métalloprotéases matricielles

MS (milieu) : Murashige et Skoog

MTT (test au) : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

n-BuOH : butanol

NA : noradrénaline

Na^+ : sodium

NADH (réducteur) : nicotinamide adénine dinucléotide

NAPQI : N-acétyl-*p*-benzoquinone imine

NBT (test au) : bleu de nitrotétrazolium

NCAM : molécule d'adhérence neuronale

NMDA (récepteur) : N-méthyl-D-aspartate

NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level* ou dose maximale pour laquelle aucun effet toxique n'est observé

$NO\cdot$: monoxyde d'azote radicalaire

NOS : monoxyde d'azote synthase

NTR : *No Transfer Response* ou réponse de non transfert

O_2 : oxygène moléculaire ou dioxygène

O_2^- : radical superoxide	PSAPP : souris doublement transgénique (double mutation PS-1 et APP)
$^1O_2$: oxygène singulet	
$^3O_2$: oxygène triplet	PS-1 : préséniline-1
$\cdot OH$: radical hydroxyle	Rf : rapport frontal
^-OH : anion hydroxyde	RMN : résonnance magnétique nucléaire
OMS : Organisation Mondiale de la Santé	$RO_2\cdot$: radical peroxyde
^-OONO : peroxydinitrite	ROS : <i>Reactive Oxygen Species</i> ou espèces réactives de l'oxygène
PAF : <i>Platelet Activating Factor</i> ou facteur d'activation plaquettaire	RT-PCR : <i>Reverse Transcription PCR</i> ou PCR inverse
PAL : phosphatase alcaline	SERT : <i>serotonin transporter</i> ou transporteur de la sérotonine
PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou réaction de polymérisation en chaîne	S-180 (cellules) : lignée cellulaire de sarcome 180
PDE : phosphodiesterase	SM : spectrométrie de masse
PG : prostaglandine	SNC : système nerveux central
PGI_2 : prostacycline	SOD : superoxide dismutase
pCREB : phospho-CREB ou CREB phosphorylé	TBARS : <i>ThioBarbituric Acid Reactive Substances</i> ou substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
PKC : protéine kinase C	TDAH : trouble de déficit de l'attention/hyperactivité
PKA : protéine kinase A	TDZ : thidiazuron
PLA_2 : phospholipase A_2	TLT : <i>Transfer Latency Time</i> ou délai de transfert d'un compartiment à un autre
PND : <i>Postnatal Day</i> ou nombre de jours depuis la naissance	
PROD : 7-pentoxyrésorufine-O-déalkylase	

TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha* ou
facteur de nécrose tumorale

TPH2 : tryptophane hydroxylase 2

TRx : thiorédoxine

TS : *Time Spent* ou temps passé au niveau
du quadrant-cible

UICN : Union Internationale pour la
Conservation de la Nature

VGLUT : transporteur vésiculaire du
glutamate



Figure 1 : planche botanique de *Bacopa monnieri* (Blanco, Flora de filipinas 1883, wikipedia.fr).

Introduction

Aucun être-vivant n'est éternel ! Pourtant, comme en témoignent les nombreux mythes et légendes anciens, l'Homme, douloureusement conscient de sa propre mortalité, a depuis toujours été animé et fasciné par la quête de la vie éternelle.

L'Ayurvêda, littéralement « Science de la Vie », est l'un des plus anciens systèmes de médecine du monde. Cette médecine et sagesse traditionnelle indienne prône l'emploi de *Rasayana*, des élixirs de longévité et de rajeunissement, censés permettre de dépasser sa simple condition humaine et d'accéder à la voie heureuse de l'Absolu, l'Eternel. Véritable plante divine, le *Bacopa monnieri* L. (Plantaginacées) est utilisé depuis plus de 3000 ans dans l'Ayurvêda et constitue l'un des principaux ingrédients de ces potions de rajeunissement. En référence à *Brahmâ*, le Dieu créateur originel du monde, la Réalité suprême, le bacopa est nommé symboliquement *Brahmi* dans les traités médicaux sanskrits fondateurs de la doctrine classique ayurvédique. Traditionnellement, cette petite plante grasse était surtout employée comme tonique nerveux et fortifiant cérébral. Le bacopa permettrait ainsi d'augmenter la mémoire et la concentration et de traiter diverses pathologies du système nerveux central telles la folie, l'hystérie, les convulsions. Un régime quotidien à base de bacopa a la réputation de promouvoir une longue vie saine et de lutter contre le vieillissement.

Il est un fait établi que l'espérance de vie augmente et que la pyramide des âges s'est modifiée, faisant apparaître ce que certains nomme « une génération en plus », les plus de 75 ans. Le vieillissement général de la population et les problématiques liées à la longévité représentent un enjeu démographique important ; c'est toute la société qui doit accompagner un nouvel âge de la vie, dans le domaine de la santé (gérontologie) mais pas seulement (économique, sociologique, pouvoirs publiques). Le projet de création du Gêrontopôle Autonomie et Longévité des Pays de la Loire incarne parfaitement la nécessité d'améliorer la prise en compte des besoins des personnes âgées et de créer les conditions favorables à l'amélioration de leur existence. Naturellement, cette tranche d'âge est devenue la nouvelle cible de la société de consommation et il se développe un véritable « gérontobusiness » autour de ce marché lucratif. Aussi, le bacopa s'inscrit pleinement dans cette mouvance actuelle de la médecine « anti-âge » et ses revendications traditionnelles sont reprises en tant qu'arguments marketing par les fabricants et distributeurs.

En conséquence, et devant l'introduction récente du *Bacopa monnieri* en Occident et depuis quelques années dans les officines françaises, il nous est apparu nécessaire d'évaluer la véracité des promesses thérapeutiques du bacopa face aux réalités scientifiques. Dans un

premier temps, après une description de l'histoire du bacopa et des principaux concepts de la médecine ayurvédique, l'étude botanique et pharmacognosique ainsi que les modes de culture de la plante seront abordés. Dans un second temps, il s'agira de rassembler les données de la littérature scientifique internationale concernant l'investigation de ses activités biologiques et d'en dégager les principales propriétés. Enfin, nous nous intéresserons à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et de la sécurité d'emploi du bacopa chez l'homme.

Partie 1 : la plante

I. Une plante de la médecine ayurvédique

I.1. L'Ayurveda

I.1.1. Origines

L'Ayurveda (ou *Āyurveda*) est, comme son nom l'indique, la « Science de la Longévité », *ayur* signifie vie, longévité et *veda* savoir, connaissance d'origine divine[1].

La médecine ayurvédique est considérée comme une doctrine médicale essentielle de l'Inde. C'est la plus ancienne médecine du sous-continent indien (Népal, Sri Lanka, Pakistan, Inde, Bangladesh et Bhoutan), elle est utilisée depuis le XII^e siècle avant Jésus-Christ[2]. Le bouddhisme a largement participé à sa diffusion. L'Ayurveda est devenue une médecine incontournable au Tibet et au Sri Lanka dès le VII^e siècle après J-C[3]. De plus, elle partage des théories médicales avec la médecine unani (*yunâni*, médecine grecque) mais se différencie de cette dernière par son origine géographique [1]. En effet, la médecine indienne s'est propagée de la Mongolie à l'Indonésie tandis que la médecine unani s'est développée de l'Occident aux pays arabes.

Les médecins ayurvédiques sont tout d'abord des philosophes, guidés par les concepts de l'Inde ancienne. La médecine ayurvédique entretient et guérit la santé physique ou mentale de l'homme, et elle fortifie également la santé pour prolonger la vie. C'est une véritable philosophie qui prend ses origines dans la tradition védique[4].

Les védas sont quatre textes sacrés, les plus anciens de l'hindouisme, datant de 1800 avant Jésus-Christ et sont appelés *Rigveda*, *Samaveda*, *Yajurveda* et *Atharvaveda*.

L'Ayurveda est considérée comme un membre annexe de l'*Atharvaveda* (véda contenant des formules médicales magiques) ou comme un « sous-véda » du *Rigveda* (véda contenant des hymnes et prescriptions rituelles)[1]. Elle a donc bien été élaborée à partir de ces védas[5].

Selon la philosophie hindoue, l'Ayurveda est d'origine divine et *Brahmâ* (le dieu créateur mythique dans le panthéon hindou) est le premier à enseigné aux hommes cette médecine qui

va être transmise à Prajâpati, le créateur, puis aux Ashvins, les médecins des dieux et à Indra, le roi des Dieux[1].

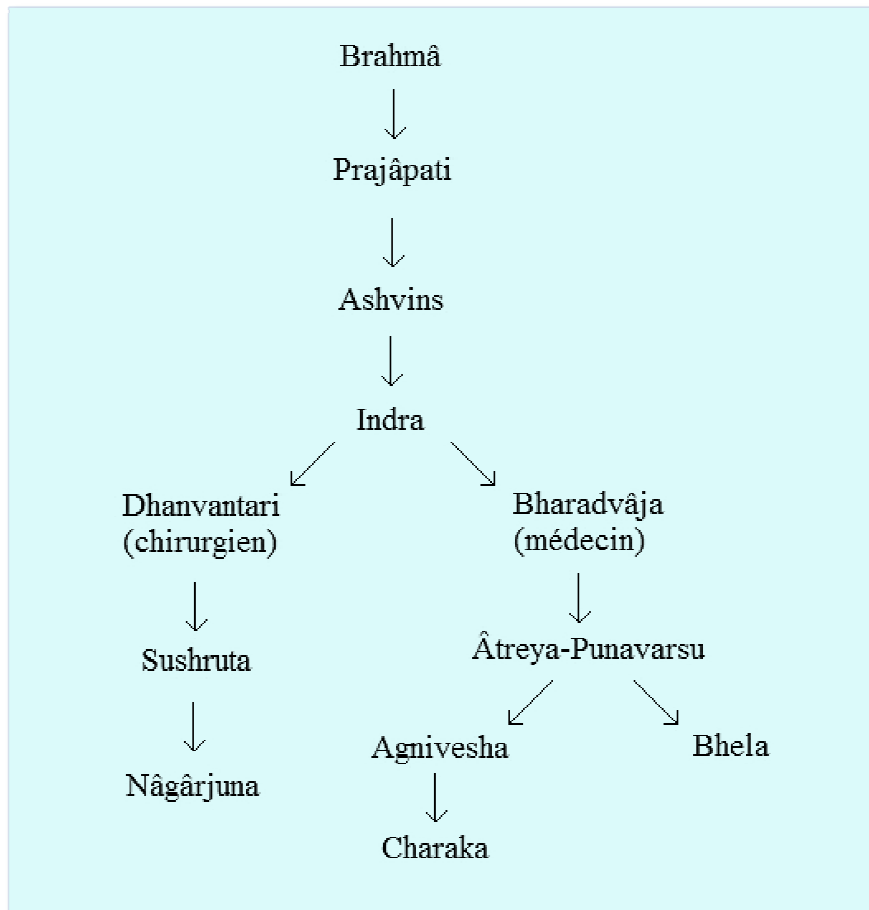


Figure 2: origines divines de l'Ayurvêda[1].

Les recueils de médecine ou *tantra* et la Pharmacopée indienne ou *kalpa* constituent les bases de l'Ayurvêda. Ils ont été transcrits dans plusieurs traités, appelés *samhitâ*, notamment ceux écrits au début de l'ère chrétienne par Charaka, Sushruta et Bhela, puis celui de Vâgbhata écrit au VII^e siècle après J-C[4].

Actuellement, on considère que le *Charaka-Samhitâ*, le *Sushruta-Samhitâ* et le *Vâgbhata-Samhitâ* constituent la base de l'enseignement ayurvédique. Les écrits remontant à la période de l'*Âyurveda* ont tous disparu.



Figure 3: représentation de *Brahmā* (alokapari.fr).



Figure 4: représentation de la quadruple tête de *Brahmā* du Musée Guimet (wikipedia.fr).

Brahmâ divise l'Âyurveda en huit sections[4] :

- Médecine générale : *kaya cikitsa* ;
- Ophtalmologie et ORL : *salakya tantra* ;
- Chirurgie générale : *salya tantra* ;
- Toxicologie : *agada tantra* ;
- Psychiatrie et démonologie : *bhuta vidya* ;
- Pédiatrie et obstétrique : *bala tantra* ;
- Médecine des tonifiants : *rasayana tantra* ;
- Médecine des aphrodisiaques : *vajikarana tantra*.

Ces catégories de la médecine sont reprises dans les traités sanskrits par différents auteurs qui ont choisi de développer telle ou telle discipline. Ainsi, Charaka, médecin, inscrit dans le *Charaka-Samhitâ* toutes ses connaissances médicales à propos de l'anatomie, l'embryologie, la physiologie, la pathologie... et bien d'autres matières médicales. Sushruta, quant à lui, chirurgien, note dans le *Sushruta-Samhitâ* tout ce qui se rapporte à la chirurgie, il y développe les techniques opératoires, les instruments et les traitements post-opératoires. Enfin, Vâgbhata, médecin du VII^e siècle après J-C, enseigne la médecine, développe la thérapeutique et complète les connaissances chirurgicales dans son traité, le *Vâgbhata-Samhitâ*[4].

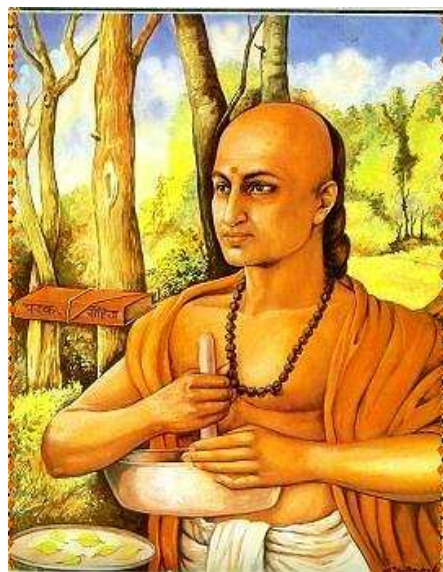


Figure 5: représentation de Charaka (Ayur-vedas.com).

Le médecin ayurvédique privilégie une approche globale du malade, il soigne à la fois son corps et son esprit et non un organe bien distinct. Son objectif est d'obtenir un bien-être physique, mental, social et spirituel. Il a une approche holistique de la santé[2].

I.1.2. Principes de base

La médecine ayurvédique est probablement le plus ancien système de médecine au monde[6].

I.1.2.1. Théorie des Panchamahâbhûta

La théorie des *panchamahâbhûta* repose sur les cinq (*pancha*) grands (*mahâ*) éléments (*bhûta*) fondateurs de l'univers : la terre, l'eau, le feu, l'air et l'espace, qui sont représentés respectivement dans le corps humain par les solides, les liquides, la chaleur, le souffle et le vide des organes creux[3].

Tableau 1 : les cinq grands éléments de l'univers et ceux du corps humain[3].

Mahâbhûta	Elément du corps humain
<i>prithvi</i> : terre	solides
<i>jala</i> : eau	liquides
<i>tejas</i> : feu	chaleur animale
<i>vâyu</i> : air	souffle, mouvement
<i>âkâça</i> : espace ou éther	vide des organes creux

L'homme est une représentation réduite de l'Univers et sa santé repose sur une harmonie parfaite entre son corps et la nature.

I.1.2.2. Théorie des *Tridosha*

L'Âyurveda croit en l'équilibre des cinq grands éléments de l'univers qui se combinent sous forme de trois forces ou *dosha* appelées *vâta*, *pitta* et *kapha*[5].

Tableau 2 : les *dosha* et leurs *mahâbhûta* respectifs[5].

Dosha	Mahâbhûta
<i>vâta</i> : vent	air + éther
<i>pitta</i> : bile	feu
<i>kapha</i> : phlegme	terre + eau

Vâta est la première force, elle gouverne *pitta* et *kapha*. Elle est responsable de tous les mouvements à l'intérieur du corps. Le principal souffle de *vâta* est *prâna* ou « souffle de devant », responsable notamment de la respiration.

Pitta représente les enzymes et les hormones de notre corps. Ce *dosha* assure la digestion et le métabolisme.

Kapha forme les cellules et les fluides de notre organisme[4].

Tant que *Vâta*, *Pitta* et *Kapha* sont en équilibre, l'individu est en bonne santé. Mais, dès qu'un *dosha* est excité ou diminué, la maladie apparaît. En effet, les *dosha* contrôlent les mécanismes physiologiques et biologiques du corps humain. Un déséquilibre entre ces trois forces est à l'origine d'un trouble, c'est pourquoi cette théorie est dite *destridosha* ou des « trois troubles ». Ce concept des *tridosha* est essentiel dans la médecine ayurvédique pour établir un diagnostic et choisir une thérapeutique[7].

I.1.2.3. Théorie des *Septadhatu*

Les *septadhatu* sont les sept éléments constitutifs de notre organisme, symbolisés par les cinq grands éléments de l'univers. *Rasa* est la substance primordiale de l'organisme, c'est elle qui « forme » les six autres[1].

Tableau 3 : les 7 *dhatu* et leurs *mahâbhûta* respectifs[1].

Dhatu	Mahâbhûta
<i>rasa</i> : chyle	<i>jala</i> : eau
<i>rakta</i> : sang	<i>tejas</i> : feu
<i>mâmsa</i> : chair	<i>prithvi</i> : terre
<i>medas</i> : graisse	<i>prithvi</i> : terre
<i>asthi</i> : os	<i>vâyu</i> : air et <i>âkâça</i> : espace
<i>majjâ</i> : moelle	<i>tejas</i> : feu
<i>çukra</i> : sperme	<i>jala</i> : eau

I.1.2.4. Théorie des *Trimala*

Les déchets du corps sont appelés *mala* et sont au nombre de trois : *mûtra*, *shakrat*, *sveda*.

Tableau 4 : les *mala* et leurs *mahâbhûta* respectifs[4].

Mala	Mahâbhûta
<i>mûtra</i> : urine	<i>jala</i> : eau
<i>shakrat</i> : matières fécales	<i>prithvi</i> : terre
<i>sveda</i> : sueur	<i>jala</i> : eau

Une personne en bonne santé possède un équilibre entre les *dosha* (3), les *dhatu* (7) et les *mala* (3) qui représentent les treize constituants de l'organisme sur lesquels reposent les bases physiologiques de l'Âyurveda[4].

I.1.2.5. Théorie des *Guna*

Selon le médecin ayurvédique, la constitution psychologique de l'homme dépend de trois *guna* ou forces psychiques appelées *sattva*, *rajas*, et *tamas* :

- *sattva* : essence, pureté, clarté, existence ;
- *rajas* : mouvement, activité, passion, désir ;
- *tamas* : inertie, paresse, obscurité, indolence.

La prédominance d'un de ces trois *guna* par rapport aux autres détermine chez un individu son type de santé mentale et spirituelle. Une perturbation de l'équilibre entre ces *guna* entraîne un trouble mental et indirectement corporel[8].

I.1.3. La maladie

Pour faire le diagnostic de la pathologie, le tradipraticien examine dans sa globalité le malade, c'est-à-dire physiquement et psychiquement. Il étudie les symptômes de la maladie et détermine lequel des trois *dosha* (*vâta*, *pitta* ou *kapha*) provoque le trouble[1]. Par exemple, la perte d'appétit, les nausées ou les indigestions traduisent une diminution de l'activité du vent, les vertiges indiquent un ralentissement des fonctions du phlegme et un excès d'activité du vent et de la bile.

Sushruta distingue trois groupes de maladies : les maladies endogènes (maladies héréditaires, congénitales et celles liées aux *dosha*), les maladies exogènes (traumatismes) et les maladies saisonnières[3]. Les maladies mentales et l'épilepsie appartiennent aux maladies endogènes.

Les médecins définissent l'épilepsie (*apasmara*) comme une perte de mémoire avec entrée de l'inconscience dans les ténèbres et comme un dérangement de l'intellect et du mental. Les forces psychiques ou *guna* (*sattva*, *rajas* et *tamas*) sont perturbées. L'épilepsie est due également à un dysfonctionnement des *dosha* (*vâta*, *pitta* et *kapha*)[9]. Les symptômes sont

des palpitations, un sentiment de vide dans le cœur, une respiration excessive, un évanouissement et une insomnie[10].

Les maladies mentales (*unmâda*) sont dues à un déséquilibre de *rajas* et *tamas*. Le *rajas* est à l'origine des désirs et des passions et lorsqu'il domine, le sujet est coléreux. Le *tamas* est synonyme d'ignorance et d'inertie et entraîne la crainte et la tristesse lorsqu'il prédomine chez un individu[3].

Les anciens traités médicaux sanskrits insistent sur l'hygiène de vie et la diététique pour éviter les maladies. Par exemple, Sushruta rappelle l'importance du bain pour faire disparaître la fatigue, purifier le corps et combattre la soif et les démangeaisons. L'alimentation doit être adaptée en fonction des saisons et de chaque individu, le riz restant l'aliment de base[3].

I.1.4. La thérapeutique

I.1.4.1. Gérontoprophylaxie

La médecine ayurvédique a deux principaux objectifs. Elle souhaite d'une part, maintenir le corps en bonne santé en luttant contre le vieillissement et d'autre part, traiter les maladies. Elle accorde une grande importance à la gérontologie. Le vieillissement est un processus lent et continu qui commence à la conception et se termine à la mort. La médecine ayurvédique caractérise le vieillissement (*jara*) par trois symptômes généraux : l'alopecie, la toux et l'essoufflement[11].

Ainsi, *rasayana tantra*, l'une des huit disciplines décrites par *Brahmâ*, étudie la prévention du vieillissement. Il y est décrit une cure de rajeunissement ou de « réjuvenation » (anglicisme) appelée *Rasayana chikitsa*[11]. Cette dernière utilise des mesures diététiques et thérapeutiques pour arrêter ou retarder le vieillissement et « rajeunir » l'ensemble de la dynamique fonctionnelle de l'organisme[12]. Selon la légende hindoue, cette cure peut se faire de deux manières : soit en milieu fermé appelé « hutte », soit en milieu ouvert, « à l'air et au soleil »[13]. D'après Charaka, « on acquiert la longue vie en se livrant à une dépuraison correcte qui nettoie les impuretés, qui chasse les maladies et qui restaure la vitalité », ce qui signifie que les traitements rajeunissants rénovent l'organisme et ses *rasa*[4].

Le mot *rasayana* signifie littéralement le « chemin que prend *rasa* » (*rasa* : chyle et *ayana* : chemin). Dans l'Ayurvêda, la qualité du *dhatu* a une influence sur la santé des autres *dhatu* et donc sur les tissus de l'organisme[12].

Les médecins ayurvédiques utilisent deux types de médicaments pour lutter contre le vieillissement :

- les *rasayana* qui sont des préparations toniques et stimulantes décrites dans le *rasayana tantra*
- les *vâjîkarana* qui sont des préparations aphrodisiaques décrites dans le *vâjîkarana tantra* (médecine des aphrodisiaques)[3].

Les *vâjîkarana* sont utilisées pour renforcer la force, l'immunité et la virilité, elles sont principalement composées de sésame, fèves, patate douce, jus de canne à sucre, poivre long, myrobolans, lait et testicules de bouc, de buffle ou d'âne.

Les *rasayana* sont des élixirs de longue vie et de jeunesse employés comme fortifiants. Il existe deux périodes principales de la vie au cours desquelles une cure de *rasayana* est recommandée : 16-30 ans (*poorva vayas*) et 30-70 ans (*madhya vayas*). *Poorva vayas* correspond à la période de développement individuel où le médicament *rasayana* peut aider à une croissance rapide des organes et des tissus. *Madhya vayas* est la période où le processus du vieillissement se met clairement en place[11]. Plusieurs formules de traitements fortifiants ont été confectionnées dont le *brâhma rasâyana* (2 formules distinctes existent sous cette appellation), l'*amalaka rasâyana*, le *cyavanaprâsa*... Une des formules de *brâhma rasâyana* contient une association de cinq racines de plantes, des fruits des myrobolans *âmalakî* (*Emblia officinalis*) et *harîtakî* (*Terminalia chebula*), de la poudre de plantes aux propriétés fortifiantes, du sucre de canne, de l'huile de sésame, du beurre clarifié et enfin du miel[9].

Indra créa une formule revitalisante, appelée *indroktam rasayana*, avec des plantes de l'Himalaya[9] : *aindri* (*Bacopa monnieri* (Linn.) Pennell), *brahmi* (*Centella asiatica* (Linn.) Urban.), *payasyâ* (*Gynandropis pentaphylla* DC.), *ksîrapuspî* (*Andropogon aciculatus* Npr.), *srâvanî* (*Sphaeranthus* sp), *mahasrâvanî* (*Sphaeranthus indicus*), *satâvarî* (*Asparagus racemosus* Willd.), *vidârî* (*Pueraria tuberosa* DC.), *jîvantî* (*Leptadenia reticulata* W), *punarnavâ* (*Boerhaavia diffusa* Linn.), *nâgabalâ* (*Grewia hirsuta* Vahl.), *sthirâ* (*Desmodium gangeticum* DC.), *vacâ* (*Acorus calamus* Linn.), *chatrâ* (*Andropogon schoenanthus* Linn.),

aticchatrâ (Anethum sowa), medâ (Polygonatum verticillatum All.), mahâmedâ (Polygonatum verticillatum All.ssp.). Selon Indra, ce remède pris chaque jour pendant six mois permet à l'espérance de vie d'atteindre son maximum, à la jeunesse de revenir, de protéger de toute maladie et de retrouver mémoire, intelligence, force et beaucoup d'autres bienfaits.

« Na kevalam dîrgham ihâyur asnute
rasâyanam yo vidhivan nisevate/gatim sa
devarsi-nisevitâm subhâm prapadvate
brahma tatheti câksayam » (Caraka,
Cikitspâ I,1,80).

« Celui qui fait une cure de rajeunissement selon la règle, celui-là obtient pas seulement une longue vie dans ce monde, mais encore il accède à la voie heureuse fréquentée par les sages divins et au brahman impérissable » d'après Charaka[13] (*Brahman* est l'Esprit Universel, l'Absolu).

I.1.4.2. Thérapie du panchakarma

La thérapie du panchakarma (*pañcakarma*-thérapie) est utilisée pour rétablir l'équilibre des trois *dosha*. Elle prépare l'organisme à éliminer le *dosha* perturbé en utilisant cinq procédés : la vomification, la purgation, les lavements, les errhines (prise de médicaments par le nez) et les saignées[3]. C'est un prétraitement indispensable pour purifier l'organisme et le préparer à la thérapie *rasayana*[12]. Elle est valable aussi bien pour les pathologies physiques que psychiques. L'efficacité de cette thérapie est optimale si elle est faite préférentiellement en juillet et en août.

I.1.4.3. Les médicaments

La Pharmacopée ayurvédique se compose de médicaments à base de plantes et de substances d'origine animale et minérale. Nous nous intéresserons seulement aux plantes.

Chaque drogue est constituée d'un *mahâbhûta* prédominant qui va caractériser ses propriétés pharmacologiques. Sushruta tient compte de ce *mahâbhûta* pour distinguer cinq classes de médicaments : les terreux (terre), les aqueux (eau), les aériens (air), les ignés (feu) et les étherés (éther)[4].

Pour déterminer ce *mahâbhûta*, l'*Âyurveda* a défini trois principaux éléments: *rasa* (saveur), *vipâka* (saveur post-digestive) et *virya* (puissance).

➔ Théorie des *rasa*

L'*Ayurveda* distingue six *rasa* constituant chacun une saveur (sucré, acide, salé, amer, piquant et astringent) : c'est la théorie des saveurs. Un *rasa* possède deux *bhûta* prédominants et agit sur les trois *dosha*[5].

Tableau 5 : action de chaque *rasa* sur les *dosha*[5].

Rasa	Mahâbhûta	Vâta	Pitta	Kapha
<i>madhura</i> : sucré	terre + eau	↓	↓	↑
<i>amla</i> : acide	terre + feu	↓	↑	↑
<i>lavana</i> : salé	eau + feu	↓	↑	↑

<i>tikta</i> : amer	air + espace	↓	↑	↓
<i>katu</i> : piquant	air + feu	↑	↑	↓
<i>kasaya</i> : astringent	air + terre	↑	↓	↓

↓ apaise l'activité du *dosha* ; ↑ aggrave l'activité du *dosha*

➔ *Vipâka*

Vipâka est le goût des substances métabolisées après la digestion. Charaka définit trois types de *vipâka* (*madhura*, *amla* et *katu*, différents des trois *rasa* qui portent le même nom) tandis que Sushruta en distingue deux (*guru*: lourd et *laghu*: léger). La différence entre *rasa* et *vipâka* est la suivante : *rasa* donne une sensation de goût immédiate tandis que *vipâka* est un état de transformation métabolique avec une réponse retardée[5].

➔ *Vîrya*

Vîrya est la force avec laquelle la drogue agit. On compte deux principales catégories de *vîrya* : *ushna* (chaud) correspondant au feu et *shita* (froid) à l'eau. Les plantes « froides » assurent une sensation de rafraîchissement et sont celles dont la saveur est douce, amère ou astringente (par exemple, la réglisse, le melon d'eau et le bambou). Les plantes « chaudes » entraînent une sensation d'échauffement par leur saveur piquante, acide ou salée (par exemple, le gingembre, l'oignon et le safran)[5].

Un médicament donné possède ainsi un type de *rasa*, de *vîrya* et de *vipâka*[4].

Les médicaments se présentent sous différentes formes : poudres, jus, pâtes, décoctions, infusions, émulsions...L'administration de ces remèdes se fait par différentes voies en fonction de la galénique : voie orale, nasale, rectale, cutanée ou oculaire[3].

I.1.5.3. Les phytomédicaments ayurvédiques

Avant le début de l'ère chrétienne, les hindous cherchaient déjà à connaître les effets des plantes sur l'organisme en fonction des théories de l'Ayurvêda. Ils ont découverts aux plantes une action efficace sur les principes vitaux. Ils définissent par exemple des plantes « anti-

bilieuses » lorsqu'elles traitent l'activité excessive de la bile, c'est le cas du *Ficus bengalensis*[3]. Au cours des siècles, la médecine ayurvédique a utilisé plus de 3000 plantes[7].

La médecine ayurvédique classe les plantes médicinales en fonction de leur activité pharmacologique et distingue plusieurs types de *rasayana* (préparations toniques ou stimulantes) en fonction de l'organe ou du tissu concerné[6] : *medhya rasayana* pour le cerveau, *hridya rasayana* pour le cœur, *twacya rasayana* pour la peau... Le terme *medhya* vient du mot *medhâ* qui signifie intelligence. Les plantes de la classe *medhya rasayana* ont plusieurs actions : prévenir le vieillissement, accroître la longévité et l'immunité, améliorer les fonctions mentales et ajouter vigueur et vitalité à l'organisme[14]. Ces drogues sont donc actives sur la mémoire et la cognition en stimulant le système nerveux central. Pour Sharma (1987), six plantes *medhya rasayana* se distinguent particulièrement dans la Pharmacopée indienne : *Bacopa monnieri*, *Centella asiatica* (centelle asiatique), *Celastrus paniculatus*, *Convolvulus pluricaulis*, *Benincasa hispida* (courge cireuse) et *Lavandula stoechas* (lavande stéchale)[15].



Figure 6 : représentation d'un tradipraticien utilisant des plantes médicinales (dentalveda.com).

Tableau 6 : les plantes *medhya rasayana*[11].

Espèce	Nom vernaculaire	Famille

<i>Bacopa monnieri</i>	brahmi	<i>Plantaginaceae</i>
<i>Centella asiatica</i>	brahmi	<i>Apiaceae</i>
<i>Withania somnifera</i>	ashwagandha	<i>Solanaceae</i>
<i>Evolvulus alsinoides</i>		<i>Convolvulaceae</i>
<i>Nardostachys jatamansi</i>	nard	<i>Valerianaceae</i>
<i>Valeriana wallichii</i>	valériane des Indes	<i>Valerianaceae</i>
<i>Embelia ribes</i>	vidanga	<i>Myrsinaceae</i>
<i>Prunus dulcis</i>	amandier	<i>Rosaceae</i>
<i>Acorus calamus</i>	acore odorant	<i>Acoracea</i>
<i>Phyllanthus emblica</i>	amla	<i>Phyllanthaceae</i>
<i>Terminalia chebula</i>	haritaki	<i>Combretaceae</i>
<i>Emblica officinalis</i>	amla	<i>Phyllanthaceae</i>
<i>Tinospora cordifolia</i>	guduchi	<i>Menispermaceae</i>
<i>Celastrus paniculata</i>		<i>Celastraceae</i>
<i>Oroxylum indicum</i>		<i>Bignoniaceae</i>
<i>Mucuna pruriens</i>	pois mascate	<i>Fabaceae</i>
<i>Elettaria cardamomum</i>	cardamome	<i>Zingiberaceae</i>
<i>Terminalia arjuna</i>		<i>Combretaceae</i>
<i>Foeniculum vulgare</i>	fenouil commun	<i>Apiaceae</i>
<i>Ipomoea digitata</i>		<i>Convolvulaceae</i>
<i>Orchis mascula</i>	orchis mâle	<i>Orchidaceae</i>
<i>Zingiber officinale</i>	gingembre	<i>Zingiberaceae</i>
<i>Terminalia belerica</i>		<i>Combretaceae</i>
<i>Myristica fragrans</i>	muscadier	<i>Myristicaceae</i>
<i>Eugenia caryophyllata</i>	giroflie	<i>Myrtaceae</i>

I.1.5.4. Nomenclature ayurvédique du bacopa

Le *Bacopa monnieri*, également nommé *Brahmi*, appartient à la classe des *medhya rasayana*. Dans l'Ayurvêda, le bacopa est amer (*rasa*), piquant (*vipâka*) et chauffant (*vîrya*) et il apaise les *doshaphlegme* (*kapha*) et vent (*vâta*) [16].

Tableau 7 : description des propriétés ayurvédiques du *Bacopa monnieri* [16].

Nom latin	Nom sanskrit	Famille	Propriétés traditionnelles
<i>Bacopa monnieri</i>	<i>Brahmi</i>	<i>Plantaginacées</i> (anciennement <i>Scrophulariacées</i>)	<i>Dosha</i> : apaise <i>kapha</i> , <i>vâta</i> <i>Rasa</i> : <i>tikta</i> (amer) <i>Vipâka</i> : <i>katu</i> (piquant) <i>Vîrya</i> : <i>ushna</i> (chauffant)

I.2. Usages traditionnels du *Bacopa monnieri*

Brahmi est une plante couramment utilisée par les praticiens de la médecine ayurvédique. Elle est fréquemment mentionnée dans le *Charaka-Samhitâ* [1]. Le *Bacopa monnieri* est utilisé depuis plus de 3000 ans [17].

I.2.1. Propriétés traditionnelles

Les traités sanskrits de l'*Âyurveda* décrivent le bacopa comme un fortifiant cérébral qui augmente la mémoire et la concentration. Charaka utilisait la poudre de plante séchée dans les pertes de mémoire, la décrépitude sénile et comme préventif d'avortement [18]. Sushruta, quant à lui, indiquait le bacopa en cas de fièvres, d'hémoptysie, de hoquet, de toux, de dyspnée, de maladies urinaires, de calculs, de maladies de peau et extérieurement pour laver l'ulcère. Il prescrivait le jus frais de bacopa avec du lait comme un régime quotidien pour promouvoir l'intellect et empêcher le vieillissement [18].

Le bacopa agirait contre diverses pathologies du système nerveux central : l'épilepsie, l'hystérie, la folie et les convulsions [19]. Une infusion de la plante a été utilisée dans le folklore indien comme un « tonique pour les nerfs »[20]. Pour rappel, le bacopa est une plante stimulante de la mémoire qui appartient à la classe des *medhya rasayana*. Ces derniers sont utilisés à plusieurs décades de la vie selon leurs propriétés biologiques. Le bacopa est principalement utilisé comme fortifiant à deux périodes de la vie : 31-40 ans et 81-90 ans. Les décades 31-40 et 81-90 correspondent respectivement à une diminution de l'intelligence et à une diminution du pouvoir cognitif[6].

Il était également utilisé pour favoriser la digestion, améliorer la respiration et tonifier le cœur [21]. Aussi, il guérirait la lèpre, l'anémie et les troubles rénaux [22]. Le jus des feuilles était donné aux enfants pour le soulagement de la bronchite et de la diarrhée. Le jus frais de bacopa était appliqué sur les articulations enflammées pour atténuer la douleur [23] ou encore une pâte de bacopa était indiquée pour soulager les rhumatismes [24]. Le bacopa était utilisé contre les brûlures et les morsures de serpents. Dans certaines régions d'Inde, *Brahmi* est réputé pour ses propriétés aphrodisiaques [17].

Au Sri Lanka, il était prescrit contre les fièvres et aux Philippines, il était utilisé comme diurétique [17].

A l'île Maurice, le bacopa est également bien connu, les anciens faisaient une décoction dans du beurre pour fabriquer un liniment (topique) avec lequel les tempes étaient badigeonnées en cas de délire. De plus, broyé dans de l'eau de riz avec du poivre, de l'acore (*Acorus calamus*) et un myrobolan (espèce végétale non précisée), le bacopa rendait la voix sonore [25]. Les Mauriciens préparaient une tisane très amère avec la plante entière de bacopa et du sel, et l'utilisaient comme antipaludique et fébrifuge [26].

I.2.2. Préparations traditionnelles

Toute la plante de bacopa pouvait être utilisée, essentiellement les feuilles et les tiges. Ces dernières étaient soit séchées puis réduites en poudre, soit broyées pour en extraire le jus. Ces matières premières furent la base de préparations utilisées par voie orale, sous forme de sirops,

décoctions, poudres, boissons rafraîchissantes ou purées à tartiner. Le bacopa a un goût très amer, c'est pourquoi les préparations sont toujours très sucrées[27].



Figure 7 : plante séchée de *Bacopa monnieri* (indiawebmall.com).

En Inde, il existait plusieurs formulations de plantes comprenant des *medhya rasayana* dont le bacopa comme, le *brahmighritham*, le *bramhi ghritha*, le *brahmi rasayan*, l'*unmadnashak ghritha*[15] et le *PiramiNey*[18]. Ces préparations appartiennent à une classe de formulations ayurvédiques dite *panchagavya*, elles sont préparées à partir des cinq (*pancha*) éléments obtenus à partir de la vache (*gavya*) : le lait, le lait caillé, le beurre clarifié, l'urine et les excréments[28]. *Ghritha* est une sous-classe de *panchagavya* et regroupe des formulations utilisant du beurre clarifié de vache ou *ghee* (ou encore *ghî* en sanskrit). Le *ghee* est un type de beurre, il est obtenu par chauffage pour séparer les graisses, la caséine et le petit lait. Les graisses sont récupérées et forment le *ghee*. Il est utilisé avec parcimonie en cuisine pour aromatiser les aliments et comme substitut du beurre de table. Il sert également d'excipient pour véhiculer le principe actif dans de nombreuses préparations à base de plantes[8]. Le *ghee* est décrit dans la médecine ayurvédique comme un agent anticonvulsivant, anti-inflammatoire et améliorant la mémoire[29].

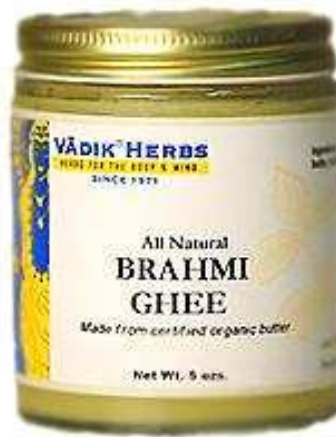


Figure 8: visuel d'une préparation *Brahmi* à base de *ghee*(ayurvediccenter.com).

➔ *Brahmighritham*

o *Composition*

- *Bacopa monnieri* (5 kg de feuilles et de tiges) ;
- *Cyperus rotundus* ou souchet d'Asie (100 g de poudre de tubercules séchés) ;
- *Saussurea lappa* ou saussurée (50 g de poudre de tubercules séchés).

Les feuilles et les tiges de *Bacopa* sont broyées au mortier et au pilon en pierre pour obtenir un jus[10]. Le jus obtenu est incorporé aux poudres de tubercules séchées et le mélange apparaît noir et se divise en deux phases : une phase aqueuse et une phase huileuse. Le mélange est chauffé pour que la teneur en eau soit réduite et l'huile devient verte en laissant un résidu goudronneux noir de consistance cireuse. La couche supérieure, verte et huileuse, correspond au *Brahmighritham* et est transférée dans des conteneurs pour sa conservation, tandis que les résidus de cire sont éliminés.

o *Utilisation*

Cette formulation de plante était utilisée contre l'épilepsie.

o *Expérimentation*

Des études animales réalisées en 1991 sur des rats ont montré une efficacité du *Brahmighritham* vis-à-vis des crises épileptiques induites expérimentalement [10]. Trois groupes de rats ont été utilisés : un groupe a reçu la formulation de plantes, un autre une benzodiazépine (diazépam) et le dernier un placebo. Après trois mois de traitement, la préparation à base de bacopa a permis de diminuer la fréquence des crises épileptiques avec un résultat comparable à celui de la benzodiazépine.

➔ *Bramhi ghrita*

o *Composition*

- *Bacopa monnieri* (8 g de feuilles et de tiges) ;
- *Acorus calamus* ou acore odorant (4 g de racines) ;
- *Evolvulus alsinoides* (4 g de parties aériennes) ;
- *Saussurea lappa* ou saussurée (4 g de racines).

o *Utilisation*

Cette préparation était traditionnellement utilisée pour stimuler la mémoire et pour ses propriétés anticonvulsivantes [29].

o *Expérimentation*

L'action au niveau du système nerveux central de *Bramhi ghrita* a été évaluée en 2003 sur des rats et des souris [29, 30]. L'administration de cette formulation de plantes a amélioré les fonctions cognitives, a entraîné des effets dépresseurs centraux et a montré une action anticonvulsivante chez les rongeurs.

➔ *Brahmi rasayan* et *Brahmi rasayana*

o *Composition*

- *Bacopa monnieri* (feuilles) ;
- *Syzygium aromaticum* ou giroflier (bourgeons de fleur) ;
- *Piper longum* ou poivrier long (tiges) ;
- *Elettaria cardamomum* ou cardamome (semences)[31].

o *Utilisation*

Cette formule était décrite dans l'Ayurvêda comme une cure de rajeunissement[32]. Une autre formulation, proche de *Brahmi rasayan* et appelée *Brahmi rasayana*, comprenant en plus deux autres plantes, *Cinnamomum zeylanicum* ou cannelier de Ceylan (écorce) et *Piper nigrum* ou poivrier noir (fruits), était utilisée pour améliorer les fonctions cognitives[2].

o *Expérimentation*

La préparation *Brahmi rasayan* a été étudiée sur des rats et des souris pour évaluer son action sur le système nerveux central (SNC). Une action anticonvulsivante a été mise en évidence[31].

En 2006, des expérimentations sur des souris avec *Brahmi rasayana* ont été faites et ont montré des effets facilitateurs sur l'apprentissage et la mémoire[2]. Selon les auteurs, cette formulation de plantes pourrait avoir un intérêt dans les pathologies neurodégénératives.

➔ *Unmadnashak ghrita*

o *Compositon*

- *Bacopa monnieri* (6 g de parties aériennes) ;
- *Ferula narthex* ou fêrulle (6 g de résine) ;
- *Gardenia gummiifera* ou gardénia (6 g de feuilles) ;
- *Elettaria cardamomum* ou cardamome (6 g de semences).

o *Utilisation*

Traditionnellement, cette formulation était recommandée pour traiter l'épilepsie, la manie et d'autres troubles du SNC.

o *Expérimentation*

Des expérimentations sur des souris réalisées en 2003 ont montré des effets dépresseurs centraux, une activité analgésique et une action anticonvulsivante[28].

➔ *Pirami Ney*

o *Composition*

- *Bacopa monnieri* (jus frais) ;
- *Acorus calamus* (acore odorant);
- *Alpinia speciosa*.

o *Utilisation*

Cette préparation était prescrite lors de convulsions, de débilités nerveuses, de délires et de pertes de mémoire [18]. Aucune expérimentation n'a été réalisée à ce jour.

I.2.3. Préparations d'inspiration traditionnelle

La médecine ayurvédique est encore beaucoup utilisée aujourd'hui et ne cesse de se développer dans le monde entier. De nombreuses formulations de plantes s'inspirant des concepts ayurvédiques ont vu le jour.

Une étude pharmaco-épidémiologique conduite en 2005 auprès de 351 pharmaciens (dont 284 pharmaciens d'officine et 67 d'herboristerie traditionnelle) de la région de Gujarat (Inde) a révélé que les médicaments à base de plantes censées améliorer la mémoire et la vitalité sont

très populaires parmi la population indienne[33]. Les plantes communément utilisées étaient : *Bacopa monnieri*, *Centella asiatica*, *Withania somnifera*, *Evolvulus alsinoides*, *Asparagus racemosus*, *Glycyrrhiza glabra* et *Acorus calamus*. Les pharmaciens devaient analyser à quelle tranche d'âge et à quelle catégorie sociale s'adressaient les phytomédicaments. Les résultats sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8 : profil des consommateurs de plantes stimulant la mémoire et la vitalité [33].

Paramètres	Rural	Urbain	Total
répartition parmi les différentes catégories d'âge (%)			
11-20 ans	19,41	14,83	17,12
21-40 ans	16,5	18,58	17,54
41-60 ans	11,08	12	11,54
61 ans et plus	4,5	4,75	4,625
répartition parmi les différents groupes professionnels (%)			
Ecole/collège	14,83	19,75	17,29
Femmes au foyer	5,08	5,16	5,12
Personnes actives	13,5	17,08	15,29
Personnes âgées, en retraite	6,58	8,16	7,37

A la lecture de ces résultats, on constate que les étudiants et les adultes actifs sont les personnes qui ont le plus utilisé des phytomédicaments stimulant la mémoire et la vitalité. Ces 2 groupes d'individus sont ceux qui ont peut-être le plus besoin, pour leurs activités quotidiennes, que leur mémoire soit efficace, performante et si possible améliorée.

De plus, cette étude a révélé que les 6 plantes les plus utilisées, seules ou en association au sein de formulations à base de plusieurs plantes, sont : *Bacopa monnieri*, *Evolvulus alsinoides*, *Withania somnifera* (ashwagandha), *Nardostachys jatamansi* (nard), *Acorus calamus* (acore odorant) et *Emblica officinalis* (amla)[33]. Enfin, l'étude a montré que les populations indiennes ont recours aux traitements par les plantes pour des raisons économiques. En effet, selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 70 % de la population indienne utilisent la médecine traditionnelle pour des convictions culturelles mais aussi pour son accessibilité financière par rapport à la médecine occidentale. L'OMS a mis en place en 2002 une stratégie

pour soutenir l'utilisation de la médecine traditionnelle et pour assurer la sécurité des patients lors de la prise de médicaments traditionnels (innocuité et qualité)[34].

L'enthousiasme des populations pour la médecine ayurvédique n'a pas échappé à l'industrie pharmaceutique qui a mis sur le marché de nombreuses formulations de plantes s'inspirant des concepts ayurvédiques, dont voici quelques exemples :

➔ Bacopamine[®](SciTech Healthcare Pvt. Ltd.)

○ *Composition*

- *Bacopa monnieri* ;
- *Cuminum cyminum*(cumin) ;
- *Curcuma longa*(curcuma) ;
- *Camellia sinensis*(théier) ;
- *Mentha piperita*(menthe poivrée) ;
- *Piper nigrum*(poivrier noir).

○ *Revendication commerciale*

Cette formulation de plantes permettrait de lutter contre les troubles de la mémoire[35].

○ *Expérimentation*

Une étude animale réalisée sur des rats et des souris traités avec de la Bacopamine[®] a montré un effet facilitateur de cette préparation, *versus* placebo, sur l'apprentissage et la mémoire [35]. Cette formulation de plantes apparaîtrait comme un agent puissant dans l'amélioration des fonctions cognitives.

➔ Mentat[®]

o *Composition*

C'est une préparation de 25 plantes ayurvédiques appartenant aux *medhya rasayana* dont des feuilles de *Bacopa monnieri*[36].

o *Revendication commerciale*

Le Mentat[®] est préconisé pour améliorer les capacités d'apprentissage, la mémoire, la concentration et l'attention. Il est indiqué aussi bien chez les enfants, les adultes que chez les personnes âgées. Il permettrait de lutter contre les déficits cognitifs bénins liés au vieillissement.

o *Expérimentation*

In vitro, le Mentat[®] a manifesté des propriétés antioxydantes (neutralisation du monoxyde d'azote radicalaire) [37].

Chez les rongeurs, cette formulation semble posséder des propriétés anti-amnésiante (amnésie induite expérimentalement par les électrochocs [38, 39, 40] ou par la benzodiazépine diazépam [41]), anxiolytique et antidépressive [42, 43] et nootrope (facilitation des processus d'apprentissage et de mémorisation avec une efficacité comparable au piracétam) [44, 45].

Dans deux modèles animaux (rats) validés de maladie d'Alzheimer, le Mentat[®] a permis de s'opposer aux altérations de la transmission cholinergique centrale par une préservation des taux d'acétylcholine, de l'activité de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine (acétylcholine transférase) et du nombre de récepteurs cholinergiques muscariniques. Et, alors que les rats non traités ont manifesté des déficits cognitifs (épreuve comportementale évaluant la réponse conditionnée d'évitement), les rats ayant pris du Mentat[®] n'ont montré aucun trouble [36].

Enfin, dans le cadre d'un essai clinique *versus* placebo, il a été observé une amélioration des troubles comportementaux chez des enfants ayant un retard mental [46].

➔ Protandim[®] (LifeVantage Corporation)

o Composition

C'est une combinaison de 5 plantes très utilisées dans la tradition indienne. Une gélule de protandim[®] (675 mg) contient :

- 150 mg de *Bacopa monnieri* (45 % de bacosides, principales molécules actives du bacopa) ;
- 225 mg de *Silybum marianum* ou Chardon-Marie (70-80 % de silymarine) ;
- 150 mg de *Withania somnifera* ou ashwagandha (1,5 % de withanolides) ;
- 75 mg de *Camellia sinensis* ou théier (98 % de polyphénols et 45 % d'épigallocatechine-3-gallate) ;
- 75 mg *Curcuma longa* ou curcuma (95 % de curcumine)[47].

o Revendication commerciale

Le Protandim[®] est un complément alimentaire riche en antioxydantset qui permettrait de lutter contre le vieillissement. Selon le laboratoire, il serait le seul complément alimentaire capable de réduire de près de 40 % le niveau de stress oxydant en déclenchant un processus enzymatique permettant d'éliminer plus d'un million de radicaux libres par seconde. Le laboratoire américain LifeVantage Corporation est « très fier » de son produit. Il avait même lancé une campagne de publicité sur la chaîne de télévision américaine ABC aux heures de grande écoute (*prime time*) pour promouvoir les bienfaits du Protandim[®] (vidéo disponible sur youtube.com).

Chaque plante aurait été choisie selon des critères bien définis afin d'obtenir des effets synergiques avec des doses individuelles suffisamment basses pour éviter d'avoir des effets indésirables[48, 49].



Figure 9: visuel du Protandim® (lifevantage.com).

o *Expérimentation*

Un essai clinique réalisé sur des sujets jeunes et âgés a montré qu'après 30 jours de traitement avec le Protandim® le taux d'un marqueur biologique du stress oxydant (taux de peroxydation lipidique) avait diminué de 40 % et qu'après 120 jours, l'activité des enzymes antioxydantes avait augmenté (augmentation de 30 % pour la superoxyde dismutase et de 54 % pour la catalase) [48]. L'amélioration du statut antioxydant global [48, 49, 50] apportée par ce complément alimentaire constituerait, selon les auteurs des études, une approche originale dans la prévention des cancers [47, 51].

II. Etude botanique

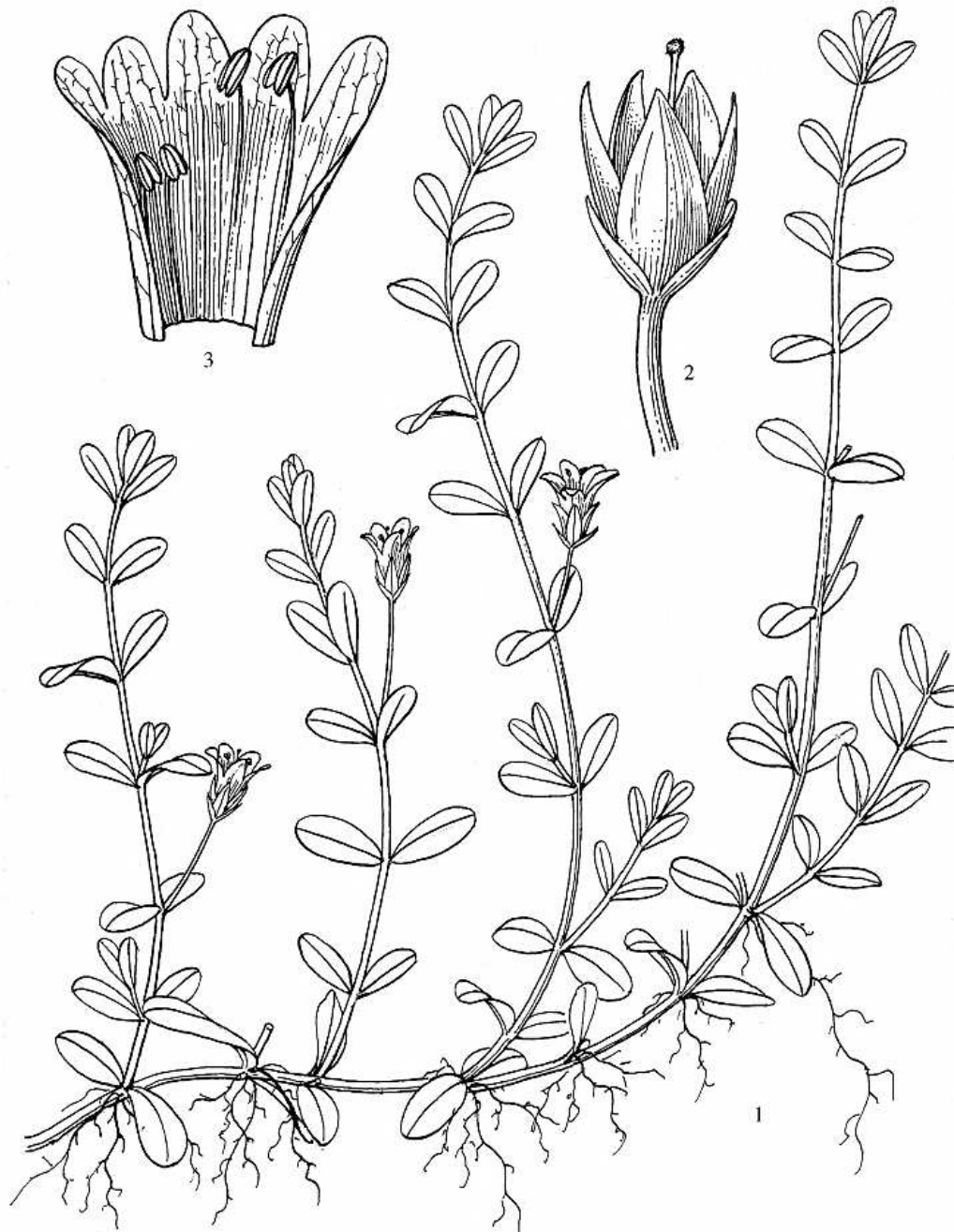


Figure 10: planche botanique de *Bacopa monnieri* : la plante entière (1), la fleur (2) et les étamines didynames soudées à la corolle(3) (eFlora.org).

Pour une meilleure compréhension, tous les termes spécifiques de la botanique sont expliqués dans le glossaire (cf. page319).

II.1. Classifications

II.1.1.Taxinomie

La classification des espèces végétales est en perpétuel mouvement[52]. Au XVIII^e siècle, Carl Von Linné établit la première classification scientifique des espèces végétales, on parle d'une classification naturelle[53]. Plus tard, des classifications phylogénétiques apparaissent, comme la classification d'Arthur Cronquist en 1981 et les classifications de l'APG (*angiosperm phylogeny group*) : APG I en 1998, APG II en 2003 et APG III en 2009[54].

II.1.1.1. Place selon Linné

Le système de Linné est fondé sur les modifications variées que peuvent présenter les organes sexuels (les étamines et les carpelles). 24 classes de plantes ont été créées. Aujourd'hui, cette classification n'a qu'un intérêt historique[53]. Aussi, Linné a créé une nomenclature binaire, universellement utilisée, pour nommer les espèces. Cette nomenclature est basée sur le nom du genre (commençant par une majuscule) et le nom de l'espèce, écrits en latin et en italique. Ainsi, le bacopa se nomme *Bacopa monnieri*L., avec *Bacopa* le nom du genre, *monnieri* le nom de l'espèce et L. pour Linné, le botaniste qui a décrit la plante.

II.1.1.2. Place selon Cronquist

La classification des Angiospermes (plantes à fleurs) de Cronquist est basée sur des critères morphologiques (comme la classification de Linné), des critères anatomiques et biochimiques. Elle est représentée par deux branches : les *Magnoliopsida* et les *Liliopsida*.

Cronquist divise les *Magnoliopsida* en 6 sous-classes et en 55 ordres et les *Liliopsida* en 5 sous-classes et en 18 ordres[55].

Cronquist classe le genre *Bacopa* dans la famille des *Scrophulariaceae*, dans l'ordre des *Scrophulariales*, dans la sous-classe des *Asteridea*, dans la classe des *Magnoliopsida* et dans l'embranchement des *Magnoliophyta* [56].

II.1.1.3. Place selon l'APG

Les classifications de l'APG sont réalisées par une équipe internationale. Elles sont fondées sur la génétique et utilisent les techniques modernes de la biologie moléculaire. Les botanistes utilisent l'amplification des gènes par PCR (*polymerase chain reaction*) afin de répliquer de nombreuses fois un fragment d'ADN puis d'en étudier l'ordre des bases : adénine, cytosine, guanine et thymine[53]. Pour déterminer la parenté entre 2 plantes, il suffit de comparer une partie des séquences d'un même gène et de convertir en indices de divergence et de convergence les différences constatées (phylogénie)[52].

La classification de l'APG III est la classification utilisée actuellement. Elle évolue en fonction des progrès de la génétique et est continuellement révisée[53]. Le genre *Bacopa* a été classé dans la famille des *Scrophulariaceae* dans l'APG I [57] et dans la famille des *Plantaginaceae* dans l'APG II et III [58, 59].

Le genre *Bacopa* appartient à l'ordre des *Lamiales*, à la sous-classe des *Lamiidae*, à la classe des *Asteridae* et à l'embranchement des Dicotylédones vraies[58].

Tableau 9 : récapitulatif des différentes classifications du *Bacopa monnieri*.

Classification	Cronquist[56]	APG I[57]	APGII[58]	APG III[59]
Division	<i>Magnoliophyta</i>	Dicotylédones vraies	Dicotylédones vraies	Dicotylédones vraies
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Asteridae</i>	<i>Asteridae</i>	<i>Asteridae</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>	<i>Lamiidae</i>	<i>Lamiidae</i>	<i>Lamiidae</i>
Ordre	<i>Scrophulariales</i>	<i>Lamiales</i>	<i>Lamiales</i>	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantaginaceae</i>
Genre	<i>Bacopa</i>	<i>Bacopa</i>	<i>Bacopa</i>	<i>Bacopa</i>

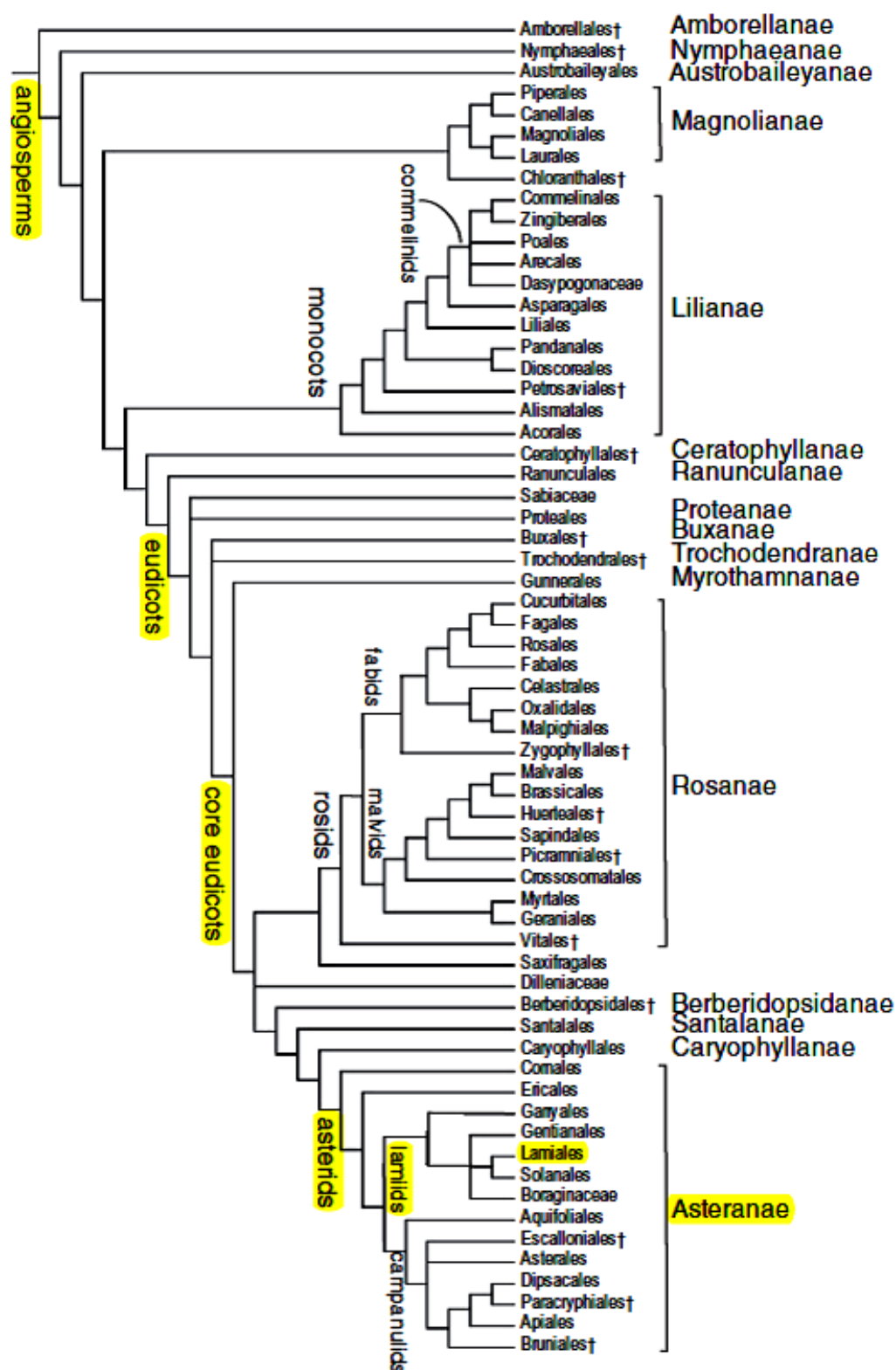


Figure 11: place des *Lamiales* dans la classification de l'APG III [60].

II.1.2. Ordre des *Lamiales*

L'ordre des *Lamiales* rassemble des espèces à fleurs généralement zygomorphes[61]. La zygomorphie permet une meilleure adaptation à la pollinisation par les insectes[52]. Les feuilles sont généralement opposées[55]. L'androcée est didyname[61]. Les substances de réserve sont composées d'oligosaccharides[61]. L'ordre des *Lamiales* comprend 21 familles et environ 17800 espèces. Les familles principales sont les *Plantaginaceae*, les *Oleaceae*, les *Lamiaceae* et les *Scrophulariaceae*[62]. Des modifications ont été faites dans l'ordre des *Lamiales* entre la classification de Cronquist et la classification de l'APG I. Dans la classification de Cronquist, l'ordre des *Lamiales* (avec 4 familles) se distingue de l'ordre des *Scrophulariales* (avec 12 familles) tandis que dans la classification de l'APG I, l'ordre des *Scrophulariales* n'existe plus et seul l'ordre des *Lamiales* existe et intègre une majorité des familles des ex-*Scrophulariales*[55]. Ainsi, le genre *Bacopa* était classé dans l'ordre des *Scrophulariales* selon Cronquist puis dans l'ordre des *Lamiales* selon l'APG[61].

II.1.3. Famille des *Plantaginaceae*

La famille des *Plantaginaceae* regroupe actuellement 106 genres comme *Bacopa*, *Calceolaria*, *Veronica*, *Plantago* et *Mimulus*[62] et 2000 espèces environ[55]. Ce sont des plantes herbacées. Elles sont annuelles ou vivaces et parfois aquatiques[61]. La distribution géographique des *Plantaginaceae* est cosmopolite, on les retrouve dans les régions à climat tempéré ou tropical[55]. Les composés actifs les plus représentés sont les glycosides phénoliques et les saponosides triterpéniques[63].

Les feuilles des plantes appartenant aux *Plantaginaceae* sont alternes ou opposées, simples, entières ou dentées, et penninervées[55]. Elles ne possèdent pas de stipule[61].

L'inflorescence varie en fonction de l'espèce. Les fleurs sont très souvent hermaphrodites et zygomorphes[61]. De l'extérieur vers l'intérieur de la fleur, on peut distinguer :

- le calice, formé de 4 ou 5 sépales soudés ;
- la corolle, constituée de 4 ou 5 pétales soudés et souvent bilabiés ;

- l'androcée, le plus souvent didyname (plus rarement, il possède 2 étamines). Les étamines sont soudées à la corolle par leur filet. Les anthères ont 2 loges bien séparées s'ouvrant par 2 fentes[61];
- le gynécée, constitué de 2 carpelles[55].

Le calice et la corolle constituent le périanthe[55].

Le gynécée est formé d'un ovaire pluri-ovulé, d'un style et d'un stigmate bilobé [55]. L'ovaire des *Plantaginaceae* est supère et la fleur est alors hypogyne[61]. La placentation est axile[62].

La description de l'appareil reproducteur est simplifiée par la formule florale décrivant les pièces florales : les sépales S, les pétales P, les étamines E et les carpelles C :

$$\overline{4 \text{ ou } 5 \text{ S}} + \overline{(2 + 3) \text{ ou } 4 \text{ P}} + \overline{(2 + 2) \text{ ou } 2 \text{ E}} + \overline{2 \text{ C}}$$

Nota bene : les traits supérieurs indiquent la soudure des pièces florales alors que le trait inférieur signifie que les étamines sont soudées à la corolle. L'ovaire supère est représenté par $\overline{C}$ [61].

Le fruit des *Plantaginaceae* est le plus souvent une capsule septicide et parfois une capsule poricide ou loculicide. Les graines sont anguleuses ou ailées[55].

Entre l'APG I et l'APG II, beaucoup de genres appartenant à la famille des *Scrophulariaceae*, ont changé de famille et ont été rangés dans la famille des *Plantaginaceae*[62] ; c'est notamment le cas du genre *Bacopa*. La famille des *Scrophulariaceae* a alors été réduite, elle renferme actuellement 24 genres et 1200 espèces environ[55]. Les familles des *Scrophulariaceae* et des *Plantaginaceae* sont très proches et se distinguent entre elles par le mode de déhiscence des anthères. Les anthères des *Scrophulariaceae* sont biloculaires mais les loges ne s'ouvrent que par une seule fente (contrairement aux *Plantaginaceae* où les loges s'ouvrent par deux fentes)[61]. Les pièces florales des *Scrophulariaceae* sont presque identiques à celle des *Plantaginaceae*, leurs nombres peuvent être différents.

La formule florale des *Scrophulariaceae* est[61] :

$$\overline{3 \text{ ou } 5 \text{ S}} + \overline{2 \text{ ou } 3 \text{ P}} + 5 \text{ ou } (2 + 2) \text{ ou } 2 \text{ E} + \overline{2 \text{ C}}$$

Finaleme nt, sur la seule base des critères morphologiques, l'espèce *Bacopa monnieri* pourrait tout autant appartenir à la famille des *Scrophulariaceae* qu'à celle des *Plantaginaceae*.

II.1.4. Genre *Bacopa*

Le genre *Bacopa* regroupe une centaine d'espèces dont *Bacopa monnieri*, *Bacopa aquatica* [64], *Bacopa sessiliflora*, *Bacopa bacopoides*, *Bacopa flexilis* [65], *Bacopa rotundifolia*, *Bacopa floribunda*, *Bacopa caroliniana* et *Bacopa repens* [66].

Il renferme des plantes aquatiques, certaines restent constamment immergées (sous l'eau) et d'autres ont seulement leurs racines dans l'eau et leur tige atteint la surface de l'eau pour se recourber et croître en rampant à la surface de l'eau [64]. Ce sont des plantes hydrophytes.

Le genre *Bacopa* renferme des plantes herbacées, dressées ou rampantes. Les feuilles sont opposées. Certaines espèces ont 1 ou 2 bractées. Les fleurs sont le plus souvent solitaires et axillaires [61, 64, 66] mais pas seulement, elles peuvent aussi être rassemblées en une inflorescence appelée grappe. Le calice est constitué de 4 ou 5 sépales soudés. La corolle est composée de 5 pétales soudés et peut être bilabiée. L'androcée est le plus souvent didyname (rarement, il possède 5 étamines) et les étamines sont soudées à la corolle. Les anthères ont 2 loges bien séparées. Le fruit est une capsule s'ouvrant par 2 fentes. La capsule provient de l'ovaire supère à 2 carpelles soudés [66].

La formule florale du genre *Bacopa* est la suivante :

$$\overline{4 \text{ ou } 5 \text{ S}} + \overline{5 \text{ ou } (2 + 3) \text{ P}} + 5 \text{ ou } (2 + 2) \text{ E} + \overline{2 \text{ C}}$$

II.2.Description de la plante

Le *Bacopa monnieri* est une plante grasse et herbacée de petite taille (jusqu'à 20 cm)[27]. C'est une plante glabre, charnue, rampante et ramifiée[55].Elle forme un « tapis » sur le sol.



Figure 12: l'espèce *Bacopa monnieri* (helpfulhealthtips.com).

La phylogénie et la génétique du bacopa sont peu connues, il semblerait qu'il soit octoploïde (8 paires de chromosomes)[67].

II.2.1. Habitat

II.2.1.1. Le sol

Le bacopa pousse dans les endroits humides et chauds : dans des zones marécageuses, le long des cours d'eau ou près des étangs [68]. Il croît sur un sol sablonneux ou argileux ayant un pH situé entre 5 et 7,5. On le trouve à une altitude allant jusqu'à 1300m [69].



Figure 13: le *Bacopa monnieri* sur un sol sablonneux (wikimedia.org).

Le *Bacopa monnieri* est de plus en plus utilisé comme plante ornementale en rocaille humide. S'adaptant bien en milieu aquatique, il peut pousser dans l'eau [16]. La plante peut être entièrement ou partiellement recouverte d'eau [27]. Ceci explique le nom qu'on lui prête parfois : hysop d'eau (*Water hyssop*).

Le bacopa est connu et très utilisé en aquariophilie.



Figure 14 : le *Bacopa monnieri* en milieu aquatique (sport-sante.com).

II.2.1.2. Distribution géographique

L'espèce *Bacopa monnieri* est largement distribuée dans les régions tempérées et tropicales du globe. C'est une espèce indigène présente à l'état sauvage sur tous les continents [70, 71, 72] :

- en Asie : Inde, Sri Lanka, Népal, Tibet, Pakistan[70, 71] et dans la chaîne de montagnes de l'Himalaya[9] ;
- en Amérique : principalement au Sud des Etats-Unis, du Texas à la Floride[70];
- en Afrique : Afrique du Sud et Madagascar ;
- en Europe : Guinée française, Guadeloupe et Martinique ;
- en Australie[32].

Elle a été introduite dans les Iles Caïmans (Caraïbes)[25].

II.2.2.Appareil végétatif

II.2.2.1. Tiges

Les tiges de bacopa sont minces (1 à 2 mm de diamètre),tendres et fragiles. Elles sont de couleur verte ou verte violacée. Elles sont succulentes pour survivre lors des sécheresses et sont glabres. Les nœudset les entre-nœuds sont proéminents sur la tige [54, 16]. Enfin, les tiges sont rampantes :elles se propagent dans toutes les directionset s'enracinent dans le sol au niveau des nœuds. La croissance se fait surtout au niveau des tiges et se traduit par l'allongement des entre-nœuds [73].La tige a un goût amer [16].



Figure 15: un « tapis » de *Bacopa monnieri*(helpfulhealthtips.com).



Figure 16: parties aériennes de *Bacopa monnieri* (ayurvedaherbalmedicine.com).

II.2.2.2. Feuilles

Les feuilles de bacopa sont simples et sessiles. La forme générale du limbe est obovale [62]. Elles sont opposéesdécussées [54], ponctuéeset penninervées. Elles mesurent 1 à 2,5 cm de long et 0,4 à 1 cm de large [68], ont un apex arrondi, une marge entière ou rarement dentée et sont de couleur verte avec un goût amer [16].

Le nom vernaculaire anglais dubacopa est *Thyme-leaved Gratiola* ou « gratiole à feuille de thym ». Le genre *Gratiola* appartient à la famille des Plantaginacées [55]. *Gratiola officinalis* est une petite plante herbacée avec des feuilles opposées et lancéolées et des petites fleurs blanches.Elle pousse principalement dans les marais et au bord de l'eau. Les caractéristiques morphologiques et l'habitat de *Gratiola officinalis* ressemblent à ceux du *Bacopa monnieri*. Cependant, la forme du limbe des feuilles permet de distinguer le *Bacopa monnieri* (feuilles obovales) de la *Gratiola officinalis* (feuilles lancéolées). Le thym (*Thymussp.*) appartient à la famille des Lamiacées, il se dinstingue du *Bacopa monnieri* par ses tiges ligneuses et son habitat (zone sèche). Les feuilles du thym ont des caractéristiques morphologiques différentes de celles du *Bacopa monnieri* et seule la petite taille du limbe peut les rapprocher.

Au microscope, les feuilles montrent un épiderme supérieur et inférieur couvert d'une cuticule mince. Les cellules épidermiques des feuilles renferment quelques cristaux d'oxalate de calcium [16].



Figure 17 : feuilles obovales de *Bacopa monnieri* (hallandsbotan.org).

II.2.2.3. Racines

Les racines du bacopa sont minces, raides, petites, ramifiées et de couleur jaune crème [16]. Au niveau des nœuds des tiges, des racines peuvent se former, elles sont dites racines adventives.



Figure 18: représentation de *Bacopa monnieri* (tropica.com)

II.2.2.4. Influence des saisons sur la croissance végétative

En Inde, les mois de janvier à mars correspondent à l'hiver, de mars à juin à l'été et de juin à septembre/octobre à la saison des pluies appelée mousson (la mousson se caractérise par des vents violents et de fortes précipitations).

Pour une croissance optimale, le bacopa préfère des températures situées entre 33 et 40°C avec 60 à 80 % d'humidité [16]. En Inde, il est cultivé en été et pendant la saison des pluies [68]. Selon une étude, il apparaît que la croissance est maximale à la saison des pluies, de juin à septembre où les températures sont élevées et le taux d'humidité maximal [73]. C'est à cette saison que la tige principale et les tiges secondaires doublent leur longueur comparativement aux saisons d'hiver et d'été où la croissance évolue peu. Ainsi, la plante fournit plus de matière végétale à la saison des pluies qu'en été et en hiver (74,6 mg/jde matière sèche à la saison des pluies contre 50,8 mg en hiver et 56,5 mg en été) [73]. De plus, il a été rapporté que le pourcentage de feuilles en poids sec diminue de septembre à janvier, puis augmente petit à petit à partir de janvier (saison hivernale). Enfin, le ratio feuilles/tiges augmente de juillet à novembre (saison des pluies) et diminue en hiver [74], saison pendant laquelle le bacopa entre en dormance[69].

II.2.3. Appareil reproducteur

II.2.3.1. Fleurs

Les fleurs de l'espèce *Bacopa monnieri* sont petites, axillaires, solitaires et de couleur blanche à bleu-violacée [69, 70].



Figure 19: fleur de *Bacopa monnieri* aux pétales violacés (mon-herboristerie.com).

L'appareil reproducteur du *Bacopa monnieri* est caractérisé par :

- un calice à 5 sépales soudés mesurant 0,4-0,9 cm de long ;
- une corolle à 5 pétales soudés ;
- un androcée didyname dont les étamines sont soudées à la corolle ;
- un gynécée à 2 carpelles soudés.

Les pétales sont deux fois plus longs que les sépales, ils mesurent 0,8-1 cm. Ils sont arrondis et échancrés [69].

Le gynécée est formé d'un ovaire pluri-ovulé, d'un style et de stigmates bilobés. L'ovaire est supère donc la fleur est hypogyne. La placentation est axile.

D'après les caractéristiques décrites, la formule florale de l'espèce *Bacopa monnieri* est la suivante :

$$\overline{5 S} + \overline{5 P} + (2 + 2) E + \overline{2 C}$$

La floraison commence en mai et dure jusqu'à septembre/octobre. Elle peut aussi s'effectuer sporadiquement dans l'année.

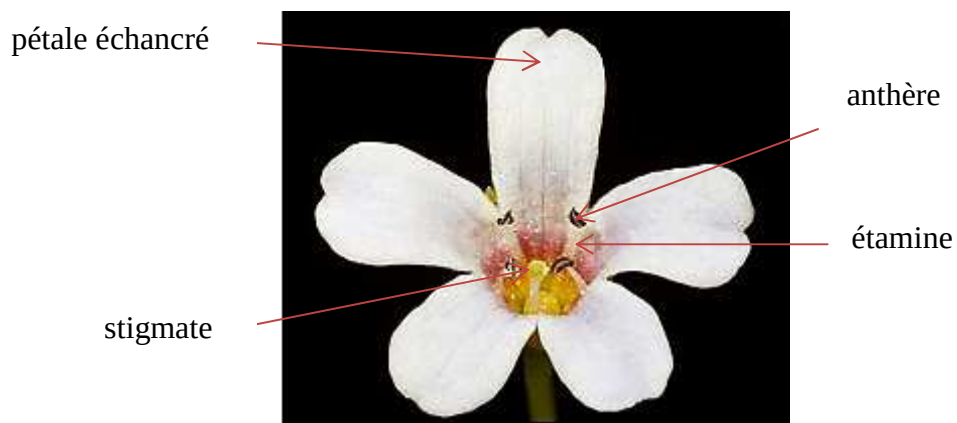


Figure 20 : fleur de *Bacopa monnieri* (florabase.fr).



Figure 21: photographie de *Bacopa monnieri* (helpfulhealthtips.com).

Le nom commun antillais du *Bacopa monnieri* est « petite véronique ». La petite véronique fait référence à la véronique petit-chêne (*Veronica chamaedrys*) de la famille des Plantaginacées [55], une petite plante herbacée rampante qui se distingue du bacopa par ses feuilles velues, ses inflorescences en grappe et ses fleurs d'un bleu vif.

II.2.3.2.Fruits

Les fruits du bacopa sont des capsules de forme ovoïde, glabres, enveloppées dans le calice persistant et mesurant jusqu'à 5mm [16]. Ils se forment l'été [32] et renferment de nombreuses petites graines jaune-brunes tronquées à une extrémité et striées longitudinalement [75]. Les graines sont produites au cours des mois d'octobre et de novembre [69].



Figure 22: capsules de *Bacopa monnieri* (eol.org).



Figure 23: graines de *Bacopa monnieri* (eol.org).

II.2.4. Noms vernaculaires à travers le monde

- Nom botanique : *Bacopa monnieri* L.

Le nom « *monnieri* » est le seul conforme à la grammaire latine (et non « *monniera* ») et fait référence à un certain Le Monnier (1717-1799), botaniste français[76].

- Autres noms latins : *Bacopa monniera*, *Bramia monnieri*, *Herpestis monniera*, *Gratiola monniera*, *Monniera cunefolia*, *Lysimachia monnieri*, *Calytriplex obovata*[24].

- Noms français : Hysope d'eau [77], Bacope [64].
- Noms sanskrits : Brahmi, Bahuphene, Ahiphena, Phenavati [32], Barambhi, Nirabrahmi, Vyasthaa, Surasaa, Somavallari, Suvarchalaa, Kapotavankaa, Somavalka [18], Jala-brahmi, jalanimba [72], Svetakamini, Manduki [10].
- Noms indiens : Neerbrahmi, Bamanavari, Nirubrahmi, Valabrahmi, Ondelaga, Mandukaparni, Bhahmi, Jalnam, Birami, Brahmibuti, Sambarenu, Sambrani [16], Brahmbi, Safed-kammi, Nir-brahmi, Sambranichettu [10], Aindri [9].
- Nom chinois : Pa-chi-tien [10].
- Noms anglais : Water hyssop, Thyme-leaved Gratiola [64], Indian penny-wort [18].
- Noms allemands : Bakope, Fettblatt [77].
- Nom antillais : Petite véronique [26].

II.2.5. Confusion avec *Centella asiatica*

Depuis des siècles, *Bacopa monnieri* est confondu avec *Centella asiatica*, une petite plante herbacée [68]. Ces plantes portent toutes deux le nom de *Brahmien* langage sanskrit, et partagent parfois le nom vernaculaire indien de Mandukaparni [10]. Toutefois, ces deux plantes appartiennent à deux familles distinctes et diffèrent dans leurs caractéristiques anatomiques [78]. *Centella asiatica* (ou *Hydrocotyle asiatica*) appartient à la famille des *Apiaceae* et à l'ordre des *Apiales* selon les classifications de Cronquist et de l'APG [52]. Originale d'Asie, elle est fréquemment utilisée comme plante médicinale dans la médecine ayurvédique. Elle pousse dans des zones tropicales et tempérées de l'hémisphère sud et principalement dans les montagnes [61]. Ses feuilles sont simples et alternes à limbe arrondi crénelé. Ses fleurs sont très petites, blanches et forment des ombelles simples. Elles ont 5 sépales libres, 5 pétales libres, 5 étamines libres et 2 carpelles. L'ovaire est infère et la placentation est axile. Le fruit est un schizocarpe [62].



Figure 24: feuilles de *Centella asiatica* (helpfulhealthtips.com).



Figure 25: inflorescences de *Centella asiatica* (lepidoptera.butterflyhouse.com).



Figure 26: planche botanique de *Centella asiatica*(lepotager-demesreves.fr)

II.2.6. Une espèce en danger

Les besoins annuels en matière sèche de *Bacopa monnieri* sont estimés à 12 700 tonnes [79] et 100 000 tonnes de matière végétale fraîche sont collectées chaque année pour une utilisation commerciale [80]. La demande en médicament de phytothérapie ne cesse de croître dans le monde entier [81]. En Inde, la médecine ayurvédique utilise 3000 plantes médicinales, 95 % d'entre elles sont recueillies à partir de populations sauvages et plus de 70 % de la récolte est destructrice en raison des parties de plante utilisées, comme les racines, les écorces ou encore la plante entière [82]. Comme la demande en matière première est très importante, la ressource naturelle s'épuise progressivement et le *Bacopa monnieri* est par conséquent

considéré comme une espèce menacée, inscrite sur la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) [82]. Les catégories et les critères de l'UICN pour la liste rouge définissent les espèces qui risquent de disparaître à l'échelle mondiale [83]. Le bacopa est dans la catégorie des espèces en danger critique d'extinction, son risque d'extinction étant très élevé à l'état sauvage. Sur la base de son importance médicinale, de sa valeur commerciale et de son potentiel de recherche, le bacopa est une des priorités dugouvernement indien qui ne souhaite pas que cette plante disparaisse en Inde [84, 85]. Les firmes multinationales ont adapté l'offre à une demande en constante progression en procédant à une cueillette intensive sans tenir compte du maintien de la biodiversité. Le développement de la culture *in vitro* du bacopa (cf. page 116) s'est ainsi imposé comme une nécessité pour la survie de l'espèce d'une part, et pour assurer la disponibilité en matière première végétale de qualité d'autre part [81].

III. Composition

III.1. Découverte chronologique des constituants

Le bacopa est constitué de saponosides, principalement responsables de l'activité biologique, d'alcaloïdes et de flavonoïdes [86].

1931 : Bose K.C.& Bose N.K. prétendent avoir isolé un alcaloïde du bacopa, la brahmine, mais aucune étude ultérieure ne confirmera sa présence [87].

1947 : L'herpestine, un alcaloïde, est découverte [88].

1959 : Sastri découvre un saponoside, l'hersaponine, qui ne sera jamais caractérisé par la suite [89].

1963 : Sept constituants, à partir d'un extrait éthanolique de la plante entière de bacopa, sont isolés : les bacosides A et B, l'acide bétulique, le D-mannitol, le stigmastérol, le β -sitostérol et le stigmastanol [90]. La monnierine, un saponoside, est découverte [91].

1964 : L'hydrolyse acide du bacoside A donne un mélange de quatre aglycones(sapogénines triterpéniques), les bacogénines A₁, A₂, A₃ et A₄, ainsi que du glucose et de l'arabinose [92].

1966 : Basu *et al.* font l'hydrolyse acide du bacoside B, ils obtiennent les mêmesbacogénines qu'avec le bacoside A, du glucose et de l'arabinose [93].

1972 : La nicotine, le 3-formyl-4-hydroxy-2H-pyrane, la lutéoline et la lutéoline-7-glucoside sont découverts dans un extrait méthanolique de bacopa [94].

1972-1973 : La structure des bacogéninesA₁ [95] et A₂est caractérisée plus précisément: elles appartiennent au groupe des sapogénines triterpéniques tétracycliques de type dammarane [96] et sont des isomères [97]. La bacogénine A₄ est définie comme le composé majoritaire du mélange d'aglycones et comme une ébeline lactone [98].

1974 : Le bacoside A donne, par dégradation Smith-de-Mayo, une jujubogénine et une autre sapogénine ayant un spectre RMN similaire à celui de la jujubogénine [99, 100]. L'hydrolyse acide de la jujubogénine donne la bacogénine A₄.

1976 : La structure de la bacogénine A₃ est élucidée [101].

1977 : La sapogénine pseudojujubogénine est découverte par dégradation Smith-de-Mayo [102]. Le bacoside A produit, par dégradation Smith-de-Mayo, un mélange de composé possédant tous une sapogénine tétracyclique jujubogénine ou pseudojujubogénine. Sous l'action de l'acide sulfurique, la pseudojujubogénine donne la bacogénine A₁.

Nota bene : les bacogénines ne sont pas les « vraies » génines des saponosides triterpéniques du bacopa, elles sont générées seulement lors de l'hydrolyse acide de ces saponosides. Ce sont donc des artéfacts produits lors de cette hydrolyse. Au début des investigations, les bacogénines ont été identifiées à tort comme les génines des saponosides du bacopa ; mais ce sont bien les génines jujubogénine et pseudojujubogénine qui sont réellement les génines des saponosides du bacopa.

1992-1993 : Deux nouvelles molécules sont isolées du bacopa, le bacoside A₁[103] et le bacoside A₃[104].

1995 : Quatre nouveaux saponosides triterpéniques de type dammarane, les bacopasaponines A, B, C et D, sont isolés et identifiés [105, 106].

1997 : Vohora *et al.* isolent un nouveau triterpène appelé bacosine [107].

1998 : Le bacoside A₂ est découvert [108].

1999 : Des méthodes analytiques ont permis d'isoler 4 constituants : le bacoside A₃, un saponoside déjà identifié mais chez *Zizyphus joazeiro* (jujubier), la bacopasaponine C et une autre substance non identifiée à cette date [109].

2000 : Deux nouvelles molécules d'intérêt biologique sont isolées du bacopa, les bacopasaponines E et F (deux glycosides de jujubogénine bisdesmosidiques) [110].

2001 : Deux glycosides de pseudojujubogénine sont identifiés, les bacopasides I et II [111].

2002 : Cinq nouveaux composés sont isolés à partir de la fraction soluble dans le *n*-butanol d'un extrait méthanolique de bacopa : le bacopaside III, la bacopasaponine G et les

bacopasides A, B et C [112]. Quelques mois plus tard, trois glycosides phényléthanoïques sont identifiés, les monnierasides I, II et III, ainsi qu'un quatrième composé, identique au plantainoside Bretrouvé chez *Plantago* sp. (plantains) [113].

2003 : Les bacopasides III, IV et V sont isolés de la fraction soluble dans le *n*-butanol d'un extrait méthanolique de bacopa [114]. La présence du flavonoïde lutéoline est confirmée [115].

2005 : Deepaket *al.* déterminent la composition du bacoside A en tant qu'un mélange de saponosides triglycosidiques [116] dont les 4 principaux sont : le bacoside A₃, le bacopaside II, la bacopasaponine C et l'isomère au niveau de la jujubogénine de la bacopasaponine C (ce dernier saponoside sera appelé par la suite le bacopaside X). De plus, ils rapportent la présence du flavonoïde apigénine. Cette même année, deux nouvelles molécules sont découvertes : les bacopasides N1 et N2. Aussi, le bacoside B est défini comme un mélange de composés diglycosidiques : les bacopasides IV, V, N1 et N2 [117].

2006 : Les bacopasides VI, VII et VIII sont découverts [118]. Un nouveau composé est caractérisé, le bacostérol-3-O-β-D-glucopyranosyl [119]. Les bacosides A₄, A₅ et A₆ [120] et la bacopasaponine G sont identifiés [121].

2007 : Cinq cucurbitacines sont isolées du bacopa : les bacobitacines A, B, C, D et E [122]. La présence du flavonoïde quercétine est rapportée pour la première fois [123].

2009 : Les bacopasides IX, X et XI sont isolés et identifiés [124, 125].

III.2. Les saponosides

III.2.1. Structure

III.2.1.1. Pré-requis

Les saponosides sont des métabolites secondaires (composés n'ayant pas de fonction apparente et vitale pour l'organisme qui les produit, regroupant notamment les saponosides, les alcaloïdes et les composés phénoliques) qui, par exclusion, n'appartiennent pas aux

métabolites primaires (acides aminés, nucléotides, glucides...) [54]. Ils sont très présents chez les végétaux et appartiennent au grand groupe des terpénoïdes. Ces derniers regroupent des composés appelés terpènes. Plusieurs classes de terpènes existent en fonction du nombre d'unités isopréniques (un isoprène est un motif pentacarboné) constituant leur squelette carboné [63] :

- les monoterpènes avec $n = 2$ (10 C) ;
- les sesquiterpènes avec $n = 3$ (15 C) ;
- les diterpènes avec $n = 4$ (20 C) ;
- les sesterpènes avec $n = 5$ (25 C) ;
- les triterpènes avec $n = 6$ (30 C) ;
- les tétraterpènes avec $n = 8$ (40 C).

Les triterpènes renferment les saponosides, les hétérosides cardiotoniques, les phytostérols et les stéroïdes [63]. Ils possèdent un squelette carboné soit tétracyclique soit pentacyclique. La structure tétracyclique est appelée dammarane et constitue en fait une molécule intermédiaire évoluant en un squelette pentacyclique [63].

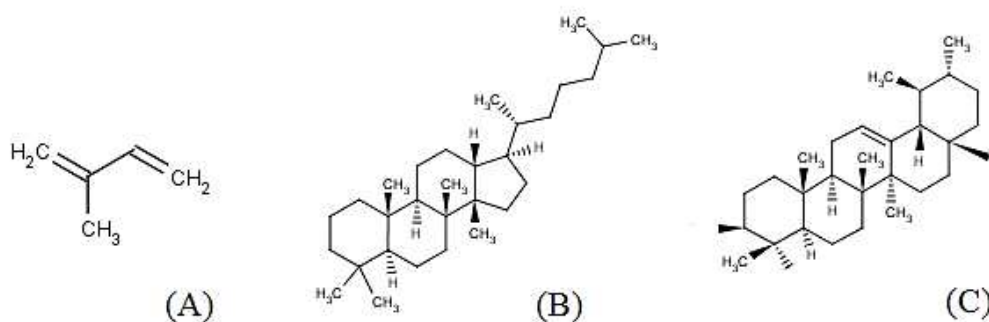


Figure 27: structure d'une unité isoprénique (A), d'un triterpène tétracyclique (B) et d'un triterpène pentacyclique (C) (chemIDplus.fr).

Les saponosides sont des substances hétérosidiques. Un hétéroside résulte de l'établissement d'une liaison osidique entre un ose et une molécule non osidique dite génine (ou aglycone).

En fonction de la génine, les saponosides sont stéroïdiques (la génine possède 27 carbones et 6 cycles) ou triterpéniques (la génine a 30 carbones et 5 cycles).

Les oses principaux des saponosides sont le D-glucose, le D-galactose et le L-arabinose. Ils sont liés à la génine par une liaison éther ou ester et en fonction du nombre de chaînes saccharidiques, la molécule est un monodesmoside (unose unique sur le C-3) ou un bidesmoside (un premier ose en C-3 et un second soit en C-28 pour les sapogénines triterpéniques soit en C-26 pour les sapogénines stéroïdiques) [63].

III.2.1.2. Les saponosides du bacopa

Les saponosides du bacopa possèdent une génine triterpénique de type dammarane, la jujubogénine ou la pseudojujubogénine, ou des dérivés 20-déoxy de ces génines. La bacopasaponine H est constituée de la 20-déoxy-pseudojujubogénine et le bacoside A₆ de la 20-déoxy-jujubogénine [121].

Les saponosides du bacopa diffèrent entre eux à la fois par leur génine et par leur partie sucrée. La jujubogénine et la pseudojujubogénine ont des structures très proches, elles diffèrent seulement par la position de la chaîne carbonée sur le cycle oxydé.

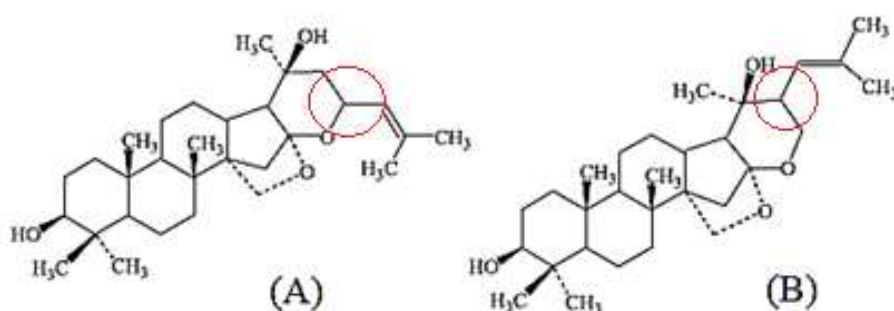


Figure 28: structure de la jujubogénine (A) et de la pseudojujubogénine (B). Le cercle rouge montre la différence de position de la chaîne carbonée sur le cycle oxydé [126].

Les bacosides A et B, découverts dans les années 1960, ont beaucoup intéressés les chercheurs. Les équipes de Chatterji et Basu ont élucidé une structure pour ces deux bacosides qui étaient, selon ces chercheurs, des molécules pures et chirales se distinguant l'une de l'autre par leur pouvoir rotatoire : le bacoside A est décrit comme lévogyre [91] et le bacoside B comme dextrogyre [92]. En fait, cette caractérisation des bacosides A et B s'est avérée fautive et plus tard, ils ont été identifiés comme étant deux mélanges de composés. Le bacoside A est constitué de 4 principaux saponosides triglycosidiques : le bacoside A₃, la bacopasaponine C et les bacopasides II et X [116]. Le bacoside B est, quant à lui, constitué de 4 principaux saponosides diglycosidiques : les bacopasides N1, N2, IV et V [117].

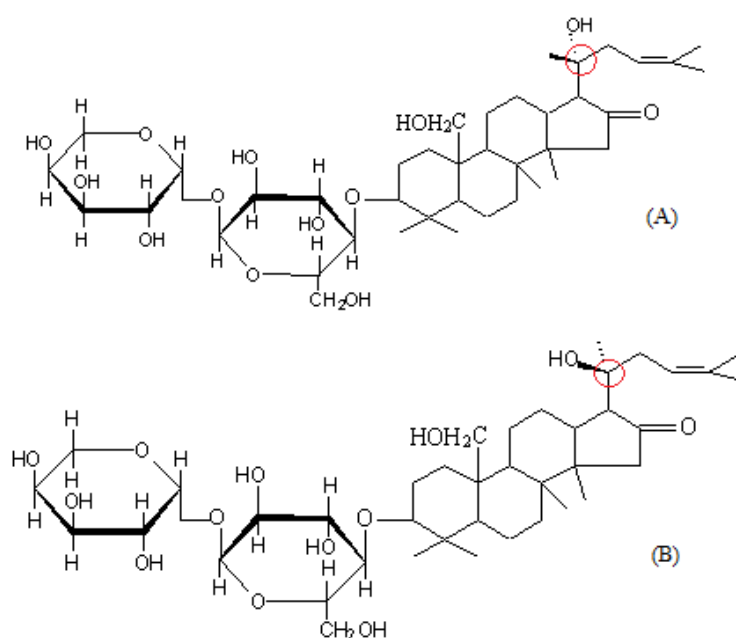
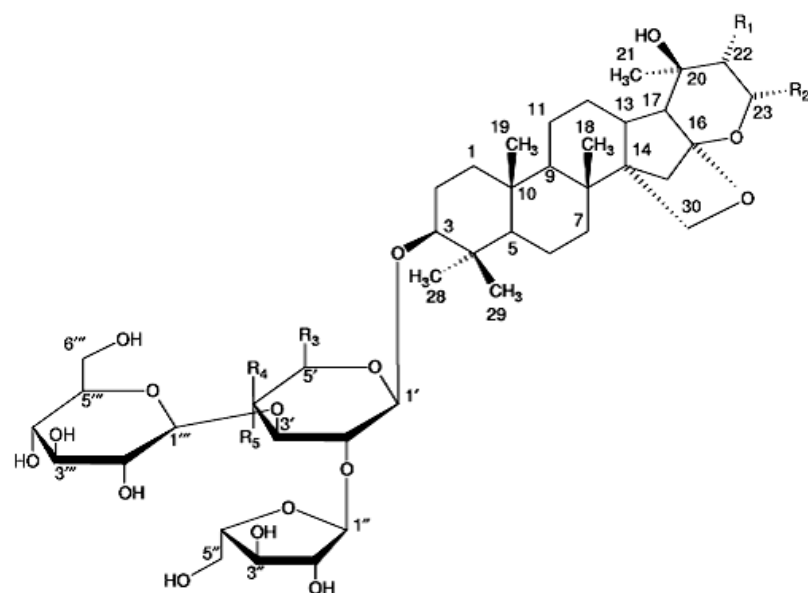


Figure 29: caractérisation erronée du bacoside A (A) et du bacoside B (B) en tant que 2 énantiomères purs. Le cercle rouge indique le carbone asymétrique (bacopin.com).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Aglycones
1	H	CH= C(CH ₃) ₂	CH ₂ OH	H	OH	jujubogenin
2	CH= C(CH ₃) ₂	H	CH ₂ OH	H	OH	pseudojujubogenin
3	H	CH= C(CH ₃) ₂	H	OH	H	jujubogenin
4	CH= C(CH ₃) ₂	H	H	OH	H	pseudojujubogenin

Figure 30: caractérisation définitive du bacoside A en tant qu'un mélange de saponosides : le bacoside A₃ (1), le bacopaside II (2), le bacopaside X (3) et la bacopasaponine C (4) [116].

De nombreuses investigations ont été réalisées dans les années 1990 et 2000 et ont permis l'élucidation structurale de plusieurs saponosides du bacopa : les bacosides A₁, A₂ et A₃, les bacopasaponines A, B, C, D, E, F, G et H et les bacopasides I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, A, B, C, N1 et N2.

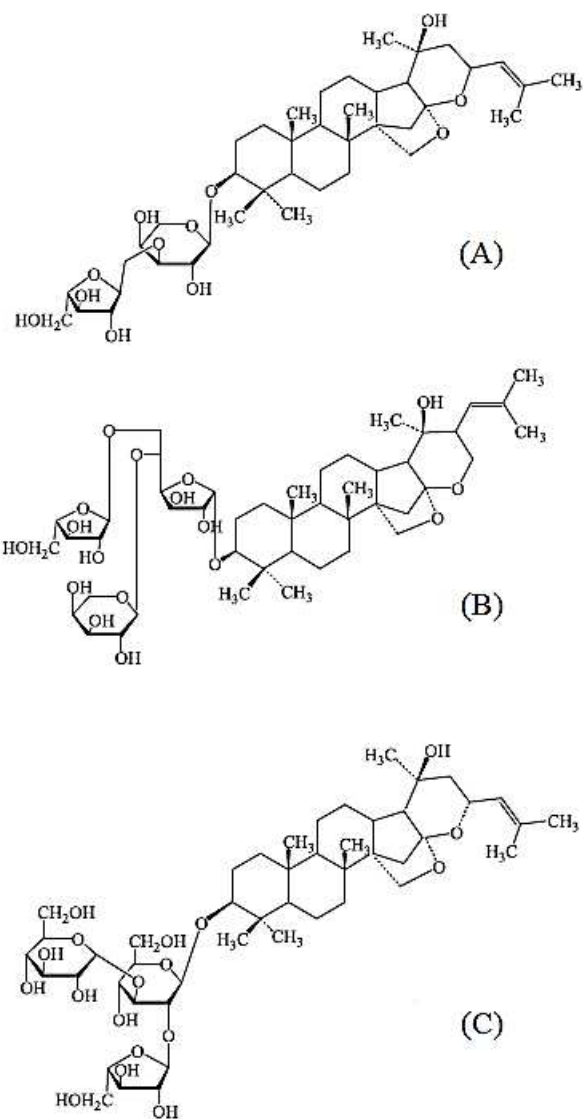


Figure 31: structure des bacosides A₁ (A), A₂ (B) et A₃ (C)[126].

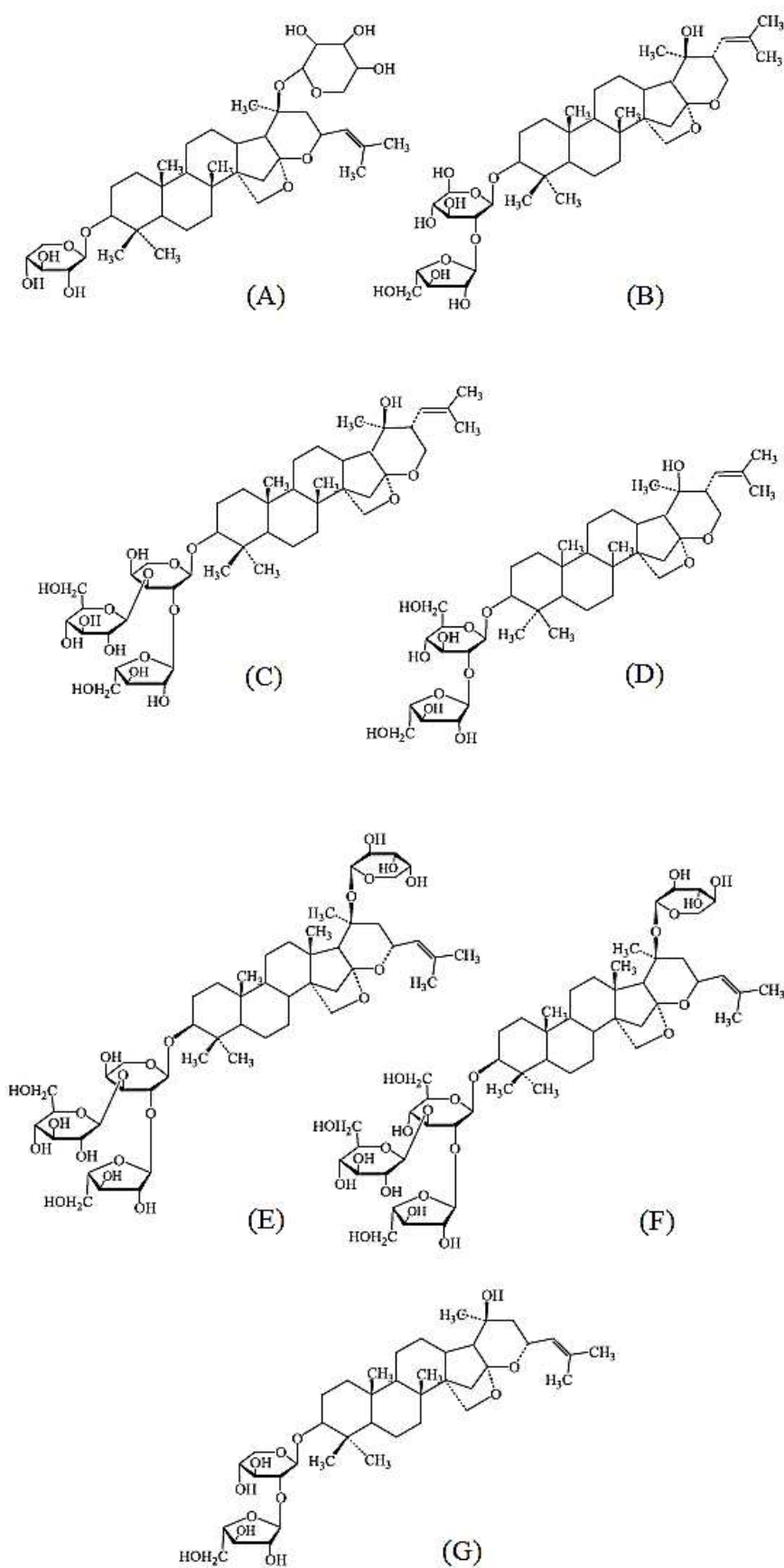


Figure 32: structure des bacopasaponines A (A), B (B), C (C), D (D), E (E), F (F) et G (G) [126].

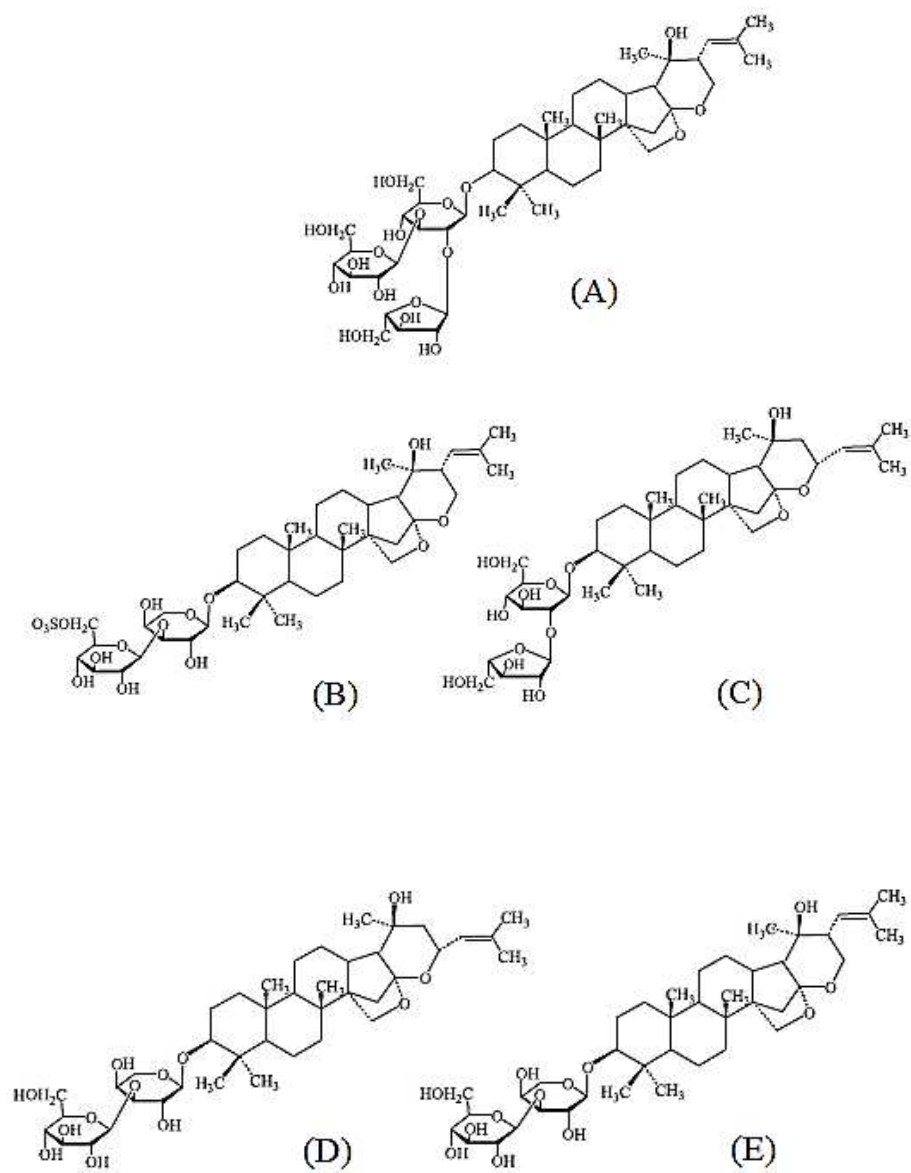


Figure 33: structure des bacopasides II(A), III (B), III (C), IV (D) et V (E) [126].

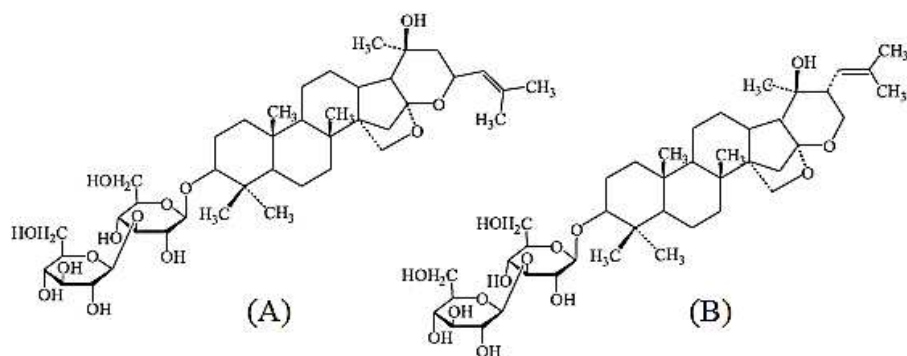


Figure 34: structure des bacopasides N1 (A) et N2 (B) [126].

III.2.2. Réactions de caractérisation

III.2.2.1. Test de mousse ou « froth test »

Les saponosides ont des propriétés tensioactives dues à leur structure amphiphile : ils possèdent à la fois une partie hydrophile (partie osidique) et une partie hydrophobe (aglycone). Ils sont très solubles dans l'eau et forment des solutions moussantes. Le test de mousse est utilisé pour mesurer le pouvoir moussant d'un composé. Ainsi, tout saponoside ajouté dans de l'eau produira une mousse persistante après agitation [127]. Cependant, ce test n'est pas spécifique des saponosides car toute molécule amphiphile est douée de propriétés moussantes [63]. Les saponosides du bacopa, en solution aqueuse, forment donc une mousse persistante après agitation [117].

III.2.2.2. Test de Liebermann-Burchard

Le test de Liebermann-Burchard est une réaction colorée utilisée pour caractériser les génines des saponosides. Il se réalise en milieu acide avec de l'anhydride acétique. Le changement de coloration diffère selon le type de génine : coloration bleu-vert pour les génines stéroïdiques et

rose-rouge pour les génines triterpéniques [63]. Les saponosides du bacopa répondent donc à ce test par une coloration rose-rouge [117, 128].

III.2.2.3. Réaction de Molisch

La réaction de Molisch est une réaction colorée spécifique des oses. Elle permet de confirmer la présence d'ose(s) ou de chaîne(s) osidique(s) dans une substance. En pratique, une solution de naphthol et d'acide sulfurique concentré est ajoutée dans un tube à essai contenant la solution à tester. Si la substance contient un radical osidique, une coloration violette en anneau apparaît à l'interface acide/solution [127]. Cette réaction a été utilisée pour le bacopa et a permis de rapporter la présence de glycosides [117].

III.2.3. Décomposition chimique

III.2.3.1. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide des saponosides rompt les liaisons osidiques, séparant ainsi l'aglycone de la partie osidique, de même que les oses entre eux.

L'hydrolyse acide des bacosides A et B donne 4 aglycones : les bacogénines A₁ à A₄ (sapogénines triterpéniques tétracycliques de type dammarane) qui ne sont pas les « vraies » aglycones. Ce sont des artéfacts résultants d'une altération structurelle produite lors de cette hydrolyse [99, 102].

bacosides A + B → glucose + arabinose + bacogénines A₁ à A₄

Toute hydrolyse acide des saponosides à génine triterpénique du bacopa produit des artéfacts. Par exemple, les réactions d'hydrolyse acide du bacoside III et de la bacosaponine G sont les suivantes [105] :

bacoside III → bacogénine A₁ + D-glucose + L-arabinose

bacopasaponine G $\rightarrow$ bacogénine A₄ + L-arabinose

III.2.3.2. Hydrolyse alcaline ou dégradation Smith-de-Mayo

L'hydrolyse alcaline des saponosides rompt les liaisons osidiques et permet l'isolement de la « vraie » génine. Aucun artéfact n'est alors produit. L'hydrolyse alcaline des bacosides A et B du bacopa a permis l'identification des génines jujubogénine et pseudojujubogénine [100, 102].

bacosides A + B $\rightarrow$ jujubogénine + pseudojujubogénine + sucres

Par exemple, l'hydrolyse en milieu alcalin du bacoside III et de la bacopasaponine G peut se résumer ainsi [112] :

bacoside III $\rightarrow$ pseudojujubogénine + sucres

bacopasaponine G $\rightarrow$ jujubogénine + sucres

III.3. Autres constituants

III.3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments hydrosolubles responsables notamment de la couleur des fleurs. Ils sont issus de la même structure de base, le 2-phénylchromane (2 noyaux aromatiques et 1 noyau central pyranique possédant au moins une fonction hydroxyle) [63]. Selon le degré d'oxydation du noyau pyranique, plusieurs classes de flavonoïdes existent dont les 2-phénylchromones comprenant les flavones, les flavonols, les flavanones et les dihydroflavonols (dérivés 2,3-dihydrogénés).

Le bacopa est constitué de flavones et d'unflavonol. Les flavones sont :

- la lutéoline et 3 dérivés, la lutéolin-7-glucoside [93], l'acide lutéolin-7-O-glucuronique [112] et la lutéolin-7-O- β -D-glucopyranoside [119] ;

- l'apigénine [116] et 1 dérivé, la glucuronyl-7-apigénine [126].

Le flavonol est la quercétine [116].

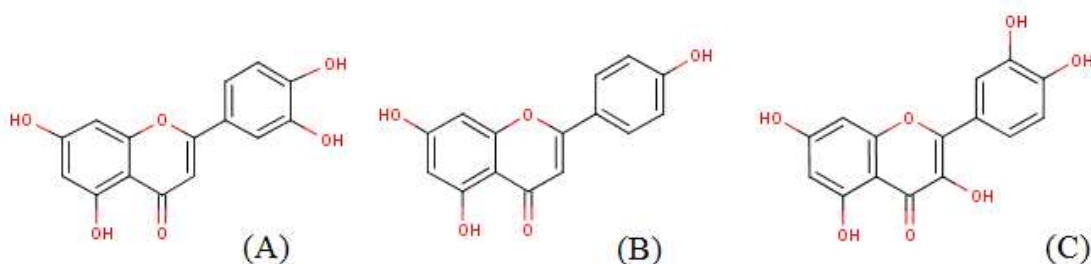


Figure 35: structure de la lutéoline (A), de l'apigénine (B) et de la quercétine (C) (chemidplus.fr).

III.3.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules de structure complexe, azotées et basiques, dont l'atome d'azote (N) est inclus dans un système hétérocyclique. Les principaux alcaloïdes du bacopa retrouvés dans la littérature sont la brahmine et l'herpestine (leur présence n'a jamais été confirmée ensuite). De la nicotine a également été identifiée dans le bacopa [129].

Pour détecter les alcaloïdes, une réaction de précipitation est provoquée avec un réactif comportant des métaux et des métalloïdes. Les principaux réactifs utilisés sont le réactif de Valser-Mayer (tétraiodomercurate de potassium) et le réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium) [63].

III.3.3. Divers autres constituants

Le bacopa contient d'autres composés :

- des phytostérols : bacostérol-3-O- β -D-glucopyranosyl, stigmastérol, β -sitostérol et stigmastanol [126] ;

- des triterpènes tétracycliques : bacobitacines A, B, C, D et E, acide bétulinique et bacosine [130] ;
- des composés phénoliques : monnierasides I, II et III [113], plantainoside B, acide ursolique, acide gallique et acide tannique [131] ;
- des acides aminés : acide glutamique, acide aspartique, lysine, leucine, alanine, glycine et tyrosine [132] ;
- des éléments : fer (Fe), manganèse (Mn), cuivre (Cu), zinc (Zn), calcium (Ca), potassium (K), phosphore (P) et chrome (Cr) ;
- des vitamines : acide ascorbique (vitamine C) et acide nicotinique (vitamine PP) ;
- des protéines, des lipides, des glucides, des fibres et de l'eau (bacopin.com).

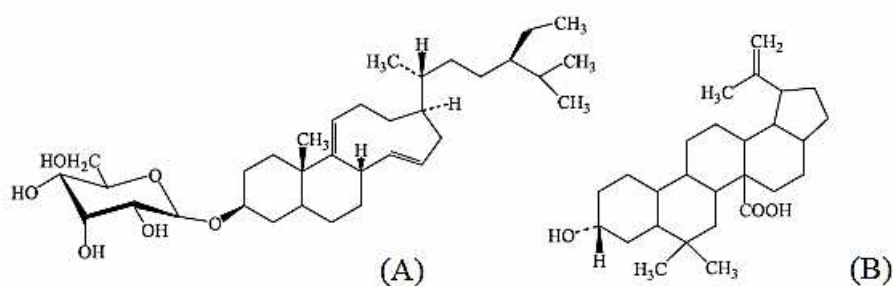


Figure 36: structure du bacostérol-3-O-β-D-glucopyranosyl (A) et de la bacosine (B) [126].

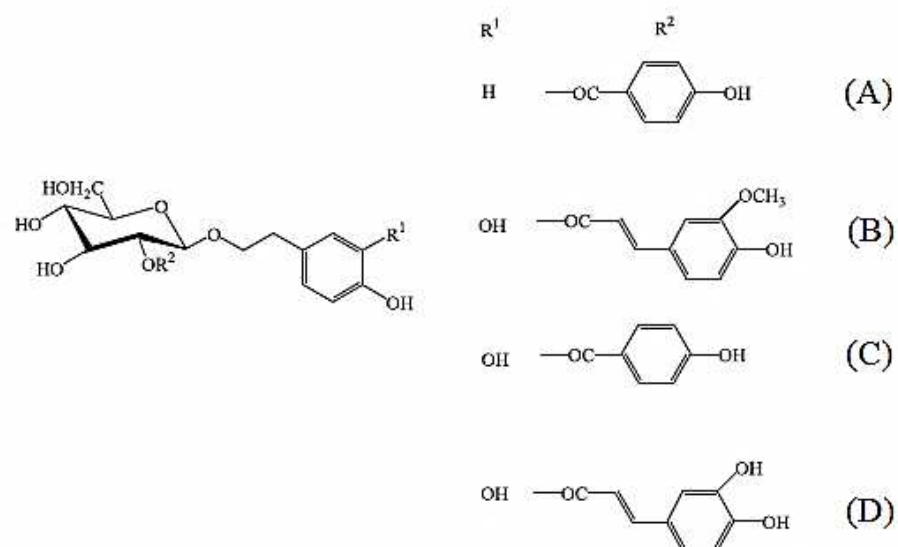


Figure 37: structure des monnierasides I (A), II (B) et III (C) et du plantainoside B (D) [126].

Une analyse de 100 g de feuilles de bacopaa permis d'établir les valeurs nutritionnelles et énergétiques ainsi que la quantité d'eau et de cendres contenue dans ces feuilles.

Tableau 10 : bulletin de contrôle de 100 g de feuilles de bacopa (bacopin.com).

Composés	Feuilles de bacopa (100 g)
Protéines	2,1 g
Lipides	0,6 g
Glucides	5,0 g
Fer	7,8 mg
Phosphore	16 mg
Calcium	202 mg
Acide ascorbique	63 mg
Acide nicotinique	0,3 mg
Fibres brutes	1,05 g
Eau	88,4 g
Cendres	1.9 g
Energie	38 kcal

III.4. Les méthodes analytiques

III.4.1. Les méthodes chromatographiques

III.4.1.1. Pré-requis

➔ Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode chromatographique sépare les molécules pour les analyser et/ou les purifier. Elle utilise une phase stationnaire solide qui joue le rôle d'adsorbant (gel de silice) et une phase mobile liquide qui est l'éluant. La substance à analyser est déposée sur la plaque de CCM puis elle migre en fonction de son affinité avec l'éluant. La différence de migration des substances sur la plaque permet de séparer les substances et de les identifier en fonction du rapport frontal ou R_f (rapport entre la distance parcourue du composé depuis l'origine et celle parcourue par le front de solvant). Le R_f obtenu est comparé à un R_f témoin [133].

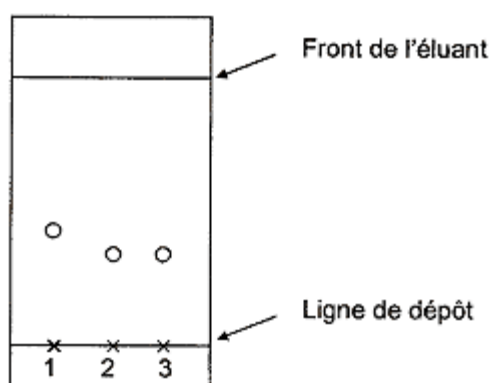


Figure 38: représentation schématique d'un chromatogramme obtenu par CCM (chimix.com).

➔ Chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP)

La CCMHP est fondée sur le même principe que la CCM mais diffère par le matériel utilisé. L'adsorbant utilisé (plaque de silice) est de meilleure qualité et les méthodes de dépôt des échantillons sont plus précises [133]. Le gel de silice est constitué de particules ayant un diamètre de 3 à 5 μm soit environ 4 fois plus petit que celui des particules d'une plaque de CCM classique. La surface de la plaque d'une CCMHP est donc plus lisse, ce qui va générer un pouvoir de séparation plus élevé.

➔ Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La CLHP est une méthode de séparation et de quantification qui se fait à l'aide d'une colonne en verre contenant la phase stationnaire (gel de silice par exemple) dans laquelle s'écoule la phase mobile où l'échantillon à analyser sera introduit. À la sortie de la colonne, un détecteur UV mesure l'absorbance du composé testé [133].

➔ Chromatographie en phase supercritique

Cette méthode chromatographique utilise le dioxyde de carbone à l'état supercritique (soumis à une forte pression et à une forte température) comme phase mobile. Elle permet de séparer des composés de structures proches notamment les énantiomères d'une molécule chirale

[133]. Elle a été utilisée pour analyser le bacoside A₃ et le bacopaside II et a permis, selon les chercheurs, une meilleure séparation des composés qu'avec une CLHP [134].

➔ Chromatographie à contre-courant de gouttelettes

Elle permet la séparation des composés présents dans une colonne en utilisant une phase mobile formée de gouttelettes et une phase stationnaire constituée d'un liquide non miscible avec la phase mobile [135]. En 1977, Kawai & Shibata ont utilisé cette méthode pour isoler deux fractions du bacoside A, l'une contenant des saponosides à jujubogénine et l'autre des saponosides à pseudojujubogénine [102].

Ces techniques chromatographiques ont été utilisées pour la séparation, l'identification et la quantification des composés du bacopa. La suite de l'exposé sera principalement consacrée à la CLHP et à la CCMHP.

III.4.1.2. Analyse chromatographique du bacopa

Une méthode de CLHP en phase inverse a été validée pour analyser individuellement les saponosides d'un extrait méthanolique de bacopa [136]. Les saponosides sont tous constitués d'une génine, jujubogénine ou pseudojujubogénine (2 génines structurellement très proches) et de sucre(s). Ils possèdent un chromophore (partie de la molécule ayant la capacité de changer de couleur en réponse à une excitation lumineuse [133]) de faible intensité nécessitant une longueur d'onde non spécifique (200 nm) lors de la détection par absorption. Selon les auteurs, la séparation et la détection des saponosides du bacopa sont difficiles et requièrent une évaluation minutieuse de tous les paramètres de séparation (phase stationnaire, phase mobile, débit, température, longueur d'onde). Après optimisation de tous ces paramètres, 6 saponosides (cf. figure 39) ont été séparés de l'extrait : le bacoside A, les bacopasides II, IV, V et X et la bacopasaponine C. Un autre composé a été séparé en plus de ces 6 saponosides mais il n'a pas été caractérisé.

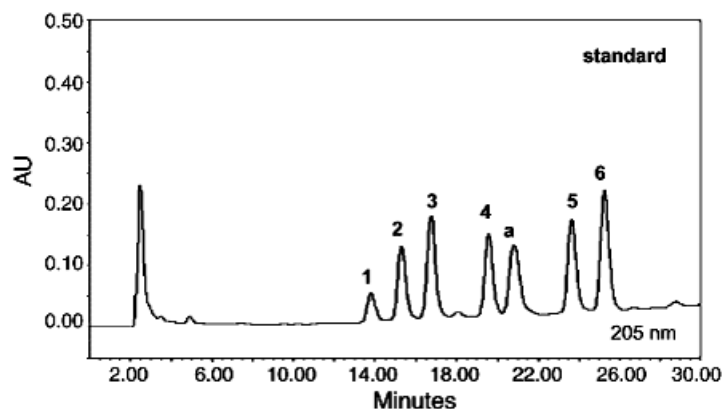


Figure 39 : chromatogramme d'un extrait méthanolique de bacopa obtenu par CLHP indiquant 7 pics : le bacoside A₃ (pic 1), le bacoside II (pic 2), la bacopasaponine C (pic 3), le bacopaside X (pic 4), le bacopaside IV (pic 5), le bacopaside V (pic 6) et le composé a (pic a). Le composé a n'a pas pu être identifié[136].

➔ Le bacoside A

Une équipe de chercheurs a séparé par CCMHP le bacoside A contenu dans un extrait méthanolique de bacopapar comparaison avec un standard de référence [137]. La CCMHP a permis l'identification rapide du bacoside A. Le pourcentage de bacoside A contenu dans l'extrait a ensuite été mesuré par spectrométrie d'absorption UV. **La CCMHP apparaît être une méthode rapide, simple et rentable, utilisable en routine pour le contrôle qualité d'extraits de bacopa.**

En 2005, une méthode de CLHP a été mise au point afin de caractériser et doser les constituants du bacoside A d'un extrait méthanolique de bacopa [116]. Le chromatogramme a permis d'identifier 4 constituants à l'aide des 4 pics obtenus : le bacoside A₃, les bacopasides II et X et la bacopasaponine C. La CLHP a donc permis d'assimiler le bacoside A à un mélange de composés et de les doser individuellement. **La CLHP est donc plus spécifique que la CCMHP.** Dans la présente étude, 4 saponosides ont représenté 89,3 % m/m des saponosides totaux du bacoside A contenu dans l'échantillon :

- 22,1% de bacoside A₃;
- 19,8 % de bacopaside II ;

- 29,4 % de bacopaside X ;
- 18 % de bacopasaponine C.

Un extrait hydro-éthanolique (50 : 50 v/v) préparé à partir de 2 mg de poudre totale de bacopa a été utilisé afin de doser le bacoside A [138]. La technique CLHP utilisée est dite micro-analytique car elle ne nécessite qu'une faible quantité de matériel végétal. Elle a permis la séparation des 4 principaux saponosides du bacoside A (cf. figure 40) ; la concentration en bacoside A de l'échantillon était de 0,12 % m/m. **La CLHP micro-analytique présente un intérêt économique par rapport aux autres CLHP et permet un criblage rapide d'un grand nombre d'échantillons d'espèces végétales.**

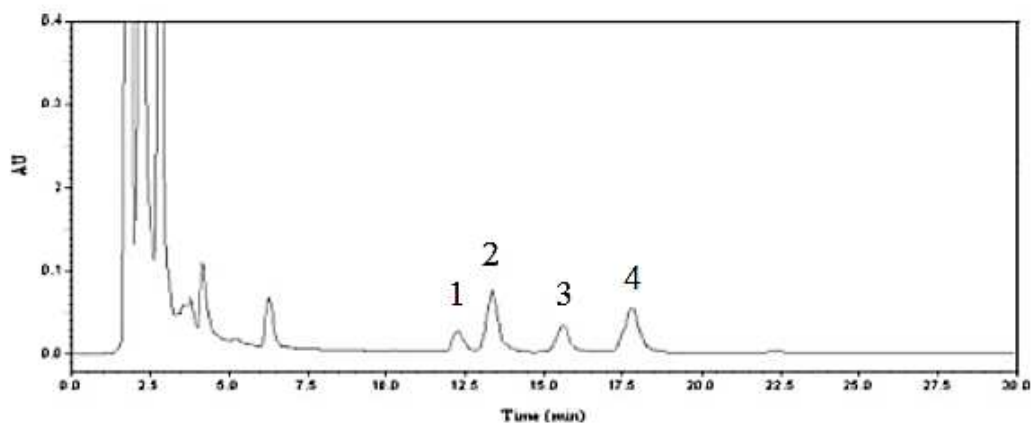


Figure 40: chromatogramme d'un extrait hydro-éthanolique de bacopa obtenu par CLHP micro-analytique indiquant les 4 principaux constituants du bacoside A : le bacoside A3 (pic 1), le bacopaside II (pic 2), le bacopaside X (pic 3) et la bacopasaponine C (pic 4) [138].

➔ Le bacoside B

Sivaramakrishna *et al.* ont utilisé la CLHP pour séparer et caractériser les saponosides du bacopa [117]. Un extrait hydro-méthanolique (30 : 70 v/v) préparé à partir d'une poudre totale de la plante a permis d'isoler 12 saponosides (bacoside A₃, bacopasides I, II, III, IV, V, X, N1 et N2 et les bacopasaponines C, E et F) en utilisant des éluants de polarités différentes. Les auteurs se sont notamment intéressés au bacoside B, un mélange de 4 saponosides diglycosidiques. Ces 4 composés ont représenté 80,92 % des saponosides totaux contenus dans le bacoside B, avec la répartition suivante :

- 3,37 % de bacopaside N1 ;
- 7,85 % de bacopaside N2;
- 41,5 % de bacopaside IV;
- 28,2 % de bacopaside V.

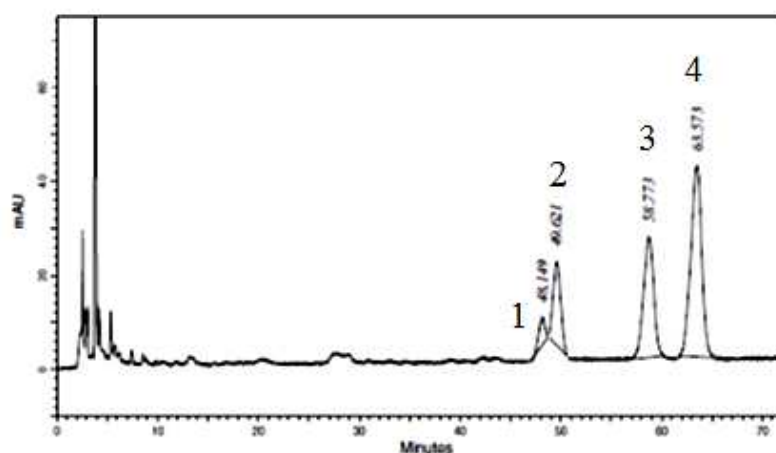


Figure 41: chromatogramme d'un extrait hydro-méthanolique de bacopa obtenu par CLHP indiquant les 4 principaux constituants du bacoside B: le bacopaside N1 (pic 1), le bacopaside N2 (pic 2), le bacopaside IV (pic 3) et le bacopaside V (pic 4) [117].

III.4.2. Les méthodes spectroscopiques

III.4.2.1. Pré-requis

➔ Spectrométrie de masse (SM)

Cette méthode est utilisée pour identifier et surtout élucider la structure des composés. Une source d'ionisation dirigée contre la molécule à analyser (électronique, chimique ou par bombardement d'atomes rapides : FAB-MS) produit des ions positifs ou négatifs qui seront séparés en fonction de leur rapport masse/charge ; un détecteur enregistre le signal électrique. Chaque ion donne un pic dans le spectre de masse [133].

➔ Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectrométrie RMN est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques [133]. Elle est fondée sur l'absorption de radiations électromagnétiques par un noyau excité dans un champ magnétique. Ce noyau possède un nombre quantique de spin nucléaire spécifique. Cette méthode permet, avec des substances parfaitement pures, de déterminer les structures complètes, en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser la RMN du proton ^1H , du carbone ^{13}C et du phosphore ^{31}P . Les saponosides du bacopa, préalablement hydrolysés en milieu acide, sont analysés par la RMN du ^1H et du ^{13}C . La RMN permet notamment l'identification de la génine (nombre d'atomes et stéréochimie).

La RMN deux dimensions (RMN 2D) permet d'analyser des structures plus complexes que celles étudiées par la spectrométrie RMN une dimension en analysant la corrélation (couplage) entre les noyaux homonucléaires (^1H - ^1H) et les noyaux hétéronucléaires (^1H - ^{13}C). Elle a l'avantage d'être réalisée sans hydrolyse acide préalable.

III.4.2.2. Analyse spectroscopique du bacopa

Garai *et al.* ont purifié la fraction *n*-butanolique d'un extrait méthanolique de feuilles de bacopa à l'aide d'une CLHP [105]. Ils ont extrait et caractérisé les bacopasaponines A, B et C en réalisant d'une part, l'hydrolyse acide et d'autre part, les spectrométries de masse et RMN. Le bombardement des atomes par la méthode FAB a ionisé les molécules et a permis de les séparer en fonction de leur rapport masse/charge. Pour la bacopasaponine A, 5 pics ont été obtenus dans le spectre de masse, permettant alors d'identifier la génine comme une

jujubogénine bisdesmosidique avec un arabinose positionné à 2 niveaux de l'aglycone. Les spectres RMN des atomes ^1H et ^{13}C ont permis d'identifier les liaisons entre les différents atomes et donc de déterminer la structure finale : 3-O- α -L-arabinopyranosyl-20-O- α -L-arabinofuranosyl-jujubogénine. Ces techniques spectrométriques ont été utilisées pour caractériser structurellement tous les constituants du bacopa. Cependant, elles sont parfois insuffisantes et nécessitent, en plus, l'analyse des spectres RMN en 2D pour les molécules plus complexes [111, 113, 114, 119, 122]. C'est le cas, par exemple, du bacopaside I qui possède une géninepseudojujubogénine et une unité trisaccharidique (arabinofuranose, glucopyranose et arabinopyranose). Son analyse structurale a été faite à l'aide des spectres de masse et RMN 2D.

Ainsi, les techniques spectrométriques ont permis d'élucider la formule moléculaire (spectrométrie de masse), les modes de liaisons (spectre RMN) et les éléments structuraux plus complexes (RMN 2D) des constituants du bacopa.

III.4.3. Le couplage des techniques analytiques

Les techniques dites couplées sont des méthodes analytiques où deux techniques instrumentales sont associées pour obtenir une procédure analytique plus puissante [133]. Les techniques chromatographiques sont le plus souvent couplées à des techniques spectrométriques afin d'analyser rapidement et efficacement les composants d'intérêt.

Renukappa *et al.* ont utilisé la CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) et à la RMN (CLHP-RMN) ainsi qu'une CLHP guidée par l'activité biologique anti-helminthique contre *Caenorhabditis elegans* (nématode appartenant aux Rhabditidées) pour analyser les saponosides du bacopa [109]. La CLHP-RMN et la CLHP-SM ont permis le criblage direct et rapide d'extraits bruts totaux debacopa et l'identification des métabolites secondaires. L'extrait méthanolique de bacopa possède une activité anti-helminthique. Et, au cours du fractionnement chromatographique, l'évaluation de cette activité a permis de vérifier si une fraction donnée la conservait ou la perdait et donc, d'identifier les composés actifs biologiquement. Sur les 7 fractions de l'extrait obtenues à partir de l'extrait MeOH, une seule a conservé cette activité anti-helminthique. Cette fraction contenait du bacoside A_3 , de la

bacopasaponine C et un autre saponoside non nommé. En conséquence, l'activité anti-helminthique semble être supportée par ces 3 constituants du bacopa.

Le couplage des techniques chromatographiques et spectrométriques permet d'étudier et de caractériser des mélanges complexes de molécules sans altérer l'échantillon durant l'analyse. Il a un intérêt ici pour doser les constituants du bacopa et leur attribuer une structure moléculaire. L'analyse du fractionnement chromatographique guidé par une activité biologique donnée permet d'isoler et d'identifier le(s) composé(s) actif(s).

III.4.4. Nomenclature IUPAC des principaux constituants

La nomenclature IUPAC (Union internationale de chimie pure et appliquée) est le système utilisé pour nommer les composés chimiques de manière universelle.

Tableau 11 : nomenclature IUPAC des principaux composés du bacopa (* le bacoside III a été identifié comme 2 composés différents par 2 équipes de chercheurs) [126].

Glycosides	Nomenclature IUPAC
bacoside A1	3-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-arabinopyranosyl]-jujubogenin
bacoside A2	3 β -O-[α -L-arabinofuranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 5)-O- α -D-glucofuranosyl)oxy]
bacoside A3	3 β -[O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-glucopyranosyl)oxy]-jujubogenin
bacopasaponine A	3-O- α -L-arabinopyranosyl-20-O- α -L-arabinofuranosyl]-jujubogenin
bacopasaponine B	3-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl]-pseudojujubogenin
bacopasaponine C	3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- α -L-arabinopyranosyl]-pseudojujubogenin
bacopasaponine D	3-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosyl]-pseudojujubogenin
bacopasaponine E	3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- α -L-

	arabinopyranosyl]-20-O- α -L-arabinopyranosyl]-jujubogenin
bacopasaponine F	3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- β -D-glucopyranosyl]-20-O- α -L-arabinopyranosyl]-jujubogenin
bacopasaponine G	3-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranosyl]-jujubogenin
bacopaside I	3-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{6-O-sulfonyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)}- α -L-arabinopyranosyl]-pseudojujubogenin
bacopaside II	3-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)}- β -D-glucopyranosyl]-pseudojujubogenin
bacopaside III*	3-O-[6-O-sulfonyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-arabinopyranosyl]-pseudojujubogenin
bacopaside III*	3-O-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ β -D-glucopyranosyl]-jujubogenin
bacopaside IV	3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ α -L-arabinopyranosyl]-jujubogenin
bacopaside V	3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ α -L-arabinopyranosyl]-pseudojujubogenin
bacopaside VI	3-O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-arabinopyranosyl}jujubogenin
bacopaside VII	3-O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-arabinopyranosyl}jujubogenin
bacopaside VIII	3-O-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosyl}-20- α -L-arabinopyranosyl]-jujubogenin
bacopaside X	3-O- α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)}- α -L-arabinopyranosyl]-jujubogenin
bacopaside N1	3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranosyl]-jujubogenin
bacopaside N2	3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranosyl]-pseudojujubogenin
monnieraside I	α -O-[2-O-(4-hydroxybenzoyl)- β -D-glucopyranosyl]-4-hydroxyphenylethanol
monnieraside II	α -O-[2-O-(3-methoxy-4-hydroxycinnamoyl)- β -D-glucopyranosyl]-3,4-dihydroxyphenylethanol
monnieraside III	α -O-[2-O-(4-hydroxybenzoyl)- β -D-glucopyranosyl]-3,4-dihydroxyphenylethanol
bacostérol glycoside	bacostérol-3-O- β -D-glucopyranoside

III.4.5. Les tests immunologiques

III.4.5.1. Test ELISA

Le test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) est un dosage immunoenzymologique utilisant un anticorps marqué par une enzyme. L'enzyme réagit alors avec un substrat incolore (chromogène) pour donner un produit coloré. Plusieurs tests ELISA peuvent être utilisés, nous nous intéresserons seulement au test ELISA par compétition [139].

Deux types d'anticorps existent : les anticorps polyclonaux et monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont des anticorps dirigés spécifiquement contre différents épitopes d'un antigène. Les anticorps monoclonaux sont dirigés spécifiquement contre un épitope donné d'un antigène.

Des réactions croisées se produisent lorsqu'un anticorps se combine à des antigènes différents présentant chacun un même épitope.

Phrompittayarat *et al.* ont utilisé le test ELISA par compétition pour doser le bacopaside I (saponoside à pseudojujubogénine) présent dans un extrait éthanolique de bacopa [140]. Le bacopaside I représente l'antigène à doser et est non immunogène (il ne peut pas engendrer seul une réponse immunitaire). Avant d'être injecté à un lapin, il est conjugué à une protéine (albumine de sérum humain) afin de produire une réponse immunitaire et de permettre alors la production d'anticorps polyclonaux (IgG) dirigés spécifiquement contre le bacopaside I. Lors du test ELISA par compétition, le complexe bacopaside I-albumine est déposé dans des puits et une quantité inconnue d'anticorps polyclonaux ainsi que l'échantillon contenant le bacopaside I sont ajoutés. Plus il y a de bacopaside I dans l'échantillon et moins d'anticorps polyclonaux seront disponibles pour se lier aux puits où le complexe bacopaside I-albumine est adsorbé. Des anticorps secondaires marqués par une enzyme et dirigés spécifiquement contre le fragment Fc des anticorps polyclonaux de lapin (anticorps anti-IgG) sont ajoutés dans le puit et permettent alors le dosage de ces anticorps polyclonaux et donc du bacopaside I. De la même façon, le dosage du bacopaside I a été réalisé à l'aide cette fois-ci d'anticorps monoclonaux anti-bacopaside I produits lors de l'immunisation de souris à l'aide du complexe bacopaside I-albumine de sérum humain [141] (cf. figure 42).

Des réactions croisées entre les anticorps polyclonaux ou monoclonaux et d'autres composés que le bacopaside I ont été observées. Ainsi, ces anticorps dirigés spécifiquement contre le

bacopaside I (saponoside à pseudojujubogénine) ont provoqué des réactions croisées avec trois autres saponosides à pseudojujubogénine (les bacopasides II et V et la bacopasaponine C). En revanche, peu de réactions croisées ont été produites avec les saponosides à jujubogénine. Les anticorps polyclonaux et monoclonaux utilisés ne sont donc pas spécifiques du bacopaside I mais de tous les saponosides à pseudojujubogénine. Cette méthode permet donc le dosage des saponosides à pseudojujubogénine totaux contenus dans l'échantillon. Les anticorps monoclonaux n'ont pas montré de spécificité supérieure envers le bacopaside I par rapport aux anticorps polyclonaux. Enfin, en 2011, des anticorps monoclonaux anti-bacopaside A₃ ont été utilisés dans le but de doser le bacopaside A₃ à l'aide d'un test ELISA par compétition [142]. Là encore, du fait de la réactivité croisée des anticorps utilisés, ce sont tous les saponosides à jujubogénine qui ont été dosés. Les anticorps monoclonaux anti-bacopaside A₃ ne sont donc pas spécifiques du bacopaside A₃ mais plutôt de tous les saponosides à jujubogénine.

La production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés spécifiquement contre le bacopaside I ou contre le bacopaside A₃ permet, à l'aide du test ELISA, de doser respectivement les saponosides à pseudojujubogénine totaux et les saponosides à jujubogénine totaux contenus dans un échantillon. Le test ELISA est une méthode rapide, simple et sensible. Il permet de doser un grand nombre d'échantillons et exige peu de matériel végétal et de réactifs. Il semble plus sensible que la CLHP mais il ne permet pas de quantifier individuellement les saponosides.

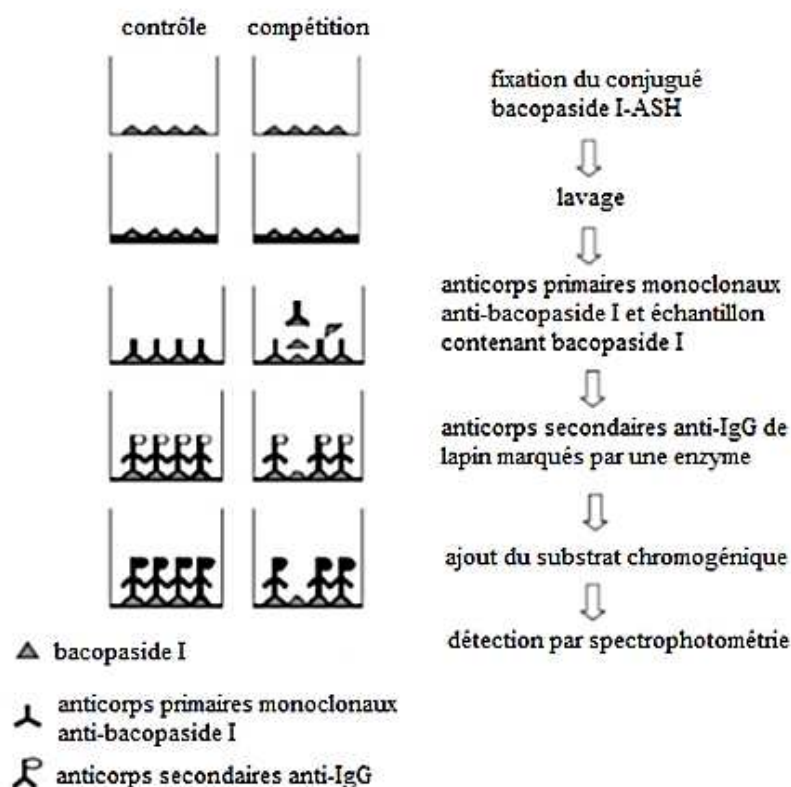


Figure 42: principe du test ELISA par compétition développé pour le dosage du bacopaside I[142].

III.4.5.2. Test immunochromatographique sur bandelette

Un test immunochromatographique sur bandelette utilisant des anticorps monoclonaux anti-bacopaside Ia été développé pour détecter les saponosides à pseudojujubogénine du bacopa[143]. Il se présente sous forme d'une bandelette constituée de 3 zones : une zone de dépôt de l'échantillon, une zone de réaction composée d'un anticorps marqué par une particule d'or colloïdale et une zone d'adsorption composée d'anticorps de capture. Le réactif de détection est constitué d'anticorps monoclonaux anti-bacopaside I et le réactif de capture d'un complexe bacopaside I-ASH immobilisé sur la bandelette. Lorsqu'un échantillon de bacopa est incubé avec les réactifs de détection et de capture, il y a compétition entre les saponosides à pseudojujubogénine et le réactif de capture pour se lier au réactif de détection. Ainsi, les échantillons positifs (contenant des saponosides) ne montrent pas de couleur au niveau de la zone de capture (seule la zone contrôle est colorée) alors que pour les

échantillons négatifs une coloration apparaît à la fois dans les zones de capture et de contrôle. **Tous les échantillons de bacopa testés pendant l'étude ont donné un test positif, confirmant la présence de saponosides à pseudojubogénine. C'est un test de diagnostic rapide, simple et peu coûteux [139].**

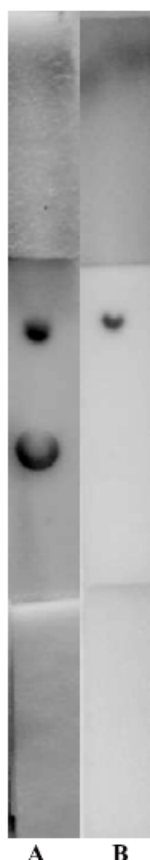


Figure 43 : test immunochromatographique sur bandelette : l'échantillon A ne contient pas de saponosides à pseudojubogénine (négatif) et l'échantillon B contient des saponosides à pseudojubogénine (positif)[143].

III.4.6. Validation des méthodes analytiques

Les méthodes analytiques utilisées pour la caractérisation des constituants du bacopa ont été validées sur la base de plusieurs critères de qualité dont la reproductibilité, la répétabilité, la précision, l'exactitude, les limites de détection et de sensibilité. La valeur d'un résultat d'analyse résulte de la qualité de la méthode analytique mis en œuvre, depuis le prélèvement jusqu'au résultat final [144].

III.5. Etude quantitative du bacoside A et de ses constituants

Le bacoside A est un mélange de saponosides dont les 4 principaux sont le bacoside A₃, les bacopasides II et X et la bacopasaponine C. Ces 4 saponosides sont les constituants majoritaires du bacoside A (89,3-98,9 %) [116, 117] et semblent supporter une partie au moins de l'activité biologique du bacopa.

III.5.1. Facteurs de variation

III.5.1.1. La provenance de la plante

Afin d'évaluer les éventuelles variations de concentration en saponosides liées à l'origine géographique de la plante, 3 plantes de bacopa ont été récoltées dans 3 différentes régions d'Inde. Les poudres totales (1, 2 et 3) des 3 plantes ont été analysées par CLHP [116]. Pour chaque poudre, l'analyse des constituants a été répétée 3 fois et la moyenne des résultats a permis de comparer leur concentration respective en saponosides (cf. tableau 12) :

- La poudre 2 est celle qui contient le plus de bacoside A₃ et de bacopaside II, suivie de la poudre 3 et de la poudre 1. Les 3 poudres ont globalement les mêmes teneurs en bacopaside X et en bacopasaponine C ;
- La poudre 2 présente une quantité totale en saponosides supérieure aux deux autres. La poudre 1 est celle qui en contient le moins.

D'après ces résultats, les 3 plantes de bacopa ont des concentrations totales en saponosides différentes et cela semble être principalement dû aux variations de concentration du bacoside A₃ et du bacopaside II. Les 3 plantes ayant une provenance différente, il peut être conclu que la teneur en saponosides varie selon le lieu de récolte.

Tableau 12 : comparaison des concentrations en 4 saponosides dans 3 plantes entières de bacopa d'origine différente (n = 3) [116].

Composés	Concentration (% m/m)		
	Poudre 1	Poudre 2	Poudre 3
Bacoside A ₃	0,14	0,44	0,29
Bacopaside II	0,18	0,46	0,49
Bacopaside X	0,15	0,14	0,08
Bacopasaponine C	0,05	0,10	0,09
Total	0,52	1,14	0,95

Néanmoins, les facteurs agro-climatiques ne semblent pas totalement expliquer les variations de concentration en saponosides. En effet, l'analyse des poudres totales de 3 plantes d'une même origine a également objectivé des variations de composition en saponosides (cf. tableau 13) [136].

Tableau 13: comparaison des concentrations en 4 saponosides dans 3 plantes de bacopa de même origine (en % m/m) [136].

Composés	Concentration (% m/m)		
	Poudre 1	Poudre 2	Poudre 3
Bacoside A ₃	0,92	0,27	0,10
Bacopaside II	0,54	0,74	0,70
Bacopaside X	0,12	0,70	0,03
Bacopasaponine C	0,16	0,28	0,23
Total	1,74	1,99	1,06

En conclusion, la zone géographique peut influencer le contenu en saponosides mais ce facteur n'explique pas entièrement les variations de composition observées puisque 3 échantillons de bacopa de même origine peuvent avoir des concentrations en saponosides différentes.

III.5.1.2. La période de récolte

Il a été rapporté que des échantillons de feuilles de bacopa provenant de la même région et récoltées respectivement de juin à septembre, de septembre à décembre et de février à mai avaient des concentrations variables en bacoside A. Les résultats obtenus par chromatographie ont indiqué que la saison des pluies, de juin à septembre, est la période durant laquelle la teneur en bacoside A est la plus importante (2,1 %). De septembre à décembre, elle est minimale (1,2 %) et augmente à partir de février jusqu'en mai (1,6 %) [73, 74]. **D'après ces résultats, la teneur en bacoside A varie en fonction de la période de récolte. La récolte du bacopa devrait se faire à la saison des pluies (juin à septembre) afin d'obtenir le meilleur rendement en actifs.**

III.5.1.3. La partie de la plante

Une étude a été menée pour évaluer les potentielles variations de concentration en 4 saponosides en fonction de la partie de la plante étudiée [145]. Les parties aériennes hautes (feuilles + tiges situées à 10 cm de l'apex), les parties aériennes basses (feuilles + tiges) ainsi que les racines ont été étudiées.

D'après les résultats, les parties aériennes hautes ont une concentration totale en saponosides supérieure aux parties aériennes basses et aux racines (cf. tableau 14).

Tableau 14: comparaison des concentrations en 4 saponosides dans les parties aériennes hautes et basses et les racines de bacopa (% m/m) [145].

Composés	Concentrations (% m/m)		
	parties aériennes	parties aériennes	racines
	hautes	basses	
Bacoside A ₃	0,31	0,13	0,10
Bacopaside II	0,64	0,32	0,08
Bacopaside X	0,34	0,10	0,10
Bacopasaponine C	0,23	0,07	0,15
Total	1,52	0,62	0,43

Il semblerait qu'il y ait un gradient de concentration en saponosides dégressif depuis l'apex de la plante jusqu'aux racines. Les parties hautes sont constituées des plus jeunes tissus élaborés par la plante et qui, de part leur disposition, peuvent mieux capter la lumière que les parties basses. Ceci explique probablement pourquoi les tissus proches de l'apex sont plus riches en saponosides.

Une autre analyse, réalisée sur des poudres sèches de feuilles et de tiges a permis de préciser le type de drogue qui renfermait le plus de saponosides au sein des parties aériennes (feuilles et tiges). Il a été montré que les feuilles contenaient plus de saponosides que les tiges [116].

En conclusion, ce sont les feuilles qui possèdent le plus de saponosides, surtout celles proches de l'apex. Ces dernières devraient être privilégiées pour un emploi médicinal.

III.5.3. Standardisation phytochimique

III.5.3.1. Intérêt

Les plantes médicinales possèdent des composés responsables de leur activité biologique. La concentration en composés actifs varie en fonction de la matière première utilisée (lieu et période de récolte de la plante, partie de plante utilisée, variété, techniques de séchage...), du processus de fabrication du produit fini (technique(s) utilisée(s), mode d'extraction, solvant...) et des conditions de conservation et de stockage (type de

conditionnement, conservation à l'abri de la lumière et de l'humidité et à une température inférieure à 25°C...) [146]. Il est donc indispensable de procéder à une standardisation des drogues végétales, c'est-à-dire à une normalisation des procédures à toutes les étapes de fabrication, depuis la matière première jusqu'au produit fini [146], pour s'assurer de leur stabilité et de leur conformité phytochimiques, pour éviter les falsifications et pour garantir leur efficacité thérapeutique et leur sécurité d'emploi [144].

III.5.3.2. Drogues végétales du bacopa

Le dosage des saponosides du bacopa à l'aide de techniques chromatographiques (cf. page 93) [109, 116] permet de vérifier l'authenticité et la pureté des échantillons testés et de réaliser un contrôle qualité sensible et fiable [136, 137, 147]. Le bacoside A est spécifique du *Bacopa monnieri* et est responsable, au moins en partie, de l'activité biologique. Aussi, il constitue le marqueur idéal pour la standardisation des drogues végétales du bacopa [146, 148].

Une analyse chromatographique réalisée sur une préparation commerciale à base de bacopa a révélé que les saponosides étaient en quantités inférieures à celles mentionnées sur l'étiquette et que l'un d'eux était même totalement absent. Selon les auteurs, les constituants auraient subi une dégradation au cours du traitement et du stockage, entraînant alors une diminution de leur concentration, voire une absence totale [134].

L'analyse de 3 préparations commerciales de bacopa (une provient des Etats-Unis, une autre d'Inde et une dernière d'Australie) a indiqué des variations de concentration en saponosides [136, 147]. La préparation originaire d'Australie est celle qui contient le plus de saponosides (environ 23,2 %), tandis que celle venant d'Inde en contient beaucoup moins (environ 3,5 %) que les deux autres (cf. tableau 15).

Tableau 15 : comparaison des concentrations en 4 saponosides dans 3 compléments alimentaires à base de bacopa (en % m/m) [136, 147].

Composés	Concentrations (% m/m)		
	Etats-Unis [130]	Inde [140]	Australie [140]
Bacoside A ₃	4,03	1,83	8,52
Bacopaside II	2,70	0,27	4,29
Bacopaside X	1,65	0,69	5,70
Bacopasaponine C	1,32	0,68	4,68
Total	9,70	3,47	23,19

Cette étude révèle la grande hétérogénéité qui existe au sein des différents compléments alimentaires à base de *Bacopa monnieri* commercialisés et confirme l'intérêt de la titration du bacoside A dans le cadre du contrôle qualité des produits finis.

IV. Culture

IV.1. La sélection massale

La sélection massale est une méthode empirique consistant à choisir les plantes qui semblent les plus intéressantes dans une population et à utiliser leurs graines comme semences pour la culture suivante. Les plantes sont sélectionnées en fonction de plusieurs critères (définis par le sélectionneur) et particulièrement ceux qui sont favorables à la culture, à la récolte et à la production de biomasse et de composés actifs [53]. L'observation des caractères phénotypiques et génotypiques au sein de l'espèce *Bacopa monnieri* a ainsi permis de sélectionner des variétés (sous-ensembles d'une espèce aux caractères morphologiques particuliers) intéressantes en termes de rendement en matière végétale et de production en bacoside A [53].

IV.1.1. Diversité phénotypique

Le phénotype d'un individu est l'ensemble de ses caractères apparents (morphologiques et biochimiques).

L'observation de 29 populations (accessions) de *Bacopa monnieri* de différentes régions d'un Etat indien (Kerala) a permis de noter de nombreuses différences phénotypiques au sein de l'espèce [149]. Ainsi, la longueur de la plante, la longueur, la largeur et la surface des feuilles, le nombre de fleurs et de feuilles, la longueur des entre-nœuds ainsi que le contenu en bacoside A varieraient selon la zone géographique. D'après les résultats de l'étude, la plante idéale de bacopa, permettant une production élevée en bacoside A, devrait posséder un grand nombre de feuilles avec un limbe large et charnu et de courts entre-nœuds. Une autre étude portant sur plusieurs échantillons de bacopa collectés dans des environnements différents, semi-tempérés, subtropicaux et tropicaux, de localités indiennes géographiquement distinctes, a été réalisée pour déterminer les différences morphologiques et phytochimiques [80]. L'étude des caractères végétatifs et biochimiques ainsi que l'observation macroscopique de la couleur

des organes des plantes ont permis de regrouper les phénotypes en différents groupes et d'illustrer les résultats sous la forme d'un dendrogramme (diagramme montrant l'arrangement des groupes générés). Sur les 7 groupes observés, regroupant 27 accessions de bacopa, 3 apparaissent assez distincts et séparés des autres. Le premier groupe a le plus fort rendement en matière végétale mais le plus bas taux de production de bacoside A. Les deux autres ont au contraire des rendements végétatifs plus faibles mais des teneurs en bacoside A plus élevées. D'après cette étude, il est clair que l'environnement agro-climatique d'une région et le microenvironnement interagissent sur le phénotype concerné.

Lors d'une étude, 24 accessions de bacopa de diverses zones géographiques ont été cultivées en serre pendant une année, à l'issue de laquelle 6 d'entre elles ont été sélectionnées pour leur teneur foliaire élevée en bacoside A et leur rendement important en matière végétale [75]. Elles ont ensuite été cultivées et étudiées minutieusement pendant 3 ans afin de sélectionner la plante au meilleur rendement en biomasse et en bacoside A ; c'est le principe de la sélection massale. Une variété de bacopa appelée CIM-Jagriti a alors été sélectionnée et son matériel génétique a été étudié (PCR). CIM-Jagriti produit des herbes hautes (12 à 18 entre-nœuds d'une longueur de 1,8 à 2,8 cm [75]) et a un rendement d'herbes sèches de 4000 kg/hectare/récolte, soit l'équivalent de 85 kg de bacoside A [69]. La plante entière a une teneur totale en bacoside A de 2 %. Les plantes sont bien vertes et luxuriantes [75]. Par la suite, d'autres variétés de bacopa, telles Subodhak et Pragyashakti, ont été sélectionnées selon les mêmes critères. Subodhak et Pragyashakti fournissent respectivement 4700 kg et 6500 kg d'herbe sèche/hectare/récolte et ont une concentration respective en bacoside A de 1,6 et 1,8 % [69]. La production de bacoside A de ces 3 variétés est supérieure à la production moyenne (0,12 % à 1,54 %) des plantes sauvages de bacopa [87, 116, 117, 138]. **La sélection de certaines variétés de bacopa est donc intéressante car elle permet d'obtenir des plantes plus riches en saponosides et qui pourront par la suite être cultivées en masse au laboratoire.**

IV.1.2. Diversité génotypique

Le génotype d'un individu est l'ensemble des caractéristiques héréditaires qu'il a reçu de ses parents.

Pour comprendre les variations phénotypiques observées, des chercheurs utilisant la technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe ou RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) ont étudié le matériel génétique de différentes populations de bacopa collectées en Inde et en Malaisie [67]. Ils ont réalisé l'extraction de l'ADN à partir de jeunes feuilles. La séquence de l'ADN n'étant pas connue, ils l'ont amplifié par PCR (*polymerase chain reaction*) de manière aléatoire, c'est la RAPD. Ils ont ensuite séparé les fragments amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose et les ont caractérisés par détection UV. Les résultats ont montré un faible taux de variabilité génétique entre les différents échantillons de bacopa avec plus de 80 % de similarité. **Cette base génétique étroite des populations de bacopa pourrait être attribuée d'une part, à une propagation surtout végétative de cette espèce et d'autre part, au fait que les microenvironnements des habitats du bacopa sont similaires dans des aires géographiques distinctes (le bacopa pousse toujours près d'un point d'eau).**

IV.2.Culture en plein champ

Avant le bouturage de pousses de bacopa, le sol doit être labouré en profondeur afin de l'aérer et d'éliminer les mauvaises herbes [68]. Les boutures de 4-5 cm (des feuilles, des nœuds et des racines), obtenues à partir de la plante-mère, peuvent ensuite être plantées dans un sol humide avec un espacement de 40 cm entre chaque plante [69]. Pour la culture et la multiplication du bacopa, on peut également utiliser les semences. Généralement, les graines sont d'abord mises à germer dans des petits godets et les plantules résultantes sont ensuite mises en pleine terre (bacopin.com).

Dès la plantation, le bacopa est irrigué par inondation pour optimiser ses chances de croissance, puis, une fois enraciné (au bout d'une semaine) [69], l'irrigation se fait tous les 7 jours. Idéalement, la plantation se fait à une période chaude et humide, de mars à juin [68]. La culture de plantes médicinales comme le bacopa doit se faire sans engrais ni pesticides chimiques, l'utilisation d'engrais organiques comme le fumier, riche en azote et en phosphore, ou de pesticides biologiques peut être envisagée [68]. Pour un hectare de culture, il faut environ 40 000 plantules soit 70 kg de poids frais [69]. La plante entière peut être récoltée

après 120 à 150 jours de culture, lorsqu'elle atteint 20 à 30 cm de longueur, de septembre à octobre.



Figure 44: photographie de *Bacopa monnieri* (pharmacie-fleurentin.fr).

IV.3. Culture *in vitro*

IV.3.1. Principes

La culture *in vitro* est une technique permettant de faire croître, au laboratoire, différents matériels biologiques à partir de la plante entière [150] :

- des amas cellulaires appelés cals (cellules méristématiques non différenciées) ;
- des fragments d'organes appelés explants (nœuds, feuilles, tiges...) ;
- des cellules isolées.

Les méthodes de culture *in vitro* ont deux objectifs principaux, soit multiplier des amas tissulaires ou cellulaires pour en extraire des métabolites secondaires (composés actifs des

plantes), soit régénérer des plantes entières, en utilisant notamment une propriété des cellules végétales : la totipotence. La totipotence correspond au fait que des cellules différenciées d'un tissu donné, après avoir perdu cette spécialisation (dédifférenciation), peuvent se redifférencier pour donner des cellules d'un autre tissu [53]. Par exemple, lors d'une bouture de feuille, les cellules de la base du pétiole peuvent, par l'ajout d'hormones végétales, se dédifférencier et former un cal qui, si on le souhaite, pourra se différencier en cellules de racine.

Les plantes entières produites par culture *in vitro* peuvent être des plantes génétiquement identiques à la plante mère ou des plantes différentes et améliorées possédant un génome modifié [151]. Les techniques utilisées pour régénérer des plantes identiques à la plante mère sont la micropropagation (technique de multiplication végétative en culture *in vitro*), l'embryogénèse somatique et la culture de cellules en suspension. Les techniques pour modifier un génome sont basées sur le génie génétique, l'hybridation somatique et la mutagénèse [150].

IV.3.2. Matériels et méthodes

IV.3.2.1. Milieu de culture

La culture *in vitro* se réalise à l'abri des contaminations sur des milieux nutritifs stériles, liquides, solides ou semi-solides. Le milieu Murashige et Skoog (MS), très utilisé en culture *in vitro*, est composé de nutriments, de vitamines, de saccharose et d'agar et il peut être liquide ou solide [152]. En règle générale, les milieux de culture sont enrichis d'une source de carbone (glucose) et d'azote (nitrate), de vitamines et de phytohormones (hormones végétales de croissance). La concentration en saccharose et le pH doivent être ajustés en fonction de la plante. Pour le bacopa, une étude a rapporté qu'une concentration en saccharose de 2 % et un pH égal à 4,5 permettaient d'obtenir un bon rendement, avec 151 jeunes pousses par explant [153].

Le milieu de culture est essentiel à la croissance et au développement de l'explant végétal et doit donc être bien sélectionné. Selon une étude, les pousses de bacopa obtenues à partir d'explants d'entre-nœuds et transférées sur un milieu MS liquide ont montré un meilleur

enracinement (plus grand nombre de racines) et une meilleure élancement (longueur de pousse supérieure) comparativement à celles se développant sur un milieu solide [154]. Ceci s'explique d'une part, par une meilleure assimilation des nutriments grâce aux surfaces de contact plus larges de l'explant avec le milieu liquide et d'autre part, par le maintien de la balance oxygène/dioxyde de carbone (équilibre permettant à la plante de survivre) [85]. En conséquence, le pourcentage de « survivants » lors de la culture en plein champ est supérieur lorsque les pousses proviennent d'un milieu liquide par rapport aux pousses provenant d'un milieu solide [154]. Cependant, aucune règle stricte n'existe à propos du choix du milieu de culture et les résultats des études sont parfois contradictoires. En effet, une étude a rapporté que le milieu solide était plus efficace que le milieu liquide pour régénérer des bourgeons à partir d'explants de feuilles [154], tandis qu'une autre, dans les mêmes conditions, a montré que le milieu liquide était préférable au milieu solide (cf. figure 45) [155]. L'utilisation de l'un ou l'autre milieu dépend vraisemblablement du matériel végétal de départ. **Néanmoins, le milieu liquide semble être préférable lorsque la culture *in vitro* se fait à partir d'explants d'entre-nœuds ou de feuilles de bacopa.**

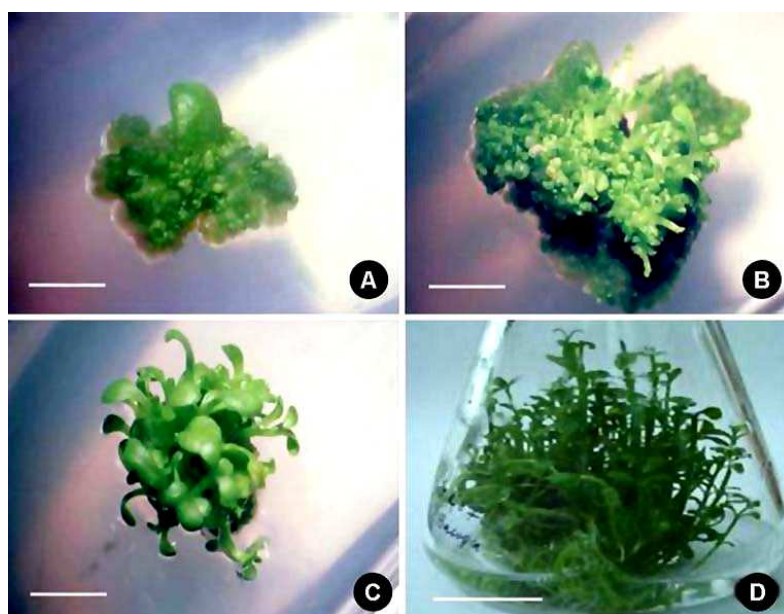


Figure 45: développement de bourgeons adventifs à partir d'explants foliaires sur un milieu solide après 3 semaines (A) et après 4 semaines (B) de culture et comparaison du développement de pousses de bourgeons après repiquage sur un milieu solide (C) et sur un milieu liquide (D) [155].

IV.3.2.2. Hormones de croissance

Les phytohormones, auxines et cytokinines, sont des régulateurs de croissance produits naturellement chez les plantes et indispensables au bon déroulement des cultures *in vitro* de tissus végétaux [150, 156]. Les auxines agissent sur l'élongation cellulaire (auxèse) et la croissance des racines et s'opposent à la formation de bourgeons. Les cytokinines, quant à elles, agissent sur la croissance des bourgeons et s'opposent à la formation de racines [152]. Plus le rapport auxines/cytokinines est élevé, plus la croissance racinaire sera favorisée et plus ce rapport est faible, plus le développement des bourgeons et des tiges sera privilégié [53]. Ainsi, un rapport auxines/cytokinines élevé permet de différencier les cellules de cal en cellules de racines tandis qu'un rapport auxines/cytokinines faible permet de différencier les cellules de cal en cellules de tiges.

Il existe plusieurs structures d'auxines :

- l'acide indol-3-acétique (AIA) ;
- l'acide naphthalène acétique (ANA) ;
- l'acide 3-indole butyrique (AIB) ;
- le dichloro-2,4-phénoxyacétique.

Il existe plusieurs structures de cytokinines :

- la kinétine;
- la benzyl-6-aminopurine (BA) ;
- le thidiazuron (TDZ) ;
- l'isopentényladénine.

En fonction de la concentration relative de ces phytohormones, différents types d'organogénèse (formation d'un organe) peuvent se produire(cf. figure 46) [53] :

- le bourgeonnement axillaire : un fort taux de cytokinines et une très faible teneur en auxines permet d'obtenir des bourgeons axillaires (bourgeons situés à l'aisselle des feuilles) ;

- le bourgeonnement adventif : un fort taux de cytokinines et une faible teneur en auxines permet d'obtenir des bourgeons adventifs (bourgeons situés autour du bourgeon principal) ;
- la caulogenèse : un taux équivalent en auxines et en cytokinines entraîne la formation de tiges ;
- la rhizogenèse : un fort taux d'auxines et un faible taux de cytokinines permet la formation et le développement de racines.

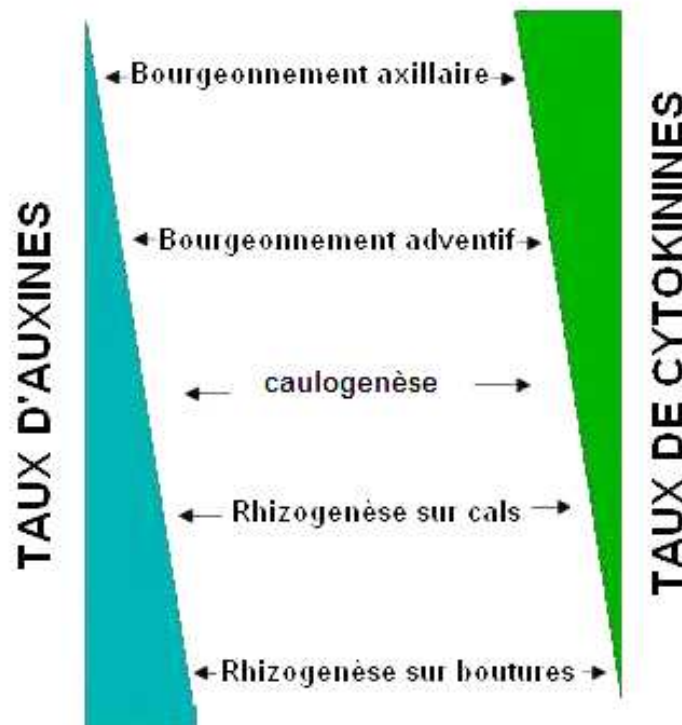


Figure 46 : influence des concentrations relatives d'auxines et de cytokinines sur l'organogenèse (biotech-ecolo.net).

Lors d'une culture *in vitro*, les auxines et les cytokinines, ayant des rôles différents, sont choisies en fonction du matériel végétal de départ et du type d'organogenèse souhaité. Plusieurs études ont été menées pour comparer l'effet de ces hormones. La cytokinine BA apparaît être l'hormone la plus polyvalente pour la régénération d'explants [82] tandis que la

cytokinine TDZ semble être plus spécifique aux explants de nœuds [157]. Aussi, il a été noté que l'association cytokinine TDZ + auxine ANA permettait une meilleure induction de pousses que l'association cytokinine TDZ + auxine AIA [157]. Une synergie d'action entre les hormones TDZ et ANA a même été mentionnée. Fort de ces résultats, les auteurs ont alors développé une méthode de culture en masse du bacopa en deux étapes successives : des explants de feuilles sont d'abord mis en culture dans un milieu MS contenant TDZ et ANA afin d'induire le plus de bourgeons possible puis, repiqués dans un nouveau milieu MS contenant seulement BA pour favoriser le développement des pousses résultantes. Les plus faibles concentrations d'hormones de croissance ont été utilisées afin d'obtenir une meilleure rentabilité. **Ce procédé de culture *in vitro* du bacopa dans deux milieux successifs contenant chacun des hormones spécifiques a permis une meilleure multiplication et élongation des pousses par rapport à une technique utilisant un seul milieu de culture.**



Figure 47: étapes d'une culture *in vitro* de *Bacopa monnieri* : développement de bourgeons adventifs à partir dans un milieu MS contenant TDZ (1,5 mg/L) et ANA (0,5 mg/L) à partir d'explants d'entre-nœuds (A) et d'explants de feuilles (B), multiplication des plantules en touffe dans un second milieu MS contenant BA (0,2 mg/L) (C) ou BA (0,5 mg/L) (D), développement des plantules inoculées dans un milieu induisant la rhizogenèse (E), formation de plantes avec des racines (F), acclimatation des plantes dans des pots (G), développement des plantes entières en plein champ (H) [157].

En conclusion, le matériel utilisé et la méthode de réalisation d'une culture *in vitro* (matériel végétal de départ, milieu de culture, choix et concentration des phytohormones) doivent être rigoureusement définis afin d'obtenir une propagation en masse de bacopa optimale.

IV.3.3. La régénération

IV.3.3.1. L'organogénèse

L'organogénèse consiste à générer de nouveaux organes ou tissus comme des bourgeons, des racines et des tiges à partir de fragments d'organes (explants) [158].

→ Le bourgeonnement

Il a été rapporté que des explants de feuilles mis en culture dans un milieu MS enrichi en cytokinines donnaient un plus grand nombre de bourgeons que des explants de nœuds ou d'entre-nœuds [79]. D'autre part, il a été montré que les explants de feuilles de bacopa provenant de culture de pousses *in vitro* avaient une plus grande facilité au bourgeonnement que les explants de feuilles provenant de plantes cultivées en plein champ [81]. **Les explants de feuilles semblent donc être les explants les plus appropriés à l'induction de bourgeons et particulièrement les feuilles provenant de plantes de culture *in vitro*.**

Une étude ayant évalué l'efficacité de la Bavistine® (ou carbendazime, un antifongique) à induire un bourgeonnement a montré que, quelque soit le type d'explant (nœuds, entre-nœuds, feuilles), elle permettait d'induire 3 fois plus de bourgeons que les cytokinines [84]. Elle aurait un effet promoteur sur la régénération des bourgeons et posséderait une activité cytokinine-like, s'expliquant par une analogie structurale avec les cytokinines. **La Bavistine® pourrait donc être intéressante dans le cas d'une culture commerciale de bacopa car, en plus de son apparente efficacité, elle permet de réduire les coûts engendrés (les cytokinines sont plus coûteuses).**

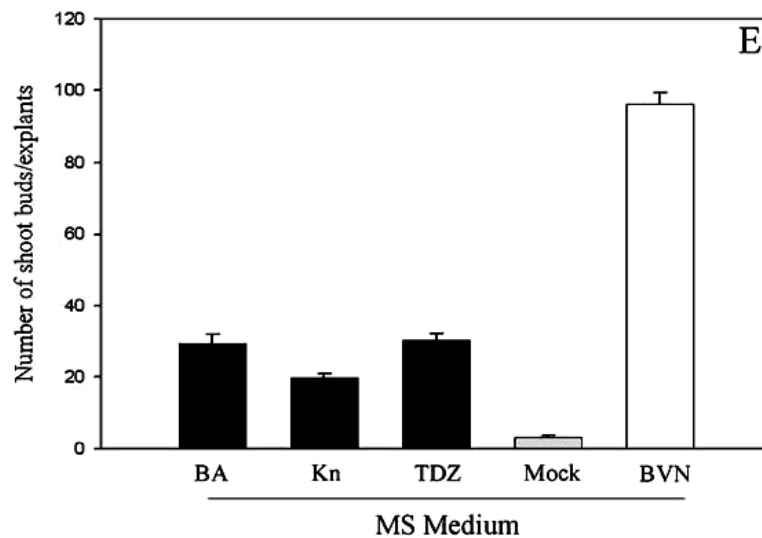


Figure 48 : comparaison du nombre de bourgeons adventifs obtenus à partir d'explants d'entre-nœuds de bacopa cultivés sur un milieu MS avec la bavistine, les cytokinines kinétine, BA et TDZ et sur un milieu Mock (sans hormone de croissance)[84].

➔ La rhizogenèse

Il ressort d'essais empiriques que l'auxine ANA est, semble-t-il, celle qui possède la plus grande capacité à induire une rhizogenèse à partir de jeunes pousses de bacopa. Un protocole développé pour le bacopa et utilisant l'auxine ANA a permis de donner, *in fine*, des plantes entières viables qui se sont enracinées avec succès une fois transférées en plein champ [79].



Figure 49: plantes de *Bacopa monnieri* obtenues par rhizogenèse [79].

IV.3.3.2. L'embryogénèse somatique

L'embryogénèse somatique est une multiplication végétative permettant d'obtenir une plante fille génétiquement identique à la plante mère. Le développement de l'embryon peut se faire à partir d'explants prélevés sur l'appareil végétatif de la plante ou à partir de cellules végétales somatiques cultivées *in vitro*. Ainsi, les cellules somatiques (cellules non sexuelles) se divisent et se développent afin de produire des embryoïdes (structure comparable à un embryon zygotique retrouvé dans la reproduction sexuée) qui peuvent croître en plantes fertiles sur un milieu artificiel [158].

Il a été montré que les cals de cellules méristématiques de bacopa cultivés sur un milieu MS enrichi en auxines puis sur un milieu MS enrichi en cytokinines pouvaient produire des embryons somatiques [79, 159]. Les embryons, une fois germés sur le milieu MS, ont pu former des plantules. Les plantules résultantes ont été sorties du laboratoire et mises en culture en plein champ ; la transplantation a été réussie pour plus de 95% d'entre elles [79]. **L'embryogénèse somatique a donc permis d'obtenir des plantes entières viables et pourrait être utilisée pour une culture en masse de bacopa.**



Figure 50: embryon somatique obtenu à partir d'un cal dans un milieu de culture contenant 0,5mg/L de BA [79].

IV.3.4. Culture cellulaire en suspension

La culture cellulaire en suspension est une technique de culture *in vitro* qui se réalise dans un milieu liquide afin d'obtenir des cellules qui, dépourvues d'inhibition de contact, peuvent se multiplier continuellement. Elle est principalement utilisée pour sélectionner les cellules ayant un potentiel de multiplication et une capacité à produire des métabolites secondaires importants [156].

Dans une étude, des cellules de cals obtenus à partir d'explants de feuilles de bacopa, ont été mises dans un milieu MS liquide et continuellement agitées pour les maintenir en suspension et favoriser leur développement [160]. Elles ont ensuite été séchées à 37°C et pesées. Parmi les 10 échantillons étudiés, 2 lignées cellulaires ont été sélectionnées sur la base de leur potentiel de croissance (augmentation du nombre de cellules d'un facteur 5-6 au bout de 40 jours de culture). L'analyse par CCMHP de ces 2 lignées a révélé des concentrations élevées en bacosides A et B, avec une prédominance pour le bacoside A. La production de bacosides a été mise en évidence dès le 10^e jour de culture et a ensuite augmenté progressivement pour atteindre 1 g de bacoside A pour 100 g de cellules sèches. **La culture de cellules de bacopa en suspension a permis de sélectionner des cellules riches en bacosides et capables de se**

multiplier rapidement. L'utilisation de la culture cellulaire en suspension pourrait permettre de surmonter le problème d'approvisionnement en bacopa en assurant une production constante, sous un environnement contrôlé, de bacosides.

IV.3.5. Symbiose

Au sein de l'écosystème, les organismes vivants partagent les ressources nutritives et énergétiques et entretiennent parfois une relation étroite et bénéfique à chacun : c'est la symbiose. Un cas rapporté a montré une interaction forte et viable entre le système racinaire du bacopa et les hyphes (filaments mycéliens) de *Piriformospora indica* lors d'une co-culture dans un milieu *in vitro* [32]. Ce dernier est un champignon symbiotique appartenant à l'embranchement des Basidiomycètes (classe des *Homobasidiomycetes*). Les hyphes du champignon ont colonisé les racines du bacopa à un niveau intercellulaire et intracellulaire permettant alors une meilleure assimilation des nutriments en créant un mycorhize (association symbiotique entre le champignon et la plante). Le champignon agit en fait comme un biofertilisateur, un bioprotecteur et un biorégulateur permettant alors au bacopa de croître dans un milieu optimal et d'augmenter sa production de métabolites secondaires. Il semblerait que la culture du bacopa avec *Piriformospora indica* soit plus rapide que celle réalisée sans le champignon et que cette co-culture produise plus de bacosides et de biomasse végétale. **L'utilisation de ce champignon s'avère donc prometteuse pour optimiser la culture du *Bacopa monnieri*. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour savoir si ce phénomène symbiotique entre le bacopa et *Piriformospora indica* peut réellement être exploité à plus grande échelle.**

IV.3.6. Intégrité génétique

L'intégrité génétique d'une plante générée par culture *in vitro* est évaluée en comparant son ADN à l'ADN de la plante-mère (PCR) [157]. Il a été rapporté que l'ADN de plusieurs populations de bacopa obtenues soit par micropropagation (régénération *in vitro*) soit par semences artificielles (embryon somatique encapsulé dans une bille d'alginate et formant une

semence) présentait une faible divergence génétique en comparaison avec celui de la plante-mère [161]. Cette étude, qui est la première à avoir étudié la variabilité génétique de plantes issues de cultures *in vitro*, a ainsi montré que les plantes filles conservent un génome très proche de celui de la plante-mère. La conservation du patrimoine génétique lors d'une micropopagation ou de l'utilisation de semences artificielles est en effet un élément capital dont il faut s'assurer avant d'envisager une quelconque application à l'échelle industrielle.

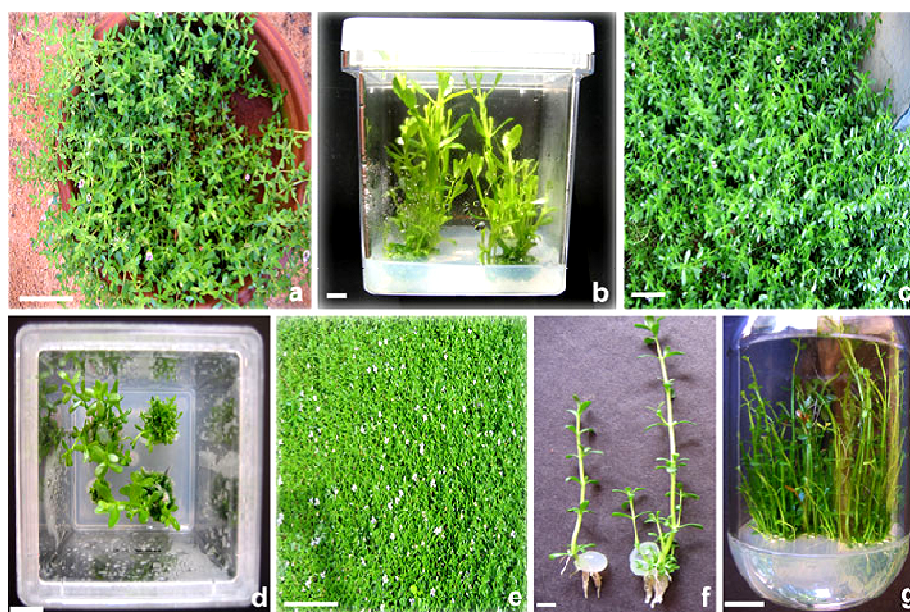


Figure 51 : culture *in vitro* de *Bacopa monnieri* : plante-mère (A), micropopagation *in vitro* et maintien au laboratoire (B), puis évolution sur le terrain (C), semences artificielles maintenues au laboratoire (D), semences artificielles et acclimatation sur le terrain (E), semences artificielles stockées à 4°C pendant 70 jours et régénérées au laboratoire (F) micropopagation *in vitro* de plantes (G) [161].

En conclusion, le *Bacopa monnieri* se prête bien aux différentes techniques de cultures *in vitro*. Ces dernières permettent la régénération d'organes à partir de cals ou de fragments de tissus, fournissant ainsi une source d'approvisionnement en plantules de qualité de façon régulière et continue. Ces méthodes simples et reproductibles pourraient être adaptées en vue d'une culture à grande échelle de *Bacopa*.

IV.4. Transformation génétique

La transformation génétique est utilisée pour améliorer génétiquement les plantes par un processus de transfert d'un ou plusieurs gènes (transfection) conférant à la plante cible des caractères nouveaux [53]. On parle alors de plantes transgéniques ou d'organismes génétiquement modifiés (OGM) [156]. Pour intégrer le gène sélectionné, on peut utiliser un vecteur biologique comme une bactérie qui va, à partir de son plasmide (molécule d'ADN circulaire double brin indépendante du génome principal [53]), transférer dans le génome de la plante un fragment d'ADN dit ADN de transfert (ADN-T, fragment d'ADN plasmidial simple brin) [150]. Les 2 principaux plasmides employés appartiennent à des bactéries du genre *Agrobacterium* : le plasmide Ti d'*A. tumefaciens* (agent responsable de la gale du collet) et le plasmide Ri d'*A. rhizogenes* (agent responsable du chevelu racinaire) (pour inducteur de tumeur). Les plasmides Ti ou Ri, infectieux mais ne contenant plus de gène virulent, sont au préalable modifiés. En effet, un fragment d'ADN exogène est intégré à leur ADN-T et comprend classiquement 3 types de gènes : des gènes marqueurs de sélection (gènes codant par exemple pour la néomycine phosphotransférase et qui confère une résistance à la kanamycine), des gènes rapporteurs (gènes confirmant l'état transgénique des cellules) et des gènes d'intérêt (gènes sélectionnés pour modifier génétiquement la plante). La kanamycine étant un antibiotique létal pour les plantes, elle est utilisée pour différencier les cellules modifiées des cellules non transformées génétiquement ; en sa présence, seules survivront les cellules ayant intégré dans leur génome l'ADN-T et donc le gène de résistance à la kanamycine.

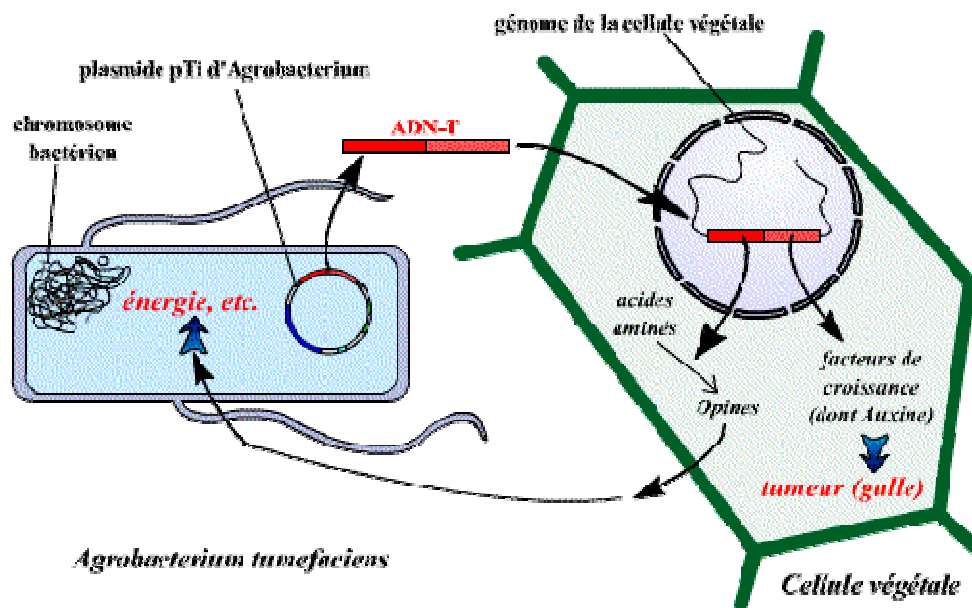


Figure 52 : transfert d'un fragment d'ADN d'*Agrobacterium tumefaciens* dans le génome de la plante (snv.jussieu.fr).

IV.4.1. Transformation par *Agrobacterium tumefaciens*

Une étude a utilisé *Agrobacterium tumefaciens* comme vecteur pour transférer les gènes de la β -glucuronidase (gènes rapporteurs) et de la néomycine phosphotransférase (gènes marqueurs) et évaluer le potentiel des cellules de bacopa à subir une transfection génique [162]. Des explants de feuilles de bacopa ont été mis en culture dans un milieu MS supplémenté en auxines et en cytokinines et contenant 2 antibiotiques, la kanamycine (aminoside) et la cefotaxime (céphalosporine de 3^{ème} génération utilisée ici pour limiter la prolifération de la bactérie). *Agrobacterium tumefaciens* a ensuite été ajouté dans le milieu. Quatre semaines après l'infection bactérienne, les explants de feuilles ont montré des cals sur le milieu de sélection alors que les explants contrôles, non infectés, ont montré un brunissement et une sénescence. Les cals résistants à la kanamycine ont été transférés sur des milieux de culture et ont donné en deux semaines des jeunes pousses, puis *in fine*, des plantes résistantes à la kanamycine. La PCR a permis de prouver le succès de la transformation en mesurant le taux de gènes transférés. Plus de 60 % des explants de feuilles de bacopa ont subi une transformation génétique et la régénération des plantules à partir de ces explants transgéniques s'est faite en 2 mois. La transformation génétique du bacopa s'est donc bien

déroulée et a permis d'obtenir des plantes viables. **D'après cette étude, le génome du bacopa serait capable de subir des modifications et d'être amélioré par l'ajout de gènes d'intérêt. La réussite de la transfection pourrait s'expliquer par la réponse efficace des explants de bacopa à se régénérer *in vitro*.**

IV.4.2. Transformation par *Agrobacterium rhizogenes*

La bactérie *Agrobacterium rhizogenes* a été utilisée dans le but de transformer génétiquement le *Bacopa monnieri* pour améliorer son rendement en biomasse et sa production de saponosides [163]. Des explants de feuilles ont été mis en culture dans un milieu MS et ont été infectés par la bactérie puis lavés avec l'ampicilline (antibiotique). L'amplification de l'ADN-T (PCR) a permis de vérifier que les plantes régénérées possédaient bien les gènes transférés. Après 12 semaines de culture *in vitro*, l'étude des plantes transgéniques de bacopa a montré qu'elles permettaient un rendement en biomasse plus élevé (phénotype supérieur) et qu'elles possédaient des quantités de bacopasaponines D et F et de bacopasides II et V également plus élevées, en comparaison avec les plantes non génétiquement modifiées. **Ce protocole de transformation par *Agrobacterium rhizogenes* a donc permis d'améliorer génétiquement le bacopa et pourrait être utilisé en vue notamment de multiplier en masse ces plantes transgéniques.**

IV.5. Polyploïdisation

La polyploïdisation est une technique utilisée pour doubler le nombre de chromosome et créer une nouvelle variété [53].

Pour un intérêt ornemental, des chercheurs argentins ont utilisé une technique de polyploïdisation sur des segments nodaux issus de plantes cultivées *in vitro* et les ont mis en contact avec diverses concentrations de colchicine [164]. La colchicine, alcaloïde extrait du colchique (*Colchicum autumnale*), est utilisée pour son action antimitotique (blocage de la mitose en métaphase) [165] et permet un doublement du nombre de chromosomes. Le taux de

ploïdisation a été déterminé par cytométrie en flux (technique qualitative et quantitative caractérisant des molécules à l'aide d'un faisceau laser) et le diamètre des fleurs et des tiges ainsi que la taille des feuilles ont été mesurés soigneusement afin de sélectionner le « meilleur » phénotype. Dans cette étude, deux plantes tétraploïdes ont été retrouvées parmi les 150 traitées, avec un phénotype significativement différent des autres plantes : les feuilles, les fleurs et les tiges étaient plus grandes et les couleurs plus intenses (ces caractéristiques sont décrites dans le tableau 16). Une nouvelle variété de bacopa, Ali INTA-JICA, a ainsi pu être créée par polyploïdisation.

Tableau 16: comparaison de la taille des feuilles, des fleurs, des tiges et des entre-nœuds entre la variété Ali INTA-JICA et un témoin [164].

Organe	Témoin	Ali INTA-JICA
Feuille (aire en mm ²)	30,81 ± 6,13	79,30 ± 11,72
Fleur (diamètre en mm)	9,4 ± 1,5	15,1 ± 1,28
Tige (diamètre en mm)	0,86 ± 0,09	1,76 ± 0,24
Entre-nœuds (nombre)	4,0 ± 0,8	7,6 ± 0,67



Figure 53: comparaison de la taille et de la couleur entre la fleur tétraploïde à gauche (indiquée par la flèche) et la fleur témoin à droite [164].

En conclusion, le *Bacopa monnieri* est considéré en Inde comme une espèce menacée, la demande ne cesse d'augmenter et les ressources naturelles, quant à elles, diminuent rapidement. Ainsi, des techniques de propagation *in vitro* du *Bacopa monnieri* sont développées pour permettre d'une part, de répondre à la demande de l'industrie pharmaceutique en assurant une matière première végétale de qualité et d'autre part, de préserver cette espèce de l'extinction[154].

Partie 2 : Activités biologiques

I. Etudes préliminaires

Bacopa monnieri (L.) est utilisé depuis des temps immémoriaux mais l'authentification des revendications traditionnelles s'est progressivement imposée comme une nécessité afin d'établir, sur des bases scientifiques conventionnelles et opposables, sa réelle activité biologique. Les premières investigations, dont nous retraçons brièvement la chronologie ci-après, sont bien évidemment hésitantes, la méthodologie n'est pas toujours rigoureuse, les résultats sont parfois contradictoires... Elles ont au moins le mérite d'avoir ouvert la voie aux travaux de recherche ultérieurs.

1931 : Une équipe revendique avoir retrouvé en très faible quantité un alcaloïde, la brahmine, dans le bacopa (nommé à l'époque *Herpestis monniera*), lequel serait hautement toxique chez la grenouille et le cochon d'Inde [87].

Nota bene : la brahmine ne sera jamais isolée et caractérisée.

1959 : Un extrait alcoolique de la plante entière est rapporté comme possédant des propriétés cardiotonique, vasoconstrictrice, sédative et de blocage neuromusculaire. Le saponoside isolé de cet extrait, l'hersaponine, est retrouvé comme étant cardiotonique chez la grenouille, sédative chez le rat albinos et le cochon d'Inde et ayant une action spasmodique au niveau de certains muscles lisses isolés [166].

1960 : L'action sédative de l'hersaponine est confirmée chez la souris et surtout, elle potentialise l'action hypnotique de l'alcool et des barbituriques. L'hersaponine ne prévient pas l'apparition de crises convulsives provoquées par des électrochocs (chez le rat) ou par le métrazole (chez la souris). Chez la souris, elle produit une hypothermie, réduit la toxicité de l'amphétamine, mais n'a pas d'effet sur la toxicité du métrazole. L'hersaponine partagerait des mécanismes d'action avec deux tranquillisants, la réserpine et la chlorpromazine [167].

1961 : Trois alcaloïdes sont retrouvés dans la plante entière dont un clairement identifié comme étant de la nicotine. Chez l'animal ou sur organe isolé, la fraction alcaloïdique totale stimule puis bloque la transmission ganglionnaire sympathique et parasympathique, possède une action spasmodique sur le muscle strié squelettique (probablement en agissant au niveau de la jonction neuromusculaire), stimule puis déprime la respiration, peut provoquer une

tachyphylaxie, une rigidité et des convulsions. Ce sont, pour les auteurs, des effets globalement « nicotine-like » [129].

Le bacopa diminue la consommation d'oxygène d'un homogénat de cerveau de rat avec, en terme d'efficacité : fraction alcaloïdique > extrait alcoolique total > hersaponine. L'inhibition de la respiration du tissu cérébral par la fraction alcaloïdique est partiellement bloquée par le glutamate de sodium et le succinate de sodium, suggérant une action de la fraction alcaloïdique au niveau du cycle de Krebs. L'action inhibitrice de l'hersaponine est, quant à elle, réduite par le LSD ou *lysergic acid diethylamide* (antagoniste sérotoninergique dérivé de l'acide lysergique) et potentialisée par la sérotonine (5-HT), suggérant une action de l'hersaponine sur la sécrétion de 5-HT [168].

L'hersaponine semble provoquer une déplétion en noradrénaline et sérotonine au niveau du cerveau de rats, comme la réserpine [169].

Nota bene : la remarque faite pour la brahmine s'applique tout autant pour l'hersaponine, elle ne sera jamais élucidée.

1967 : les effets comportementaux du bacopa chez le rat (évalués dans une épreuve dite de réponse conditionnée d'évitement) suggèrent des propriétés tranquilisantes, mais bien moins que celles de la chlorpromazine prise comme témoin positif. En revanche, le bacopa potentialise l'action de la chlorpromazine. Quand il est donné avec de la réserpine, l'effet résultant est approximativement la somme des effets de chacun (absence de synergie). Chez la souris, il protège des crises audiogéniques (mais beaucoup moins que la chlorpromazine) et inhibe le comportement de grattage induit par la mescaline (« *mescaline-scratch* »), suggérant des propriétés tranquilisantes [170].

Pour évaluer les propriétés tranquilisantes du bacopa, une batterie de tests neuropharmacologiques a été réalisée [171]. Le bacopa est ici administré en intrapéritonéal. Les résultats peuvent être résumés comme suit :

- le bacopa réduit l'activité motrice spontanée de rats non stimulés mais est moins efficace sur des rats stimulés par l'amphétamine ;
- il provoque une diminution graduelle de la température rectale chez la souris et l'effet est potentialisé par l'iproniazide (IMAO non sélectif) et antagonisé par le LSD ;

- les souris sont capables de réaliser un test d'activité motrice forcée pour des doses de bacopa qui diminuent pourtant de façon marquée l'activité motrice spontanée ;
- chez la souris, le bacopa inhibe la course circulaire et l'hyperkinésie induite par l'administration chronique intrapéritonéale de β , β' -iminodipropionitrile (drogue entraînant des lésions de l'axone du motoneurone périphérique) et cela sans produire d'ataxie ou de perte du réflexe de redressement ;
- enfin, le bacopa provoque une légère diminution, retrouvée comme non significative statistiquement, du taux de sérotonine du cerveau de rats.

II. Propriétés antioxydantes

II.1. Pré-requis

II.1.1. Les radicaux libres

Par définition, un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule), chargée ou non, possédant un électron non apparié sur son orbitale externe [172]. Cet électron célibataire rend le radical libre très réactif. Pour retrouver un état stable, ce radical libre devra acquérir un électron à partir d'une molécule avoisinante, la transformant elle-même en radical libre. C'est le début d'une réaction en chaîne auto-entretenu et susceptible de perturber le fonctionnement cellulaire.

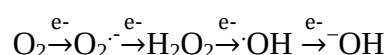
Dans les milieux biologiques, les radicaux libres sont en majorité des métabolites dérivés de l'oxygène ; cependant, il existe aussi des radicaux libres non dérivés de l'oxygène comme le monoxyde d'azote [173]. De plus, toutes les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) ne sont pas des radicaux libres, comme en témoignent l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène qui ne possèdent pas d'électron célibataire et sont donc des oxydants non radicalaires [174].

II.1.1.1. Espèces réactives de l'oxygène

➔ L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

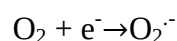
Tout organisme aérobie utilise comme source d'énergie des réactions d'oxydo-réduction, autrement dit des réactions entre donneurs d'électrons (réducteurs) et accepteurs d'électrons (oxydants). C'est ainsi que l'oxygène moléculaire (ou dioxygène, O_2) récepteur final d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, se transforme en eau (H_2O) et que 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) sont produites [175]. 85 % de l' O_2 sont métabolisés au sein des mitochondries. Mais, la réduction de l' O_2 en H_2O (qui nécessite normalement 4 électrons) est parfois incomplète et 2 à 3 % de l' O_2 consommé au niveau

mitochondrial sont transformés en radicaux superoxydes $O_2^{\cdot -}$; il s'agit alors d'une réduction monoélectronique de l' O_2 (un seul électron s'ajoute à l' O_2). La molécule d' O_2 peut alors accepter un deuxième électron et former l'anion peroxyde O_2^{2-} (O_2^{2-} sous l'action de protons H^+ se transforme en peroxyde d'hydrogène H_2O_2), puis un troisième et former le radical hydroxyle $\cdot OH$ et enfin un quatrième et former l'anion hydroxyde OH^- . Ces quatre réactions de réduction de l' O_2 forment trois espèces réactives de l'oxygène : $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ et H_2O_2 [172].



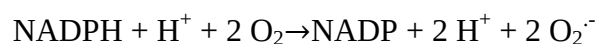
o Formation du radical $O_2^{\cdot -}$

L'ion superoxyde est le point de départ des réactions radicalaires. Il est formé à partir de la molécule d'oxygène, par une réduction monoélectronique.



L'ion superoxyde est principalement, mais non exclusivement, formé au niveau des mitochondries [176] où la réduction du dioxygène en eau se réalise et produit alors des « fuites » de $O_2^{\cdot -}$.

En effet, le complexe NADPH oxydase (NADP signifie nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), présent notamment dans les polynucléaires neutrophiles, permet à la molécule d'oxygène de gagner un électron et de se transformer en radical superoxyde [176]. Ce radical est libéré soit à l'extérieur (pour les cellules phagocytaires) soit à l'intérieur (pour les cellules non phagocytaires) de la cellule.



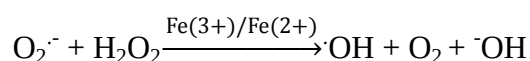
o Potentiel standard d'oxydoréduction

Le radical $O_2^{\cdot -}$ intervient dans deux couples d'oxydoréduction $O_2/O_2^{\cdot -}$ et $O_2^{\cdot -}/H_2O_2$, ayant un potentiel standard d'oxydoréduction de respectivement $-0,33$ et $+0,93$ volt. En conséquence, $O_2^{\cdot -}$ est capable de réagir sur un oxydant dont le potentiel standard d'oxydoréduction est

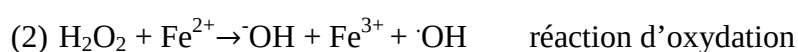
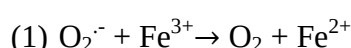
supérieur à $-0,33$ volt et sur un réducteur dont le potentiel standard d'oxydoréduction est inférieur à $+0,93$ volt [172].

De part ces résultats, $O_2^{\cdot-}$ n'est ni un bon réducteur ni un bon oxydant ; il a, de tous les radicaux libres, la réactivité la plus faible vis-à-vis des substrats bio-organiques. En effet, il n'a aucune action sur les acides nucléiques, les protéines et leurs acides aminés, les lipides et les acides gras polyinsaturés. Par contre, il réagit de manière prépondérante avec les cytochromes, l'ascorbate et les superoxydes dismutases [172].

o Mode d'action



C'est la réaction de Haber-Weiss, elle se fait en présence de l'élément fer (Fe) qui joue le rôle de catalyseur et se décompose en deux réactions [177] :



La réaction (2) est la réaction de Fenton découverte en 1894 [178].

➔ Le radical hydroxyle (${}^{\cdot}OH$)

o Formation du radical ${}^{\cdot}OH$

La réaction monoélectronique du H_2O_2 donne naissance au radical hydroxyle ${}^{\cdot}OH$ grâce à la réaction de Fenton.



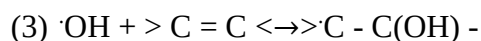
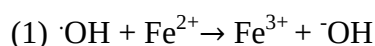
La radiolyse de l'eau, c'est-à-dire la décomposition de l'eau sous l'action de rayons ionisants, provoque aussi la formation du radical hydroxyle [172].

o *Potentiel standard d'oxydoréduction*

Le radical $\cdot\text{OH}$ a un pouvoir oxydant très puissant. En effet le potentiel standard du couple $\cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ est de + 2,34 V. Il va pouvoir oxyder tous les réducteurs dont le potentiel standard d'oxydoréduction est inférieur à + 2,34 V, ce qui correspond à la plupart des substrats bio-organiques [172], notamment les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN.

o *Mode d'action*

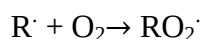
Le radical hydroxyle agit de trois manières : il peut arracher un électron (1), arracher un atome d'hydrogène (2) ou s'ajouter à une double liaison (3) [172].



L'arrachement d'un atome d'hydrogène (2) par le radical $\cdot\text{OH}$ sur le résidu 2-désoxyribose (en position C3, C4 ou C5) provoque une rupture simple-brin ou double-brin de l'ADN ou une perte de base(s) [172]. Si les mécanismes de réparation sont efficaces, ces dommages sont corrigés par voie enzymatique. L'addition du radical hydroxyle sur les doubles liaisons $\text{C} = \text{C}$ et $\text{C} = \text{N}$ (3) de la guanine (base purique de l'ADN) provoque la formation de deux radicaux dont la 8-hydroxyguanine, qui est le principal marqueur du stress oxydant au niveau de l'ADN [172].

➔ Les radicaux peroxy ($\text{RO}_2\cdot$)

o *Formation du radical $\text{RO}_2\cdot$*



Le radical $\text{R}\cdot$ résulte de l'action des radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ sur les doubles liaisons des molécules biologiques RH. Le carbone du radical $\text{R}\cdot$ réagit avec l' O_2 pour former le radical peroxy [172].

Parmi les radicaux peroxy, il y a le radical hydroperoxy $\text{HO}_2^\cdot$ qui se trouve dans les milieux cellulaires acides comme les lysosomes (organites cellulaires présents dans le cytosol et renfermant des enzymes digestives) [176].

o Potentiel standard d'oxydoréduction

Le couple redox $\text{RO}_2^\cdot/\text{RO}_2\text{H}$ a un potentiel standard de + 1,00 V, c'est pourquoi $\text{RO}_2^\cdot$ est un puissant oxydant.

o Mode d'action

$\text{RO}_2^\cdot$ participe à quatre réactions: réaction d'addition sur une double liaison $\text{C} = \text{C}$ (1), réaction monomoléculaire de décomposition du $\text{RO}_2^\cdot$ (2), action avec un radical perhydroxyle ($\text{HO}_2^\cdot$) (3), réaction avec lui-même pour former le tétraoxyde RO_4R , un produit très instable (4).

(1) $\text{RO}_2^\cdot + >\text{C} = \text{C} \leftrightarrow \text{C}^\cdot - \text{C}(\text{O}_2\text{R})$ - réaction d'addition sur une double liaison

(2) $\text{RO}_2^\cdot \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$ (ou $\text{HO}_2^\cdot$) + produit réaction de décomposition du $\text{RO}_2^\cdot$

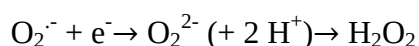
(3) $\text{RO}_2^\cdot + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{RO}_2\text{H} + \text{O}_2$ réaction biradicalaire

(4) $\text{RO}_2^\cdot + \text{RO}_2^\cdot \rightarrow \text{RO}_4\text{R}$ réaction biradicalaire (avec lui-même)

De la même manière que le radical hydroxyle, $\text{RO}_2^\cdot$ oxyde les bases de l'ADN et le 2-désoxyribose de l'ADN. Il est capable également d'initier la peroxydation des lipides.

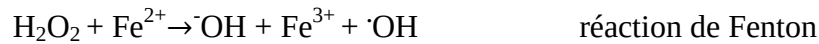
➔ Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

o Formation du H_2O_2



Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre [172] mais il possède une forte réactivité et un puissant pouvoir oxydant.

o *Mode d'action*



Le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'ADN en oxydant la base adénine [172].

➔ L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

o *Formation du $^1\text{O}_2$*

$^1\text{O}_2$ est une forme excitée de l' O_2 à l'état triplet ($^3\text{O}_2$) [176].

o *Mode d'action*

$^1\text{O}_2$ oxyde la base guanine de l'ADN par une réaction de cycloaddition type Diels-Alder formant des endoperoxydes fortement instables [172].

II.1.1.2. Marqueurs biologiques du stress oxydant

Les radicaux libres réagissent avec les lipides, les protéines et les bases de l'ADN pour former des substrats d'oxydation qui peuvent être quantifiés et qui sont des marqueurs du stress oxydant [179].

➔ La peroxydation des lipides

Les acides gras insaturés (molécules possédant une longue chaîne hydrocarbonée avec une ou plusieurs doubles liaisons) sont les lipides les plus sensibles aux radicaux libres. La réaction des radicaux libres sur les lipides est appelée la peroxydation des lipides et s'effectue en trois étapes (initiation, propagation et terminaison) pour former des peroxydes(cf. figure 54) [174]. Le test dit à l'acide thiobarbiturique est utilisé pour déterminer la dégradation oxydative des lipides.

o L'initiation

Un radical libre $R^\bullet$ réagit avec un acide gras insaturé membranaire LH pour former un radical lipidique $L^\bullet$. Ce dernier réagit avec une molécule d'oxygène pour donner un radical peroxyde $LOO^\bullet$.

o La propagation

Le radical peroxyde formé agit sur un autre acide gras insaturé $L'H$ pour former un hydroperoxyde lipidique $LOOH$ et un radical alkyle $L'^\bullet$. L'hydroperoxyde $LOOH$, sous l'action des métaux, conduit à la formation des radicaux alkoxydes ($LO^\bullet$) et hydroxyles ($^\bullet OH$), qui vont induire les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique. Le radical $L'^\bullet$, quant à lui, peut se fixer à l'oxygène moléculaire et former un radical peroxyde $L'OO^\bullet$, capable à son tour de réagir avec un acide gras insaturé.

o La terminaison

Le cycle de formation des radicaux peroxydes peut être interrompu par des réactions de recombinaison entre espèces radicalaires, formant alors des aldéhydes $LOOL'$ (produit stable).

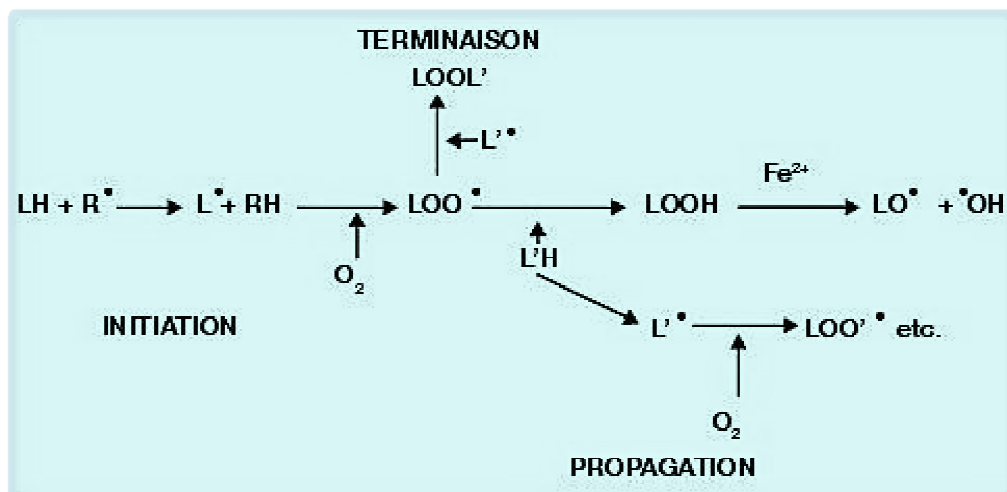


Figure 54: description des phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique [180].

o Le test à l'acide thiobarbiturique

Les peroxydes formés ($\text{LOO}^\bullet$) lors de la peroxydation des lipides sont très instables et se décomposent en aldéhydes, des composés très réactifs, responsables des effets délétères sur les protéines [176]. Un des aldéhydes formés s'appelle le malondialdéhyde (MDA) et c'est le marqueur le plus utilisé pour identifier un stress oxydant. La réaction de dosage du MDA repose sur la formation en milieu acide et à chaud, entre le MDA et 2 molécules d'acide thiobarbiturique (TBA, *thiobarbituric acid*), d'un complexe $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$ (cf. figure 55). Les techniques de CLHP, de spectrophotométrie et de fluorimétrie permettent le dosage du complexe $\text{MDA}-(\text{TBA})_2$, un pigment rose absorbant à 532 nm [179, 181].

D'une façon générale, on parle du dosage des TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) ou des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique.

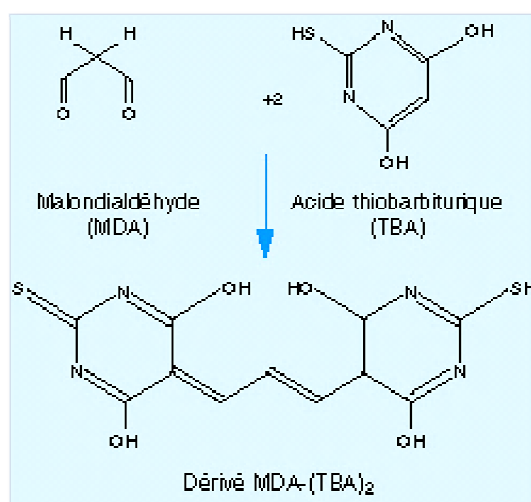


Figure 55: réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique [181].

Un test d'estimation rapide du taux de MDA dans les urines (bandelette urinaire) est disponible en pharmacie (quotipharm.com, sidnsante.com). Il est à réaliser sur les premières urines du matin et le résultat est lisible 5 minutes après avoir fait le test grâce à une réaction colorée. Il permettrait d'apprécier son niveau de stress oxydant (OxyTest distribué par S.I.D. Nutrition[®], ACL 9651650).

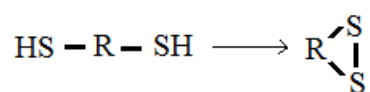
➔ Oxydation des protéines

o *La carbonylation des protéines*

L'oxydation de certains acides aminés (arginine, thréonine, proline et lysine) entraîne la formation de chaîne carbonylée par l'ajout d'un groupe carbonyle C = O [172]. Cette réaction conduit à la dénaturation des protéines. Le taux de carbonylation est le marqueur le plus utilisé pour évaluer l'oxydation des protéines ; sa détermination repose sur l'activité des groupements carbonylés avec la dinitrophénylhydrazine (DNPH) et la formation d'un précipité [179].

o *L'oxydation des fonctions thiols*

L'oxydation des fonctions thiols (SH) des protéines se fait essentiellement par le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ [176]. L'oxydation des fonctions thiols entraîne la formation de ponts disulfures (S-S).



o *L'oxydation du groupe aminé des protéines*

Les aldéhydes formés lors de la peroxydation des lipides réagissent avec les groupements aminés des protéines et entraînent leur réticulation, leur agrégation et donc leur dénaturation [176].

➔ Oxydation des bases de l'ADN

Le radical $\cdot\text{OH}$ oxyde en particulier les bases purines, adénine et guanine, et le désoxyribose. La guanine est la base la plus fréquemment oxydée et forme la 8-hydroxyguanine. C'est avec le test Comète (*comet assay*) que la quantité d'ADN endommagée est quantifiée. Ce test permet, après une lyse alcaline des cellules (pour détruire les membranes cellulaires), d'analyser l'ADN des noyaux par électrophorèse sur gel d'agarose. Un intercalant fluorescent

est ajouté pour la révélation de l'ADN. Lorsque le noyau a une forme de comète (avec une queue), il provient d'un ADN lésé. Le noyau reste rond pour un ADN non modifié [179].

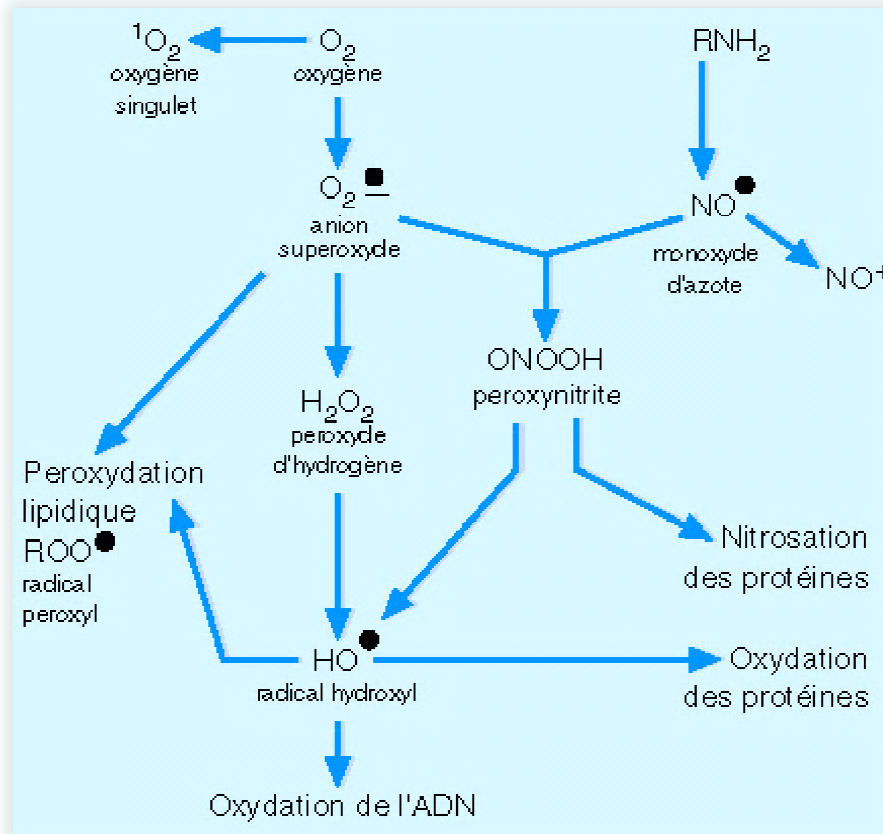


Figure 56: effets sur les lipides, les protéines et l'ADN des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [182].

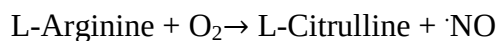
II.1.1.3. Monoxyde d'azote

Furchgott Robert-Francis découvre en 1980 le monoxyde d'azote $\cdot NO$ (appelé dans un premier temps *endothelium-derived relaxing factor* ou EDRF, puis monoxyde d'azote ou $\cdot NO$), un composé libéré par l'endothélium vasculaire et capable de provoquer une vasorelaxation. Le $\cdot NO$ est une espèce radicalaire. Le $\cdot NO$ diffuse facilement à travers les membranes cellulaires et possède diverses propriétés biologiques. En effet, il a un rôle dans le

fonctionnement rénal et vasculaire, une activité anti-inflammatoire, il agit comme neurotransmetteur et enfin, il limite la peroxydation lipidique [176].

➔ Formation du radical NO

Le NO est présent dans tous les types cellulaires et se forme à partir d'un atome d'azote de l'acide aminé L-Arginine et d'une molécule d'oxygène, à l'aide d'enzymes, les NO synthases [173].



Les monoxydes d'azote synthases ou NOS (*nitric oxide synthase*) sont regroupées en deux catégories, les NOS constitutives et les NOS inductibles [179].

Les NOS constitutives sont calcium-dépendantes, c'est-à-dire qu'elles sont activées et produisent du NO seulement lors de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Deux isoformes de NOS constitutives existent les NOS endothéliales et les NOS neuronales :

- Les NOS endothéliales sont présentes dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et dans les plaquettes. Le NO produit par l'endothélium vasculaire est responsable de la vasodilatation et celui provenant des plaquettes s'oppose à l'agrégation plaquettaire ;
- Les NOS neuronales (d'abord identifiées dans les neurones, d'où leurs noms, puis dans d'autres cellules) sont situées dans les neurones et dans les cellules du pancréas, des muscles et des poumons. Le NO joue ici un rôle de neurotransmetteur et permet de maintenir le tonus des cellules musculaires lisses.

Les NOS inductibles sont actives en permanence et sont indépendantes du calcium. Leur production est induite par les cytokines. Elles prédominent dans le cytosol des macrophages, des cellules du pancréas, des hépatocytes et des polynucléaires neutrophiles. Le NO ainsi produit joue un rôle dans les processus inflammatoires [176].

➔ Mode d'action

o réaction avec le dioxyde d'azote



Le trioxyde d'azote (N_2O_3) formé provoque des réactions de nitrosation (addition d'un ion nitrosonium NO^+) des protéines soit sur un atome de soufre (S-nitrosation) soit sur un atome d'azote (N-nitrosation). Il est responsable à la fois d'un stress nitrosant et d'un stress oxydant [173].

o réaction avec l'anion superoxyde



Le peroxynitrite est un composé très réactif qui s'attaque aux lipides, protéines et acides nucléiques. Il participe au stress oxydant [173]. Le dioxyde d'azote (NO_2) formé possède également des effets délétères [173].

o réaction de S-nitrosylation



Le S-nitrosothiol (RSNO) formé par addition d'un groupe nitrosyl NO^- sur une fonction thiol peut modifier les fonctions des protéines et notamment des enzymes antioxydantes qui, si elles sont inactivées, ne pourront plus protéger la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [172, 173].

o réaction de M-nitrosylation

Enfin, le $\cdot\text{NO}$ réagit avec les métaux, principalement le fer, pour former un complexe métal-nitrosyl au niveau des métallo-enzymes : c'est la réaction de M-nitrosylation. En fonction de

l'enzyme, cette réaction de M-nitrosylation peut soit l'activer soit l'inactiver. Par exemple, lorsque le $\cdot\text{NO}$ se lie au groupe héminique de la guanylate cyclase, il va activer cette enzyme et entraîner la formation de GMP cyclique (GMPC) à partir de la guanosine triphosphate (GTP). D'autres enzymes peuvent au contraire être inactivées, c'est notamment le cas pour la cytochrome coxydase, la catalase ou les enzymes des cytochromes P450.

II.1.1.4. Sources des radicaux libres

➔ Sources exogènes

Les radicaux libres proviennent de diverses sources environnementales [172] :

- Les radiations ionisantes ;
- Les radiations UV ;
- Les toxiques environnementaux : pollution, tabac, paraquat, etc. ;
- Les xénobiotiques dont les médicaments.

➔ Sources endogènes

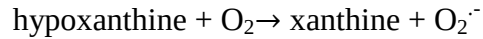
Les radicaux libres sont produits physiologiquement dans les cellules, essentiellement par les enzymes NADPH oxydase et xanthine oxydase et des enzymes mitochondriales [172].

o *NADPH oxydase*

La NADPH oxydase est une enzyme présente dans toutes les cellules notamment dans les polynucléaires neutrophiles [172]. Elle catalyse la réduction de l' O_2 en $\text{O}_2^{\cdot-}$.

o *Xanthine oxydase*

La xanthine oxydase est localisée dans le cytosol, principalement au niveau hépatique et intestinal. Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines et entraîne la production du radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, puis de H_2O_2 [172].



o *Complexe enzymatique mitochondrial*

La chaîne mitochondriale oxyde les coenzymes réduits, NADPH, H^+ et FADH_2 , et libère des protons et des électrons.

La chaîne de transport des électrons est constituée de plusieurs complexes :

- Complexe I : il permet le transfert de 2 électrons du NADH au coenzyme Q par une flavoprotéine (protéine permettant le transfert des électrons) et des protéines à centre fer-soufre ;
- Complexe II : il accepte 2 électrons du succinate et du FADH_2 et catalyse la réduction du coenzyme Q en QH_2 à l'aide d'une flavoprotéine et des protéines à centre fer-soufre ;
- Complexe III : il est constitué d'un centre fer-soufre et de cytochromes b et c il permet le transfert d'électrons au complexe IV ;
- Complexe IV : il est composé de deux atomes de cuivre et du cytochrome a et il catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.

Les flavoprotéines, le coenzyme Q, les cytochromes, les protéines à centre fer-soufre et la protéine à cuivre participent aux réactions de transfert des électrons. Les électrons produits réagissent avec l'oxygène et des « fuites » de radicaux libres peuvent se produire (cf. page 137). Le complexe enzymatique mitochondrial est la source majoritaire de ROS dans la cellule, devant la NADPH oxydase et la xanthine oxydase[172].

o *Lipo-oxygénases et cyclo-oxygénases*

Les lipoxygénases (LOX) et les cyclo-oxygénases (COX) sont des enzymes qui catalysent la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes et prostaglandines. Elles sont impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène [177].

o *Enzymes du reticulum endoplasmique*

Les enzymes des cytochromes P450 réduisent l' O_2 en $\text{O}_2^{\cdot -}$ et/ou en H_2O_2 .

0 Enzymes des lysosomes

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme lysosomiale. Elle permet l'oxydation de l'ion chlorure Cl^- par H_2O_2 pour former l'acide hypochloreux HOCl , un oxydant puissant [172].

0 Enzymes des peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites cellulaires présents dans le cytosol et constitués de plusieurs enzymes dont la glycolate oxydase et la D-aminoacide oxydase. Ces enzymes sont responsables de la production de H_2O_2 .

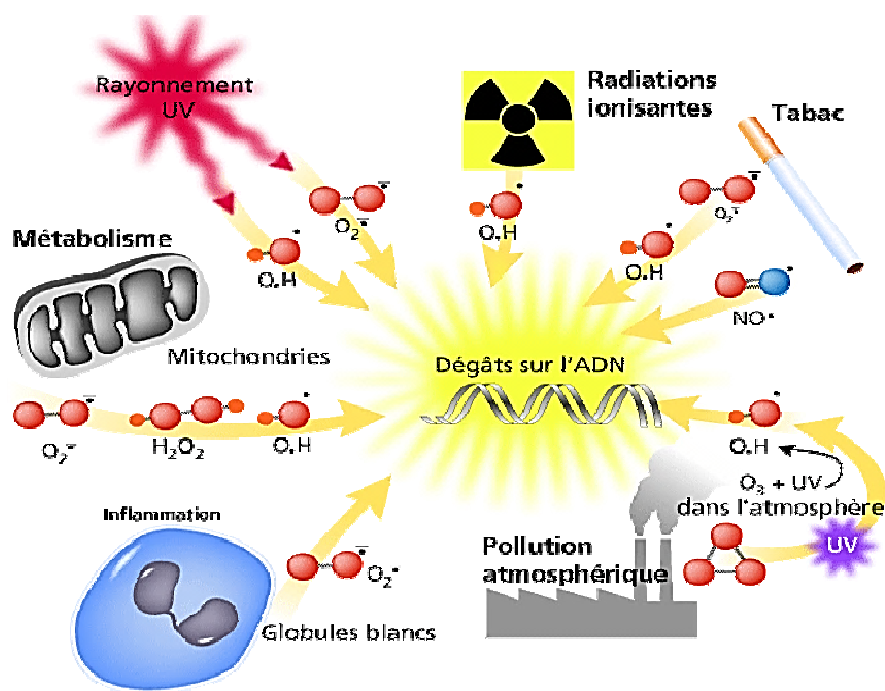


Figure 57 : effets sur l'ADN des sources radicalaires endogènes et exogènes (lanutrition.fr).

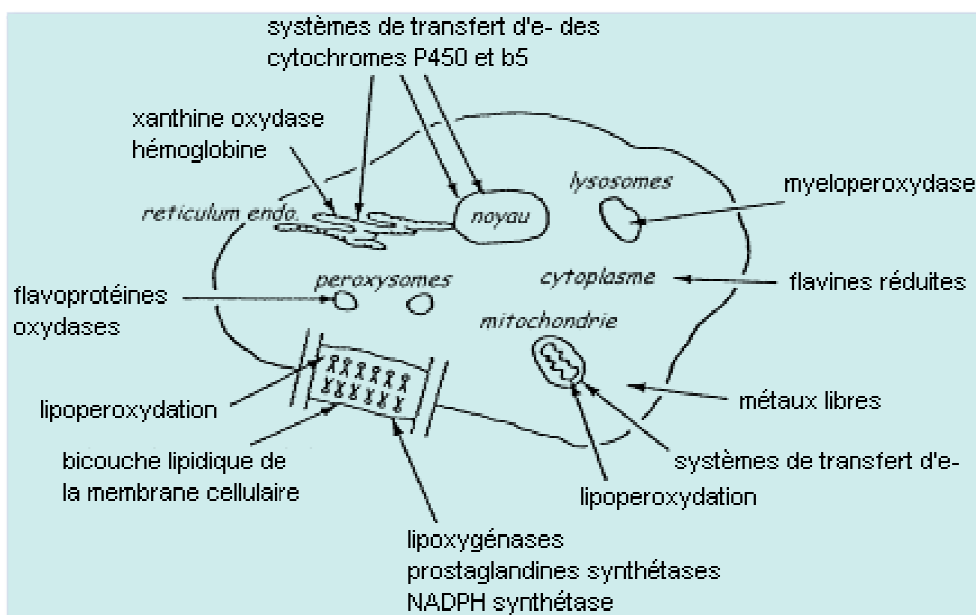


Figure 58: sources cellulaires des radicaux libres [183].

II.1.1.5. Systèmes de défense antioxydants

Les radicaux libres sont produits physiologiquement dans les cellules et ont des effets bénéfiques pour l'organisme. Ils sont impliqués dans la signalisation cellulaire et dans la phagocytose des bactéries [175]. Lorsque leur production n'est plus contrôlée, les radicaux libres ont des effets néfastes et attaquent les constituants cellulaires. Les cellules de l'organisme ont toujours un potentiel redox légèrement négatif qui doit être maintenu pour leur survie et les radicaux libres, principalement oxydants, augmentent ce potentiel redox intracellulaire, perturbant alors les mécanismes cellulaires [176].

Un antioxydant est une espèce qui empêche l'oxydation d'un substrat en capturant les radicaux libres et en réparant les dommages occasionnés par les radicaux libres. L'organisme possède des systèmes de défense enzymatique et non enzymatique permettant en situation physiologique de réguler la production des espèces réactives de l'oxygène [175].

➔ Système enzymatique endogène

o *Superoxyde dismutase (SOD)*

La SOD catalyse la réaction de dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène [174]. Il existe trois isoenzymes de SOD, la SOD à cuivre-zinc (SOD1) présente dans le cytosol, la SOD à manganèse (SOD2) dans les mitochondries et la SOD à cuivre-zinc (SOD3) extracellulaire [176]. Les superoxydes dismutases protègent les cellules de l'action délétère de $O_2^{\cdot-}$.

o *Catalase (CAT)*

La catalase, par son action peroxydase, réduit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Cette enzyme se trouve dans les peroxysomes de plusieurs tissus (foie, sang, moelle osseuse, reins) [174]. Elle détruit le H_2O_2 formé par les oxydases.

o *Glutathion peroxydase (GPx)*

La glutathion peroxydase est une enzyme contenant du sélénium qui réduit le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques. Il existe cinq isoenzymes de la GPx [172] pour protéger les lipides membranaires et l'hémoglobine de l'oxydation par les radicaux peroxydes.

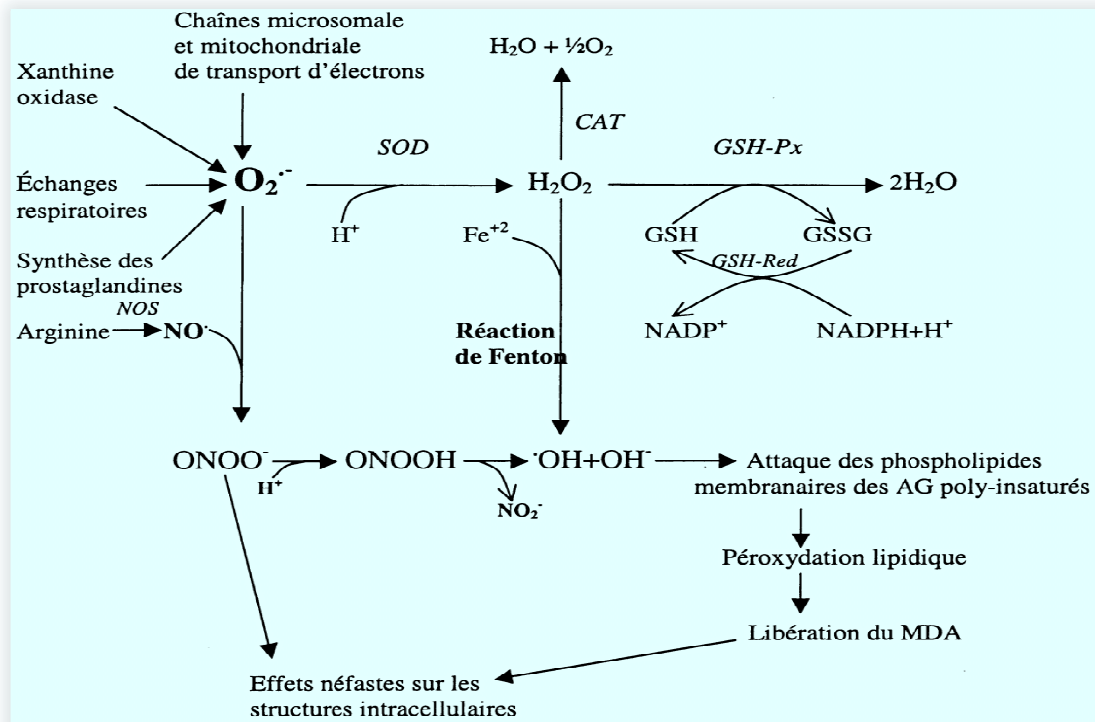


Figure 59: représentation du système de défense enzymatique anti-oxydant et de la peroxydation lipidique [184].

➔ Système non enzymatique endogène

Les principaux régulateurs du potentiel redox de la cellule sont le glutathion et la thiorédoxine, deux couples redox disulfure/dithiol.

o Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion forme un couple d'oxydoréduction GSSG/GSH (glutathion oxydé/glutathion réduit). La glutathion réductase permet de régénérer et de donc de maintenir des concentrations élevées de GSH. Le GSH neutralise deux types d'oxydants, le H_2O_2 et les peroxydes lipidiques [174].

o Thiorédoxine (TRx)

La thiorédoxine est un co-facteur protéique à groupement thiol, elle est impliquée dans la formation des ponts disulfures. Elle appartient à un couple d'oxydo-réduction, la forme oxydée étant régénérée sous sa forme réduite au cours d'une réaction catalysée par la thiorédoxine réductase. Elle possède une activité antioxydante intrinsèque, notamment sur les peroxydes lipidiques et le H_2O_2 [174].

➔ Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes, contrairement aux antioxydants endogènes, sont fournis à l'organisme par des apports extérieurs soit par l'alimentation soit par une supplémentation.

o Vitamine E (α -tocophérol)

La vitamine E est une vitamine liposoluble présente au sein des lipoprotéines et des membranes cellulaires. Elle neutralise l'oxygène singulet, le radical hydroxyle et les radicaux peroxydes [174]. C'est un antioxydant très puissant, elle agit en stoppant la propagation radicalaire.

o Vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C a une action antioxydante en piégeant les radicaux libres superoxyde, hydroxyle, peroxydes ainsi que le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet [174]. Enfin, elle permet la régénération de la vitamine E.

o Oligoéléments et β -carotène

D'autres systèmes antioxydants existent, notamment les oligoéléments et le β -carotène. Certains oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc participent aux processus de défense comme co-facteurs des enzymes antioxydantes (SOD et GPx)[173]. Le β -carotène est également antioxydant, il neutralise principalement l'oxygène singulet.

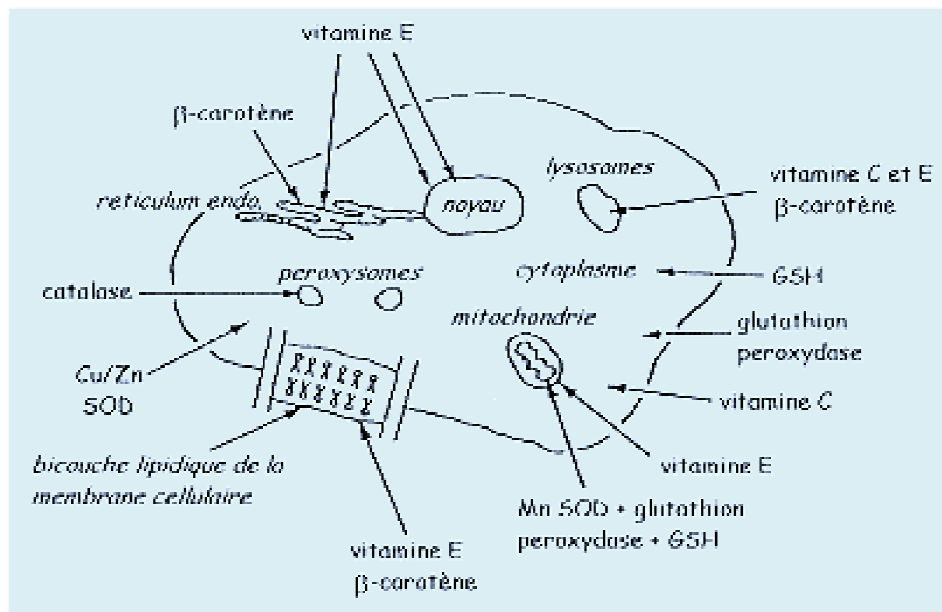


Figure 60: systèmes cellulaires de défense antioxydants[183].

II.1.1.6. Stress oxydant

Les radicaux libres sont formés en permanence dans l'organisme. Dans les tissus sains, les systèmes de défense antioxydants sont capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites physiologiquement. Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre d'une part, la production d'espèces réactives et d'autre part, les capacités antioxydantes des tissus de l'organisme. Ce déséquilibre est la conséquence d'une surproduction radicalaire et/ou d'une diminution des capacités antioxydantes de l'organisme. Le stress oxydant est responsable de l'oxydation de substrats biologiques et donc de dégâts cellulaires [175, 179].

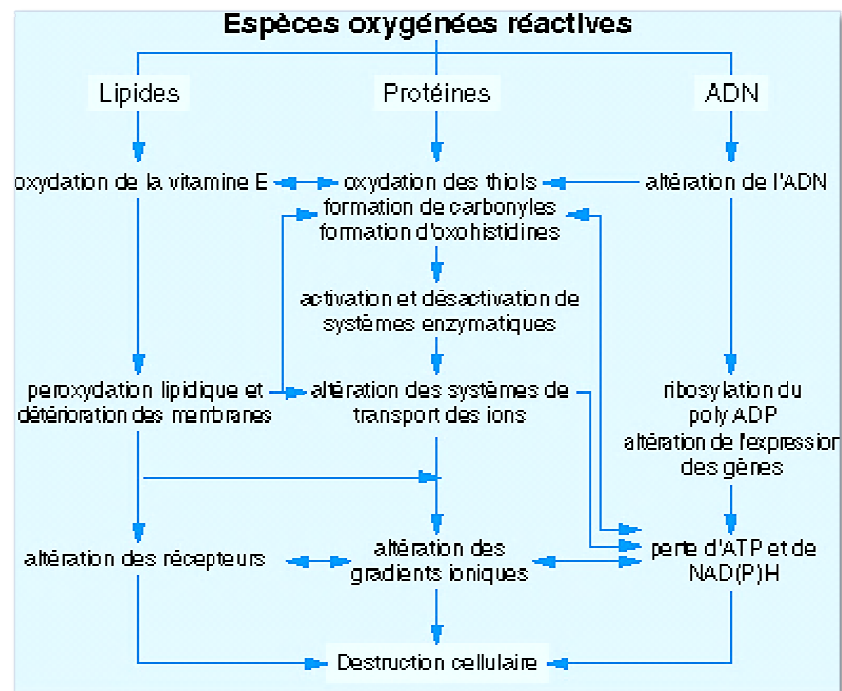


Figure 61: effets biologiques cellulaires des espèces réactives de l'oxygène [181].

L'oxydation des constituants cellulaires (protéines, lipides et ADN) participerait à diverses pathologies : cancers, maladies auto-immunes, maladies cardiovasculaires, dégénérescence neuronale... Les espèces oxydantes joueraient également un rôle dans le vieillissement [176].

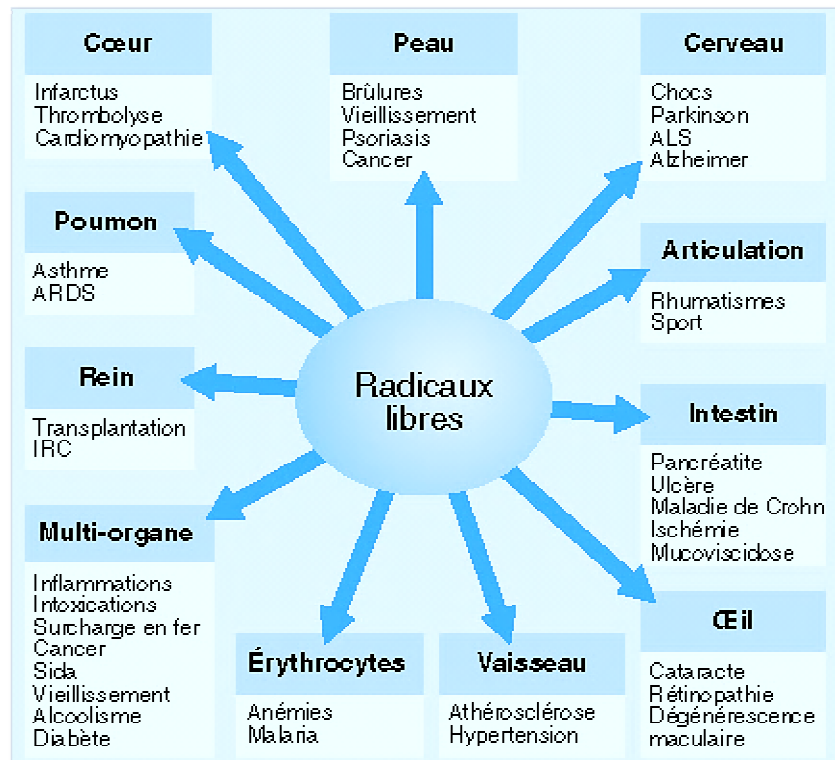


Figure 62: principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant (ARDS : syndrome de détresse respiratoire aiguë ; sida : syndrome d'immunodéficience acquise ; ALS : sclérose latérale amyotrophique) [182].

En conclusion, les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont produites physiologiquement pour réguler les fonctions cellulaires mais sont également très toxiques pour l'organisme en interagissant avec des substrats biologiques. Certains auteurs parlent de « paradoxe de l'oxygène » [175].

Le statut de stress oxydant peut être identifié par l'analyse des antioxydants sanguins et des dommages situés sur les lipides, les protéines et l'ADN.

Une alimentation équilibrée en fruits et en légumes permet un apport d'antioxydants. Lors d'une carence avérée, une supplémentation à l'aide d'un complément alimentaire riche en antioxydants peut être envisagée.

II.2. Mécanisme d'action antioxydant du bacopa

En 1996, une équipe indienne a étudié *in vitro*, sur homogénat de foie de rats, les effets des extraits éthanolique et hexanique de plante entière de bacopa sur la peroxydation lipidique induite par le sulfate ferreux (FeSO_4) et l'hydroperoxyde de cumène[185]. Les deux extraits ont permis une diminution de la lipoperoxydation (évaluée par le dosage des TBARS) mais la fraction alcoolique a permis une bien meilleure protection contre les deux agents lipoperoxydants. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux d'antioxydants connus : la vitamine C, la vitamine E, l'EDTA (éthylène diamine tétra acétate, un chélateur métallique) et le Tris (2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol, tampon ayant une affinité pour les hydroxyles). Il apparaît que l'extrait éthanolique de bacopa, la vitamine E et l'EDTA ont permis une diminution dose-dépendante des TBARS et que 100 μg de l'extrait est équivalent à 247 μg d'EDTA et à 58 μg de vitamine E. Quant à lui, le Tris n'a permis aucune inhibition de la peroxydation lipidique. D'autre part, l'étude du contenu hépatique en glutathion réduit (GSH) a montré que de faibles doses de l'extrait éthanolique offraient une protection contre l'oxydation du GSH provoquée par le FeSO_4 , mais que cet extrait n'avait qu'un rôle protecteur modéré vis-à-vis de l'auto-oxydation (oxydation à l'air) du glutathion. **On ne peut pas dire à la lecture de ces résultats si le bacopa agit notamment comme la vitamine E en tant que « casseur » ou « briseur » de chaîne interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation (et qui pourrait expliquer l'échec du bacopa à inhiber l'auto-oxydation des lipides), ou s'il agit plutôt comme l'EDTA, au stade initial de la réaction en chaîne induite par les radicaux libres, par une chélation métallique. Rien n'exclut un mode d'action mixte.**

Une étude de 2007 a comparé le pouvoir anti-radicalaire d'une poudre de feuilles de bacopa à celui de 10 autres espèces végétales utilisées en médecine ayurvédique, en termes d'activité de piégeage des radicaux libres $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ et DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl), d'inhibition de la peroxydation lipidique par le dosage du malondialdéhyde en présence d'acide thiobarbiturique, et d'activité antioxydante totale par la capacité à réduire le molybdène Mo(VI) en Mo(V) [186]. Les résultats concernant le *Bacopa monnieri* et une autre espèce végétale, *Centella asiatica*, sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17: comparaison de l'activité *in vitro* de piégeage des radicaux libres ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ et DPPH) et d'inhibition de la peroxydation des lipides des poudres de feuilles de *Bacopa monnieri* et de *Centella asiatica*. CI_{50} signifie la concentration nécessaire pour piéger 50 % des radicaux libres ou pour inhiber à hauteur de 50 % la peroxydation lipidique(résultats compilés d'après [186]).

Espèce	Piégeage des radicaux libres (CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$)			Inhibition de la peroxydation lipidique(CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$)
	Radical $\cdot\text{OH}$	Radical $\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical DPPH	
<i>Bacopa monnieri</i>	721	204	191	345
<i>Centella asiatica</i>	877	225	61,4	608

L'activité antioxydante totale retrouvée pour le bacopa est de 26,1 $\mu\text{g/mg}$ de drogue sèche en équivalent acide gallique, et de 91,0 $\mu\text{g/mg}$ de drogue sèche en équivalent acide ascorbique. **Cette étude montre une capacité significative du bacopa à piéger les espèces radicalaires dans les différents systèmes expérimentaux étudiés et à s'opposer à la production de malondialdéhyde (TBARS) et donc à la peroxydation des lipides.** Aucune corrélation n'a été retrouvée entre d'une part, le contenu en phénol total (118 $\mu\text{g/mg}$ en équivalent acide gallique) et en flavonoïdes (1,83 $\mu\text{g/mg}$ en équivalent acide ascorbique) et d'autre part, l'activité antioxydante.

L'équipe de Pawar et *al.* a réalisé un test de réduction au bleu de nitrotétrazolium (NBT) à partir de polynucléaires neutrophiles pour évaluer l'effet d'inhibition de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ d'un extrait hydro-alcoolique de plante entière de bacopa[187]. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux de deux standards de référence, la quercétine et l'acide ascorbique. Pour rappel, après la phagocytose d'une bactérie par un polynucléaire, celle-ci va notamment être détruite par des radicaux libres oxygénés, dont les superoxydes[139]. Le NBT est une substance jaune clair, hydrosoluble qui se transforme après réduction en une substance bleu foncé (le bleu de formazan). C'est ainsi que l'équipe a mis en évidence un effet inhibiteur de l'extrait de bacopa sur l'anion $\text{O}_2^{\cdot-}$ et, qu'après fractionnement chromatographique, cet effet a surtout été attribué à un composé présent dans la fraction butanolique de l'extrait : le bacoside A_3 . Pour des concentrations de 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de bacoside A_3 , les pourcentages d'inhibition de la réduction du NBT ont été respectivement de 83 %, 91.66 %, 91.66 % et 85 %, ce qui en fait un puissant inhibiteur des superoxydes. **Avec une CI_{50} de 10,22 $\mu\text{g/ml}$ le bacoside A_3 apparaît comme environ 11 fois plus puissant que la quercétine ($\text{CI}_{50} = 111$**

µg/ml) et environ 1.4 fois plus puissant que la vitamine C (CI₅₀ = 14 µg/ml). Les autres saponosides sont en comparaison moins puissants.

Quelques années plus tard, lors de l'isolement et de la caractérisation de deux nouveaux bacosides par cette même équipe, les bacosides A₄ et A₅, aucune activité significative n'a été observée au test de réduction du NBT comparativement à l'activité du bacoside A₃ et des standards, vitamine C et quercétine [120]. Une faible activité a tout de même été retrouvée pour les bacosides A₄ et A₅ au test de chimioluminescence au luminol (test LCL pour *luminol-enhanced chemiluminescence*) ; le luminol étant une sonde dite lucigénique à savoir qu'elle produit de la lumière notamment en présence de peroxydes [182]. **Le type de sucre et/ou leur nombre et/ou leur position sur la génine pourrait donc contribuer à l'activité biologique d'un saponoside donné.**

Une expérimentation sur des rats, conduite par Bhattacharya *et al.* en 2000, a évalué l'effet d'un extrait standardisé enrichi en bacoside A (82 ± 0,5 %) sur les activités de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GPx) au niveau de différentes régions cérébrales : le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe [188]. L'extrait de bacopa a été administré par voie orale à des doses allant de 5 à 10 mg/kg/j pendant 7, 14 ou 21 jours et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le déprényl, un IMAO-B (inhibiteur sélectif de la monoamine oxydase de type B), administré à raison de 2 mg/kg/j *per os* pendant la même période. L'extrait de bacopa a induit une augmentation significative et dose-dépendante de l'activité des trois enzymes antioxydantes dans toutes les zones du cerveau étudiées après 14 ou 21 jours de traitement. En comparaison, le déprényl a seulement permis une augmentation de l'activité de SOD, CAT et GPx après 14 ou 21 jours de traitement au niveau du cortex frontal et du striatum, mais pas au niveau hippocampique. **L'extrait de bacopa apparaît donc comme un puissant inducteur des enzymes de défense antioxydantes au niveau du cerveau de rat. En revanche, l'induction des défenses antioxydantes enzymatiques n'est retrouvée comme statistiquement significative qu'à partir de J14, comme si les mécanismes qui sous-tendaient cette induction enzymatique demandaient un certain délai pour se mettre en place, expliquant ainsi ce retard à l'induction. Cet élément est à prendre en compte en vue d'une utilisation du bacopa en tant que thérapeutique antioxydante.**

L'équipe de Russo *et al.* a étudié la capacité d'un extrait méthanolique de plante entière de bacopa à piéger les radicaux libres, et son effet protecteur vis-à-vis des dommages induits sur

l'ADN [189]. Le bacopa a montré un effet dose-dépendant de piégeage des anions superoxydes $O_2^{\cdot -}$ et 25 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait de bacopa est équivalent en terme d'effet à 80 mUI/ml de SOD. Une activité dose-dépendante de neutralisation du radical DPPH a également été observée et 400 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait de bacopa est équivalent à 30 μM de Trolox (analogue structural de la vitamine E). L'intérêt de l'utilisation de ce test d'extinction du DPPH (disparition d'une bande d'absorption, violette) réside dans le fait que ce dernier est un radical libre stable et qu'il permet de connaître la réactivité d'un composé en sa présence, indépendamment de toute activité enzymatique. **Les propriétés anti-radicalaires du bacopa ont également été confirmées par la protection contre les dommages provoqués sur un plasmide par les radicaux libres $\cdot\text{OH}$.** Alors que les plasmides (ADN circulaire double-brin avec super-enroulement de la double hélice), en présence de radicaux libres, sont transformés en des formes circulaires ouvertes et des formes linéaires (correspondant respectivement à une scission simple-brin et double-brin de l'ADN), l'extrait a totalement supprimé la formation d'ADN linéaire et a permis une récupération partielle de la forme circulaire super-enroulée. En comparaison, le Trolox[®] et la vitamine C ont seulement empêché la formation de la forme linéaire (cf. figure 63).

Sur culture cellulaire de fibroblastes humains non immortalisés, le bacopa a permis d'atténuer de manière significative et dose-dépendante la cytotoxicité induite par H_2O_2 . En effet, la croissance cellulaire a été maintenue à un taux normal, le pourcentage d'altérations génomiques a été considérablement diminué (test Comète) et la sécrétion de LDH (lactate déshydrogénase) hors des fibroblastes a été significativement réduite [189]. Pour rappel, la LDH est une enzyme cytosolique qui peut être retrouvée dans le milieu extracellulaire lorsqu'il y a perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique, notamment quand il y a peroxydation des phospholipides membranaires par des espèces radicalaires. L'activité cytoprotectrice de l'extrait à 25 $\mu\text{g/ml}$ correspondrait à celle de 100 μM de Trolox[®]. Fait intéressant, l'extrait méthanolique de bacopa n'est par lui-même pas cytotoxique (à 12 et 25 $\mu\text{g/ml}$).



Figure 63: électrophorèse sur gel d'agarose montrant l'effet protecteur d'un extrait de bacopa contre la coupure simple-brin (forme ouverte circulaire OC) et double-brin (forme ouverte linéaire LIN) d'un plasmide ADN circulaire double-brin super-enroulé (SC) provoquée par les radicaux libres $\cdot\text{OH}$. Tracé 1 = plasmide non traité (contrôle), tracé 2 = H_2O_2 seul, tracé 3 = bacopa + H_2O_2 , tracé 4 = Trolox® + H_2O_2 et tracé 5 = acide ascorbique + H_2O_2 [189].

Devant certaines preuves de l'implication pathogénique potentielle, notamment dans le cas de maladies neurodégénératives, de fortes concentrations de monoxyde d'azote générées par les astrocytes activés, l'équipe de Russo A. et *al.* a voulu examiner l'effet d'un extrait méthanolique de la plante entière de bacopa sur la toxicité induite par un donneur de NO, la S-nitroso-N-acétyl-pénicillamine (SNAP) sur culture cellulaire d'astrocytes purifiés de rats [190]. Les astrocytes, *in vivo*, réalisent un soutien mécanique pour les neurones et permettent le maintien de leurs fonctions métaboliques. Aussi, après 18 heures de traitement, la SNAP a provoqué une augmentation dose-dépendante des espèces oxydantes intracellulaires, comme le démontre l'oxydation d'un marqueur à base de fluorescéine. La SNAP a également causé une fragmentation de l'ADN génomique (test Comète) mais sans induire de rupture de la membrane cellulaire (absence de relargage de LDH).

L'extrait de bacopa (aux doses de 3, 6 et 12 $\mu\text{g/ml}$) additionné aux cellules traitées par la SNAP a inhibé de manière dose-dépendante la formation des espèces réactives intracellulaires (cf. figure 64) et ainsi prévenu les dommages induits sur l'ADN. L'étude révèle aussi l'absence d'effet du bacopa *per se* (en l'absence de SNAP) sur culture d'astrocytes. **Ces données prises ensemble suggèrent que cet extrait méthanolique de bacopa pourrait jouer un rôle dans la prise en charge de pathologies neurologiques. D'autre part, elles supporteraient certaines utilisations traditionnelles du bacopa.**

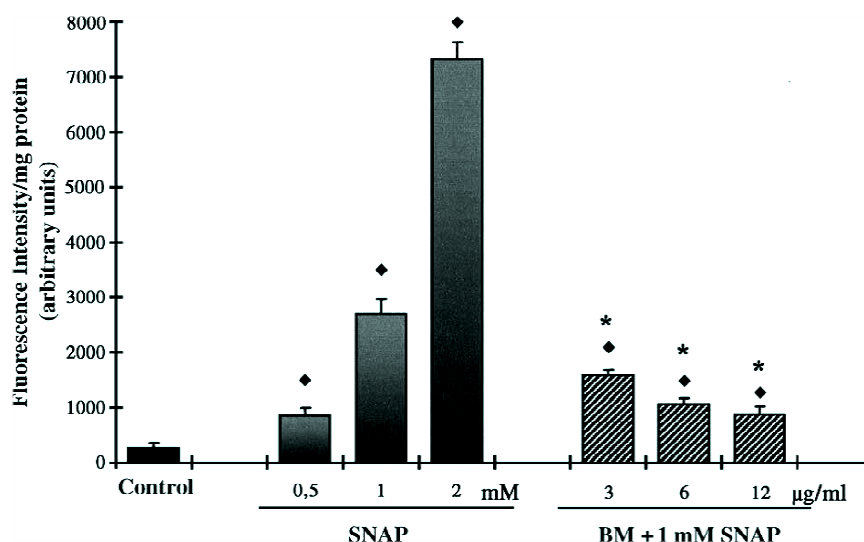


Figure 64: intensité de la fluorescence (proportionnelle au taux d'oxydants intracellulaires par réaction de ceux-ci avec un dérivé de fluorescéine) au niveau des astrocytes purifiés de rats, des groupes contrôle, SNAP (0,5, 1 et 2 mM) et BM (extrait de bacopa à 3, 6 et 12 µg/ml) + SNAP 1mM. ♦ = différence significative *versus* contrôle et * = différence significative *versus* SNAP 1 mM [190].

En 2011, une expérimentation animale conduite par G.K. Shinomol a évalué la capacité du bacopa à moduler le stress oxydant au niveau du cerveau de souris prépubères âgées de 4 semaines. Cette étude renvoie en fait à une double interrogation :

- si l'apport alimentaire à court terme de bacopa peut diminuer significativement le taux des marqueurs endogènes d'un stress oxydant, cytoplasmiques et mitochondriaux, dans différentes régions du cerveau de souris prépubères (cortex frontal, striatum, cervelet et hippocampe) et,
- si la supplémentation en bacopa confère un quelconque avantage suite à l'exposition des synaptosomes (terminaisons nerveuses pré-synaptiques isolées) à un neurotoxique exogène, l'acide 3-nitropropionique [191].

Les souris dont la nourriture a été supplémentée à hauteur de 0,5 % ou 1 % avec une poudre de feuilles de bacopa pendant 4 semaines ont montré une diminution significative des taux basaux des marqueurs oxydants (génération de ROS, taux de MDA, taux d'hydroperoxydes, taux de carbonylation des protéines) à la fois dans le cytoplasme et les mitochondries, et dans toutes les régions cérébrales étudiées. Ceci s'est accompagné d'une augmentation des taux de GSH et du contenu en groupement thiol (thiol total et thiol non protéique), ainsi que d'une

augmentation des activités des enzymes antioxydantes, CAT, SOD et GPx. L'étude *in vitro* s'est terminée par la mise en évidence d'une réduction significative de l'activité de l'acétylcholinestérase dans toutes les aires cérébrales des souris supplémentées en bacopa. Les résultats s'entendent bien évidemment comparativement à un groupe contrôle, à savoir des souris prépubères dont l'alimentation n'a pas été enrichie avec de la poudre de bacopa. L'étude *ex vivo* d'exposition des synaptosomes à des doses croissantes d'acide 3-nitropropionique confirme ces résultats : ceux isolés du groupe contrôle présentent une augmentation significative et dose-dépendante de la peroxydation lipidique et de la génération de ROS alors que ceux provenant des souris préalablement supplémentées en bacopa ne montrent qu'une induction marginale à la plus forte dose testée d'acide 3-nitropropionique. **Toutes ces données indiquent clairement le potentiel du bacopa à moduler les marqueurs du stress oxydant au niveau du tissu cérébral des souris.**

Bien d'autres travaux se sont intéressés aux propriétés anti-radicalaires du bacopa. Une équipe américaine a ainsi montré qu'un extrait éthanolique préparé à partir de feuilles de bacopa peut, à partir d'une certaine dose, inhiber l'activité de la lipoxygénase (LOX) [192]. En effet, l'ajout de 250 ou 500 µg d'extrait alcoolique de bacopa à un milieu contenant de l'enzyme LOX et de l'acide linoléique inhibe l'oxydation de ce dernier de respectivement 47 % et 60 % comparativement au contrôle [193]. D'autre part, l'extrait alcoolique de bacopa utilisé sur homogénat de cerveau de souris permet d'inhiber de manière dose-dépendante la génération de ROS induite par le t-butyrylhydroperoxyde et la peroxydation lipidique induite par le peroxyde d'hydrogène. Cet extrait de bacopa permet aussi une réduction dose-dépendante du fer ferreux(Fe^{++}) mettant en évidence les propriétés de chélation métallique du bacopa. Enfin, alors que l'extrait par lui-même ne manifeste aucune génotoxicité, il permet de protéger des plasmides en conformation super-enroulée (pBR322) des dommages oxydatifs.

II.3. Protection contre le stress oxydant

En 2009, des chercheurs indiens se sont intéressés aux propriétés neuroprotectrices du bacopa contre le stress oxydant et la neurotoxicité induits par la roténone chez la drosophile, *Drosophila melanogaster*, dite aussi « mouche du vinaigre » [194]. La drosophile est classiquement utilisée comme modèle expérimental pour étudier le développement et la

progression des maladies neurodégénératives, et notamment, pour comprendre les maladies à médiation sporadique comme la maladie de Parkinson. Ce sont ici des mouches mâles adultes dites de « souche K d'Oregon » qui sont utilisées. La roténone est un pesticide naturel, inhibiteur spécifique et de haute affinité de la NADH déshydrogénase (complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale). Etant très lipophile, elle passe aisément et rapidement la barrière hémato-encéphalique et s'accumule dans des organites comme les mitochondries où elle altère la phosphorylation oxydative. Il a été montré [195], *in vitro*, que la roténone induit l'apoptose, l'agrégation d' α -synucléine et d'ubiquitine, des dommages oxydatifs, une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques et des troubles comportementaux retrouvés dans la maladie de Parkinson, des inclusions cytoplasmiques similaires aux corps de Lewy, des dysfonctionnements locomoteurs sévères... Dans cette étude, les drosophiles dont la nourriture a été complétée avec une poudre titrée de bacopa ont montré une diminution significative des taux des marqueurs endogènes du stress oxydant (malondialdéhyde, hydroperoxyde) et une augmentation des taux de glutathion réduit. Le contenu en carbonyles des protéines n'a en revanche pas été modifié significativement. D'autre part, le bacopa a complètement protégé les mouches du stress oxydant induit par la roténone (500 μ M), y compris concernant le taux de carbonylation des protéines.

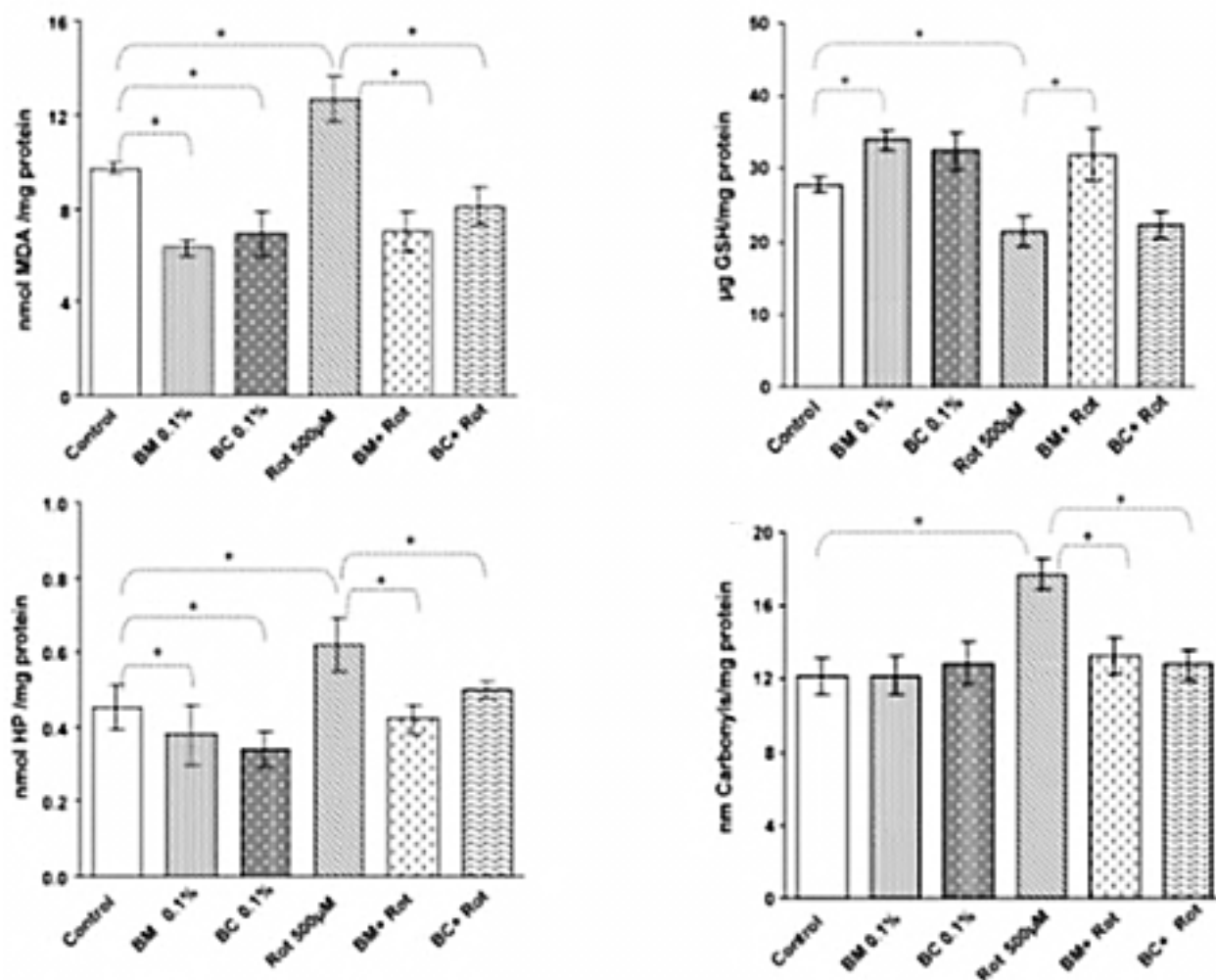


Figure 65: comparaison des taux de malondialdéhyde (MDA), de glutathion réduit (GSH), d'hydroperoxydes (HP) et de groupes carbonyles des protéines chez la drosophile, dans les groupes contrôle, BM (extrait de bacopa à 40 % de bacosides), BC (capsules de *Brahmi* achetées dans une officine indienne), roténone (Rot), BM + Rot et BC + Rot. * = $p < 0,05$ [194].

Le bacopa a également fortement inhibé la déplétion en dopamine induite par la roténone (inhibition de 33 % au niveau de la tête et de 44 % pour le corps) [194]. Les drosophiles traitées avec de la poudre de bacopa et exposées à la roténone ont montré une plus faible incidence de la mortalité (40-66 %) et ont obtenu de meilleures performances (40-65 %) à l'étude de géotaxie négative (la géotaxie est un changement d'orientation inné d'un animal, déclenché puis maintenu par la pesanteur ; dite négative quand le mouvement s'élève), suggérant le potentiel neuroprotecteur du bacopa. Un test de résistance au paraquat (herbicide

pro-oxydant hautement toxique) a également été réalisé et le bacopa a conféré une protection significative (43-54 %) contre le stress oxydant induit par ce toxique environnemental. **Bien que les mécanismes précis qui sous-tendent l'activité de neuroprotection du bacopa ne soient pas encore bien élucidés, les propriétés antioxydantes du bacopa pourraient, partiellement ou totalement, l'expliquer.**

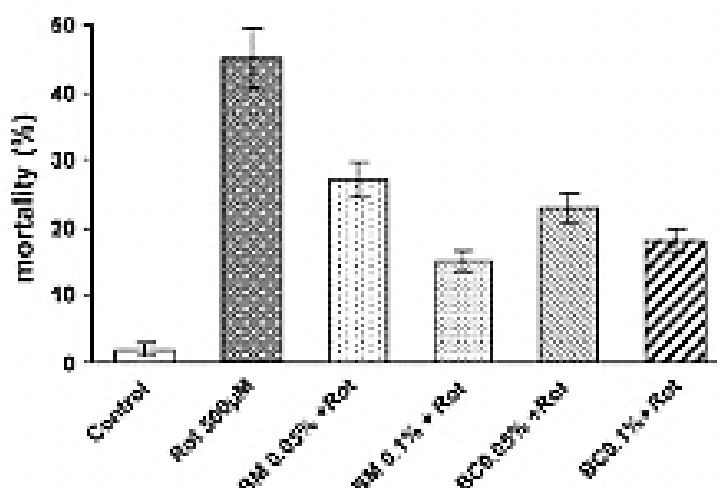


Figure 66: incidence de la mortalité (%) des drosophiles dans les différents groupes étudiés [194].

Cette même équipe a, en 2010, évalué les effets d'un traitement prophylactique à base de poudre de feuilles de bacopa contre la létalité, les perturbations oxydatives et les altérations des fonctions mitochondriales provoquées par la paraquat chez la drosophile [196]. La neurotoxicité du paraquat, ou dichlorure de 1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium, est connu pour être médiée *via* un stress oxydant, même si les mécanismes exacts restent non totalement élucidés. Il est considéré comme un facteur de risque dans le développement de la maladie de Parkinson, notamment en raison de sa similarité structurale avec la MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,4-tétrahydropyridine), un agent inducteur de parkinsonisme bien connu. Dans cette étude, l'exposition des mouches mâles adultes au paraquat seul (40 mM dans 5 % de sucrose) a provoqué une mortalité de 50 % à 48 heures. **Le traitement prophylactique pendant 7 jours avec la poudre titrée de bacopa (40 % environ de bacosides) a permis**

une protection significative, de l'ordre de 40 %, contre la mortalité induite par le paraquat. De plus, les altérations oxydatives et les dysfonctions mitochondriales chez les drosophiles exposées au paraquat ont été suivies pendant 24 heures. Une induction significative du stress oxydant a été observée avec une augmentation des taux de malondialdéhyde et d'hydroperoxydes, mais également des activités des enzymes antioxydantes (SOD et CAT). Quant aux altérations mitochondriales, elles se manifestent par une réduction significative des activités des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le prétraitement avec le bacopa a offert une protection contre le stress oxydant induit par le paraquat et a permis de restaurer les activités des enzymes de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, suggérant clairement son effet spécifique sur les mitochondries. **Bien que le mécanisme d'action précis du bacopa nécessite d'autres investigations, ces données démontrent sa capacité à moduler positivement les marqueurs endogènes d'un stress oxydant induit par le paraquat chez la drosophile ; et cela semble largement dû à son potentiel antioxydant.**

Alors qu'il apparaît évident que la neurotoxicité de l'aluminium et de ses sels est associée, au moins en partie, à un stress oxydant [197], Jyoti *et al.* ont étudié, en 2006, l'action neuroprotectrice d'un extrait éthanolique de bacopa contre les changements induits dans l'hippocampe de rats par le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) [198]. La peroxydation des lipides (dosage des TBARS), l'oxydation des protéines (estimation du contenu carbonyle des protéines) et l'activité de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD) ont été évaluées. Les effets sur l'accumulation de lipofuscine (pigment chromolipoïde brunâtre formant des amas cellulaires et qui sont des corps résiduels lysosomiaux) et les changements ultrastructuraux observés au niveau de l'aire CA1 hippocampique ont également été étudiés. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux du L-déprényl (IMAO-B utilisé dans la prise en charge de la maladie de Parkinson, dit aussi sélégiline en D.C.I.) administré à la dose de 1 mg/kg/j en intrapéritonéal (i.p.) car plus efficace que par voie orale. L'homogénat de l'hippocampe des rats ayant reçu pendant 5 semaines du chlorure d'aluminium (50 mg/kg/j *per os*, dans leur eau potable) ont montré une augmentation significative de la peroxydation lipidique et de la carbonylation des protéines et une diminution de l'activité de la SOD, comparativement au groupe contrôle n'ayant reçu que de l'eau. La co-administration de l'extrait titré de bacopa (40 mg/kg/j, *per os*) pendant la même période a permis de prévenir efficacement l'oxydation des lipides et des protéines, ainsi que la dépression de l'activité de la SOD. Ces résultats ont été confirmés au niveau microscopique. En effet, le bacopa a inhibé

l'accumulation intraneuronale de lipofuscine et les changements morphologiques (altérations nécrotiques, modifications de la chromatine, inclusions vésiculaires...) induits par l'aluminium dans l'hippocampe. Ceci suggère le potentiel antioxydant du bacopa et sa capacité à s'opposer à la neurotoxicité de l'aluminium. L'extrait éthanolique utilisé contenant une forte proportion de bacosides (55-60 %), la neuroprotection observée pourrait être due aux bacosides contenus dans l'extrait. Les observations ont aussi montré que les effets neuroprotecteurs du bacopa étaient comparables à ceux de la sélégiline tant au niveau biochimique que microscopique. Cette même équipe de chercheurs a réalisé une étude complémentaire [199] et a rapporté des effets protecteurs du bacopa contre la toxicité induite par l'aluminium au niveau cette fois du cortex cérébral, toujours chez le rat. **Le bacopa a permis de neutraliser la neurotoxicité de l'aluminium en manifestant une puissante activité antioxydante, en inhibant la lipofuscinogenèse neuronale et en permettant de préserver l'ultrastructure cellulaire corticale, de manière comparable à la sélégiline.**

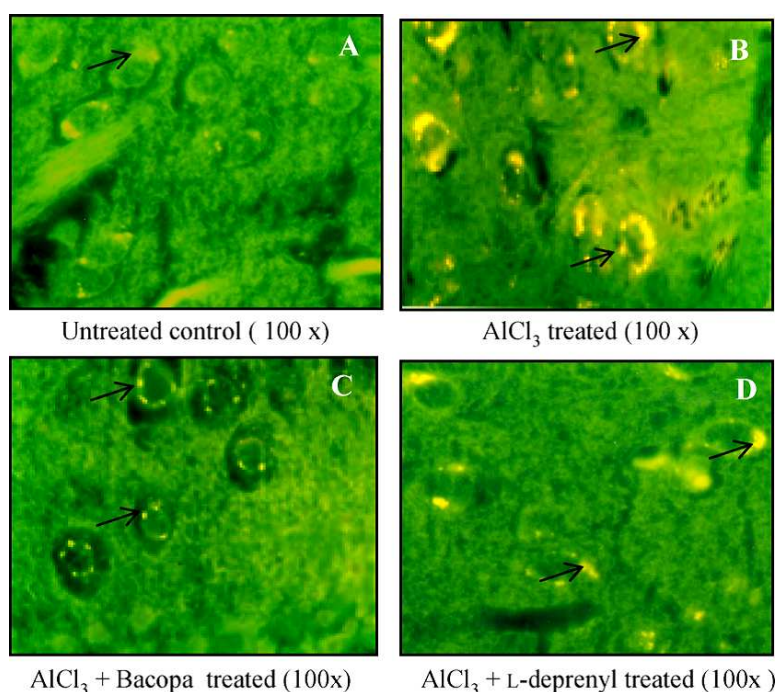


Figure 67: microscopie à fluorescence (grossissement $\times 100$) représentant les granules de lipofuscine des cellules corticales cérébrales de rats des groupes contrôle (A), AlCl₃ (B), AlCl₃ + bacopa (C) et AlCl₃ + déprényl (D) [199].

Ainsi, le bacopa et la sélégiline préviennent la neurotoxicité de l'aluminium au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral, et peut-être aussi dans d'autres régions non encore explorées. La sélégiline est un neuroprotecteur et antioxydant connu dont on pense qu'elle exerce des effets « anti-âge » et notamment qu'elle peut prolonger l'espérance de vie [200]. **Toutes ces données prises ensemble font du bacopa une potentielle drogue anti-vieillessement. Enfin, sachant que les dommages oxydatifs observés au niveau de l'hippocampe et du cortex durant le vieillissement et le stress oxydant peuvent être à l'origine de déficits cognitifs [201] et, que ces régions cérébrales sont sensibles aux effets du bacopa, alors, le bacopa pourrait être utile dans l'amélioration des processus cognitifs altérés au cours du vieillissement et du stress oxydant. Ceci devrait ouvrir la voie à des investigations futures.**

Une équipe de chercheurs s'est intéressé aux effets neuroprotecteurs d'un extrait éthanolique de bacopa chez des souris dont on a provoqué un stress oxydant par administration sous-cutanée quotidienne de D-galactose (0,5 ml à 5 %, par jour) pendant 15 jours [202]. Les auteurs présentent cette étude comme un modèle expérimental de vieillissement induit ; le D-galactose, sucre réducteur, provoque la formation d'AGEs (*Advanced Glycation End products* ou produits de glycation avancée) c'est-à-dire les produits issus des réactions non enzymatiques d'oses simples sur les acides aminés des protéines [203]. L'accumulation de ces AGEs peut provoquer des altérations des protéines et conduire à des dysfonctionnements biologiques. Les effets des AGEs sont surtout relayés par l'activation de récepteurs spécifiques, les RAGE (récepteurs des AGEs), qui provoquent l'induction d'un stress inflammatoire et oxydant par la formation de radicaux libres et de certains médiateurs comme le TNF α et le VEGF. Il est donc légitime de vouloir développer des stratégies ciblant la production ou la destruction des AGEs. Aussi, dans cette expérimentation, le D-galactose a provoqué une augmentation hautement significative du taux de peroxydation des lipides au niveau de différentes régions du cerveau, ainsi qu'une diminution, également significative de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx), comparativement aux souris du groupe contrôle (ayant reçu de l'eau distillée). Au contraire, le traitement avec l'extrait éthanolique de bacopa, à raison de 40 mg/kg de poids corporel/jour, a permis une diminution de la lipoperoxydation et une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, comparativement aux souris n'ayant reçu que du D-galactose.

De façon similaire, d'autres travaux se sont portés sur les effets protecteurs potentiels d'une administration de bacopa contre le stress oxydant et le vieillissement prématuré induit par du

D-galactose. Ainsi, alors qu'une administration sous-cutanée quotidienne de D-galactose 0,5 % (0,5 ml/jour) pendant 20 jours chez des souris mâles provoque une augmentation de la peroxydation des lipides et des dépôts de lipofuscine au niveau de la prostate, le traitement avec un extrait éthanolique de bacopa permet au contraire de prévenir la peroxydation lipidique et la lipofuscinogénèse. Le bacopa offre donc un effet protecteur contre le vieillissement cellulaire prématuré et les altérations oxydatives provoquées par du D-galactose au niveau de la prostate, chez la souris [204]. Une autre étude s'est intéressée à l'effet antioxydant d'un extrait éthanolique de bacopa sur les taux de phospholipides au niveau des organes reproducteurs mâles (testicules et épидидymes) subissant un stress oxydant provoqué là encore par l'administration de D-galactose, chez la souris [205]. L'importance de l'équilibre entre génération d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense endogènes antioxydants doit d'autant plus être soulignée au niveau des organes reproducteurs mâles en raison de leur richesse en phospholipides et donc de leur susceptibilité à la peroxydation lipidique. Et, les testicules et les épидидymes étant impliqués dans la régulation de la spermatogénèse, la lipoperoxydation pourrait ainsi l'altérer. Les résultats montrent une diminution du contenu total en phospholipides et du taux de phosphate des phospholipides au niveau des testicules et épидидymes des souris traitées avec du D-galactose, indiquant justement une peroxydation lipidique augmentée. Les souris ayant reçu l'extrait de bacopa ne montrent en revanche aucune altération au niveau de leurs organes reproducteurs. **Le bacopa a donc offert une protection contre le stress oxydant induit par le D-galactose. Ces études sont en accord avec la théorie radicalaire du vieillissement émise en 1956 par Harman et selon laquelle le vieillissement est dû à une accumulation de lésions oxydatives qui finissent par perturber le bon fonctionnement cellulaire [206].**

II.4. Discussion

Les études *in vitro* et *in vivo* indiquent clairement que le bacopa est doué de propriétés antioxydantes. Même si son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé, ses effets semblent multiples. Les résultats des tests de laboratoire montrent qu'il est capable de piéger diverses espèces radicalaires ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, DPPH) [186] et probablement, de réaliser une chélation métallique (fer) [185, 192]. L'efficacité du bacopa est tout à fait comparable, voire supérieure, à celle d'antioxydants connus tels la vitamine C, la vitamine E et le Trolox[®], ou

encore la quercétine [185-187]. De plus, il apparaît efficace pour s'opposer à la génération d'espèces réactives de l'oxygène induite par divers agents pro-oxydants [185] et aux effets de ces ROS sur les substrats biologiques (lipides, protéines et ADN) [186, 189-192]. Cela se traduit expérimentalement par une diminution de la peroxydation des lipides, de la carbonylation des acides aminés des protéines et des altérations de l'ADN. En ce sens, le bacopa montre une réelle aptitude à diminuer les marqueurs biologiques d'un stress oxydant et donc à protéger les cellules des dommages oxydatifs. Il permet également de renforcer les défenses endogènes antioxydantes, enzymatiques et non enzymatiques. C'est, en effet, un puissant inducteur des enzymes antioxydantes que sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) [188] ; et il permet de restaurer ou de maintenir des taux normaux de glutathion sous sa forme réduite (GSH). Enfin, les expérimentations effectuées avec un donneur de monoxyde d'azote ont montré que cette plante semble pouvoir s'opposer aux effets délétères provoqués par de fortes concentrations de NO [190], en s'opposant au stress oxydant et nitrosant générés. Partant du principe que le stress oxydant est un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées et azotées d'une part, et les systèmes antioxydants endogènes et exogènes d'autre part, il n'est pas surprenant que chez l'animal, *in vivo*, le bacopa puisse s'opposer à l'action d'agents pourvoyeurs de radicaux libres comme les radiations gamma [207] ou les toxiques environnementaux, roténone [194] et paraquat [194, 196].

Du point de vue phytochimique, ce sont les extraits alcooliques de la plante qui supportent les activités de neutralisation des espèces réactives et de protection contre les dommages oxydatifs, et plus précisément, les fractions riches en bacosides (saponosides triterpéniques) [187], suggérant que ces composés sont à la base des effets antioxydants rapportés pour le bacopa. C'est même le bacoside A [188] qui a été le plus étudié car il est communément admis que ce mélange contient les composés majeurs de la plante en ce qui concerne son activité biologique.

Un chercheur, Harman (1956), a suggéré que les ROS produits par la respiration cellulaire en aérobiose provoquaient des dommages oxydatifs cumulatifs, responsables du vieillissement et de la mort de tout être vivant [206]. C'est la théorie radicalaire du vieillissement, théorie qui fait le bonheur des fabricants de compléments alimentaires contenant des substances antioxydantes et censés préserver notre jeunesse ! Le vieillissement n'est pas une maladie mais un processus physiologique, et ses causes sont complexes et font toujours débat au sein de la communauté scientifique. Quoi qu'il en soit, la diminution de la mortalité induite par la

roténone [194] ou le paraquat [194, 196] chez la drosophile, ou la réduction, chez le rat, de marqueurs du vieillissement cellulaire comme les dépôts neuronaux de lipofuscine [198], constituent pour certains des preuves du potentiel « anti-vieillesse » du bacopa [202, 204, 205]. En réalité, le bacopa ne constitue peut-être pas une fontaine de Jouvence mais il se pourrait qu'en améliorant le statut antioxydant global d'un individu, il puisse diminuer sa susceptibilité à développer diverses maladies liées au vieillissement. De façon similaire, connaissant l'implication pathogénique du stress oxydant dans nombre de pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires ischémiques, dégénérescence neuronale, maladies immunitaires et inflammatoires...), l'on pourrait formuler, à ce stade de notre exposé, le postulat selon lequel le *Bacopa monnieri* peut être efficace dans la prévention de certaines maladies par la réduction de leur composante « oxydative ».

Concernant l'utilité réelle d'une supplémentation antioxydante avec du bacopa et ses bienfaits pour la santé, de nombreuses études, notamment la grande étude épidémiologique française Suvimax [208] (supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants), ont montré des effets bénéfiques ou au contraire délétères d'une supplémentation antioxydante, en fonction des doses utilisées, du statut antioxydant initial et de l'existence de facteurs de risque de cancer. Ainsi, l'apport supplémentaire d'antioxydants à doses nutritionnelles serait bénéfique chez un individu déficitaire ou carencé en antioxydants d'origine alimentaire et en l'absence de facteur de risque cancéreux comme le tabagisme. Après presque 8 ans de suivi, une réduction d'un tiers des cancers chez les hommes recevant une association d'antioxydants (6 mg de β -carotène, 120 mg de vitamine C, 30 mg de vitamine E, 20 mg de zinc et 100 μ g de sélénium) a été observée dans l'étude Suvimax. En revanche, chez un individu ayant une alimentation équilibrée et suffisamment riche en antioxydants (5 fruits et légumes par jour, des céréales complètes, des huiles végétales variées, etc.), une supplémentation antioxydante serait le plus souvent inutile ou pire, pourrait augmenter le risque de certains cancers (comme le cancer de la peau dans l'étude Suvimax). La plupart des antioxydants ont été rapportés comme étant toxiques et dangereux pour la santé humaine lorsqu'ils sont pris en trop grandes quantités sous forme de compléments alimentaires [209]. Pourtant, les consommateurs de ces produits sont généralement des personnes soucieuses de leur alimentation et il apparaît légitime de se questionner quant aux effets délétères potentiels qu'elles encourent. En conséquence, et en l'absence de données précises, il ne peut être exclu la possibilité d'une action duale des bacosides du bacopa (bénéfiques à dose recommandée et néfastes en apport excessif).

En conclusion, par rapport aux antioxydants les plus couramment rencontrés dans les compléments alimentaires consommés en France, tels la vitamine C, la vitamine E, les divers caroténoïdes et flavonoïdes, le sélénium... le bacopa pourrait, en théorie du moins, se révéler tout aussi efficace chez les personnes ayant une alimentation déséquilibrée, en l'absence de facteur de risque particulier, et dans le respect des posologies recommandées par le fabricant.

III. Propriétés

neuropsychopharmacologiques

III.1. Effets cognitifs et implications physiopathologiques

Dans l'Ayurvéda, le bacopa est décrit comme un fortifiant cérébral utilisé pour augmenter les capacités mentales telles la mémoire et la concentration. Il est également indiqué dans la folie, l'hystérie, l'épilepsie et diverses autres pathologies du système nerveux central. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à l'évaluation des effets neuropharmacologiques et comportementaux de cette plante.

III.1.1. Effets facilitateurs sur l'apprentissage et la mémoire

III.1.1.1. Pré-requis

Quelques définitions

L'apprentissage peut être défini comme le processus par lequel un animal ou un homme enregistre des éléments de son environnement, des informations, qui modifieront son comportement ultérieur. La mémoire proprement dite sera alors l'ensemble de ces éléments ou informations enregistrés dans le système nerveux [210].

L'apprentissage est donc un terme qui renvoie à un changement relativement permanent dans le comportement d'un organisme en réponse à une expérience, alors que le terme de mémoire renvoie à la capacité de se rappeler une expérience antérieure et implique donc une représentation mentale (dite trace mnésique) de l'expérience antérieure [211].

A ces concepts d'apprentissage et de mémoire, il convient d'en rajouter deux autres, moins connus sur le plan biologique mais dont l'importance reste cependant considérable : l'oubli et

le rappel. L'oubli est le fait que l'information enregistrée devient, au fil du temps, de moins en moins capable de provoquer un comportement donné. On est dans l'incapacité de dire aujourd'hui s'il résulte d'un « effacement » des informations, d'un « masquage » des informations (celles-ci restent présentes dans le cerveau mais ne parviennent plus à la conscience), ou de ces deux phénomènes. Le rappel est justement le retour à la conscience des informations, l'exemple le plus célèbre étant la madeleine de Proust.

L'évaluation comportementale animale : les techniques de conditionnement

Les techniques les plus largement utilisées pour étudier l'apprentissage et la mémoire sont celles dites de conditionnement, où l'acquisition d'une réponse par un animal et les facteurs qui influent sur cette réponse sont rigoureusement contrôlés par l'expérimentateur. On distingue deux types de conditionnement : le conditionnement classique (encore appelé conditionnement répondant ou pavlovien) et le conditionnement instrumental (encore appelé conditionnement opérant ou skinnérien).

Le principe du conditionnement pavlovien est très simple. Par exemple, l'expérimentateur propose de la nourriture à un rat et celui-ci va saliver. Un « stimulus inconditionnel » (la nourriture) a donc produit une réponse réflexe chez le rat (la salivation). Si maintenant on associe la présentation de la nourriture à un stimulus neutre comme l'émission d'un son et que l'on répète plusieurs fois l'opération, le rat se mettra finalement à saliver à l'émission du son, même en l'absence de nourriture. Le son est dit « stimulus conditionnel », c'est-à-dire capable de produire la réponse (la salivation). Tout stimulus conditionnel peut à son tour jouer le rôle de stimulus inconditionnel vis-à-vis d'un nouveau stimulus neutre, par exemple une lumière qui clignote : le rat apprendra à saliver à l'apparition de cette lumière, en l'absence de stimulus sonore, parce que le clignotement lumineux aura été associé plusieurs fois au son. Il s'agit d'un conditionnement secondaire. Certains disciples de Pavlov, comme Bechterew, ont poussé à l'extrême la pensée de leur maître et ont ainsi imaginé que tout apprentissage ne serait que le jeu de conditionnements successifs, comme emboîtés les uns dans les autres, les stimuli conditionnels devenant stimuli inconditionnels pour de nouveaux stimuli neutres, et ainsi de suite à l'infini. Il s'agit là d'une conception très rigide et fautive dans la mesure où de nombreux apprentissages n'obéissent pas aux règles des conditionnements pavloviens [210].

Dans le conditionnement skinnérien, l'animal doit effectuer une certaine réponse pour obtenir une récompense comme de la nourriture (et l'on parle de « renforcement positif ») ou pour éviter une punition, le plus souvent un choc électrique (l'on parle alors de « renforcement négatif ») [210]. La réponse à effectuer peut-être très variée et peut consister à appuyer sur un levier, parcourir un labyrinthe, changer de compartiment dans une boîte qui en comporte deux, etc. On peut citer deux techniques de conditionnement instrumental, « la boîte d'évitement » et « la piscine de Morris ». Dans la boîte d'évitement, l'animal doit quitter le compartiment dans lequel il se trouve et passer dans un autre pour éviter un choc électrique et ce, dès qu'il entend un signal sonore ou qu'il perçoit un signal lumineux. L'expérience créée par Richard Morris consiste quant à elle à placer l'animal dans un grand bassin dans lequel est immergée une plate-forme que l'animal ne peut voir. L'animal doit découvrir qu'il existe une échappatoire à cette situation, à savoir la plate-forme immergée qui peut lui permettre de s'extirper de l'eau. Les tâches peuvent bien évidemment être plus compliquées et il existe de nombreuses variantes à ces tests [211].

La principale différence entre ces deux types de conditionnements réside dans le fait que, dans le conditionnement répondant la réponse (salivation) est postérieure à la présentation du stimulus inconditionnel, alors que dans le conditionnement opérant la réponse comportementale précède l'obtention du renforcement (récompense ou punition).

A cette présentation des phénomènes de conditionnement, il faut adjoindre celle d'un phénomène qui leur est lié : l'extinction de la réponse. En effet, si une réponse n'est plus renforcée, ou, dans un conditionnement pavlovien, cesse d'être associée au stimulus inconditionnel, le stimulus conditionnel qui la déclenche perd peu à peu de son efficacité. Une telle disparition expérimentale de la réponse peut être comparée à l'oubli spontané que l'on connaît tous.

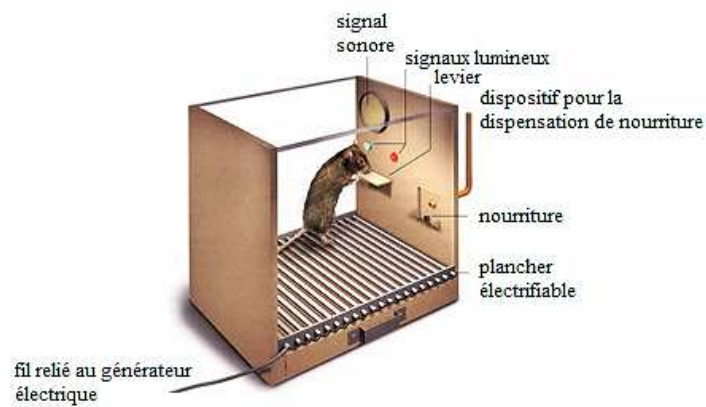


Figure68: représentation schématique d'une boîte de Skinner (modifiée d'après maketechnologies.com)



Figure 69 : boîte de Skinner (bioseb.com).



Figure 70 : labyrinthe en Y (med-associates.com).



Figure 71 : labyrinthe surélevé (bioprobeshk.com).

III.1.1.2. Effets pro-mnésiques

En 1982, H.K. Singh et B.N. Dhawan ont étudié l'effet d'un extrait éthanolique de bacopa sur l'acquisition, la consolidation et la rétention de trois réponses comportementales conditionnées chez des rats albinos [22] :

- un labyrinthe en Y où l'animal, pour éviter un choc électrique (renforcement négatif), doit aller dans la branche éclairée ;
- une épreuve où le rat doit apprendre à monter sur un poteau à l'émission d'un son (stimulus inconditionnel) sinon il recevra, 15 secondes après le son, un choc électrique (stimulus conditionnel) de 1,0 mA. Le but est ici que l'animal grimpe spontanément sur le poteau avant même l'émission du son (réponse conditionnée secondaire) ou sinon dès l'émission du son mais quoi qu'il en soit avant de recevoir la décharge électrique ;
- une épreuve de Sidman dite d'évitement continu dans laquelle le rat doit appuyer régulièrement sur un levier pour éviter un choc électrique. Et, s'il réduit trop son débit de réponse, il reçoit un choc électrique.

Les rats traités avec du bacopa (40 mg/kg tous les 3 jours, p.o.) ont obtenu de meilleures performances à ces trois épreuves, comparativement au groupe contrôle. **Il a été observé une meilleure acquisition des tâches conditionnées, des temps de réaction plus courts, mais aussi une meilleure rétention (ou consolidation) des nouveaux comportements appris et une diminution de leur extinction.** En revanche, les auteurs ont noté que l'effet facilitateur cognitif du bacopa ne durait pas plus de 3 jours à ce dosage.

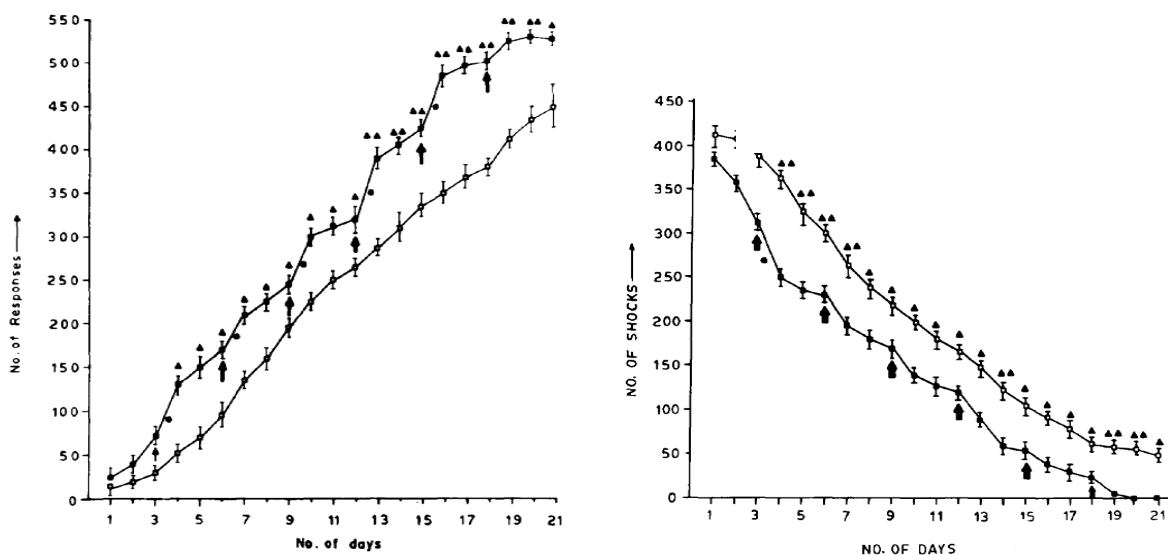


Figure 72: nombre de pressions sur le levier (graphe A) et nombre de chocs électriques (graphe B) des groupes bacopa (■) et contrôle (□) en fonction du temps durant l'épreuve de Sidman. Les flèches (↑) indiquent les jours d'administration d'une dose de maintien de bacopa. ▲ = $p < 0,01$ et ▲▲ = $p < 0,05$ entre les groupes bacopa et contrôle. * = $p < 0,05$ entre 1 dose de maintien et le jour suivant [22].

Quelques années plus tard, cette même équipe a démontré que l'effet cognitif était dû à 2 mélanges de saponosides actifs, les bacosides A et B, présents dans l'extrait éthanolique [212]. **Les bacosides A et B sont apparus comme des molécules prometteuses, permettant d'améliorer les capacités d'apprentissage et de mémorisation chez le rat.** Les bacosides A et B ont également inhibé les effets amnésiants de la scopolamine, des électrochocs et du stress lié à une immobilisation. Enfin, une augmentation de l'activité des protéines kinases et du contenu protéique dans l'hippocampe a été rapportée [213].

En 2007, une équipe de chercheurs indiens a évalué les propriétés nootropes (ou nootropiques) d'une composition phytochimique enrichie préparée à partir d'extraits titrés de bacopa, le Bacomind® (Natural Remedies Pvt. Ltd, Bangalore), et dont le contenu en constituants actifs est le suivant [214] :

- bacoside A₃ > 5 % m/m ;
- bacopaside I > 7 % m/m ;
- bacopaside II > 5,5 % m/m ;
- bacopasaponine C > 4,5 % m/m ;
- isomère du bacopasaponine C > 7,0 % m/m ;
- lutéoline > 0,2 % m/m ;
- apigénine > 0,1 % m/m ;
- β-sitostérol-D-glucoside > 0,3 % m/m.

Cette composition brevetée est également normalisée en ce qui concerne son activité biologique évaluée *in vitro* :

- inhibition de la lipoxycgénase : IC₅₀ < 600 µg/ml ;
- neutralisation du radical ABTS (acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) : IC₅₀ < 100 µg/ml ;
- neutralisation du radical DPPH : IC₅₀ < 200 µg/ml ;
- inhibition de la butyrylcholinestérase : IC₅₀ < 3000 µg/ml ;
- neutralisation des radicaux hydroxyles générés par l'AAPH (dichlorhydrate de 2,2'-azobis(2-amidinopropane)) > 750 µmol d'équivalent Trolox®/g, communément nommé test ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) ;

Pour rappel, les « nootropes » font partie des psychotropes qui, chez l'animal, améliorent les capacités d'apprentissage et la mémoire, et agissent contre leur détérioration. Ce terme

concerne actuellement un groupe de médicaments dotés de la propriété d'améliorer certains mécanismes cérébraux supposés en lien avec les performances mentales, tels l'acétyl-L-carnitine et le piracétam [215].

Le Bacomind® a été administré chez des souris pendant 7 jours (à des doses de 40, 60 et 80 mg/kg/j, p.o.) dans des épreuves de labyrinthe surélevé et d'évitement passif et, chez des rats durant la même période (à des doses de 27, 40 et 54 mg/kg/j, p.o.) dans un test de reconnaissance d'objets [214]. La scopolamine (0,3 mg/kg, en dose unique i.p.) a été utilisée pour induire une amnésie et le piracétam (100 mg/kg, en dose unique i.p.), nootrope prototypique, a été pris comme standard de référence. Le Bacomind® a amélioré significativement l'apprentissage et la rétention des informations chez les animaux normaux (sans scopolamine) dans tous les modèles testés, suggérant pour les auteurs son utilisation thérapeutique potentielle pour améliorer l'apprentissage et la mémoire de sujets sains. De plus, il a protégé les animaux des déficits induits par la scopolamine lors des différentes épreuves, mettant en évidence les effets anti-amnésiant et neuroprotecteur du Bacomind®. Dans cette étude, on peut noter une augmentation significative de l'indice de discrimination des objets chez les rats traités avec cette formulation originale et cela est en faveur d'une possible amélioration de la mémoire épisodique et donc de son utilité dans les troubles de la mémoire épisodique observés durant le vieillissement et aux stades initiaux de diverses pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer où il a été rapporté des altérations précoces de la mémoire à court terme. **En conclusion, sur la base des résultats de cette étude, il semble que le BacoMind® exerce une réelle activité nootrope en améliorant les processus d'acquisition et de rétention de la mémoire des rongeurs sains mais aussi de ceux souffrant de troubles cognitifs. Mais, il nous apparaît fortement souhaitable de valider ces effets chez l'homme avant toute revendication thérapeutique humaine.**

En 2009, le bacopa a été sélectionné par un groupe de chercheurs dans une étude dont le but premier était de concevoir une méthode alternative d'extraction à partir de matériel végétal, sans solvant, et utilisant une base lipidique hydrophile, le Gelucire®. De par sa composition (mono-, di- et triglycérides et mono- et diesters de polyéthylèneglycol), il est utilisé pour augmenter la solubilité de drogues faiblement hydrophiles, comme le bacoside A. Il existe en fait toute une gamme de Gelucire®, en fonction du point de fusion et de la balance hydrophile/lipophile ; c'est le Gelucire® 50/13 qui a été sélectionné. Afin de confirmer l'efficacité de l'extraction au Gelucire®, les auteurs ont donc comparé cet extrait lipidique à des extraits conventionnels, méthanolique et aqueux, à un extrait préparé à partir de beurre

clarifié et enfin au *ghrita* ayurvédique (cf. page 44) [216]. Cette comparaison s'est faite en termes de composition (CCMHP, chromatographie sur couche mince haute performance), de toxicité aiguë (administration de doses orales croissantes chez la souris et observation de la mortalité résultante à + 4 h et + 24 h), et surtout, d'activité nootrope. Les extraits méthanolique et lipidique et le *ghrita* ayurvédique contenaient respectivement 3,56 %, 4,10 % et 0,005 % de bacoside A. Une amélioration significative des performances des rats a été observée tant au niveau de la reconnaissance spatiale dans un labyrinthe en Y qu'au niveau de la réponse conditionnée d'évitement avec les extraits méthanolique et lipidique, en comparaison avec le *ghrita* ayurvédique. Les extraits méthanolique et lipidique ont également permis une meilleure récupération suite à l'amnésie provoquée par la scopolamine. Ainsi, alors que l'extrait lipidique contient un peu moins de bacoside A, il apparaît tout autant efficace dans l'amélioration des processus d'apprentissage et de mémorisation que l'extrait méthanolique. Le Gelucire® peut former des microémulsions au contact des fluides biologiques et peut-être a-t-il augmenté l'absorption gastro-intestinale des drogues, ou peut-être améliore-t-il la cinétique des drogues *in vivo* ou encore, parce qu'il permet d'extraire des composés à la fois hydrophiles et hydrophobes, des composés non extraits avec le méthanol ont pu l'être avec le Gelucire®. Des études complémentaires sont nécessaires pour pouvoir y répondre. Cette étude a de toute façon confirmé les propriétés nootropes du bacopa chez l'animal.

Jusqu'en 2010, aucun essai n'avait vraiment étudié l'influence de la dose et de la durée du traitement sur les effets nootropes du bacopa et pourtant, ces données précliniques sont primordiales avant toute utilisation thérapeutique. Et c'est ainsi qu'une étude indienne [217] a examiné les effets d'amélioration cognitive d'un extrait hydro-alcoolique titré de bacopa (10 % m/m de bacosides A et B), à différentes doses (20, 40 et 80 mg/kg/j *per os* dans 5% de gomme acacia) et pendant des durées de traitement de 2, 4 et 6 semaines. Les résultats ont montré qu'un traitement à faible dose (20 mg/kg/j) pendant 2 semaines ne permettait pas aux rats d'obtenir une amélioration significative (*versus* contrôle) de l'apprentissage spatial, ni même aux tests d'évitement passif. En revanche, l'augmentation des doses (40 et 80 mg/kg/j) a permis une augmentation statistiquement significative de leurs performances à toutes les épreuves et ce, quelle que soit la durée de traitement (y compris 2 semaines). De la même manière, l'augmentation de la durée de traitement (4 et 6 semaines) a permis une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire quelle que soit la dose utilisée (y compris 20 mg/kg/j). **En conclusion, la dose-seuil thérapeutique peut être fixée à 20 mg/kg/j p.o. pour un**

traitement de minimum 4 semaines, ou au minimum à 40 mg/kg/j p.o. pour un traitement de 2 semaines, chez le rat.

Des éléments nouveaux dans la compréhension de l'action centrale du bacopa ont été apportés par une étude indienne publiée en 2011 [218] et qui s'est surtout intéressée à l'interaction du bacopa avec le système sérotoninergique durant les différentes phases de l'apprentissage et de la mémorisation, notamment en évaluant l'expression génique de la tryptophane hydroxylase 2 (TPH2), une enzyme impliquée dans le métabolisme de la sérotonine (5-HT) et du transporteur assurant la clairance synaptique et extra-synaptique de la 5-HT (SERT, *serotonin transporter*) par PCR inverse (RT-PCR) semi-quantitative des ARNm, mais aussi par le dosage (ELISA) des neurotransmetteurs (5-HT, dopamine DA, acétylcholine ACh et glutamate Glu) [219]. Un extrait éthanolique de feuilles de *Bacopa monnieri* administré par voie orale chez de jeunes rats (40 mg/kg/j du 15^e au 29^e jour après leur naissance (PND-15-29 pour *postnatal day*) a permis d'améliorer leurs performances mnésiques dans des épreuves comportementales. Parallèlement, le taux de 5-HT a significativement augmenté alors que celui de DA a diminué. Il a été observé des variations non significatives des taux d'ACh et de Glu. D'autre part, le taux de 5-HT a augmenté jusqu'à PND-37 et il est revenu à un niveau normal à PND-53. Fait intéressant, il y a eu, de manière concomitante, une régulation positive de l'expression génique (évaluée au niveau transcriptionnel par la quantification des ARNm correspondants) de la TPH2 et de SERT pendant la période PND-29-37, et un retour aux valeurs initiales à PND-53. **Ces résultats suggèrent clairement que l'amélioration des capacités d'apprentissage et de la mémoire chez ces jeunes rats pourraient être due à l'activation, au renforcement, de la transmission sérotoninergique ; l'up-régulation de l'expression de TPH2 est en accord avec une possible augmentation de la synthèse de 5-HT et celle de SERT avec une possible augmentation du transport de 5-HT. A notre connaissance, c'est la première fois qu'il est fait état d'une amélioration du métabolisme et du transport de la 5-HT par le bacopa. Ce renforcement de la transmission sérotoninergique demande à être confirmé par d'autres investigations.**

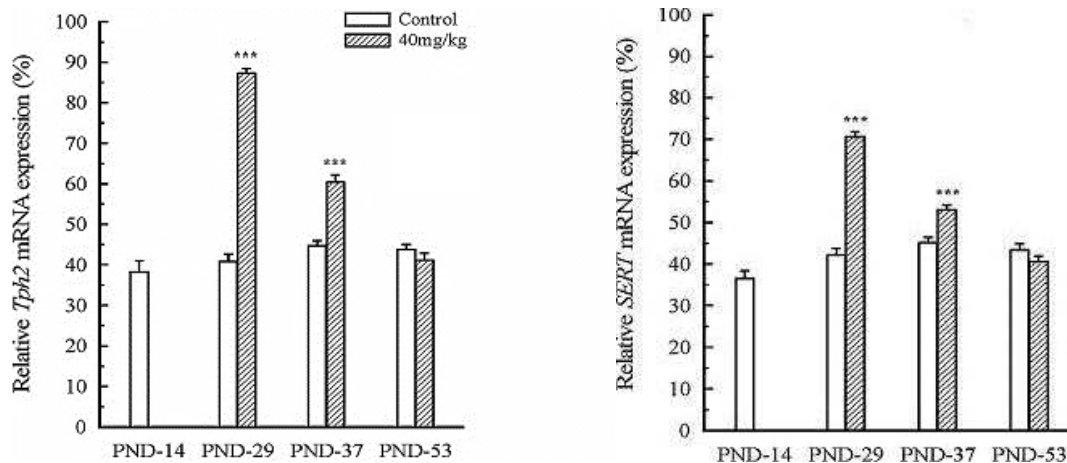


Figure 73: expression relative des ARNm (%) de TPH2 (graphe A) et SERT (graphe B) des groupes bacopa (40 mg/kg) et contrôle à PND-14, 29, 37 et 53. *** = $p < 0,001$ versus groupe contrôle [218].

En 2011, Vollola *et al.* ont étudié l'arborisation dendritique des neurones amygdaliens chez des rats nouveau-nés (âgés de 10 jours et donc en pleine période de maturation neuronale) ayant été gavés pendant 2, 4 et 6 semaines avec un extrait de bacopa à différentes doses (20, 40 et 80 mg/kg/j) [220]. Lors du développement du SNC (qui débute avant la naissance et se poursuit après), l'arborisation dendritique va permettre aux neurones qui viennent de se différencier de disposer de la surface nécessaire à l'établissement des contacts synaptiques [211]. En fait, le développement d'une dendrite comporte deux événements : la mise en place de l'arborisation dendritique (mise en place des branches) et la croissance des épines dendritiques. Les dendrites apparaissent d'abord sous la forme de petites protubérances qui se développent en donnant naissance à des branches. Les embranchements sont ensuite de plus en plus complexes, un peu comme les branches d'un arbre. L'amygdale est une région du cerveau impliquée dans les processus d'apprentissage et de la mémoire ; aussi, cette équipe indienne a étudié plus spécialement la morphologie dendritique des neurones amygdaliens, en termes de quantification des points d'embranchement (mesure de l'arborisation dendritique) et des intersections dendritiques (mesure de la longueur des dendrites). Comparativement aux rats n'ayant pas reçu de bacopa (groupe contrôle), la longueur des dendrites et les points d'embranchement dendritique apparaissant le long des dendrites ont significativement augmenté chez les rats traités à toutes les doses étudiées pour des durées de traitement de 4 et 6 semaines, et seulement aux doses de 40 et 80 mg/kg/j pour un traitement de 2 semaines. En fait, plus la dose et/ou la durée augmentent et plus les résultats sont significatifs

statistiquement. Des constituants présents dans l'extrait de bacopa semblent donc manifester des propriétés de stimulation de la croissance des dendrites neuronales et cela pourrait expliquer, en partie du moins, la facilitation cognitive exercée par cette plante. Il a, par exemple, été constaté des anomalies dans l'arborisation dendritique des neurones de différentes régions du cerveau de patients schizophrènes, ou lors de l'exposition à un stress chronique et peut-être aussi chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [211], sachant que ces patients souffrent tous de troubles cognitifs. Les résultats concernant le *Bacopa monnieri* sont prometteurs et devraient encourager de futurs travaux dans cette voie.

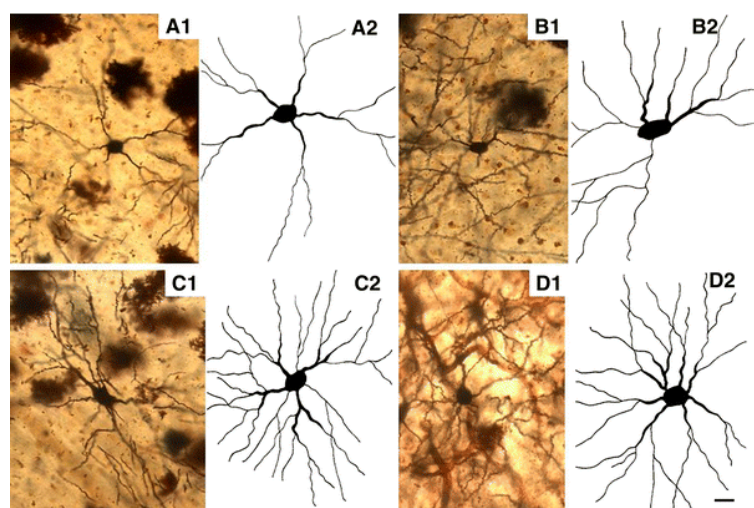


Figure 74: visualisation de l'arborisation dendritique de neurones amygdaliens à l'aide de photomicrographies (A1, B1, C1, D1) et de tracés en chambre claire (A2, B2, C2, D2) des rats du groupe contrôle (A1, A2) et des rats traités pendant 4 semaines avec l'extrait de bacopa à 20 mg/kg/j (B1, B2), 40 mg/kg/j (C1, C2) et 80 mg/kg/j (D1, D2) [220].

III.1.2. Effets anti-amnésiants et neuroprotecteurs

Afin d'explorer les effets anti-amnésiants du bacopa, une équipe indienne a évalué chez la souris en utilisant un labyrinthe aquatique de Morris les effets des bacosides (30 mg/kg, i.p.) sur l'amnésie expérimentale induite par la scopolamine (anticholinergique antagoniste des récepteurs muscariniques de l'ACh), le nitrite de sodium (agent conservateur et antidote lors d'intoxication au cyanure), et un antagoniste du récepteur du PAF (facteur d'activation plaquettaire) [72]. Les agents amnésiants ont été administrés 30 minutes avant les essais d'acquisition réalisés chaque jour de J1 à J4 (évaluation de l'apprentissage) et 30 minutes

avant les essais de récupération réalisés à J5 (évaluation de la mémoire) ; et le mélange de bacosides a été administré soit seul pour évaluer ses effets propres, soit 5 minutes après administration des drogues provoquant une amnésie expérimentale. D'autre part, tous ces composés (drogues perturbatrices et bacosides) ont été administrés de façon antérograde (avant épreuve) ou rétrograde (après épreuve). Le labyrinthe aquatique consiste en un bassin divisé en 4 quadrants et, au milieu de l'un deux est immergée, à 1 cm de la surface de l'eau, une plateforme. Aussi, les observateurs ont mesuré le temps nécessaire aux souris pour localiser la plateforme cachée (ELT, *escape latency time*) et le temps passé au niveau du quadrant-cible (TS, *time spent*). Les bacosides en administration antérograde ont significativement diminué l'ELT durant les essais d'acquisition (J1-J4) et augmenté le TS durant les essais de récupération (J5) ; en revanche les résultats ne sont pas significatifs en administration rétrograde. Les bacosides facilitent donc la mémoire antérograde. Surtout, les bacosides ont permis d'atténuer l'amnésie antérograde induite par la scopolamine suggérant une possible modulation du système cholinergique et qui serait dans le sens d'une augmentation des taux d'acétylcholine. Les bacosides ont également permis de diminuer l'amnésie antérograde induite par le nitrite de sodium suggérant cette fois leur effet protecteur en condition hypoxique. Enfin, les auteurs ont constaté une inversion de l'amnésie rétrograde induite par l'antagoniste du PAF et ceci laisse supposer que les bacosides pourraient augmenter le taux cérébral de PAF, d'autant plus que le PAF agit en tant que second messager dans les processus cognitifs [221] et que le bacopa a été rapporté comme augmentant le taux cérébral de glutamate [31] dont on sait qu'il peut indirectement augmenter la synthèse du PAF. **Ces trois postulats (l'augmentation des taux d'ACh, l'amélioration du fonctionnement cérébral en condition d'hypoxie et l'augmentation de la synthèse du PAF par l'augmentation du taux de glutamate cérébral) demandent à être confirmés par d'autres études.**

En 2006, un essai a montré que l'amnésie antérograde et rétrograde provoquée par l'électroconvulsivothérapie chez des rats était améliorée par l'administration orale d'un extrait titré de bacopa (500 mg/kg/j) et que les résultats étaient comparables à ceux obtenus avec le piracétam (200 mg/kg/j) [222].

Parallèlement à leur investigation phytochimique du bacopa ayant conduit à l'isolement et à l'élucidation structurale de 3 saponosides (bacopasides IX, X et XI), Zhou *et al.* ont également confirmé l'activité nootrope de cette plante sur les troubles de la mémoire provoqués par la scopolamine chez le rat, dans deux protocoles expérimentaux [124]. Plus

précisément, parmi les 7 saponosides triterpéniques testés, ce sont le bacopaside I, la bacopasaponine C et le bacopaside XI qui ont obtenus des résultats significatifs. **Autrement dit, tous les saponosides ne possèdent pas cette activité d'amélioration des déficits cognitifs et il serait utile d'explorer les possibles relations structure/activité parmi ces composés.**

Des travaux intéressants ont été réalisés par M.K. Saraf, A. Anand et leurs collaborateurs quant au(x) mécanisme(s) moléculaire(s) supposé(s) être à la base des effets anti-amnésiants du bacopa. Leur première étude s'est intéressée à la possible implication du système GABAergique et, comme les benzodiazépines (BZD) sont connues pour produire une amnésie en facilitant la transmission GABAergique, ils ont tout naturellement évalué chez la souris les effets d'un extrait titré de bacopa (55,35 % de bacosides) sur l'amnésie antérograde induite par le chef de file des BZD : le diazépam [223]. On sait que dans le système nerveux central (SNC) il existe des mécanismes excitateurs et inhibiteurs et que le bon fonctionnement du SNC dépend de l'équilibre des deux [224]. Le principal neurotransmetteur inhibiteur est l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ; il permet de diminuer l'excitabilité des neurones cibles par l'intermédiaire des récepteurs GABA. On lui connaît deux récepteurs : le récepteur GABA_A couplé à un canal chlore et modulé par les barbituriques et les BZD et un récepteur GABA_B qui réalise une inhibition présynaptique limitant la libération des acides aminés excitateurs [225]. La liaison du GABA au niveau du récepteur GABA_A ouvre ainsi un canal chlore, ce qui conduit à une hyperpolarisation et à une diminution de l'excitabilité neuronale. Ce récepteur est en fait un complexe macromoléculaire pentamérique [219] (5 sous-unités) et à côté du site de fixation du GABA, il existe un site de haute affinité pour les BZD ; c'est de cette façon que les BZD peuvent renforcer de façon allostérique la fixation et l'action du GABA et donc prolonger la durée d'ouverture du canal déclenchée par le GABA. Les résultats du test du labyrinthe aquatique de Morris ont révélé les effets anti-amnésiants de l'extrait de bacopa (80 et 160 mg/kg/j, par voie orale, pendant 7 jours) sur l'amnésie antérograde induite par le diazépam (2,0 mg/kg/j, en injection intrapéritonéale). Le degré de réversion était significatif. Fait à souligner, il n'a pas été retrouvé d'effets positifs significatifs du bacopa *per se* (par lui-même) mais, peut-être aurait-il fallu d'autres tâches d'évaluation de la mémoire ou encore, une étude sur une plus longue durée. **Reste que la distinction de ce qui tient de l'atténuation de troubles mnésiques d'une amélioration de la mémoire est importante. Il apparaît raisonnable de supposer que l'effet anti-amnésiant du bacopa est médié via la modulation du système GABAergique.** Les auteurs, quant à eux, ont conclu

sur la nécessité de discerner les événements moléculaires qui sous-tendent cet effet non seulement par un criblage des phytoactifs du bacopa mais aussi par l'investigation des voies de signalisation et des systèmes de seconds messagers impliqués dans ce qu'on appelle la « potentialisation à long terme ».

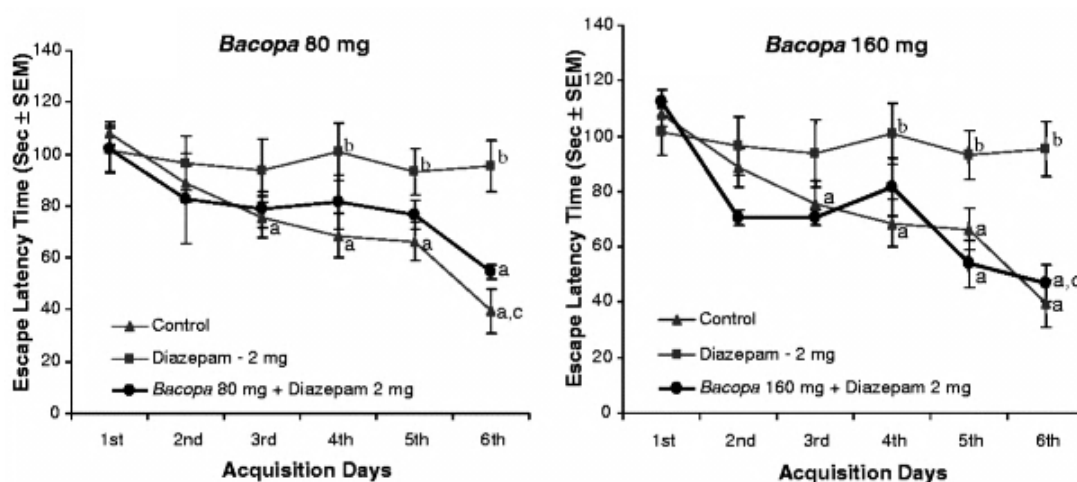


Figure 75: évolution de l'ELT (temps nécessaire pour localiser la plateforme) durant les essais d'acquisition (J1 à J6) des rats des groupes contrôle (▲), diazépam 2 mg/kg i.p. (■) et bacopa + diazépam (●), avec le bacopa à la dose de 80 mg/kg p.o. dans le graphe A et de 160 mg/kg p.o. dans le graphe B [223].

Décrite pour la première fois en détail par Tim Bliss et Terji Lomo en 1973, la potentialisation à long terme (LTP, *long term potentiation*) fait référence à une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique en réponse à de brèves salves de stimulation à haute fréquence des trajectoires nerveuses excitatrices [221]. Il s'agit d'une facilitation de l'activité des synapses qui se développent après la stimulation répétée de certains neurones ; c'est un phénomène obtenu expérimentalement au laboratoire et elle peut être provoquée dans tout l'hippocampe mais aussi, comme il l'a été rapporté plus récemment, dans d'autres régions du cerveau et notamment le néocortex cérébral [210]. Les grands travaux de recherche mis en œuvre pour comprendre le fonctionnement de la LTP sont notamment motivés par le fait que celle-ci est probablement le substrat cellulaire de certains types d'apprentissage. Certes une controverse persiste, mais la LTP reste un bon modèle pour l'interprétation des bases cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire, au niveau de l'hippocampe bien-sûr et peut-

être également ailleurs dans le cerveau. Brièvement, il faut savoir que la LTP peut être dépendante ou indépendante des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Ce sont des récepteurs du glutamate (récepteur canal-ionique), de même que les récepteurs AMPA et kaïnate. Aussi, l'association d'une activité présynaptique et d'une dépolarisation postsynaptique forte augmente l'entrée de calcium (Ca^{++}) dans les sites postsynaptiques au travers des récepteurs-canaux NMDA. Et c'est cette augmentation de Ca^{++} qui induit une LTP par un mécanisme que l'on ne comprend pas totalement mais qui semble impliquer l'activation de protéines kinases postsynaptiques [226]. Deux évidences apparaissent très fortes, d'une part la participation du Ca^{++} (second messenger) dans la LTP et d'autre part, qu'à la fois des événements pré- et post-synaptiques participent au maintien de la LTP dépendante des récepteurs NMDA [221].

Saraf *et al.* ont donc voulu tester l'hypothèse selon laquelle il y a modulation par le bacopa des messagers apparaissant en aval de la LTP (dits messagers rétrogrades) et qui pourrait expliquer ses effets anti-amnésiants. Pour cela, ils ont conduit une étude comportementale (labyrinthe aquatique de Morris) chez des souris rendues amnésiques par le diazépam et, parallèlement, ils ont effectué toute une série de dosages biologiques permettant d'analyser les voies de signalisation et les systèmes de seconds messagers de la LTP : NO, iNOS (NO-synthase inductible), PDE (phosphodiesterase), Ca/calmoduline, AMPc (adénosine monophosphate cyclique), MAP kinase (*mitogen activated protein kinase* ou protéine kinase activée par le mitogène), CREB total et phospho-CREB (*cAMP responsive element binding protein* ou élément de réponse liant l'AMPc) [227]. La partie comportementale de cette étude a montré que le bacopa inversait l'amnésie provoquée par le diazépam chez les souris, confirmant les résultats de précédents travaux. L'étude moléculaire a révélé que le diazépam provoquait une augmentation des taux de MAP kinase, pCREB et iNOS et une diminution des taux de CREB, PDE et AMPc, sans affecter les taux de calmoduline. On sait que les BZD, dont le diazépam, bloquent la LTP probablement en augmentant les potentiels postsynaptiques inhibiteurs médiés par le récepteur GABA_A , expliquant probablement les effets amnésiants des BZD. Le bacopa a permis de s'opposer à l'augmentation de MAP kinase, pCREB et iNOS induite par le diazépam. Il n'a pas affecté les taux d'AMPc, PDE et CREB. **Ainsi, les données comportementales montrent bien l'inversion par le bacopa de l'amnésie induite par la benzodiazépine mais sans que l'on puisse clairement élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents, même s'il semble que certains messagers rétrogrades de la potentialisation à long terme sont impliqués.**

Cette même équipe a réalisé en 2009 une étude similaire à la précédente mais cette fois-ci en s'intéressant aux effets protecteurs du bacopa sur l'amnésie induite par la scopolamine, toujours dans l'optique d'expliquer les mécanismes moléculaires à la base de cette action [228]. La scopolamine, drogue anticholinergique, est rapportée comme produisant une amnésie par interférence avec la LTP et peut être utilisée justement pour évaluer l'efficacité d'agents anti-amnésiants potentiels. Aussi, chez la souris, la scopolamine a produit une amnésie de type antérograde au labyrinthe aquatique de Morris avec, du point de vue neurochimique, une *down*-régulation (régulation négative) de la protéine kinase C (PKC) et de la iNOS, sans affecter significativement l'AMPc, la protéine kinase A (PKA), la calmoduline, la MAP kinase, CREB et pCREB. Ces résultats suggèrent que le blocage des récepteurs cholinergiques muscariniques par la scopolamine provoque une *down*-régulation de PKC et iNOS et pourrait expliquer l'amnésie observée chez la souris. **L'extrait de bacopa (120 mg/kg) a inversé l'amnésie antérograde provoquée par la scopolamine et surtout a augmenté significativement les taux de calmoduline et a diminué ceux de PKC et pCREB, mettant en lumière la contribution du système cholinergique et de la voie de signalisation kinase-CREB-calmoduline dans l'effet antiamnésique du bacopa ;** d'autant plus que l'extrait administré seul (sans scopolamine) n'a certes pas manifesté d'amélioration cognitive chez la souris non amnésique mais a permis d'augmenter les activités de MAP kinase, pCREB et PKA.

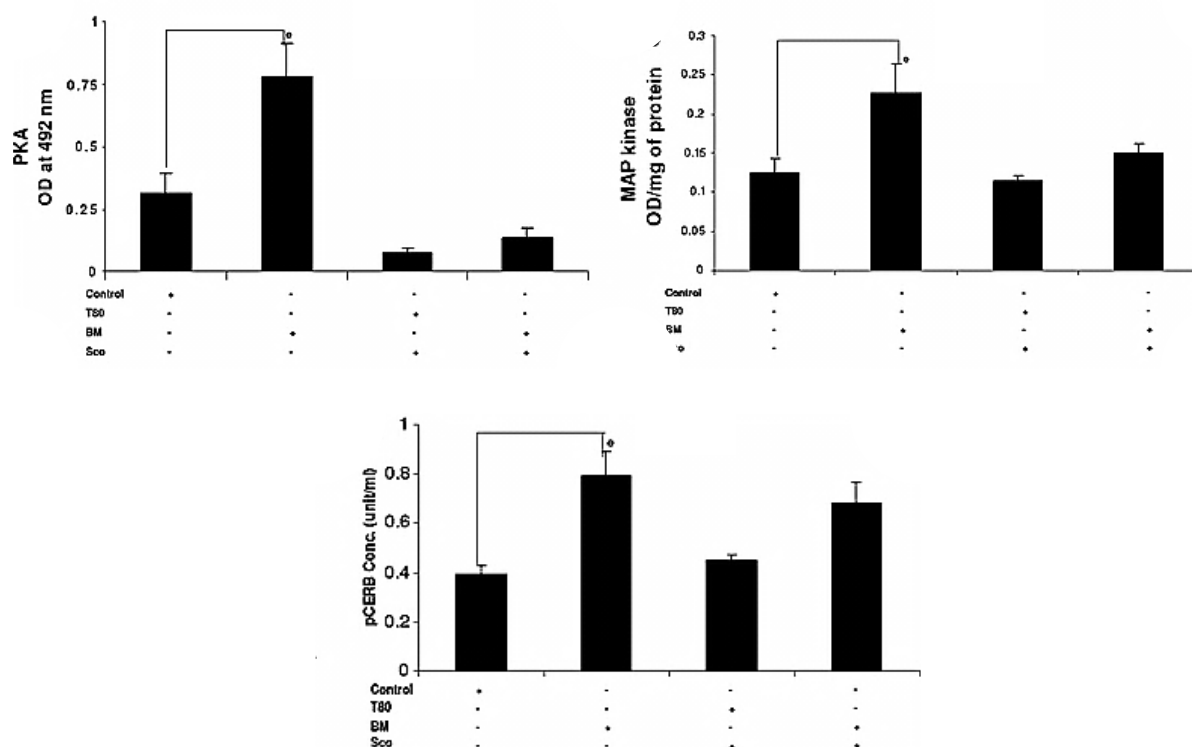


Figure 76: comparaison des taux de PKA (graphe A), MAP kinase (graphe B) et pCREB (graphe C), sur homogénats de cerveau de souris, des groupes contrôle, tween 80 (véhicule), BM (*Bacopa monnieri*) et scopolamine. * = $p < 0,05$ [228].

Parce que leur modulation affecte la potentialisation à long terme, le récepteur NMDA et les NOS sont devenus des cibles pour le développement de nouvelles thérapeutiques. Des antagonistes des récepteurs NMDA (compétitifs et non compétitifs) de même que des inhibiteurs de la NO-synthase ont été rapportés comme perturbant ou bloquant la LTP et provoquant des troubles de l'acquisition et de la récupération dans différents paradigmes d'évaluation de l'apprentissage et de la mémoire. Saraf *et al.*, dans la continuité de leurs précédents travaux, ont observé que l'administration de N_{ω} -nitro-L-arginine (L-NNA, un inhibiteur de NOS) et de dizocilpine (un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA) produisait chez la souris une amnésie antérograde et rétrograde, amnésie objectivée par des tests dans un labyrinthe aquatique de type Morris. L'extrait de bacopa a significativement atténué l'amnésie antérograde induite par la L-NNA et a partiellement diminué l'amnésie rétrograde induite par la L-NNA. En revanche, le bacopa a échoué à protéger les souris de

l'amnésie antérograde et rétrograde provoquée par la dizocilpine [229]. C'est dans une étude plus récente que l'évaluation comportementale s'est accompagnée d'une analyse des seconds messagers potentiellement impliqués. Le bacopa a augmenté significativement les taux de calmoduline et de pCREB/CREB en comparaison de ceux observés sur lysats entiers de cerveau de souris préalablement traitées avec la L-NNA [230]. **Les effets anti-amnésiants du bacopa pourraient donc être médiés via la voie de signalisation du NO impliquant la calmoduline, dont on sait qu'elle est importante pour le maintien de la potentialisation à long terme.**

Hota *et al.* ont également tenté d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les propriétés de neuroprotection et d'amélioration cognitive manifestées par le bacopa lorsque des déficits des fonctions mnésiques sont induits expérimentalement. Dans deux rapports de 2008 [231, 232], cette équipe s'était intéressée aux dommages neuronaux provoqués par une hypoxie hypobarique et avait rapporté une augmentation de l'excitotoxicité, de la dégénérescence et du processus d'apoptose des neurones (hippocampiques notamment) lors de l'exposition chronique à une hypoxie hypobarique. L'hypoxie hypobarique reproduit les effets d'une ascension en haute altitude, à savoir une diminution de la pression partielle en oxygène et donc de l'oxygénation des tissus de l'organisme. Le cerveau est particulièrement vulnérable à un tel stress hypoxique en raison de ses besoins importants en O₂ et il a été rapporté que des dysfonctionnements cognitifs avec des troubles de la mémoire pouvaient en résulter. Les causes supposées sont diverses : stress oxydant, excitotoxicité médiée par le glutamate, altération de l'expression de gènes et de la synthèse de neurotransmetteurs, déplétion du contenu bioénergétique mitochondrial, augmentation des taux de cortisol plasmatique... Cette réponse multifactorielle de l'organisme (du cerveau en particulier) à l'hypoxie hypobarique limite l'utilisation d'agents thérapeutiques qui ciblent une unique voie de signalisation dans le but d'améliorer les troubles observés dans ces conditions mais, rend ce modèle expérimental très intéressant. La présente étude (2009) a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un extrait préparé à partir de feuilles de bacopa et dont le contenu en bacosides est standardisé (55 ± 5 % de bacosides avec, 40 ± 2 % de bacoside A et 15 ± 3 % de bacoside B) dans l'amélioration des fonctions cognitives en condition expérimentale d'hypoxie hypobarique (correspondant ici à une altitude de 7600 m), chez des rats [233]. Après une étude préliminaire du choix de la dose, il a été décidé de les traiter par voie orale à la posologie de 20 mg/kg/j pendant 14 jours. Les capacités d'apprentissage et de mémorisation ont été évaluées dans un labyrinthe aquatique,

avec et sans antagoniste des récepteurs NMDA (dizocilpine). L'effet de l'administration des bacosides sur la neurodégénérescence (étude histologique), l'activité de la caspase 3 (effecteur critique de l'apoptose) et de la cytochrome *c* oxydase, la synthèse du glutamate (évaluée indirectement par l'activité de la glutamate déshydrogénase), ainsi que sur l'expression de la NCAM (molécule d'adhérence neuronale), du VGLUT (transporteur vésiculaire du glutamate), de la caspase 3 et de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA (par immunoblot) au niveau de l'hippocampe a aussi été déterminé. Enfin, la détermination d'une part, des taux de CREB/pCREB, d'ATP et de cortisol plasmatique et d'autre part, du statut antioxydant (taux d'espèces radicalaires, d'oxydation protéique, de peroxydation lipidique, de glutathion réduit et de glutathion oxydé) a été effectuée. Ainsi, l'administration de l'extrait a amélioré les fonctions cognitives des rats exposés à une haute altitude simulée, contré les effets de la dizocilpine et prévenu l'atrophie dendritique. De plus, il a diminué tous les marqueurs du stress oxydant, les taux de cortisol plasmatique et la dégénérescence des neurones hippocampiques. Il a aussi augmenté l'activité de la cytochrome *c* oxydase avec une augmentation concomitante des taux d'ATP.

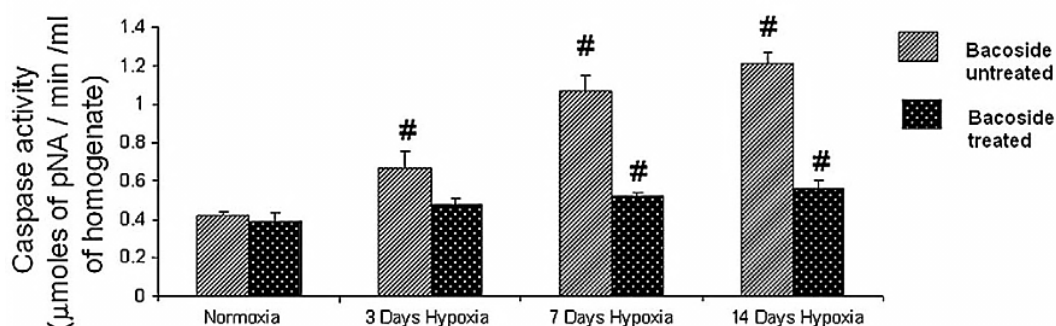


Figure 77 : comparaison de l'activité de la caspase (sur homogénat de cerveau de rat) des groupes non traité et traité avec les bacosides, en condition normale (normoxique) et en condition d'hypoxie à J3, J7 et J14. [#] = $p < 0,05$ versus groupe normoxique non traité [233].

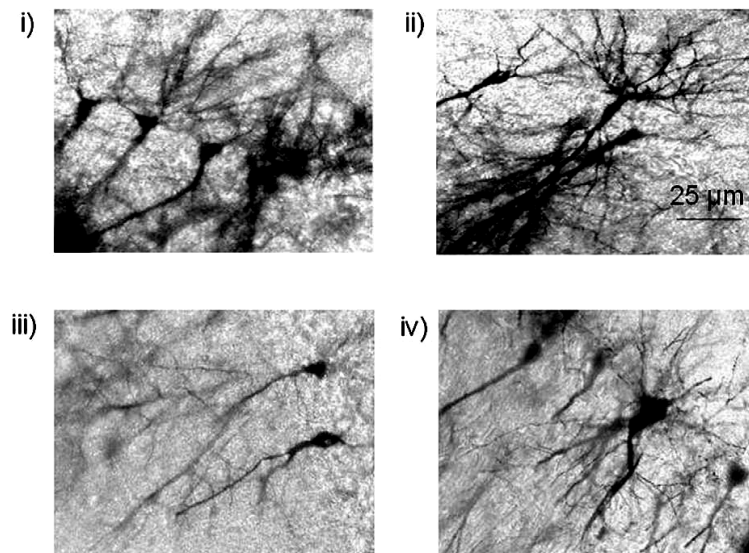


Figure 78 : embranchements dendritiques des neurones pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe des rats (coloration de Golgi) des groupes normoxique (i), normoxique + bacosides (ii), hypoxique (iii) et hypoxique + bacosides (iv) [233].

Les conclusions de cette étude sont nombreuses mais, brièvement, on peut dire que le bacopa :

- améliore les fonctions cognitives et cela pourrait être dû à l'action des bacosides au niveau de la cascade de signalisation médiée par les récepteurs NMDA ;
- diminue la neurodégénérescence hippocampique (aire CA1 surtout) probablement en préservant les circuits synaptiques à ce niveau et expliquerait l'amélioration des déficits mentaux induits par l'hypoxie hypobarique ;
- régule le contenu bioénergétique des mitochondries ;
- exerce une régulation positive de l'expression de certains gènes, notamment de la caspase 3 suggérant un effet anti-apoptotique et de la NCAM pouvant expliquer l'amélioration de l'apprentissage spatial et une certaine plasticité synaptique ;
- module positivement la plasticité synaptique d'après l'étude de colocalisation NCAM/VGLUT mais aussi par la capacité des bacosides à augmenter les branchements dendritiques des neurones glutamatergiques ;
- diminue l'excitotoxicité ;

- semble manifester des propriétés adaptogéniques vis-à-vis du stress hypoxique en prévenant l'augmentation du cortisol plasmatique et en améliorant les troubles neurologiques et comportementaux provoqués par ce stress ;
- et bien-sûr, améliore le statut antioxydant par la diminution des marqueurs endogènes du stress oxydant.

Ces résultats sont très prometteurs et font du bacopa un candidat potentiel dans la prise en charge des dysfonctionnements cognitifs et de certaines pathologies neurologiques.

III.1.3. Le bacopa et la maladie d'Alzheimer

III.1.3.1. Pré-requis

En 1907, Aloïs Alzheimer a décrit une maladie neurodégénérative qui allait porter son nom [234]. La maladie d'Alzheimer s'inscrit dans la catégorie des démences neurodégénératives à prédominance corticale [235] et représente environ 75 % des démences. Elle toucherait plus de 350 000 personnes en France. D'un point de vue clinique, la maladie d'Alzheimer se caractérise par une détérioration progressive et globale des fonctions cognitives, ainsi que par la survenue de troubles émotionnels et comportementaux. L'épidémiologie permet de distinguer deux formes : une forme familiale transmise sur le mode autosomique dominant et qui est d'apparition précoce (avant 65 ans), et une forme sporadique qui est observée surtout après 65 ans et qui est de loin la fréquente [234]. Deux types d'anomalies histologiques caractérisent la maladie d'Alzheimer :

- les plaques neuritiques (ou plaques séniles) constituées de dépôts β -amyloïdes (β -A) ainsi que d'autres protéines comme l'apolipoprotéine A (Apo A), entourées de débris neuronaux. Le peptide β -A provient du clivage d'une glycoprotéine transmembranaire, l'APP (*amyloid precursor protein*) ;
- les dégénérescences neurofibrillaires, intraneurales, surtout constituées d'agrégats de protéines *tau*[215].

En fait, la seule manière de confirmer un diagnostic provisoire de maladie d'Alzheimer est de faire l'examen *post mortem* des cerveaux des patients qui en sont victimes et de retrouver ces caractéristiques [221].

Une des principales théories contemporaines concernant la maladie d'Alzheimer est l'hypothèse de « la cascade amyloïde ». On suppose qu'une grande quantité de substance β -A détruit les neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert (NBM, dit aussi noyau *basalis magnocellularis*), soit par production excessive soit par élimination insuffisante de cette substance, ou les deux [215]. Les dégâts s'étendent davantage (et notamment à d'autres types de neurones) alors que la maladie progresse et la dégénérescence des neurones cholinergiques s'étend aux projections du noyau basal de Meynert (amygdale, hippocampe et cortex entorhinal). Dans les formes plus évoluées, d'autres types de neurones sont touchés, pas seulement cholinergiques.

Les traitements utilisés actuellement ne sont que symptomatiques et visent à retarder la progression et à améliorer la sémiologie mais ils n'arrêtent pas le processus de dégénérescence neuronale. Il s'agit des inhibiteurs de la cholinestérase ou anticholinestérasiques : la galantamine (REMINYL[®]), le chlorhydrate de donépézil (ARICEPT[®]) et la rivastigmine (EXELON[®]) [165]. Ils augmentent les concentrations intrasynaptiques d'acétylcholine, ce qui sous-tend la présence résiduelle de neurones cholinergiques fonctionnels. Un antagoniste des récepteurs NMDA est également utilisé, la mémantine (EBIXA[®]), qui bloque les effets néfastes de concentrations élevées en glutamate (excitotoxicité du glutamate). Les nootropes, même s'ils ne disposent pas d'AMM en France pour cette indication, sont fréquemment associés aux anticholinestérasiques (piracétam ou NOOTROPYL[®], piribédil ou TRIVASTAL[®]). De nombreuses autres stratégies font l'objet de travaux de recherche, notamment l'utilisation d'antioxydants.

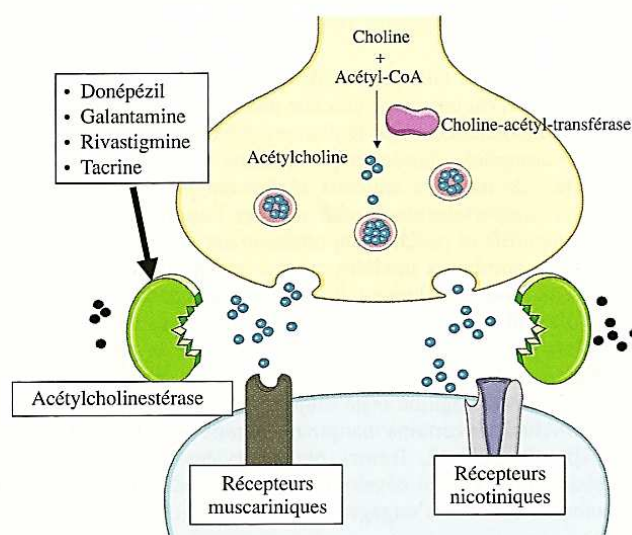


Figure 79: schéma d'une synapse cholinergique et mode d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase [235].

III.1.3.2. Effets en rapport avec la maladie d'Alzheimer

Bhattacharya *et al.* sont les premiers à avoir évalué les effets du bacopa sur des modèles expérimentaux de maladie d'Alzheimer. En 1999, ils ont ainsi étudié chez le rat les effets de l'administration orale pendant 14 jours d'un extrait enrichi (contenant 82 % de bacoside A) sur les déficits cognitifs et sur la perturbation des marqueurs cholinergiques centraux induits par l'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) de colchicine (1^{er} modèle) et par des lésions du noyau basal de Meynert provoquées par l'acide iboténique (2^e modèle) [236]. Les lésions provoquées par l'acide iboténique ou la colchicine ont induit des déficits marqués de la rétention de la réponse conditionnée d'évitement préalablement apprise, de façon significative à J7, et encore plus à J14. Le traitement avec du bacopa a permis de réduire significativement les déficits cognitifs, à J7 et J14 pour une dose de 10 mg/kg/j et seulement à J14 pour une dose de 5 mg/kg/j. Surtout, le bacopa (10 mg/kg/j) a permis d'inhiber, à J7 comme à J14, la réduction des taux d'ACh, de l'activité de la choline acétyltransférase (ChAT) et de la liaison de l'ACh aux récepteurs cholinergiques muscariniques induite par l'acide iboténique au niveau du cortex frontal et de l'hippocampe. A plus faible dose (5 mg/kg/j), les effets de la plante sur la perturbation induite de ces marqueurs cholinergiques ne sont évidents qu'à J14. Les effets du bacopa semblent donc dose-dépendants et sont

également toujours plus marqués, quelle que soit la dose employée, à J14 *versus* J7. **Les effets de facilitation cognitive du bacopa, et de ses constituants actifs, pourraient être dus à une modulation cholinergique centrale, dans le sens d'une augmentation de la transmission cholinergique ou plus exactement de la restauration d'une transmission cholinergique altérée.**

Des chercheurs ont comparé chez la souris les activités anticholinestérasiques et les effets d'amélioration cognitive d'un extrait de *Bacopa monnieri* et d'un extrait de *Ginkgo biloba*[237]. L'activité nootrope (nommée « anti-démence » par les auteurs) a été évaluée par rapport aux déficits induits par la scopolamine (3 mg/kg, i.p.) dans une épreuve de réponse conditionnée se déroulant dans une boîte d'évitement (cf. page 178) avec enregistrement d'une part, du temps nécessaire aux souris pour passer du compartiment éclairé à celui qui est sombre (TLT, *transfer latency time*) et d'autre part, des réponses de non transfert c'est-à-dire le nombre de souris qui n'entrent pas dans le compartiment sombre (NTR, *no transfer response*). Les auteurs ont aussi évalué *in vitro* sur homogénat de cerveau l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE). Différents extraits de bacopa et de ginkgo ont été administré *per os* tous les jours pendant 7 jours, et toujours 1 heure après la scopolamine. Le bacopa et le ginkgo ont significativement augmenté les TLT et NTR diminués par la scopolamine, atténuant ainsi l'effet de démence observé avec cette dernière. Par elles-mêmes (sans scopolamine), les deux plantes ont permis une inhibition dose-dépendante de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) mais, alors que le ginkgo a permis une inhibition jusqu'à 100 % le bacopa n'a jamais montré plus de 50 % d'inhibition suggérant un mécanisme d'action différent. Une revue de la littérature réalisée par une équipe britannico-indienne sur les inhibiteurs d'AChE issus de plantes fait mention de cette étude et reprend le résultat le plus significatif à savoir une inhibition de l'activité de l'AChE de 42,9 % pour une concentration de 0,1 mg de bacopa/ml [238].

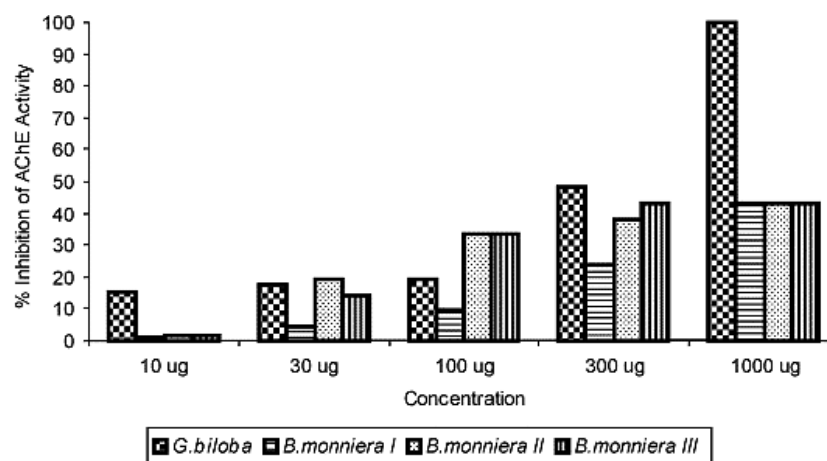


Figure 80: pourcentages d'inhibition *in vitro* de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) au niveau du cerveau de souris d'un extrait de *G. biloba* et de 3 extraits différents de *B. monnieri* (I, II et III contenant respectivement 20,1 %, 23,2 % et 63,9 % de bacogénine A₃), à des concentrations croissantes [237].

Une étude américaine conduite par L.A. Holcomb *et al.* a évalué les effets du *Bacopa monnieri* dans un modèle validé de formation spontanée de plaques amyloïdes utilisant des souris doublement transgéniques dites PSAPP [239], coexprimant la mutation « suédoise » du gène de la protéine précurseur amyloïde (APP) et la mutation M146 du gène de la préséniline-1 (PS-1). La mutation du gène de la PS-1 (gène situé sur le chromosome 14) a été retrouvée dans des cas familiaux de maladie d'Alzheimer à début précoce, mais n'a pas de lien avec l'APP. On ne connaît pas encore le rôle précis de la PS-1, la mutation de son gène aurait des effets sur les canaux calciques, le transport de protéines au sein des cellules et la différenciation cellulaire, à savoir des fonctions qui peuvent influencer sur le taux de dégénérescence des neurones [215]. Deux doses d'un extrait éthanolique préparé à partir de feuilles séchées (40 et 80 mg/kg/j, p.o.) ont été testées sur des souris âgées de 2 mois. Le traitement a duré soit 2 mois pour évaluer les effets sur les phases précoces du dépôt amyloïde (expérience « à court terme ») soit 8 mois pour évaluer les effets à une période durant laquelle les dépôts connaissent un accroissement rapide à la fois dans le cortex et l'hippocampe (expérience « à long terme »). Il n'a pas été observé de changement de poids corporel quelle que soit la période d'expérimentation (court ou long terme), avec ou sans bacopa (le poids corporel ayant été pris comme indicateur de l'état de santé général). L'analyse par ELISA des taux de protéine β -amyloïde sous deux formes (β -A 1-40 et β -A 1-42) a montré que dans l'expérience à court terme les 2 doses de bacopa ont diminué les taux de β -A 1-40 et β -A 1-42

dans le cortex (d'environ 60 %) mais pas dans l'hippocampe, alors que dans l'expérience à long terme, toujours pour les 2 doses, la diminution a également eu lieu dans l'hippocampe. L'épreuve comportementale dans un labyrinthe en Y n'a pas montré d'effets précoces de la plante sachant que les souris PSAPP ont obtenues les mêmes performances que les souris non transgéniques. En revanche, à plus long terme il a été observé des déficits chez les souris PSAPP, lesquels ont été améliorés par le bacopa. De façon similaire, le bacopa a permis de corriger les déficits du comportement d'exploration mais cette fois quelle que soit la période d'étude. Concernant la charge amyloïde fibrillaire (% d'aire corticale occupée et taille moyenne de la plaque) observée à la fin de l'expérience à long terme, aucune modification n'a été observée suite au traitement avec l'extrait de bacopa. **Les résultats montrent donc que le bacopa est capable de normaliser les changements comportementaux observés chez les souris PSAPP et de diminuer les taux de protéine β -amyloïde, sans pour autant modifier l'occupation amyloïde des aires corticales. Reste que le bacopa pourrait avoir une application potentielle dans la prise en charge de la maladie d'Alzheimer, notamment si le(s) mécanisme(s) à la base de cette diminution des taux de protéine β -A pouvait(ent) être élucidé(s).**

Des tentatives d'explication du rôle neuroprotecteur potentiel du bacopa dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer ont été apportées par plusieurs travaux. L'un d'eux [240] a ainsi montré qu'un extrait éthanolique titré de bacopa permettait d'augmenter *per se* la viabilité neuronale (mesurée par l'augmentation *in vitro* de la durée de vie sur culture cellulaire corticale primaire de rats), suggérant que certains constituants de l'extrait étaient de nature à favoriser la survie cellulaire ou à retarder la mort naturelle des neurones dans le milieu de culture. En fait, les hautes concentrations ont été retrouvées comme toxiques et ont diminué la survie cellulaire, alors que l'exposition des neurones pendant 48 et 72 heures à une concentration moyenne de 100 μ g/ml a permis d'augmenter leur durée de vie de respectivement 37 % et 20 %.

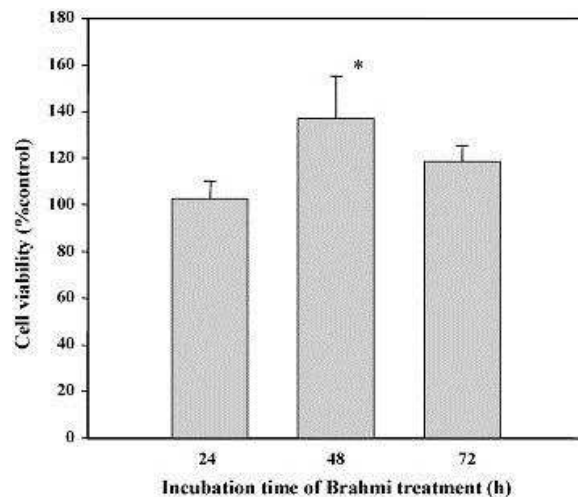


Figure 81: pourcentages relatifs (par rapport au contrôle) de la viabilité des cellules corticales mises en culture avec 100 µg/ml d'extrait de bacopa à 24, 48 et 72 h. * = $p < 0,05$ versus contrôle [240].

Parallèlement, les auteurs ont évalué les activités antioxydantes *in vitro* du bacopa et ont mis en évidence une inhibition dose-dépendante de la peroxydation des lipides (inhibition maximale de 80 %). De plus, ils ont obtenus une réduction dose-dépendante du Fe^{3+} en Fe^{2+} , comparable à celle obtenue avec du Trolox® ou de l'acide ascorbique. Ces tests de laboratoire ont été confirmés sur culture corticale primaire, le bacopa ayant diminué le taux de ROS intracellulaires. Les neurones traités avec le bacopa ont donc exprimés moins d'espèces radicalaires oxygénées suggérant ainsi qu'il peut restreindre le stress oxydant intracellulaire, ce qui permettrait alors d'expliquer la durée de vie prolongée des neurones en culture. Enfin, toujours sur culture corticale primaire, l'extrait a permis une neuroprotection en réduisant la mort neuronale et l'augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase induites par la protéine β -amyloïde 25-35. En revanche, le bacopa n'a pas permis de contrer l'excitotoxicité du glutamate. Autrement dit, le *Bacopa monnieri* diminue la mort neuronale induite par la protéine β -A par un mécanisme autre que le blocage de l'excitotoxicité du glutamate. Par lui-même, l'extrait n'a pas inhibé l'activité AChE *versus* contrôle ce qui montre son incapacité à inhiber directement l'enzyme au sein des neurones. **En conclusion, l'effet neuroprotecteur du bacopa apparaît comme le résultat à la fois de ses propriétés antioxydantes et de l'inhibition des taux augmentés de l'AChE. La neuroprotection antioxydante du bacopa pourrait constituer une approche alternative dans la prise en charge de la maladie d'Alzheimer.**

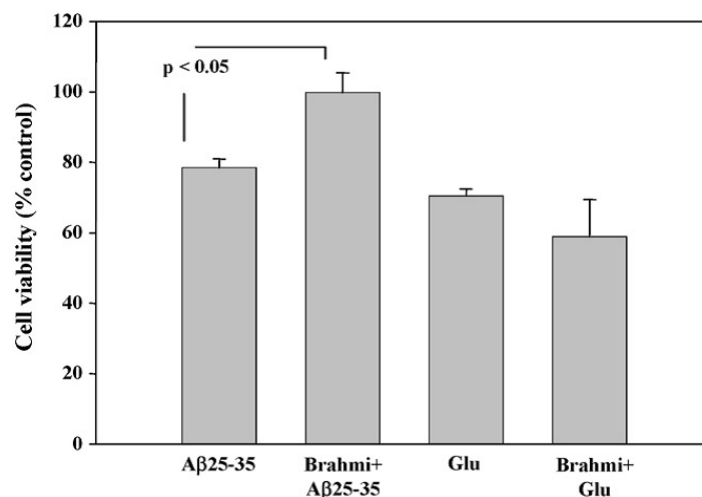


Figure 82: comparaison de la viabilité des cellules corticales (% versus contrôle) exposées à la protéine β -amyloïde (β -A 25-35) ou au glutamate (Glu), en présence et en l'absence d'extrait de bacopa[240].

Il a été rapporté que le bacopa pouvait réduire le déficit mnésique et la neurodégénérescence, notamment des neurones cholinergiques, dans un modèle expérimental de maladie d'Alzheimer ; mais qu'il ne semblait pas y avoir une étroite relation entre les effets d'amélioration cognitive et l'effet neuroprotecteur, comme si d'autres mécanismes étaient également impliqués [241] tel le renforcement de la transmission cholinergique. Un extrait éthanolique donné à des rats à différentes doses (20, 40 et 80 mg/kg/j) 2 semaines avant et continué 1 semaine après l'administration intracérébro-ventriculaire du neurotoxique AF64A (ion aziridinium d'éthylcholine) a permis d'améliorer les déficits de la mémoire spatiale imputés à l'AF64A. De plus, les études histologiques ont montré que l'extrait atténuait la dégénérescence neuronale au niveau des sous-régions hippocampiques CA1, CA2 et CA3 et qu'il s'opposait donc à la réduction de la densité neuronale induite par la neurotoxine. En comparaison, le donépézil (ARICEPT[®]) n'a manifesté un effet neuroprotecteur qu'au niveau de l'aire CA1. Et, l'observation des densités de neurones cholinergiques hippocampiques, dont sait qu'ils sont impliqués dans les processus cognitifs, a montré d'une part une diminution de la densité de ceux-ci dans toutes les aires étudiées, et d'autre part l'efficacité du bacopa à réduire la cholinotoxicité de l'AF64A au niveau de CA1 et CA2 (et dans toutes les aires pour le donépézil). Le bacopa peut donc s'opposer à la dégénérescence des neurones cholinergiques de l'hippocampe. **Ces résultats pris ensemble suggèrent que le *Bacopa monnieri* est un nootrope neuro- et cholinoprotecteur dans la maladie d'Alzheimer.**

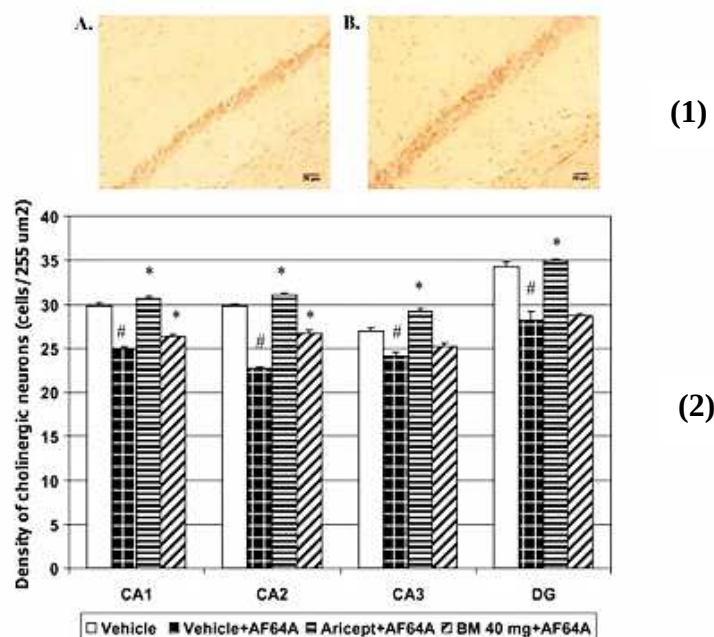


Figure 83 : (1) Microscopie optique ($\times 40$) de la densité des neurones cholinergiques de l'aire CA1 de l'hippocampe des groupes AF64A (A) et bacopa + AF64A (B). (2) Comparaison de la densité des neurones cholinergiques au niveau des aires CA1, CA2, CA3 de l'hippocampe et du gyrus denté (DG) des groupes contrôle (véhicule), AF64A, Aricept + AF64A et bacopa (BM) + AF64A [241].

Dernièrement, une étude canadienne publiée dans le *Journal of Alzheimer's Disease* a montré l'intérêt potentiel de l'utilisation du bacopa dans la maladie d'Alzheimer en modulant le stress oxydant, les voies de signalisation régulées par le potentiel redox et en améliorant les dysfonctionnements mitochondriaux provoqués par le peroxyde d'hydrogène et l'acroléine. L'acroléine est un des sous-produits de la peroxydation des lipides et, en raison de sa forte réactivité, elle n'est pas seulement un marqueur de la lipoperoxydation mais peut également être un initiateur du stress oxydant par l'addition de groupes nucléophiles au niveau des cellules. Il a été rapporté que dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les taux d'acroléine sont significativement plus élevés et que, sur cultures de neurones hippocampiques primaires, ce composé est très toxique. D'autre part, on sait que la toxicité du peptide β -amyloïde est médiée par la génération de peroxyde d'hydrogène et que les actions du H_2O_2 incluent des dommages oxydatifs sur les protéines, les lipides et l'ADN, comme il l'a été observé dans la maladie d'Alzheimer. D'où cette étude, dont le but a été d'évaluer les effets neuroprotecteurs d'extraits éthanoliques titrés de bacopa contre les méfaits de

l'acroléine et du peroxyde d'hydrogène, et d'élucider les mécanismes qui sous-tendent cette protection [242]. Brièvement, les résultats ont montré que le prétraitement avec du bacopa protège une lignée cellulaire de neuroblastome humain (SK-N-SH) contre l'acroléine et H₂O₂, qu'il inhibe significativement la génération intracellulaire de ROS, qu'il préserve le potentiel transmembranaire des mitochondries, et qu'il prévient également les modifications de l'activité de diverses protéines redox comme NF-κB, Sirt1, ERK1/2 et p66Shc, permettant ainsi d'améliorer la survie des cellules en culture en réponse au stress oxydant. **Donc, le bacopa a protégé les cellules de neuroblastome humain de la toxicité de l'acroléine et du H₂O₂ via différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. A plus long terme, il se pourrait que le bacopa trouve une application thérapeutique dans la prévention de la maladie d'Alzheimer.**

III.2. Effets dans l'épilepsie

L'épilepsie est une affection neurologique chronique définie par la répétition spontanée de crises épileptiques, une crise étant la manifestation clinique de l'hyperactivité paroxystique d'un groupe de neurones [243]. De vastes populations de neurones peuvent en effet passer, pour des raisons non totalement comprises, d'un état normal à un état d'hyperexcitabilité capable de générer une décharge rythmée, synchronisée et transitoire anormale [221]. Le taux d'incidence, défini par la survenue d'au moins deux crises spontanées par an, est de 50 pour 100000. L'épilepsie survient plus fréquemment chez l'enfant et le sujet âgé. Le taux de prévalence est de 7 ‰ en France [243]. Les décès sont 2 à 3 fois plus fréquents chez les patients épileptiques que dans la population générale (conséquences directes ou indirectes des crises et des traitements).

Les aspects cliniques du syndrome épileptique sont multiples et on distingue :

- L'épilepsie généralisée qui met en jeu de façon symétrique et synchrone les deux hémisphères cérébraux d'emblée. Il peut s'agir de crises généralisées convulsives, tonico-cloniques (grand mal épileptique) ou cloniques, ou encore de crises généralisées non convulsives (petit mal épileptique) ;
- L'épilepsie partielle (ou focale), dont le point de départ de la décharge est limité à une région circonscrite d'un seul hémisphère, peut être simple c'est-à-dire non

accompagnée de troubles de la conscience ou complexe et s'accompagnée d'altérations sensorielles, de la mémoire, de l'idéation, de l'affectivité ou du niveau de conscience.

L'épilepsie peut être également classée selon son origine : idiopathique, symptomatique, ou « cryptogénique » lorsqu'une cause lésionnelle est suspectée.

Des interactions complexes entre le terrain, le syndrome épileptique et le traitement peuvent être à l'origine de complications cognitives et comportementales.

Les traitements ont pour but de diminuer l'excitabilité des neurones du foyer épileptogène en stabilisant leur potentiel de repos et en évitant que persiste un courant dépolarisant à la fin du potentiel d'action. En principe, cette excitabilité peut être diminuée par une inhibition des neurones excitateurs (glutamatergiques surtout) et/ou par une stimulation des neurones inhibiteurs (GABAergiques surtout) [224].

III.2.1. Effets anticonvulsivants

La médecine traditionnelle indienne a toujours conféré au *Brahmi* (*Bacopa monnieri*) une indication thérapeutique dans l'épilepsie et les premières recherches ethnopharmacologiques locales avaient confirmé cet usage ancestral. L'hersaponine, principe actif alcaloïdique qui ne sera jamais caractérisé par la suite, avait ainsi été rapportée comme protégeant les souris des crises audiogéniques et il avait été mentionné une possible utilisation du bacopa comme traitement adjuvant de l'épilepsie [170].

Plus tard, une étude indienne de 1992 ayant évalué les activités neuropharmacologiques des extraits aqueux et éthanolique de la plante entière de bacopa a notamment mis en évidence une activité anticonvulsivante [19]. Une administration unique intrapéritonéale de l'un ou l'autre des extraits (effet aigu) à des doses élevées, près de 50 % de la DL₅₀ (la « dose létale 50 » est la dose entraînant 50 % de mortalité, 1 g/kg pour l'extrait aqueux et 15 g/kg pour l'extrait alcoolique), n'a pas complètement protégé les rats des convulsions au test de l'électrochoc maximal (MES pour *maximal electrochoc seizure*, ici un courant de 150 mA pendant 0,2 s) et n'a offert aucune protection au test MES aux faibles doses (près de 25 % de la DL₅₀). Le traitement à long terme (15 jours) par voie orale avec les extraits aqueux (3 g/kg)

et éthanolique (2 g/kg) n'a pas non plus protégé les souris au test MES. Les auteurs ont également utilisé le pentylènetétrazole (70 mg/kg i.p.) comme modèle expérimental de crises convulsives généralisées. L'administration unique des deux extraits à forte dose (50 % DL₅₀) a permis de retarder significativement l'apparition des crises et la mortalité est passée de 60 % à 0 % ; aucun effet n'a en revanche été constaté à faible dose (25 % DL₅₀). Le traitement *per os* à long terme a également augmenté le délai d'apparition des crises. **Aussi, bien que le bacopa ait été indiqué comme remède traditionnel de l'épilepsie dans l'Ayurvèda, cette étude animale montre une activité anticonvulsivante inconstante et seulement pour des doses élevées.**

Le journal *Seizure* a publié en 2010 une étude qui s'est intéressée au potentiel anticonvulsivant de concentrations croissantes de bacoside A dans un modèle expérimental animal impliquant un nématode, *Caenorhabditis elegans* (famille des Rhabditidées) [244]. Ce ver d'environ 1 mm de long est un des outils modernes les plus utilisés pour étudier divers processus physiopathologiques humains (apoptose, pathologies neurodégénératives, etc.). En effet, son court cycle de reproduction (3 jours) et sa durée de vie de 18-20 jours, ajouté au fait qu'environ 40 % des gènes de *C. elegans* ont des homologues dans l'espèce humaine, facilitent différents types d'investigations biologiques.

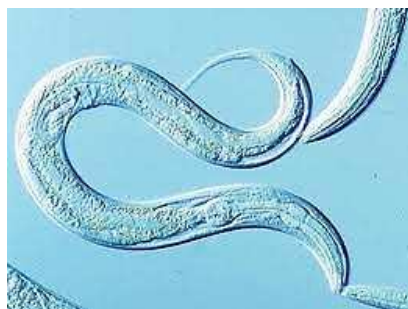


Figure 84: *Caenorhabditis elegans* (medicalfacts.nl).

Les chercheurs se sont appuyés sur le fait que l'augmentation de la température ambiante conduit à des décharges neuronales anormales chez cet organisme, lesquelles peuvent être rapprochées des crises/convulsions épileptiformes (stress thermique). Les convulsions ont ainsi été provoquées par une augmentation graduelle de la température du tampon dans lequel

sont placés les vers adultes. La fréquence des crises épileptiformes observée aux températures élevées (26-28 °C) a été diminuée significativement et de façon dose-dépendante pour des concentrations de bacoside A dans le milieu de 0,01 %, 0,1 % et 0,25 % (au-delà, une toxicité a été observée) (cf. figure 85).

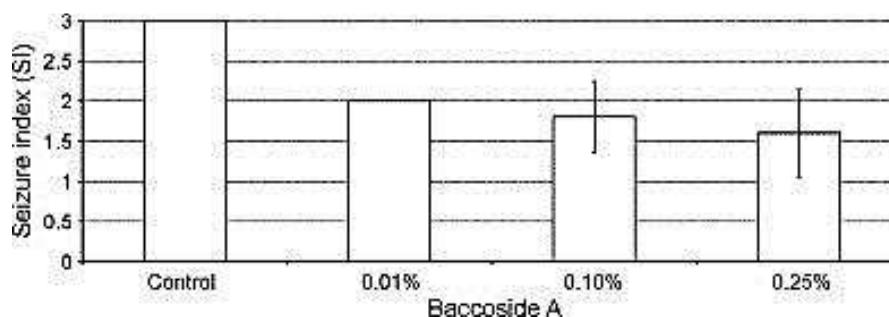


Figure 85: effet du bacoside A (0,01 %, 0,10 % et 0,25 %) sur l'intensité des crises de *C. elegans*. Codification par une échelle de 0 à 3 (indice de crise, SI) où SI = 0 signifie aucune crise ou convulsion, $1 \leq SI < 2$ signifie 2 mouvements convulsifs en 10 s, $2 \leq SI < 3$ signifie 2 à 5 mouvements convulsifs en 10 s et $SI \geq 3$ correspond à des convulsions continues [244].

En plus de la souche sauvage, l'équipe a aussi étudié la réponse au stress thermique d'une souche mutante *cca-1* qui se caractérise par une mutation du gène codant pour une protéine du canal calcique de type T. Le calcium joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'excitabilité et des fonctions neuronales, et les courants entrants sont possibles grâce à la présence d'ionophores voltage- ou ligand-dépendants. Et parmi tous les sous-types de canaux Ca^{++} , le sous-type T serait le plus impliqué dans la genèse de l'épilepsie [234], plus précisément dans les absences. L'éthosuximide (ZARONTIN®) bloque entre autres un canal calcique de type T [224]. Dans la présente étude, aucune convulsion n'est apparue chez les vers mutants *cca-1*. Il a alors été postulé que le bacoside A pouvait avoir interagit avec le canal protéique de type T des vers « sauvages », permettant de diminuer l'apparition des convulsions. En tout cas, le canal Ca^{++} de type T semble affecter la sensibilité aux crises des vers adultes et confirme le rôle crucial de *cca-1* dans l'excitabilité neuronale. **Maintenant, le mécanisme d'action antiépileptique du bacoside A via la modulation des flux entrants calciques demande à être validé par d'autres expérimentations et notamment des études 3-D du canal calcique T et de ses différentes sous-unités, du mode de liaison du bacoside A à celui-ci...**

III.2.2. Effets sur l'épileptogénèse

L'épilepsie est un état chronique d'hyperexcitabilité et le processus mal connu qui sous-tend le développement de cet état est connu sous le nom d'épileptogénèse [221].

III.2.2.1. Système GABAergique

Le système GABAergique est le système de neurotransmission qui a été le plus étudié dans l'épilepsie [234] et de nombreux médicaments agissent sur ce système dans le but de renforcer l'inhibition médiée par l'acide γ -aminobutyrique (GABA) [221] :

- soit par une action directe au niveau du récepteur-canal chlore postsynaptique GABA_A (benzodiazépines : diazépam, clonazépam, clobazam..., progabide (GABRENE[®]), gabapentine (NEURONTIN[®])) ;
- soit en augmentant la concentration de GABA dans la fente synaptique par blocage de sa dégradation physiologique par la GABA-transaminase, enzyme réalisant la désamination du GABA (acide valproïque (DEPAKINE[®]), vigabatrin (SABRIL[®])), ou par inhibition de sa recapture présynaptique (tiagabine (GABITRIL[®])).

Jobin Mathew et ses collaborateurs ont entrepris toute une série d'expérimentations animales pour étudier le(s) effet(s) du bacopa et de son constituant actif, le bacoside A, sur la régulation fonctionnelle et les altérations du récepteur GABA_A au niveau du cervelet [245], du striatum [246] et de l'hippocampe [247] de rats rendus épileptiques par administration intrapéritonéale de 350 mg/kg de poids corporel de pilocarpine (alcaloïde du jaborandi, parasympathomimétique à action cholinergique directe) [165]. Les résultats obtenus avec un extrait aqueux de la plante entière ou le bacoside A (respectivement 300 mg/kg/j p.o. et 150 mg/kg/j p.o., pendant 15 jours) ont été comparés à ceux de la carbamazépine (150 mg/kg/j p.o. pendant la même période), antiépileptique bloquant les canaux sodiques (elle est aussi utilisée dans d'autres pathologies pour ses effets antalgiques, thymorégulateurs et antimaniaques). Des homogénats de chacune des régions cérébrales étudiées ont été préparés pour la détermination des protéines totales (méthode de Lowry *et al.*, 1951 [248]), les études de liaison au récepteur GABA et l'étude de l'expression génique des sous-unités GABA_{A α 1}, GABA_{A α 5} et GABA_{A δ} du récepteur GABA_A par PCR en temps réel des ARN messagers

correspondants (dite RT-PCR ou PCR inverse). Les études de liaison (courbes de liaison) se font par un marquage du GABA avec un atome radioactif (^3H) de façon à pouvoir analyser de très faibles quantités. Le ^3H -GABA est alors ajouté en quantités connues et croissantes (ajouts dosés) dans le milieu (homogénat de cervelet, de striatum ou d'hippocampe) contenant un excès connu de GABA non marqué permettant ainsi la saturation croissante des sites récepteurs GABA par le ^3H -GABA et la détermination du nombre total de sites de liaison (liaison maximale ou B_{max}) et de leur affinité ($1/K_D$ avec K_D la constante de dissociation à l'équilibre c'est-à-dire la concentration de ligand pour laquelle 50 % des sites de liaison sont occupés). Il s'agit tout simplement de la loi d'action de masse qui décrit la fonction hyperbolique reliant la liaison (B pour *Bound*) à la concentration du ligand (c) [224] :

$$B = B_{\text{max}} \times c / (c + K_D)$$

La même technique a été employée pour étudier la liaison spécifique au récepteur GABA_A : incubation de l'homogénat considéré avec des quantités connues et croissantes de ^3H -bicuculline en présence d'un excès connu de bicuculline non marquée. La bicuculline est un antagoniste compétitif et sélectif des récepteurs GABA_A . L'analyse de Scatchard (méthode de linéarisation des données) a montré une diminution significative du nombre de récepteurs GABA et GABA_A et une augmentation inconstante de leur affinité dans les différentes régions cérébrales étudiées chez les rats épileptiques *versus* groupe contrôle (rats non épileptiques). Le traitement avec l'extrait aqueux ou du bacoside A a permis d'inverser ces changements pour les ramener à des valeurs proches du contrôle. Des résultats similaires ont été retrouvés avec la carbamazépine. D'autre part, l'expression des gènes des sous-unités $\text{A}\alpha 1$, $\text{A}\alpha 5$ et $\text{A}\delta$ a été *down-régulée* chez les rats épileptiques et le bacopa (extrait aqueux et bacoside A) a permis d'inhiber cette répression génique, de façon similaire à la carbamazépine prise comme témoin positif.

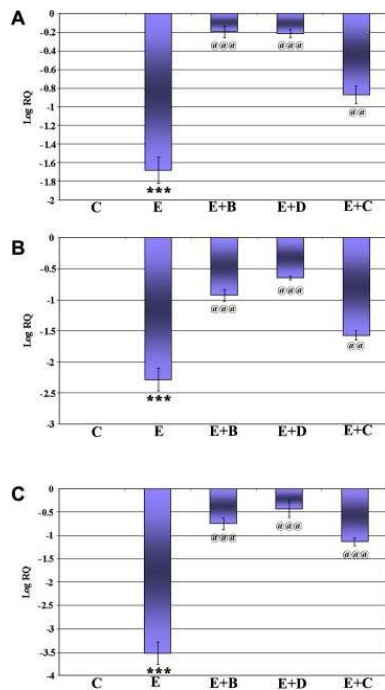


Figure 86: expression des ARNm codant pour les sous-unités Aα1 (A), Aα5 (B) et Aδ (C) du récepteur GABA_A (PCR inverse en temps réel) des groupes contrôle (C), épileptique (E), épileptique + bacopa (E+B), épileptique + bacoside A (E+D) et épileptique + carbamazépine (E+C). *** = $p < 0,001$ versus groupe C ; @@@ = $p < 0,001$ et @@ = $p < 0,01$ versus groupe E [245].

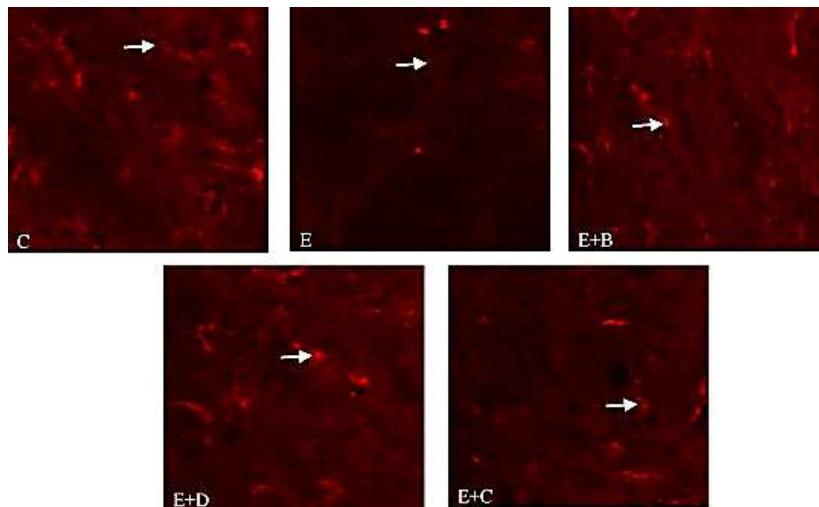


Figure 87: immunohistochimie du striatum avec visualisation sous forme de points lumineux des récepteurs GABA_Aα1 grâce à des anticorps marqués dirigés spécifiquement contre les R. GABA_Aα1, des groupes contrôle (C), épileptique (E), épileptique + bacopa (E+B), épileptique + bacoside A (E+D) et épileptique + carbamazépine (E+C) [247].

Connaissant l'implication des récepteurs centraux GABA en général et GABA_A plus particulièrement dans l'épilepsie et les troubles associés à l'épilepsie (troubles de la mémoire entre autres) le bacopa pourrait revêtir une importance clinique dans la prise en charge de l'épilepsie, en renforçant la transmission GABAergique inhibitrice.

III.2.2.2. Système glutamatergique

Aucun médicament actuellement commercialisé n'agit en diminuant la synthèse ou la recapture du glutamate, seule la lamotrigine (LAMICTAL[®]) permet une diminution indirecte de sa libération par action sur les canaux sodiques voltage-dépendants [234]. Il existe différents types de récepteurs au glutamate. Trois d'entre eux sont responsables d'une action de courte durée et sont des canaux ioniques (récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate). Le 4^e, responsable d'une action de longue durée, est un récepteur métabotrope (c'est-à-dire couplé à une protéine G) et son occupation augmente la concentration intracellulaire d'inositol triphosphate (IP₃) [224]. La réponse du récepteur NMDA peut être diminuée par la fixation du felbamate (TALOX[®]) sur celui-ci. Le topiramate (EPITOMAX[®]) agit entre autres en bloquant les récepteurs AMPA/kaïnate, bloquant ainsi le récepteur NMDA en position fermée. Enfin, il semblerait que l'oxcarbazépine (TRILEPTAL[®]) diminue aussi la transmission excitatrice glutamatergique [165,234].

Une équipe indienne a évalué les effets au niveau de l'expression génique du récepteur métabotrope du glutamate (mGluR8) d'un traitement de 15 jours avec du bacopa (poudre totale mise en suspension dans l'eau) à raison de 300 mg/kg/j chez des rats rendus épileptiques par la pilocarpine. Alors que l'expression du gène du mGluR8 est significativement augmentée (augmentation des ARNm codant pour ce récepteur objectivée par PCR) chez les rats épileptiques, le bacopa a au contraire permis de maintenir une expression proche de celle du contrôle, s'opposant ainsi à l'excitabilité neuronale médiée par le glutamate [249].

Cette même équipe s'est aussi intéressée au récepteur NMDA du glutamate au niveau de l'hippocampe. Dans cette présente étude, en plus d'évaluer l'activité de la glutamate déshydrogénase (enzyme mitochondriale désaminant l'acide glutamique en acide α -céto-glutarique) et les paramètres de liaison du glutamate sur son récepteur, les chercheurs ont également mesuré le taux d'expression du gène codant pour le récepteur NMDA R1, à partir d'homogénats d'hippocampe. Aussi, l'extrait de bacopa a pu significativement s'opposer à toutes les altérations observées chez les rats épileptiques. En effet, l'extrait a diminué l'activité de la glutamate déshydrogénase, a augmenté la B_{max} et a empêché la répression de l'expression du gène du récepteur NMDA R1 au niveau de l'hippocampe, en comparaison avec les rats épileptiques non traités [250].

Ces données suggèrent un rôle bénéfique potentiel du bacopa dans l'épilepsie en s'opposant à l'excitabilité neuronale (excitotoxicité) provoquée par le glutamate. Et, avec ce qui a été rapporté précédemment, le bacopa semble donc pouvoir diminuer l'hyperexcitabilité neuronale dans diverses aires cérébrales d'importance dans l'épilepsie à la fois en augmentant la transmission GABAergique inhibitrice et en diminuant la transmission glutamatergique excitatrice.

III.2.2.3. Système sérotoninergique

Alors que les mécanismes à l'origine de l'état d'hyperexcitabilité neuronale caractéristique de la physiopathologie de l'épilepsie ne sont pas tous connus, et devant le fait qu'il ait été rapporté une diminution des taux centraux de sérotonine (5-HT) dans des modèles expérimentaux animaux d'épilepsie généralisée, Krishnakumar *et al.* se sont intéressés aux altérations de la transmission sérotoninergique observées dans l'épilepsie provoquée expérimentalement chez des rats par la pilocarpine, et plus particulièrement au niveau du récepteur 5-HT_{2C} du cervelet [251] et de l'hippocampe [252]. Ils ont pu dans un second temps évaluer les effets du bacopa sur ces altérations et les comparer avec ceux de la carbamazépine. Ils ont observé une diminution de la concentration en 5-HT sur homogénats de cervelet de rats épileptiques, une diminution du nombre de récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2C} avec une augmentation de leur affinité (étude de liaison avec utilisation de ³H-mésulergine, antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}) et une régulation négative de l'expression du gène du récepteur 5-HT_{2C}. L'extrait de bacopa testé n'a manifesté aucun effet sur ces paramètres sérotoninergiques chez les rats non épileptiques, en revanche, il s'est opposé à tous les changements observés chez les rats épileptiques et notamment a empêché la *down*-régulation de l'expression des récepteurs 5-HT_{2C} du cervelet [251]. Par ailleurs, au niveau de l'hippocampe cette fois, les chercheurs ont mis en évidence une augmentation de B_{max} (nombre de récepteurs 5-HT_{2C}) avec une diminution de leur affinité pour la sérotonine, une augmentation des ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2C} et une augmentation du taux d'inositol triphosphate. Là encore, le traitement pendant 15 jours avec du bacopa a inversé tous ces changements et a notamment contré l'*up*-régulation de l'expression des récepteurs 5-HT_{2C} dans l'hippocampe des rats épileptiques [252]. Des résultats similaires à ceux du

bacopaont été retrouvés avec la carbamazépine, tant au niveau du cervelet que de l'hippocampe [251,252].

Ces données sur les altérations de la régulation fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{2C} et sur les effets correcteurs apportés par un traitement avec du bacopa au niveau de certaines aires cérébrales du rat épileptique confirment d'autant plus le rôle thérapeutique potentiel de cette plante dans le cadre d'une approche globale de l'épilepsie.

III.2.2.4. Métabolisme périphérique

Dans la suite logique des travaux précédents, Jobin Mathew et ses collaborateurs se sont aussi intéressés aux effets protecteurs possibles du bacopa sur l'augmentation du métabolisme et de l'excitabilité observée au niveau périphérique chez le rat épileptique (pilocarpine) [253]. En effet, ils ont noté une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau musculaire d'une part et au niveau cardiaque d'autre part, une augmentation de l'activité de la malate déshydrogénase au niveau musculaire, une augmentation du taux sérique de l'hormone thyroïdienne T3, une augmentation de l'insulinémie et une absence de changement dans les taux sériques d'adrénaline et de noradrénaline chez les rats épileptiques en comparaison avec le groupe contrôle (rats non épileptiques). Autrement dit, les auteurs ont mis en évidence une augmentation globale du métabolisme énergétique périphérique et ont suggéré qu'elle pouvait être un facteur aggravant ou déclenchant l'apparition de crises épileptiques et que la réduction de cette « excitabilité » périphérique pouvait prévenir la répétition des crises. Tous ces paramètres ont été ramenés à des valeurs proches de celles du groupe contrôle grâce à l'administration pendant 15 jours d'un extrait hydro-alcoolique de bacopa ou de bacoside A. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec la carbamazépine. **Le bacopa pourrait posséder une haute valeur médicinale dans le traitement de l'épilepsie en prévenant l'apparition des crises, ici, par la réduction des altérations périphériques associées à l'épilepsie.**

III.2.3. Effets cognitifs dans l'épilepsie

L'épilepsie est finalement plus qu'une simple maladie et elle est souvent associée à d'autres troubles, notamment des fonctions supérieures et du comportement. Le traitement de l'épilepsie doit se concevoir de manière globale et ne peut être envisagée sans une prise en charge de ces troubles associés. Aussi, dans pratiquement toutes les études animales ayant évalué les effets antiépileptiques du bacopa, les chercheurs ont parallèlement conduits des tests comportementaux de base afin de mettre en évidence des déficits éventuels induits par cet état épileptique d'une part et de vérifier les propriétés nootropes (ou d'amélioration cognitive) de la plante en une telle circonstance d'autre part. Les épreuves réalisées dans un labyrinthe radial [245, 247] (à 8 bras radiaux), dans un labyrinthe en Y [245, 246, 247] ou encore dans un labyrinthe aquatique [249, 250] ont toutes mis en évidence des altérations des réponses conditionnées et des déficits comportementaux. L'état épileptique s'est traduit chez l'animal par des troubles de l'apprentissage et de la mémoire (apprentissage moteur, reconnaissance spatiale...), lesquels ont pu être totalement corrigés par l'administration de bacopa. Il a donc permis de prévenir la détérioration des fonctions cognitives associée à l'épilepsie. Il a aussi restauré le comportement exploratoire inné des rats dans un test en espace ouvert (*open-field test*) [249], supprimé l'incoordination motrice objectivée au test de la barre tournante (rotarod, cf.figure 88) [251] et exercé une activité antidépressive au test de la nage forcée (confirmant aussi qu'un comportement dépressif peut être corrélé à l'épilepsie) [252].

Mais, la détérioration des fonctions cognitives et les troubles du comportement associés dans l'épilepsie peuvent également être iatrogènes et provenir des médicaments destinés à prévenir l'apparition des crises. Pour preuve, il a été rapporté que les antiépileptiques conventionnels affectaient les fonctions mentales des patients non épileptiques [234]. Vohora *et al.* ont montré des effets négatifs sur les fonctions cognitives (lesquelles ont été évaluées par l'apprentissage d'une réponse conditionnée d'évitement) de souris traitées *per os* avec de la phénytoïne, certes marginales en administration unique (effet aigu) mais significatives en administration quotidienne pendant 14 jours (effet chronique). Aussi, un extrait éthanolique de bacopa associé à la phénytoïne tout au long de la 2^e semaine (40 mg/kg/j p.o.) a nettement inversé les altérations cognitives provoquées par cette dernière [254]. D'autre part, l'amélioration de l'acquisition et de la rétention de la tâche conditionnée observée avec le bacopa n'a nullement affecté l'efficacité antiépileptique de la phénytoïne (test MES). **Cette**

étude fournit ainsi une preuve de l'effet correcteur potentiel du *Bacopa monnieri* sur les troubles de l'apprentissage et de la mémoire induits par la phénytoïne. Il pourrait alors être envisagé d'utiliser le bacopa en tant que traitement adjuvant de l'épilepsie, en association avec les antiépileptiques conventionnels, tout en étant certain de ne pas modifier leur efficacité anticonvulsivante.

III.3. Effets tranquillisants

III.3.1. Effet anxiolytique

Brahmi est utilisé dans l'Ayurvêda dans certaines situations cliniques qui s'apparentent à la conception moderne des troubles anxieux. Aussi, Bhattacharya *et al.* ont évalué l'activité anxiolytique d'un extrait éthanolique préparé à partir des parties aériennes du bacopa et contenant environ 25,5 % de bacoside A, sur des rats, par l'utilisation de modèles expérimentaux d'anxiété validés. L'extrait a été administré aux doses de 5, 10 et 20 mg/kg, p.o. 1 heure avant les tests et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec une benzodiazépine anxiolytique, le lorazépam (administré en i.p. 30 minutes avant les tests à raison de 0,5 mg/kg). Les épreuves comportementales et les résultats peuvent être résumés comme suit [255] :

- le test « en espace ouvert » (*open-field test*) destiné à observer le comportement exploratoire dont sait qu'il est diminué chez les rats stressés : le bacopa a permis une augmentation dose-dépendante du comportement d'exploration ;
- le labyrinthe surélevé : il comporte 4 bras en croix, 2 d'entre eux sont protégés par des parois verticales et les 2 autres au contraire surplombent directement le vide (cf. figure 71). Un rat anxieux tend à rester dans les bras protégés. L'extrait de bacopa a produit une augmentation dose-dépendante du nombre d'entrée et du temps passé dans les bras ouverts, et produit une réponse inverse pour les bras protégés du vide ;
- le test d'interaction sociale : un animal stressé montre une diminution des interactions actives avec ses congénères. L'extrait a provoqué une augmentation du temps d'interaction sociale (mais significativement que pour la dose la plus forte) ;

- le délai pour s'alimenter dans un environnement non familier (les rats étant au préalable privés de nourriture pendant 48 h) : la prise de bacopa a diminué ce délai sachant que plus l'animal est stressé et plus il est méfiant et moins il osera s'alimenter dans un environnement non connu ;
- le test du rotarod, qui consiste en une barre horizontale mise en rotation : un rat anxieux va tomber plus souvent, déraper ou encore ne pas utiliser sa queue comme balancier. Ici, cette méthode est surtout utilisée pour évaluer le déficit moteur potentiel induit par la drogue testée. En effet, une incoordination motrice constituerait un biais lors de l'évaluation des performances aux tests précités. L'extrait n'a manifesté que des effets marginaux (non significatifs) alors qu'avec le lorazépam, on observe un déficit moteur.



Figure 88: représentation d'un rotarod (ugobasileusa.com).

Globalement et à part pour le test sur la barre tournante, le bacopa a produit une réponse anxiolytique qualitativement similaire à celle observée avec le lorazépam, avec l'avantage par rapport à ce dernier de ne justement pas entraîner de déficit moteur. En fait, le profil anxiolytique du bacopa pourrait s'avérer tout à fait original. Il est rare qu'une drogue anxiolytique n'entraîne pas des effets secondaires du type amnésie, troubles locomoteurs, sédation... autrement dit, des effets indésirables BZD-like. Au contraire, le bacopa est un nootrope et comme nous l'avons vu, facilite les processus

cognitifs et est antiamnésiant. Bien évidemment, cette étude étant en soi limitée, d'autres investigations sont nécessaires pour valider ce mode d'action dual.

Une activité anxiolytique modérée a été retrouvée, chez l'animal, par une équipe de chercheurs indiens ayant réalisé une batterie de tests neuropsychologiques et ont alors suggéré que cette activité anxiolytique modérée du bacopa pouvait jouer un rôle dans l'amélioration cognitive constatée dans d'autres travaux [256].

Plus récemment, une étude comparant des extraits de *Bacopa monnieri* (80 mg/kg, p.o.) et de *Panax quinquefolium* (100 mg/kg, p.o.) dans 3 modèles murins d'anxiété (un labyrinthe surélevé, une planche à trous et un test d'aversion d'une zone illuminée) a montré que ces deux espèces végétales permettaient de réduire l'anxiété, sans entraîner d'incoordination motrice (rotarod) [257]. **En revanche, le mécanisme d'action anxiolytique des constituants actifs présents dans l'extrait de bacopa n'a pas été élucidé.**

III.3.2. Effet antidépresseur

Bacopa monnieri étant communément utilisé dans divers troubles mentaux dans le système de médecine ayurvédique, il se devait d'évaluer aussi son activité antidépressive potentielle. En 2002, une équipe a utilisé deux modèles expérimentaux animaux de dépression, une épreuve de nage forcée et un test de résignation acquise (ou test d'impuissance apprise, de l'anglais *learned helplessness test*) pour comparer les effets d'une administration d'un extrait méthanolique standardisé de *Bacopa monnieri* (38,0 % bacoside A) avec ceux d'un antidépresseur imipraminique bien connu, l'imipramine [14]. L'extrait de bacopa a été administré par voie orale aux doses de 20 et 40 mg/kg/j pendant 5 jours et l'imipramine a été délivrée par voie intrapéritonéale à la dose de 15 mg/kg 30 minutes avant les expériences. L'épreuve de la nage forcée (ou « désespoir comportemental ») consiste à placer les animaux, ici des rats, dans un bassin en ne leur laissant aucune possibilité de s'en échapper. Aussi, ils vont finir par se résigner et ne vont plus nager mais s'immobiliser. Une drogue possédant une activité antidépressive réduira l'immobilité des animaux. Quant au test de résignation acquise, il s'agit d'un modèle expérimental né du concept défini par le psychologue M. Seligman en 1968 ; un animal placé dans une situation qui échappe à son contrôle va finir par s'installer dans la résignation et l'apathie. Dans la présente étude, il s'agit de chocs électriques délivrés

de façon incontrôlable. **Le bacopa a manifesté une activité antidépressive comparable à celle de l'imipramine dans les deux modèles de dépression et aux 2 doses testées. Le bacopa apparaît donc comme un antidépresseur potentiel ; mais il est indispensable de réaliser des études neurochimiques pour démêler le(s) possible(s) mécanisme(s) à la base de cet effet.**

Tableau 18: comparaison de l'effet d'un extrait de bacopa et de l'imipramine sur la période d'immobilité dans un test de résignation acquise. * $p < 0,01$ versus contrôle [14].

Groupes	Dose (mg/kg/j $\times$ 5 jours)	Période d'immobilité (s)
Contrôle	-	112,2 $\pm$ 8,4
Imipramine	10	61,0 $\pm$ 6,9*
Extrait de bacopa	20	69,0 $\pm$ 7,7*
Extrait de bacopa	40	51,7 $\pm$ 3,8*

Deux modèles expérimentaux de dépression ont également été utilisés par une équipe chinoise, leur permettant d'évaluer chez la souris l'effet antidépresseur de plusieurs saponosides triterpéniques [118] : les bacopasides I et II, la bacopasaponine C et les bacopasides VI, VII et VIII. Le premier modèle de dépression correspond au test de la nage forcée et le second consiste à suspendre la souris par la queue et à observer son temps d'immobilité, une drogue antidépressive réduisant ce dernier. Les bacopasides I et II ainsi que la bacopasaponine C ont permis de réduire significativement les périodes d'immobilité dans le premier modèle de respectivement 75 %, 55 % et 63 % et dans le second modèle de respectivement 61 %, 38 % et 47 %. Les autres saponosides n'ont pas montré de résultats concluants. D'autre part, afin de vérifier si les résultats ne sont pas biaisés, les chercheurs ont également évalué l'activité motrice spontanée : aucun des composés n'a eu d'effet sur la locomotion spontanée ; ceci suggère que l'effet antidépresseur retrouvé pour 3 des composés n'est pas dû à l'inhibition du SNC. Fait intéressant, les 3 saponosides « antidépresseurs » contiennent la même aglycone et elle est différente de celle des 3 saponosides dépourvus d'une activité antidépressive. **Il se pourrait donc que l'aglycone joue un rôle crucial dans l'effet antidépresseur observé pour les bacopasides I et II et la bacopasaponine C.**

L'équipe ayant comparé les effets anxiolytiques du bacopa et du ginseng nord-américain (*Panax quinquefolium*, littéralement panax « à cinq folioles ») (cf. page 218) a également comparé leur efficacité antidépressive dans deux modèles murins de dépression (suspension par la queue et la nage forcée). Les extraits de ces deux plantes ont permis de diminuer le comportement dépressif des souris [257]. **Aussi, le bacopa apparaît comme possédant à la fois une activité anxiolytique et une activité antidépressive. Ce profil pharmacologique mixte pourrait faire du bacopa une thérapeutique potentielle des troubles anxio-dépressifs.**

III.4. Discussion

Dans l'Ayurvêda, le bacopa est surtout décrit comme un fortifiant cérébral, utile pour augmenter la mémoire et la concentration [18, 20]. Il est notamment indiqué dans les pertes de mémoire et la décrépitude sénile mais aussi dans diverses autres pathologies du système nerveux central (convulsions, hystérie, « folie », etc.) [19]. Une des difficultés à laquelle on se heurte quand on s'intéresse aux plantes traditionnelles est d'ordre sémantique puisque les catégories nosographiques sont souvent fort différentes des nôtres [258] ; et ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne les plantes qui agissent sur le système nerveux central : on ne soignait pas dans l'Inde ancienne la maladie d'Alzheimer ou la dépression puisque ces syndromes n'avaient pas été identifiés comme tels. Bien évidemment, cela ne veut pas dire qu'on n'essayait pas de traiter certains aspects symptomatiques de ces pathologies. Mais, le rapprochement entre la conceptualisation moderne des maladies et celle des textes anciens ayurvédiques et de certains essais ethnopharmacologiques n'est parfois pas évidente !

L'évaluation comportementale animale a montré une meilleure acquisition des tâches conditionnées, des réponses plus rapides, une meilleure rétention des nouveaux comportements appris ainsi qu'une diminution de leur extinction, grâce au bacopa [22]. Plus exactement, les composés qui supportent ces effets, les saponosides triterpéniques actifs qui composent le bacoside A [212], s'ils sont administrés à une dose suffisante (dose minimale thérapeutique) et pendant une durée de traitement de minimum 2 semaines, exercent des effets facilitateurs cognitifs [217]. Ces effets apparaissent tant chez l'animal sain que chez l'animal

dont on a provoqué expérimentalement des déficits cognitifs, et permettent de rapprocher le bacopa du concept de drogue nootrope [214-216], dont la définition générale repose justement sur la capacité à pouvoir améliorer les mécanismes cérébraux en rapport avec les performances mentales.

Les processus d'apprentissage et de mémorisation sont complexes et font intervenir différents facteurs comme les émotions, la motivation, l'analyse... et, schématiquement, le stockage des informations au niveau du cerveau requiert la création de nouvelles connexions entre les neurones et le renforcement de connexions déjà existantes. Aussi, concernant le mécanisme d'action supposé du bacopa, une facilitation de la transmission nerveuse, une modulation de différents systèmes centraux de neurotransmission (GABAergique [245-247], cholinergique [228, 236], sérotoninergique [218, 251, 252], glutamatergique [249, 250]), une augmentation de la viabilité neuronale [241] et de l'arborisation dendritique [220] semblent, entre autres, responsables des actions bénéfiques rapportées sur le système nerveux central. En cela, le bacopa apparaît comme une drogue-candidate potentielle dans nombre de pathologies neuropsychiatriques ; des troubles qui ne sont finalement pas si éloignés des indications pour lesquelles les tradipraticiens ayurvédiques prônaient (et prônent toujours pour certaines d'entre elles) l'emploi de cette plante « mystique ».

Il n'y a rien de surprenant à ce que le bacopa manifeste une activité anti-amnésiante chez l'animal [72, 222, 259]. Il s'agit simplement d'une restauration du fonctionnement cérébral lorsque des déficits cognitifs sont induits par divers agents (benzodiazépines ou autres agents déprimeurs centraux, neurotoxiques dont les cholinotoxiques [223, 241] ou lors d'une exposition à des conditions particulières (hypoxie hypobarique [233]). L'amnésie expérimentale animale a d'intéressant qu'elle permet de mieux élucider l'action des composés actifs du bacopa au niveau central et a permis, par exemple, de mettre en évidence un renforcement de la transmission cholinergique au niveau d'aires cérébrales d'importance, une possible interférence (directe ou indirecte) avec les récepteurs GABA (le GABA_A et ses différentes sous-unités en particulier) [245-247] et avec la potentialisation à long terme et les différentes voies de signalisation et systèmes de seconds messager qui la sous-tendent (Calcmoduline, protéines kinases, CREB, NO) [227-230, 233]. Une action sur des processus essentiels comme l'apoptose des cellules nerveuses et la plasticité synaptique ou encore sur l'excitotoxicité neuronale a également été envisagée. Enfin, les propriétés antioxydantes du bacopa pourraient, en partie au moins, expliquer les effets pro-mnésiques observés dans les études animales [233, 240, 242].

Pour certains chercheurs, le *Bacopa monnieri* serait capable, *in vitro* et dans des modèles murins transgéniques, de ralentir ou de s'opposer à la neurodégénérescence [239]. La préservation des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert et de leurs projections au niveau de l'amygdale, de l'hippocampe et du cortex entorhinal, ainsi que ses propriétés anticholinestérasiques, contribueraient à restaurer la transmission cholinergique altérée et à atténuer la démence de la maladie d'Alzheimer [236, 237, 240]. L'hypothèse pathogénique la plus soutenue de la maladie d'Alzheimer est celle dite de « la cascade amyloïde » et, le bacopa, en réduisant expérimentalement les effets toxiques de la protéine β -amyloïde [239, 240], apparaîtrait là encore comme un candidat prometteur en vue d'une application thérapeutique dans la prévention de la maladie d'Alzheimer ou comme thérapeutique adjuvante aux traitements symptomatiques actuels. Bien sûr, le chemin reste très long avant de pouvoir envisager une quelconque utilisation du bacopa ou de ses composés isolés dans la prise en charge de la maladie d'Alzheimer.

Le bacopa ne semble pas, par lui-même, doué d'une puissante activité anticonvulsivante, même si à doses élevées (qui le sont probablement trop pour une utilisation clinique humaine) il est capable de réduire les convulsions épileptiformes dans divers modèles expérimentaux [19, 244]. En revanche, il semblerait qu'il possède un profil pharmacologique tout à fait intéressant dans la mesure où il inhiberait la transmission excitatrice GABAergique [245-247] et renforcerait la transmission inhibitrice glutamatergique [249, 250], s'opposant ainsi à l'état d'hyperexcitabilité neuronale dans diverses aires cérébrales et donc à la survenue des crises épileptiques. De plus, en prévenant la détérioration des troubles cognitifs associés, que ceux-ci soient intrinsèquement liés à l'épilepsie [245-247, 249, 250-252] ou occasionnés par les médicaments destinés à la traiter (iatrogénie) [254], le *Bacopa monnieri* pourrait être efficace dans la prise en charge globale du syndrome épileptique et notamment, comme certains le suggèrent, en tant que traitement adjuvant, en association avec les antiépileptiques conventionnels, tout en étant certain de ne pas modifier leur efficacité anticonvulsivante [254]. La sagesse traditionnelle indienne ne s'était peut-être pas trompée en indiquant le bacopa dans les états convulsifs [170].

Tout en étant dénué d'effets déprimeurs centraux aux posologies moyennes, le bacopa manifeste clairement des propriétés tranquillisantes dans les divers modèles expérimentaux d'anxiété et de dépression validés par la communauté scientifique [14, 118, 255-257]. Même si d'une part, l'extrapolation directe à l'homme des données de l'expérimentation animale reste délicate et d'autre part, des résultats prometteurs chez l'animal ne se confirment pas

forcément lors des essais cliniques, il serait intéressant d'évaluer plus amplement les effets anxiolytiques et antidépresseurs du bacopa, notamment dans le cadre d'essais cliniques chez l'homme. Les troubles anxieux et dépressifs sont connus pour accompagner ou aggraver les troubles bénins de la mémoire et la démence de type Alzheimer et les effets tranquillisants du bacopa pourraient aussi participer à ses effets d'amélioration cognitive [256].

Pour terminer, un fait pour le moins intéressant est à noter : à notre connaissance, hormis pour les bacosides du bacopa, il n'avait jamais été rapporté d'action centrale pour des saponosides triterpéniques, composés qui sont pourtant largement distribués au sein du règne végétal [260].

IV. Autres propriétés

IV.1. Propriétés adaptogéniques

Les plantes dites adaptogènes sont par définition des plantes dont les composés augmentent la résistance de l'organisme au stress. Souvent considérées comme des régulateurs métaboliques ces plantes permettent d'accroître la résistance non spécifique aux agressions [27].

C'est un terme général, non spécifique et pharmacologiquement contestable, mais qui a l'avantage de permettre un regroupement de différentes plantes dont les principales sont le ginseng (*Panax ginseng* et *Panax quinquefolium*), le schizandra (*Schizandra sinensis*), la rhodiola (*Rhodiola rosea*) et l'échinacée (*Echinacea angustifolia*). *Bacopa monnieri*, récemment introduit en Occident, est classé par certains auteurs dans la catégorie des plantes adaptogènes et les composants actifs, les bacosides (saponosides triterpéniques), supporteraient ces activités adaptogéniques.

Chowdhuri *et al.* se sont intéressés aux effets « anti-stress » des bacosides [261] (extraits des racines de la plante et administrés sous la forme d'une solution aqueuse) en termes de modulation au niveau du cerveau de l'expression de la protéine de choc thermique Hsp70, de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de l'activité de deux enzymes dépendantes du cytochrome P450 (7-pentoxyrésorufine-O-déalkylase ou PROD, et 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase ou EROD) chez des rats, en administrant des doses orales de 20 et 40 mg/kg pendant 7 jours consécutifs. La moitié des rats traités ont été stressés 2 heures après la dernière dose de bacosides (J7) en les maintenant dans le froid et en condition d'hypoxie. Les rats des groupes contrôles (stressés et non stressés) ont seulement reçu de l'eau distillée. Les résultats sont les suivants :

- Les bacosides, aux 2 doses testées, n'ont provoqué aucun changement significatif dans l'expression de Hsp70 au niveau des différentes régions cérébrales étudiées (cortex, hippocampe, cervelet et le reste du cerveau) chez les rats non stressés. Alors que le stress seul (groupe contrôle stressé) a induit une augmentation significative de l'expression de Hsp70 dans toutes les régions cérébrales, le prétraitement avec les bacosides (aux 2 doses) a permis de diminuer l'expression de Hsp70 dans tout le

cerveau mais de façon significative seulement dans l'hippocampe en comparaison avec le groupe contrôle stressé ;

- Les bacosides à faible dose administrés aux animaux non stressés ont induit une diminution significative de l'activité de la SOD dans l'hippocampe, comme ce qui a été observé dans le groupe stressé non prétraité. La plus forte dose a, quant à elle, provoqué une diminution de l'activité de la SOD dans le cervelet et l'hippocampe mais une augmentation ailleurs. Le prétraitement des rats stressés avec la faible dose a globalement diminué l'activité de la SOD dans tout le cerveau, de même pour la plus forte dose sauf dans le reste du cerveau où une forte augmentation a été notée ;
- Le stress seul a augmenté les activités des enzymes P450-dépendantes (PROD et EROD) dans tout le cerveau des rats, de même que les bacosides chez des rats non stressés (même si l'induction enzymatique avec la plus forte dose est moins prononcée). En revanche, les activités de PROD et EROD des rats stressés ont été ramenées à des niveaux proches de ceux du groupe contrôle non stressé grâce aux bacosides à la posologie de 40 mg/kg/j. La plus faible dose a tout de même provoqué une induction du cytochrome P450, certes moindre que celle observée dans le groupe contrôle stressé ou dans le groupe non stressé ayant reçu des bacosides.

Ces données indiquent que les bacosides peuvent moduler les activités de la Hsp70, du cytochrome P450 et de la SOD, permettant ainsi au cerveau d'être prêt pour agir dans des conditions défavorables, tel le stress.

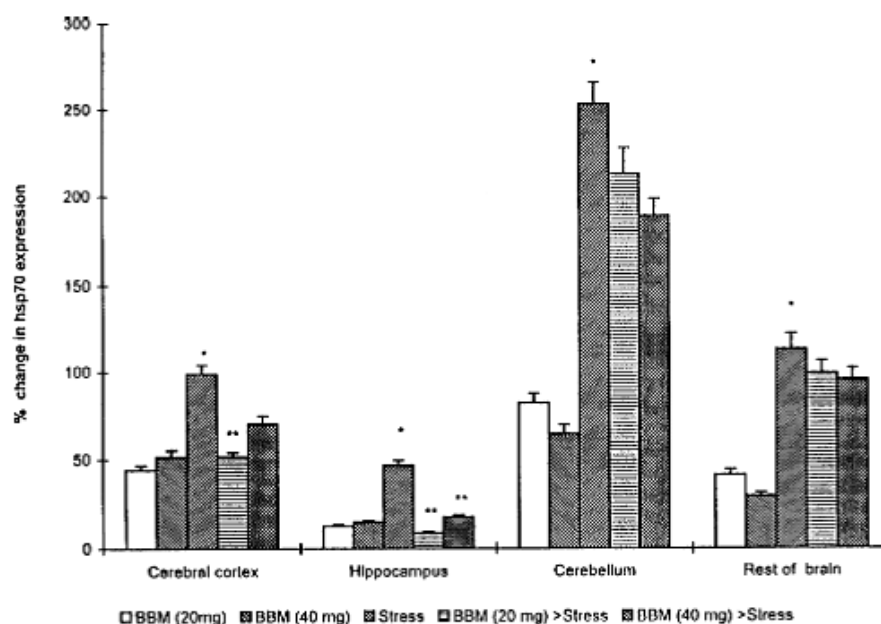


Figure 89: expression relative (% par rapport au groupe normal non traité = contrôle) de Hsp70 dans différentes régions cérébrales des rats des groupes BBM (bacosides du *Bacopa monnieri*) 20 mg, BBM 40 mg, stress, BBM 20 mg + stress et BBM 40 mg + stress. * = $p < 0,05$ versus contrôle et ** = $p < 0,05$ versus groupe stress [261].

Le bacopa apparaissant comme un inducteur enzymatique potentiel, et même si cela ne concerne pas directement le présent propos, il faudrait envisager des études complémentaires quant à cette induction du cytochrome P450, et notamment en explorer les conséquences du point de vue des interactions médicamenteuses (cf. page 307).

Une autre équipe a évalué les effets adaptogéniques d'un extrait titré de bacopa dans des modèles expérimentaux de stress aigu et chronique chez le rat en s'intéressant à l'indice ulcéreux, au poids de certains organes (thymus, rate et glandes surrénales) et à des paramètres biochimiques sanguins (glycémie, triglycémie, cholestérolémie, alanine amino transférase ou ALAT, aspartate amino transférase ou ASAT et créatine kinase ou CK) [262]. La poudre de racine de *Panax quinquefolium* (ginseng américain) a été prise comme témoin positif. Les rats stressés par une immobilisation pendant 150 minutes une seule fois (modèle de stress aigu) ou pendant 7 jours consécutifs (modèle de stress chronique) ont reçu l'extrait de bacopa (40 et 80 mg/kg/j p.o.) ou du ginseng (100 mg/kg/j p.o.) pendant 3 jours pour le stress aigu et pendant 7 jours pour le stress chronique. Aussi, l'exposition au stress aigu a augmenté significativement l'indice ulcéreux, le poids des surrénales, la glycémie, la CK et les transaminases ALAT et

ASAT, mais a diminué le poids de la rate. Le prétraitement avec l'extrait de bacopa(40 mg/kg/j) a permis de réduire significativement l'augmentation induite par le stress aigu en ce qui concerne l'indice ulcéreux, le poids des surrénales et de la rate, la glycémie, ASAT et CK. A plus forte dose (80 mg/kg/j), les effets du bacopa sont supérieures et a significativement inversé les changements au niveau du poids des surrénales, de la glycémie et des taux d'ALAT et ASAT. Le ginseng a également inversé certains paramètres modifiés lors du stress aigu (poids de la rate, glycémie, ALAT, ASAT et CK). Quant au stress chronique, les auteurs ont noté une augmentation significative de l'indice ulcéreux, du poids des surrénales et des taux plasmatiques d'ASAT et de CK, avec une diminution significative de poids du thymus et de la rate et des taux de triglycérides et de cholestérol. Le bacopa à faible dose a seulement inversé les modifications concernant l'indice ulcéreux et ASAT, alors qu'à plus forte dose il s'est en plus opposé aux changements concernant le poids des surrénales et CK. Les racines de *Panax quinquefolium* (100 mg/kg), dans le modèle de stress chronique, a permis d'inverser les mêmes paramètres que le bacopa à la dose de 80 mg/kg. **Sur la base de ces résultats, les auteurs ont conclu que le bacopa était un adaptogène puissant.**

Cette même équipe de chercheurs indiens a poursuivi ses investigations sur les effets adaptogéniques du bacopa en reprenant une procédure expérimentale sensiblement similaire. Ils se sont cette fois intéressés aux effets du bacopa sur les changements induits par un stress aigu (immobilisation unique de 150 minutes) et un stress chronique imprévisible (utilisation de divers « stressseurs » pendant 7 jours : immobilisation, nage forcée, litière subitement salie la nuit, inversion des périodes jour/nuit, jeûne) sur les taux de cortisol plasmatique et de monoamines cérébrales sur homogénats de cortex cérébral et d'hippocampe (sérotonine 5-HT, dopamine DA, noradrénaline NA), chez le rat [263]. Les actions biologiques du cortisol sont multiples et tous les métabolismes peuvent être concernés (glucidique, lipidique, protidique, phosphocalcique, hydro-électrolytique). Il existe une sécrétion basale du cortisol (sécrétion par la corticosurrénale) mais elle peut être augmentée, comme dans les situations de stress, et a des effets bénéfiques métaboliques, cardiovasculaires et anti-inflammatoires [264]. En fait, la régulation de la sécrétion du cortisol (et de l'ACTH) est sous la dépendance de 3 mécanismes : le rythme circadien (sécrétion plus élevée entre 6 et 10 heures du matin), la réponse au stress et le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes (freinage plus prononcé le soir, quand la sécrétion du cortisol est la plus basse). Ainsi, de nombreuses situations de stress, qu'il soit physique (chirurgie, fracture...), psychologique (émotions, examens...) ou métabolique (hypoglycémie par exemple), entraînent une augmentation très

marquée des taux de cortisol (d'un facteur 2 à 5). En fonction de la nature du stress, différentes structures nerveuses supra-hypothalamiques sont activées et transmettent leurs signaux au noyau paraventriculaire hypothalamique (NPV). Ainsi, cette présente étude explore l'axe corticotrope ou hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

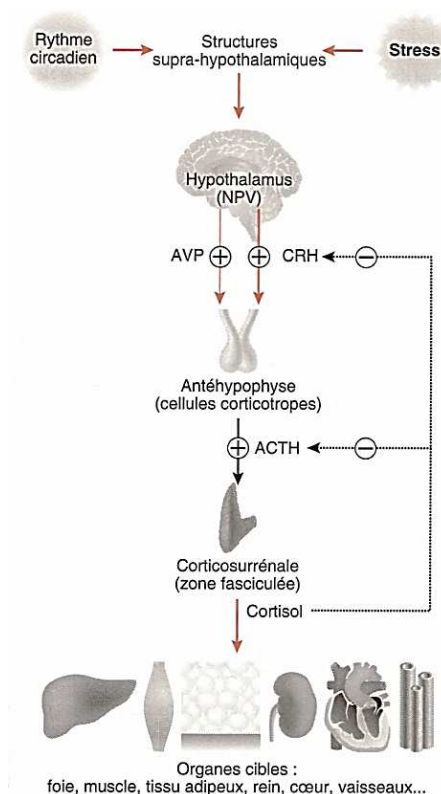


Figure 90: régulation de l'axe corticotrope ou hypothalamo-hypophyso-surrénalien. NPV : noyau paraventriculaire ; AVP : arginine vasopressine ; CRH : hormone de libération de la corticotropine ; ACTH : corticotropine [264].

Le stress aigu et chronique a provoqué chez les rats une élévation significative des taux plasmatiques de cortisol, et qui a été nettement contrée par l'administration de l'extrait de bacopa, aux 2 doses (40 et 80 mg/kg p.o.), tout comme avec le *Panax quinquefolium* (100 mg/kg p.o.). D'autre part, le stress aigu a augmenté les taux de 5-HT et diminué ceux de NA dans les 2 régions du cerveau alors que le contenu en DA a lui augmenté dans le cortex et diminué dans l'hippocampe. Le stress chronique a provoqué une déplétion en 5-HT, NA et DA dans les 2 régions. Et, alors que le traitement avec du bacopa (aux 2 doses) a permis d'atténuer les altérations des valeurs de 5-HT et de DA corticales et hippocampiques, il a été inefficace pour normaliser les taux de NA, dans le modèle de stress aigu. En comparaison, le ginseng a inversé tous les changements liés au stress aigu. Dans le modèle de stress

chronique, le prétraitement avec du bacopa ou du ginseng a permis d'augmenté significativement les taux de NA, DA et 5-HT dans le cortex cérébral et les taux de NA et 5-HT dans l'hippocampe. **Ainsi, cette étude indique que l'activité adaptogénique du bacopa pourrait être due à la normalisation de la cortisolémie et des taux des monoamines NA, 5-HT et DA au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe, lesquelles sont des régions particulièrement vulnérables en situation de stress, et ce, de façon analogue aux effets du *Panax quinquefolium*. Mais, devant le fait, entre autres, que le bacopa échoue à restaurer un taux basal de dopamine dans l'hippocampe dans le modèle de stress chronique, il nous apparaît nécessaire de réaliser d'autres études pour éclaircir le mécanisme d'action central qui sous-tend l'effet adaptogénique du bacopa.**

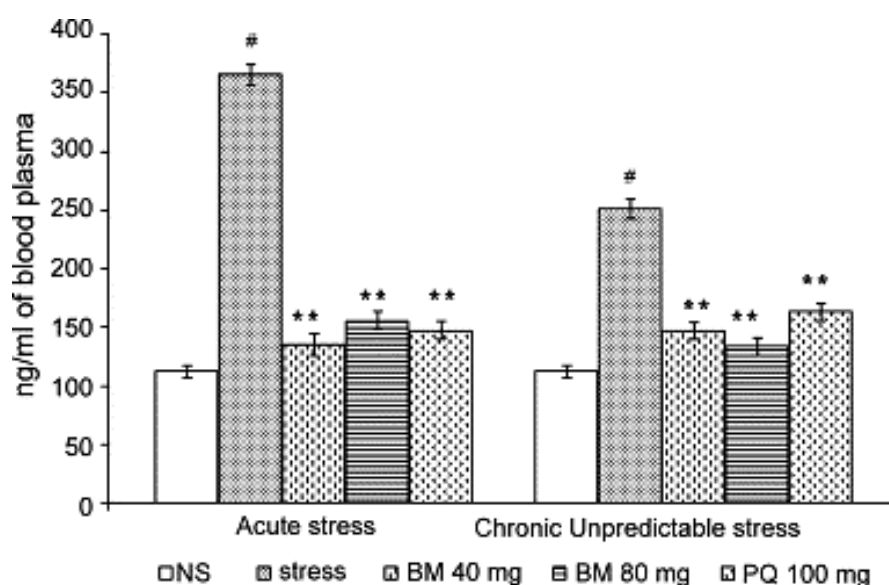


Figure 91: comparaison des taux plasmatiques de cortisol des rats des groupes contrôle (*no stress*, NS), stress, BM (*Bacopa monnieri*) 40 mg, BM 80 mg et PQ (*Panax quinquefolium*) 100 mg, lors d'un stress aigu et lors d'un stress chronique imprévisible [263].

IV.2. Propriétés hépatoprotectrices

Le paracétamol est un antalgique antipyrétique possédant un très bon rapport bénéfice/risque [225] et son principal effet indésirable est son hépatotoxicité observée en cas de surdosage (cytolyse aiguë sévère), et nécessite alors l'administration de *N*-acétylcystéine, antidote agissant comme un substitut du glutathion (grâce au groupement thiol, SH) [219]. En effet, le paracétamol est éliminé par voie rénale après sulfurono- ou glucurono-conjugaison mais une petite partie est transformée au niveau hépatique grâce au CYP450 en un métabolite toxique, la *N*-acétyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), qui doit être détoxifiée par couplage avec le glutathion. Les réserves en glutathion sont limitées et si la dose absorbée est massive (autolyse le plus souvent) et/ou les réserves initiales en glutathion sont diminuées (alcoolodépendance, médicaments inhibiteurs du CYP450, dénutrition, insuffisance hépatocellulaire...) alors la NAPQI s'accumule [224]. Aussi, une des premières investigations de l'activité hépatoprotectrice du bacopa s'est faite en administrant une dose de 500 mg/kg/j de paracétamol pendant 7 jours à des rats. Un extrait éthanolique de bacopa (300 mg/kg/j p.o.) ou de la silymarine (25 mg/kg/j p.o. ; extraite du chardon-marie, *Silybum marianum*) qui sert de témoin positif ont été administrés aux rats en même temps que le paracétamol [265]. Le bacopa et la silymarine ont produit un effet hépatoprotecteur significatif en diminuant l'activité des transaminases (ALAT et ASAT) et de la phosphatase alcaline (PAL) au niveau sérique, les taux de bilirubine, de cholestérol total et de la peroxydation lipidique. Ils ont également augmenté significativement les taux de glutathion réduit (GSH), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et HDL-cholestérol. L'extrait de bacopa a aussi été évalué sur homogénat de foie et il a permis de diminuer la lipoperoxydation induite par le chlorure ferreux (FeCl₂). **A partir de ces résultats, il peut être suggéré que le bacopa pourrait protéger les hépatocytes des dommages induits par le paracétamol grâce à ses propriétés antioxydantes, protégeant ainsi les cellules hépatiques des effets toxiques de la NAPQI.**

Une autre étude a utilisé le tétrachlorométhane (dit aussi tétrachlorure de carbone, CCl₄) pour induire une hépatotoxicité chez des rats et évaluer l'hépatoprotection offerte par le bacopa [266]. Un extrait éthanolique des parties aériennes a ainsi permis de diminuer significativement l'élévation des transaminases ALAT et ASAT, de la PAL, et des taux de bilirubine et de cholestérol total, provoquée par cette hépatotoxine. L'extrait s'est également opposé à la diminution du HDL-cholestérol et à celle du poids du foie induite par CCl₄. Les auteurs ont également montré une diminution significative de la peroxydation lipidique et une

augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) ainsi que du taux de GSH chez les rats traités avec l'extrait comparativement à ceux n'en ayant pas reçu. Enfin, les études histopathologiques ont révélé avec CCl₄ une vaste nécrose centro-lobulaire s'étendant à d'autres zones et une dégénérescence avec stéatose. L'administration de l'extrait de bacopa a permis une amélioration significative de l'architecture hépatocellulaire avec une réduction considérable de la nécrose et de la stéatose. La silymarine, prise comme référence, a manifesté des effets hépatoprotecteurs similaires. Le tétrachlorométhane subit une biotransformation par les enzymes microsomaux hépatiques CYP450-dépendantes en un radical réactif trichlorométhyl (qui peut former des adduits avec l'ADN, ou réagir avec les protéines ou les lipides) qui peut lui-même réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un radical hautement réactif, le trichlorométhyl peroxyde qui initie la chaîne des réactions de la peroxydation lipidique. **Le mécanisme de l'hépatoprotection du bacopa vis-à-vis du CCl₄ est donc probablement dû à son activité antioxydante.**

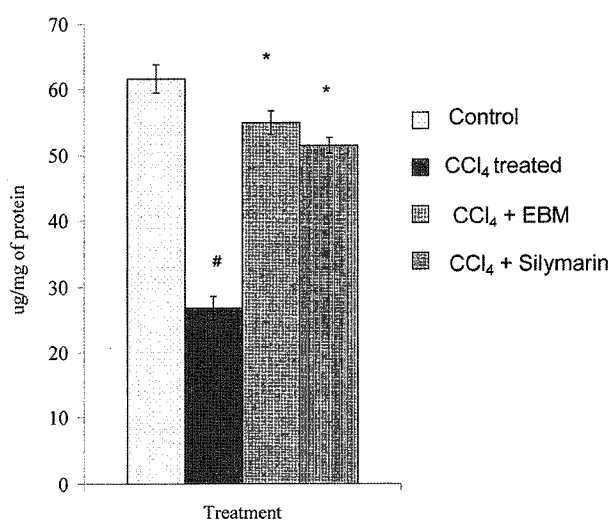


Figure 92: comparaison des taux de glutathion réduit (GSH), au niveau du foie des rats *in vivo*, des groupes contrôle, CCl₄, CCl₄ + EBM (extrait de *Bacopa monnieri* 300 mg/kg p.o.) et CCl₄ + silymarine (25 mg/kg p.o.). □ = $p < 0,001$ versus contrôle et * = $p < 0,001$ versus groupe CCl₄ [266].

Le bacopa a également permis de réduire l'augmentation de l'activité des enzymes sériques ALAT, ASAT, PAL, LDH (lactate déshydrogénase) et γ -GT (γ -glutamyl transpeptidase),

ainsi que la formation de malondialdéhyde au niveau du foie, provoquées par l'administration d'hydrochloride de D-galactosamine (D-GalN) chez des rats [267]. L'extrait a aussi permis de restaurer les taux diminués de GSH et de s'opposer à la diminution de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion réductase (GR), de la SOD, de la CAT et de la glucose-6-phosphatase (G6P). Cette étude démontre donc que le bacopa exerce des effets protecteurs contre les dommages hépatiques induits par D-GalN. Là encore, peut-être que l'hépatotoxicité est surtout médiée par la génération de ROS. **Il semblerait que le bacopa ait permis de maintenir l'intégrité structurale de la membrane des hépatocytes, peut-être en permettant une régénération accélérée des cellules du parenchyme, protégeant ainsi la sortie des marqueurs enzymatiques hépatiques dans la circulation générale, mais ceci demande à être confirmé. Quoiqu'il en soit, le potentiel hépatoprotecteur du bacopa est clairement établi, son potentiel antioxydant aussi.**

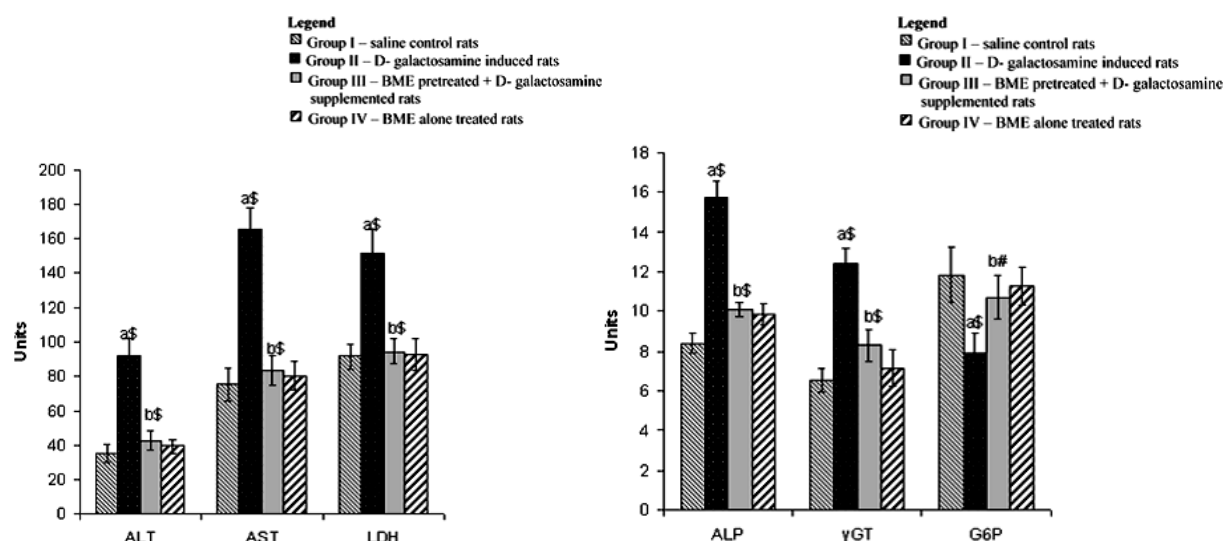


Figure93: comparaison des taux des marqueurs enzymatiques sériques hépatosécifiques (ALAT=ALT, ASAT=AST, LDH, PAL=ALP, γ-GT, et G6P) des groupes contrôle, D-Gal, BME (extrait de *Bacopa monnieri*) + D-Gal et BME seul, chez le rat [267].

Cette même équipe (Sumathi *et al.*) a, quelques mois plus tard, réussi à prouver que le constituant actif isolé du bacopa, le bacoside A, supportait tout ou partie de l'effet hépatoprotecteur [268]. En effet, le bacoside A administré quotidiennement à la dose de 10

mg/kg aux rats ayant reçu du D-GalN a permis d'atténuer les taux augmentés d'ALAT, ASAT, PAL, γ -GT, LDH, 5'-nucléotidase (5'ND). D'autre part, il a restauré significativement les taux des vitamines C et E qui avaient été diminués par l'administration de D-GalN, tant au niveau hépatique que plasmatique. **Ces résultats suggèrent une activité hépatoprotectrice du bacoside A.**

Enfin, les travaux de Janani *et al.* ont confirmé l'effet hépatoprotecteur du bacoside A contre la toxicité induite par la *N*-nitrosodiéthylamine chez des rats [269] et ont également mis en évidence les effets chimioprotecteurs (ou la protection des effets d'une substance chimique) et antimétastatique du bacoside A dans un modèle expérimental d'hépatocarcinogénèse [270, 271] (cf. page 240). La *N*-nitrosodiéthylamine est fortement hépatotoxique, provoque une nécrose hépatique, un stress oxydant avec la génération de ROS et est un hépatocarcinogène connu. Des rats ont été prétraités avec 15 mg/kg/j de bacoside A *per os* pendant 14 jours et ensuite intoxiqués avec une dose unique de *N*-nitrosodiéthylamine (200 mg/kg) en intrapéritonéal et maintenus en vie pendant 7 jours, à l'issue desquels des dosages biochimiques et une étude histologique ont été effectués [269]. Le poids du foie, le taux de peroxydation lipidique, l'activité des marqueurs enzymatiques sériques du fonctionnement hépatique (ALAT, ASAT, LDH, PAL, γ -GT) ont été augmentés de façon marquée chez les rats ayant reçu le carcinogène, alors que ces paramètres ont été retrouvés à des valeurs proches des valeurs normales chez les rats prétraités avec du bacoside A. Les activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx, GR et glutathion-S-transférase) ainsi que les taux de GSH ont été diminués au niveau hépatique chez les rats non prétraités et, là aussi, le bacoside A a provoqué une augmentation significative de ces paramètres d'étude en comparaison avec les rats non prétraités. **Le prétraitement avec le bacoside A a ainsi prévenu l'élévation de la peroxydation des lipides et des marqueurs enzymatiques sériques et a maintenu le système de défense antioxydant endogène et donc protégé les rats de l'hépatotoxicité provoquée par la *N*-nitrosodiéthylamine.**

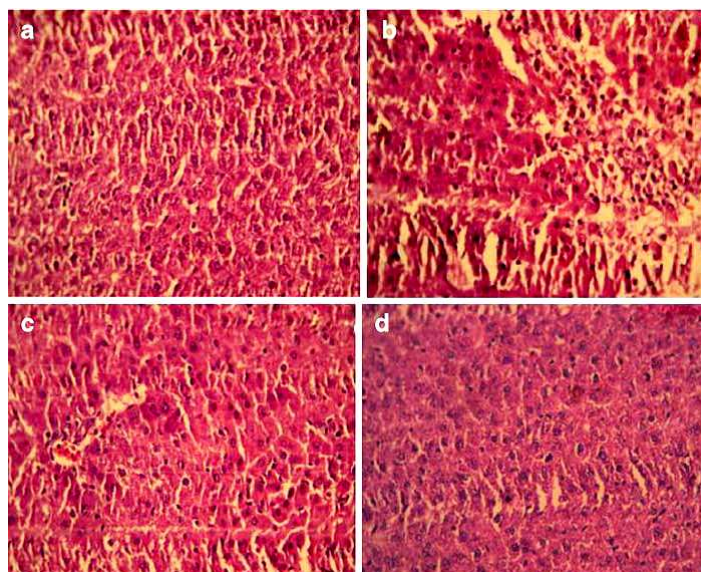


Figure 94: étude histologique de tissus hépatiques montrant un architecture normale dans le groupe contrôle (a), une nécrose hépatocellulaire et d'autres altérations dans le groupe *N*-nitrosodiéthylamine (b), une absence de nécrose et une architecture presque normale dans le groupe bacoside A + *N*-nitrosodiéthylamine (c) et une architecture normale dans le groupe bacoside A (d) [269].

IV.3. Propriétés anticancéreuses

IV.3.1. Etudes *in vitro*

Le test BSLA (*brine shrimp lethality assay*) où l'on observe la mortalité de l'artémie (*Artemia salina*), un petit crustacé, est très utilisé pour le criblage et l'évaluation rapide de drogues à activité cytotoxique supposée. En 2002, un test BSLA a été réalisé avec différents extraits de bacopa, une fraction riche en saponosides et du bacoside A [272]. L'extrait éthanolique, la fraction riche en saponosides et le bacoside A ont montré une importante activité cytotoxique avec une DL_{50} de respectivement 295, 95 et 38 $\mu\text{g/ml}$. **Aussi, le bacoside A, constituant du bacopa reconnu comme le plus actif dans d'autres propriétés biologiques, a manifesté la plus puissante activité cytotoxique, suggérant qu'il supporte une grande partie de cette activité.**

Parmi les drogues anticancéreuses, on distingue les médicaments spécifiques du cycle cellulaire (qui seront particulièrement actifs quand il existe une prolifération cellulaire importante) et les médicaments non spécifiques du cycle cellulaire (dont beaucoup se fixent à l'ADN et l'endommagent). Un outil biologique permettant d'évaluer l'impact d'un cytotoxique sur le cycle cellulaire est un champignon myxomycète eucaryote inférieur : *Physarum polycephalum*, parce qu'en surface des cultures de cet organisme syncitial on peut voir plus d'un million de noyaux se diviser de façon parfaitement synchrone, faisant de ce système un modèle expérimental idéal pour ce type d'étude. Des chercheurs ont ainsi évalué, *in vivo*, les effets d'un extrait éthanolique de bacopa sur le cycle cellulaire de *Physarum polycephalum*[273]. Il est apparu que les durées du cycle cellulaire étaient affectées par le bacopa, à la fois en fonction de la phase du cycle au cours de laquelle la drogue est administrée et de la concentration de celle-ci. Pour rappel, le cycle cellulaire se décompose en une phase G₁ (synthèse des constituants qui vont être nécessaires à la réplication de l'ADN), suivie d'une phase S (réplication de l'ADN), elle-même suivie d'une phase G₂ (synthèse des constituants qui vont être nécessaires à la mitose), et qui se termine par la mitose (division cellulaire). On définit également une phase G₀ qui correspond aux cellules qui ne sont pas en cours de cycle cellulaire (repos) [219]. **L'effet principal qui a été observé avec l'extrait de bacopa est un raccourcissement de la durée du cycle cellulaire de globalement 10 %, aux faibles concentrations (100-250 µg/ml), et qui s'est manifesté par un avancement dans l'initiation de la mitose quelle que soit la phase à laquelle on l'administre sauf en G₂, phase qui est apparue réfractaire (insensible). L'effet le plus significatif a été noté lorsque de faibles doses ont été administrées lors de la phase de réplication de l'ADN (phase S). En revanche, avec une dose élevée d'extrait (750 µg/ml), il est apparu un avancement des mitoses (raccourcissement de la durée du cycle) beaucoup moins marqué quand il est administré en phase S et même, un retard à la mitose (allongement de la durée du cycle) lorsqu'il est administré en G₂. D'autres études sont nécessaires pour identifier le(s) composé(s) de l'extrait de bacopa responsable(s) de ce effet mais aussi pour définir leur mécanisme d'action sur les processus phase-dépendants du cycle cellulaire ; peut-être le bacopa exerce-t-il une action phase-spécifique. Il a été rapporté que cette plante pouvait augmenter l'activité de protéines kinases, dont on sait que certaines (kinases cycline-dépendantes) jouent un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire, la possibilité de leur implication dans le raccourcissement du cycle cellulaire ne peut être exclue.**

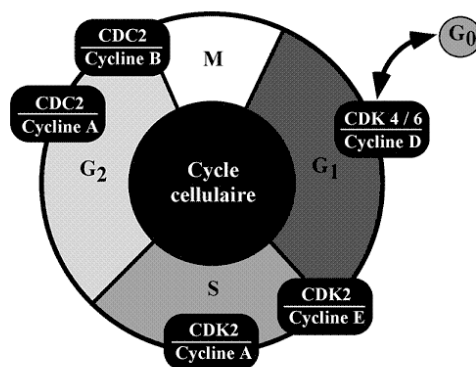


Figure 95: régulation du cycle cellulaire par les cyclines (unige.ch).

En 1995, une équipe de chercheurs s'est intéressée aux propriétés anticancéreuses potentielles du bacopa, *in vitro*, différentes concentrations d'un extrait éthanolique de la plante ayant été testées sur culture cellulaire S-180 (lignée de cellules de sarcome 180) en termes d'évaluation de la croissance et de la viabilité cellulaire et de capture de ^3H -thymidine (une base pyrimidique constitutive de l'ADN et donc indispensable à sa synthèse[274]). Les auteurs ont observés une diminution dose-dépendante de la croissance des cellules S-180 ainsi qu'une diminution, également dose-dépendante de la viabilité cellulaire. Au-delà d'une certaine concentration d'extrait ajouté au milieu de culture, une cytotoxicité importante est apparue. En effet, à $1 \text{ mg}/10^5 \text{ cellules/mL}$, la mortalité des cellules S-180 a été de 90% en 24 heures. Le site d'action d'une drogue anticancéreuse peut être évalué par des études d'incorporation de ^3H -thymidine. Dans cette présente étude, l'incorporation de ^3H -thymidine a été inférieure avec l'extrait de bacopa quelle que soit la concentration utilisée, en comparaison avec le contrôle (pas d'extrait ajouté), et l'effet était dose-dépendant [275]. **A partir de ces observations, l'effet cytotoxique du bacopa envers les cellules S-180 est évident. La croissance cellulaire retardée aux basses concentrations pourrait être d'une haute valeur thérapeutique dans le traitement du cancer. Cependant, la nature hautement toxique à forte concentration implique des tests *in vivo*. Enfin, le mécanisme d'action n'est certes pas élucidé mais pourrait être en partie dû à une inhibition directe ou indirecte de la réplication de l'ADN, comme l'a suggérée l'étude d'incorporation de thymidine tritiée.**

Plus tard, Rohini *et al.* ont évalué l'activité cytotoxique, notamment l'effet pro-apoptotique potentiel, d'un extrait éthanolique de bacopa à différentes concentrations sur des cultures de

cellules sarcomateuses murines S-180 [276]. A l'aide d'études d'exclusion du bleu de trypan (colorant entrant de manière passive dans les toutes les cellules et seules les cellules vivantes peuvent l'« exclure » par un transport actif ; les cellules mortes sont donc colorées), les auteurs ont montré que le bacopa diminuait de façon dose-dépendante et temps-dépendante la viabilité cellulaire avec une cytotoxicité maximale à 48 heures à une concentration de 550 $\mu\text{g/ml}$.

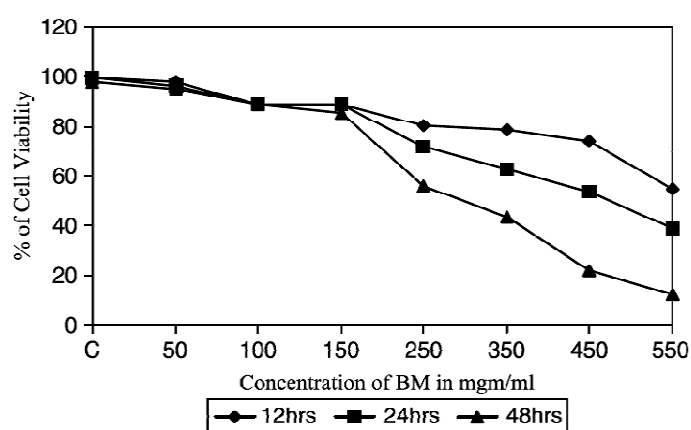


Figure 96: étude de survie des cellules S-180 (% de cellules viables) en fonction de la concentration et du temps d'exposition à un extrait alcoolique de plante entière de bacopa [276].

L'analyse morphologique de l'ultrastructure des cellules S-180 (microscopie électronique à transmission) a révélé des changements au niveau des micronuclei, une désintégration des nucléoles, une condensation de la chromatine, une perte des microvillosités, etc. Et, selon les auteurs, toutes ces modifications prédisaient l'apoptose (ou mort cellulaire programmée). De plus, les taux de GSH ont été diminués dans les cellules traitées avec l'extrait de bacopa, et là encore, il a été rapporté qu'une diminution rapide des taux de glutathion pouvait être associée au processus d'apoptose. Enfin, il a été réalisé un marquage à l'annexine V-FITC permettant de quantifier précisément les cellules apoptotiques. En effet, alors que dans une cellule non apoptotique les phosphatidylsérines membranaires ne sont présentes que sur la couche interne de la membrane cytoplasmique, les cellules en phase précoce d'apoptose subissent une translocation de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane et l'annexine V (couplée à un fluorophore) va se fixer spécifiquement sur ces phosphatidylsérines. L'analyse se fait alors

grâce à un cytomètre en flux. Ce marquage a montré 90,2 % et 76,8 % de cellules apoptotiques pour des concentrations d'extrait de bacopa de respectivement 550 et 450 $\mu\text{g/ml}$.

En conclusion, le bacopa a entraîné une mort cellulaire par apoptose des cellules S-180.

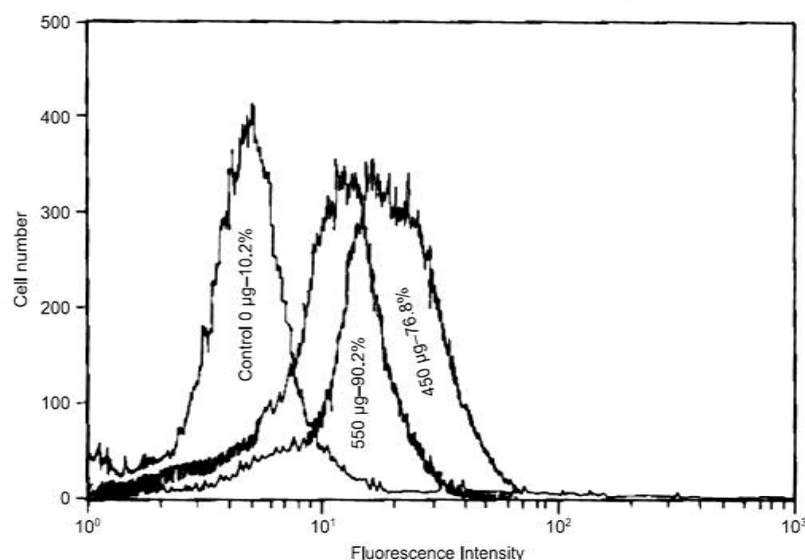


Figure 97: comptage en cytométrie en flux après marquage à l'annexine V-FITC des cellules S-180 apoptotiques, après exposition de celles-ci à un extrait de bacopa (450 et 550 $\mu\text{g/ml}$) pendant 48 heures [276].

Des chercheurs chinois se sont également intéressés aux propriétés antitumorales du *Bacopa monnieri*, sur 5 différentes lignées cellulaires humaines : MDA-MB-231 (cancer du sein), HCT-8 (adénocarcinome iléocœcal), A-549 (adénocarcinome pulmonaire), SHG-44 (gliome), PC-3M (cancer de la prostate) [21]. De plus, ils ont réalisé un fractionnement chromatographique de l'extrait méthanolique (MeOH) obtenu à partir d'une poudre totale de la plante et ont isolé 4 fractions à partir de celui-ci : éther de pétrole, chloroformique (CHCl_3), acétate d'éthyle (EtOAc) et butanolique (*n*-BuOH). C'est l'extrait MEOH qui a manifesté la plus puissante activité antitumorale contre toutes les lignées cellulaires étudiées (CI_{50} les plus basses), suivi de près par la fraction *n*-BuOH, elle-même hautement toxique sur toutes les lignées, puis vient la fraction CHCl_3 retrouvée cytotoxique sur 3 des 5 lignées et enfin, les fractions d'éther de pétrole et EtOAc n'ont pas montré d'activité antitumorale significative sur aucune des lignées. En fait, l'activité antitumorale de la fraction *n*-BuOH a été la plus

proche, mais pas supérieure, à celle de l'extrait MeOH. Les composants cytotoxiques de l'extrait MeOH ont donc été retrouvés dans la fraction *n*-BuOH et sont polaires. L'équipe a alors réalisé le fractionnement et l'isolement chromatographique de 4 saponosides à partir de cette fraction *n*-BuOH : bacopaside I, bacopaside II, bacopaside VII et bacopasaponine C. **Ce sont les bacopasides I et VII qui ont été les plus cytotoxiques, sur les 5 lignées tumorales humaines.** Les 2 autres saponosides triterpéniques ont été significativement moins puissants comparativement aux bacopasides I et VII. Le test MTT, qui permet une numération rapide des cellules vivantes par l'utilisation d'un sel de tétrazolium (le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) qui va être réduit au niveau des mitochondries des cellules vivantes en formazan donnant une couleur bleu/violet aux mitochondries, a confirmé que les bacopaside I et VII étaient bien les plus cytotoxiques sur les lignées étudiées en ayant obtenu les CI_{50} les plus basses.

Tableau19 : activité cytotoxique *in vitro* de 4 saponosides contre différentes lignées cellulaires tumorales. Le 5-fluoro-uracile (5-FU) est pris comme référence [21].

composés	CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$)				
	MDA-MB-231	SHG-44	HCT-8	A-549	PC-3M
5-FU	3,5	3,5	4,7	5,4	4,6
Bacopaside I	12,3	9,7	11,3	8,9	13,9
Bacopaside II	32,4	36,9	40,3	44,4	45,4
Bacopaside VII	14,3	15,9	9,8	9,7	10,1
Bacopasaponine C	34,9	47,3	58,3	56,4	48,2

Aussi, il a été montré sur Matrigel® de cellules humaines de cancer du sein métastasé (lignée MDA-MB-231) que les bacopaside I et VII permettaient d'inhiber significativement l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire [21], suggérant qu'ils pourraient peut-être aussi, *in vivo* cette fois, empêcher la migration tumorale et les métastases.

IV.3.2. Etudes *in vivo*

Peng *et al.* ont réalisé une étude de croissance tumorale *in vivo* en implantant des cellules S-180 dans l'ascite de souris [21] et ont montré que les bacopasides I et VII étaient les plus efficaces parmi tous les extraits, fractions et composés isolés testés (à une concentration unique de 50 µmol/kg) et qu'il avaient permis une inhibition respective de 90,52 % et 84,13 % de la croissance tumorale au 10^{ème} jour d'implantation. Les auteurs ont conclu sur la nécessité d'élucider le mécanisme d'action de ces 2 saponosides triterpéniques du bacopa.

Devant certaines évidences biologiques d'un lien entre le stress oxydant et la maladie cancéreuse (les agents carcinogènes sont dans leur quasi-totalité des générateurs de stress oxydant, les cellules tumorales produisent de grandes quantités de ROS, un stress oxydant est retrouvé chez les patients atteints d'un cancer, et les antioxydants peuvent protéger de certains cancers expérimentaux) [172] et, devant le fait que le bacopa manifeste dans de nombreux travaux de recherche une puissante activité antioxydante, il se devait d'évaluer ses effets antioxydants dans le cancer. Rohini *et al.* ont ainsi évalué en 2004 les propriétés antioxydantes et d'inhibition tumorale d'un extrait éthanolique de la plante entière de *Bacopa monnieri* en administration sous-cutanée pendant 30 jours à raison de 20 mg/kg/j (concentration minimale efficace d'après une étude dose/effet préliminaire) chez des rats porteurs d'un fibrosarcome (induit par du 3-méthylcholanthrène) [277]. Au niveau hépatique et rénal, il a été noté une diminution du statut antioxydant chez les rats porteurs d'un fibrosarcome avec une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx) ainsi que des taux de glutathion réduit (GSH) et de la peroxydation lipidique. En revanche, le traitement avec l'extrait de bacopa a permis d'augmenter le statut antioxydant (tous les paramètres ont été améliorés) et de diminuer de façon concomitante la peroxydation lipidique, comparativement aux rats non traités. D'autre part, alors que les paramètres sériques pris par les auteurs comme des marqueurs tumoraux hépatiques (activité enzymatique LDH, CK, ALAT et ASAT et le taux d'acide sialique) ont tous été fortement augmentés dans le groupe non traité avec l'extrait de la plante, ils ont été diminués dans le groupe traité. **Une corrélation positive semble donc exister d'après cette étude entre l'amélioration du statut antioxydant et la diminution de la peroxydation lipidique d'une part et la diminution des marqueurs tumoraux d'autre part.**

L'équipe de Janani a travaillé sur un modèle animal de carcinome hépatocellulaire (CHC) provoqué chez le rat par une administration de *N*-nitrosodiéthylamine (0,01 % dans l'eau de

boisson) pendant 16 semaines. Le bacoside A a été donné oralement pendant la même période à raison de 15 mg/kg/j [270]. La prise du carcinogène a diminué le poids corporel des animaux, augmenté le poids relatif du foie, augmenté le taux de peroxydation lipidique dans les érythrocytes et le foie, augmenté les marqueurs tumoraux dans le sérum (5'ND, antigène carcino-embryonnaire (ACE) et alfa-fœtoprotéine (AFP)), augmenté les marqueurs enzymatiques hépatospecifiques (ALAT, ASAT, LDH, PAL, γ -GT) et diminué le statut antioxydant aussi bien au niveau de l'hémolysat que du foie : diminution de l'expression de la SOD, des taux d'antioxydants non enzymatiques (vitamines C et E), de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx, γ -GT, LDH, GR) et des taux de GSH. Pour chacun de ces paramètres, le groupe traité avec le bacoside A a montré des valeurs proches des valeurs normales, y compris pour les marqueurs tumoraux qui ont été significativement diminués comparativement aux rats n'ayant pas reçu de bacoside A. L'étude histopathologique de sections hépatiques a confirmé les altérations biochimiques énumérées précédemment (perte de l'architecture normale du foie avec des dommages cellulaires) alors que dans le groupe *N*-nitrosodiéthylamine + bacoside A les hépatocytes sont restés normaux. De même, alors que l'étude de l'ultrastructure des hépatocytes a révélé des aberrations dans le groupe *N*-nitrosodiéthylamine, rien d'anormal n'a été constaté dans le groupe *N*-nitrosodiéthylamine + bacoside A. Enfin, le bacoside A a permis de s'opposer à la nodulogenèse, autrement dit à l'apparition de nodules tumoraux hépatiques (incidence des tumeurs de 100 % dans le groupe *N*-nitrosodiéthylamine et de seulement 16,7 % dans le groupe *N*-nitrosodiéthylamine + bacoside A). **Le bacoside A apparaît efficace dans la prévention du carcinome hépatocellulaire induit par la *N*-nitrosodiéthylamine chez le rat et plus généralement, cette étude suggère qu'il pourrait être une drogue anticancéreuse efficace. Bien évidemment, d'autres investigations sont nécessaires pour asseoir les bases mécanistiques de cette propriété.**

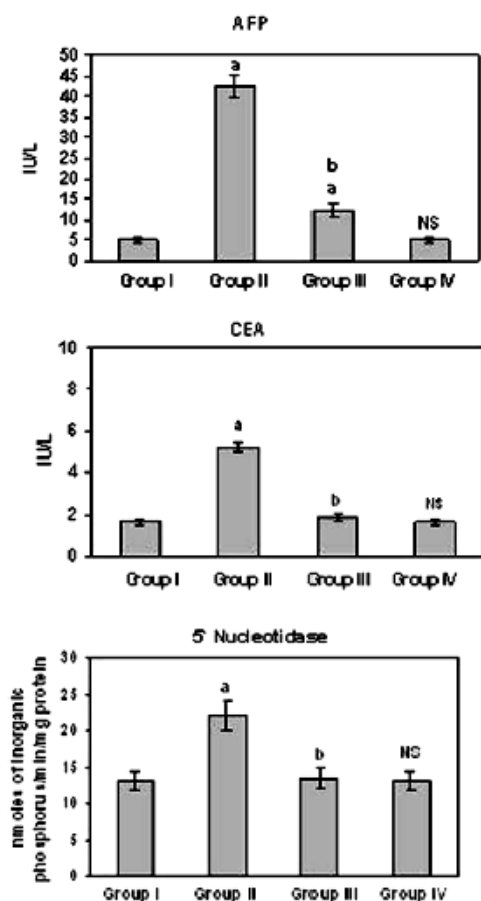


Figure 98: comparaison des taux des marqueurs tumoraux sériques, antigène carcino-embryonnaire (ACE = CEA), alfa-fœtoprotéine (AFP) et 5'-nucléotidase, entre les groupes contrôle (I), hépatocarcinome induit par la *N*-nitrosodiéthylamine (II), *N*-nitrosodiéthylamine + bacoside A (III) et bacoside A seul (IV) [270].

Tout récemment, Janani *et al.*, dans la suite logique de leurs travaux concernant les effets hépatoprotecteurs d'une part [269] et de prévention potentielle du carcinome hépatocellulaire d'autre part [270], ont montré que le bacoside A pouvait diminuer l'expression de marqueurs du processus métastatique, les métalloprotéases matricielles (MMP) de type 2 et 9, dans un modèle de CHC induit chez le rat par la *N*-nitrosodiéthylamine. Une métastase cancéreuse désigne la localisation locorégionale ou à distance d'une tumeur maligne propagée par voie vasculaire (sanguine ou lymphatique) ou plus rarement par un conduit naturel. Une métastase est donc le signe d'une diffusion du cancer et résulte d'un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes. Le CHC est une maladie multifactorielle et est dans le monde la 3^e cause de mort par cancer. Aussi, des études expérimentales et cliniques ont montré que les MMP-2 et MMP-9 étaient impliquées dans l'invasion tumorale et la formation de métastases, et l'augmentation de leur expression a été associée à un mauvais pronostic [271]. L'étude par zymographie sur gel de gélatine (gélatine couplée à de la fluorescéine et l'intensité du signal

fluorescent est proportionnelle à la protéolyse de la gélatine par les MMP) a montré que le cotraitement avec du bacoside A diminuait significativement les activités des MMP-2 et 9 en comparaison avec les animaux n'ayant pas reçu de bacoside A, dans ce modèle de CHC. D'autre part, l'analyse immunoblot a montré une diminution de l'expression de ces métalloprotéases matricielles dans le groupe *N*-nitrosodiéthylamine+bacoside *Aversus* groupe *N*-nitrosodiéthylamine. **Ces résultats suggèrent un effet anti-métastatique possible du bacoside A dans le carcinome hépatocellulaire en exerçant une inhibition de l'activité et de l'expression des métalloprotéases matricielles de type 2 et 9.**

Le médicament anticancéreux idéal devrait éliminer les cellules cancéreuses sans léser les cellules saines, mais il n'existe malheureusement pas et l'on se réfère toujours au rapport bénéfice/risque dans l'évaluation de l'utilité clinique d'une chimiothérapie anticancéreuse [219]. C'est pourquoi parmi toutes les classes de médicaments anticancéreux, certains auteurs y incluent également les agents cytoprotecteurs (ou chimioprotecteurs), c'est-à-dire toute drogue qui peut permettre de protéger les tissus normaux des effets toxiques de la chimiothérapie. En 2007, une équipe de chercheurs indiens a montré que le bacopa pouvait réduire la toxicité liée à l'utilisation d'un antimétabolite (plus précisément un antipyrimidique spécifique de la phase S) utilisé quasi-exclusivement dans les leucémies aiguës myéloblastiques : la cytarabine (cytosine-arabinoside ou Ara-C). Ces chercheurs ont évalué l'effet protecteur sur des embryons de poulet de doses croissantes d'un extrait éthanolique de bacopa (2, 4 et 6 mg par œuf, en administration unique au 12^e jour après la ponte) sur les changements biochimiques induit par l'Ara-C (dose unique au 15^e jour) au niveau du liquide amniotique et des tissus hépatique et cardiaque [278]. L'Ara-C a provoqué une augmentation des taux de glucose, protéines totales, urée, acide urique, créatinine, phosphate inorganique, de l'activité des enzymes ALAT, ASAT, PAL, LDH et MDH et une diminution des taux de vitamines antioxydantes C et E... Le bacopa a permis de diminuer significativement les taux de glucose, protéines totales, urée, acide urique, créatinine et phosphate inorganique. Les activités des enzymes PAL, LDH, ALAT, ASAT et MDH ont également été diminuées, de manière dose-dépendante, dans les 3 tissus analysés. **Ces données indiquent que le bacopa peut s'opposer aux perturbations métaboliques provoquées par la cytarabine. Néanmoins, il est toujours délicat d'extrapoler à l'homme les résultats des expérimentations animales.**

IV.4. Propriétés anti-inflammatoires

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à une agression d'origine diverse (traumatisme mécanique, chimique ou thermique, infection...). On distingue les inflammations primaires (ou locales) qui ont une cause immédiate et dont les médiateurs clés sont les cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques) et les inflammations secondaires qui sont des réactions systémiques qui se développent à distance. L'inflammation survient au cours des réactions de défense non spécifique de l'organisme mais elle accompagne aussi les réactions de défense spécifique, qu'elle amplifie [274, 279].

Les manifestations classiques d'une inflammation sont la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème. De très nombreux médiateurs chimiques endogènes sous-tendent ces manifestations de « *rubor, calor, dolor* » comme les amines et peptides vasoactifs (histamine, sérotonine), les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, *tumor necrosis factor α* ou TNF α , interféron γ ou INF γ), la bradykinine, les prostaglandines (PG), le NO, les enzymes lysosomiales, les lipoxygénases (LOX), la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), la phospholipase A₂ (PLA₂), le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et les protéines du complément. L'inflammation s'accompagne aussi d'une formation de radicaux libres.

IV.4.1. Mécanisme d'action anti-inflammatoire

En 2006, Channa *et al.* ont pour la première fois mis en évidence une action anti-inflammatoire du bacopa dans un modèle expérimental animal d'inflammation aiguë qui a consisté en l'injection chez des rats et des souris de carraghénane (1 % m/v), au niveau de leur patte arrière droite [23]. Un œdème s'est ainsi développé. Chez la souris, un extrait alcoolique de bacopa (100 mg/kg, i.p.) a manifesté un effet inflammatoire, évalué par la différence de volume de l'œdème, comparable à celui de l'aspirine (100 mg/kg, i.p.). Chez le rat, où des doses croissantes ont été testées, l'extrait de bacopa et l'aspirine à faible dose (10 mg/j, i.p.) n'ont pas provoqué d'amélioration significative alors qu'à plus forte dose (50 et 100 mg/kg, i.p.) le bacopa a permis de diminuer significativement l'œdème et il est apparu 1,6 fois plus puissant que l'aspirine. Pour comprendre les mécanismes de l'action anti-inflammatoire du bacopa, la même expérience a été réalisée chez le rat avec d'autres agents inflammatoires :

acide arachidonique, histamine, sérotonine, bradykinine ou prostaglandine E₂ (PGE₂). L'extrait de bacopa a inhibé sélectivement l'inflammation aiguë provoquée par la PGE₂ suggérant que l'activité anti-inflammatoire du bacopa passe par une inhibition des prostaglandines, ce qui est un mécanisme fréquemment rencontré parmi les drogues anti-inflammatoires. De plus, connaissant les effets modulateurs de l'acide bétulinique sur les médiateurs de l'inflammation, il a été postulé une participation possible de celui-ci dans l'activité anti-inflammatoire du bacopa, postulat qui sera repris ultérieurement par une autre équipe [280].

Cette activité anti-inflammatoire nouvellement découverte du bacopa pourrait être utile dans le soulagement de diverses pathologies inflammatoires et confirme les usages traditionnels de cette plante dans le traitement de l'inflammation.

En utilisant des modèles *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* validés, l'équipe de Viji a évalué l'activité anti-inflammatoire d'un extrait méthanolique (MeOH) et de ses différentes fractions (dont une fraction riche en bacosides) en ce qui concerne l'inhibition des médiateurs clés de l'inflammation (LOX, COX et TNF α) [281]. Là encore, l'œdème à la patte induit par le carraghénane a confirmé le potentiel anti-inflammatoire du bacopa avec une réduction maximale de celui-ci de 82% avec l'extrait MeOH à 100 mg/kg en i.p. alors que l'indométacine (un AINS, anti-inflammatoire non stéroïdien) n'a permis qu'une inhibition maximale de 70% (3 mg/kg, i.p.). Le bacopa est apparu moins puissant en administration orale même si les résultats sont restés très significatifs. Les études *in vivo* ont également montré que l'extrait MeOH de bacopa pouvait inhiber significativement les activités des LOX-5, LOX-15 et COX-2 des monocytes de rats et a obtenu des résultats comparables voir supérieurs au diclofénac (AINS) et à l'indométacine. La fraction EtOAc et la fraction riche en bacosides ont également manifesté une inhibition significative de ces enzymes. Des résultats prometteurs ont été constatés dans l'étude *ex vivo* d'inhibition de la libération de TNF α induite par le LPS (lipopolysaccharide) sur échantillons de sang de volontaires humains, avec une inhibition maximale de 45% obtenue avec la fraction EtOAc. Enfin les études *in vitro* sur cellules mononuclées de rat ont confirmé les propriétés antioxydantes du bacopa avec une puissante activité de piégeage des radicaux DPPH et $\cdot$ OH, et c'est la fraction EtOAc qui a obtenu les meilleurs résultats (CI₅₀ de 25 μ g/ml *versus* 5 μ g/ml pour la quercétine, pour le radical $\cdot$ OH). **Donc, ces données indiquent clairement l'activité anti-inflammatoire de l'extrait MeOH, de sa fraction EtOAc et des bacosides et elle apparaît comparable aux médicaments conventionnels (indométacine et diclofénac).** Fait intéressant, le ratio

d'inhibition COX-1/COX-2 a révélé que le bacopa permettait une inhibition de 70 % de la COX-2 (l'inhibition résiduelle correspondant à l'inhibition de la COX-1) alors que l'indométacine n'a permis qu'une inhibition de l'ordre de 10 % de la COX-2. Or, alors que la cyclo-oxygénase 2 est responsable de la production des PG impliquées dans l'inflammation, la cyclo-oxygénase 1 synthétise les PG constitutives qui, entre autres, protègent la muqueuse digestive [225]. Ainsi, les AINS non sélectifs ou non spécifiques de la COX-2 provoquent les effets indésirables digestifs bien connus des patients et cliniciens. D'autre part, quand on réalise un blocage de la voie des COX on réalise un « shunt » métabolique, autrement dit on renforce la voie des LOX responsables de la production des leucotriènes pouvant elles-mêmes être responsables d'effets néfastes (hypersensibilité immédiate, bronchoconstriction, chimiotactisme, participation au processus inflammatoire, etc.). Le bacopa a permis une inhibition significative des LOX étudiées évitant ainsi d'augmenter la production de leucotriènes, contrairement au diclofénac. **Pour toutes ces raisons, le bacopa semble avoir un meilleur rapport bénéfice/risque que nombre d'AINS actuellement employés.**

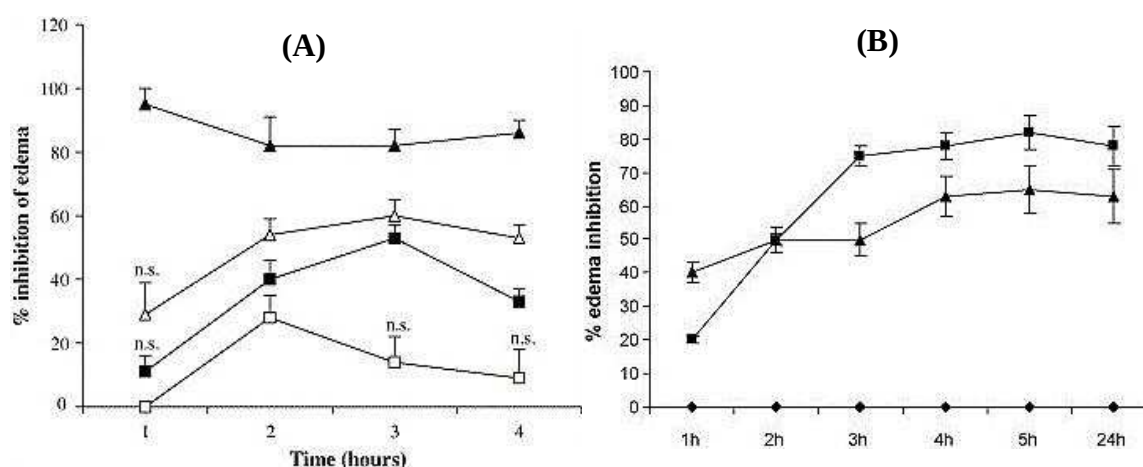


Figure 99 : comparaison des pourcentages d'inhibition de l'œdème (patte arrière des rongeurs) en fonction du temps. Graphe (A) : aspirine à 50 mg/kg (□) et 100 mg/kg (Δ) ; extrait alcoolique de bacopa à 50 mg/kg (■) et 100 mg/kg (◻) [23]. Graphe (B) : contrôle (♦), extrait alcoolique de bacopa à 100 mg/kg (■) et diclofénac à 20 mg/kg (▲) [281].

Quelques mois plus tard, cette même équipe de chercheurs a confirmé le potentiel anti-inflammatoire et antioxydant du bacopa. Elle a également démontré la capacité des fractions

triterpéniques et riche en bacosides (issues d'un extrait MeOH) a inhibé la production des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-6 dans des modèles expérimentaux *in vitro* (monocytes et cellules d'exsudat péritonéal humains) et a inhibé la production de NO par les monocytes. D'autre part, la diminution des taux sériques de CRP (protéine C réactive, protéine de la phase aiguë de l'inflammation) par la fraction triterpénique dans un modèle animal d'arthrite a permis de mettre en évidence une possible efficacité du bacopa dans cette pathologie inflammatoire [282].

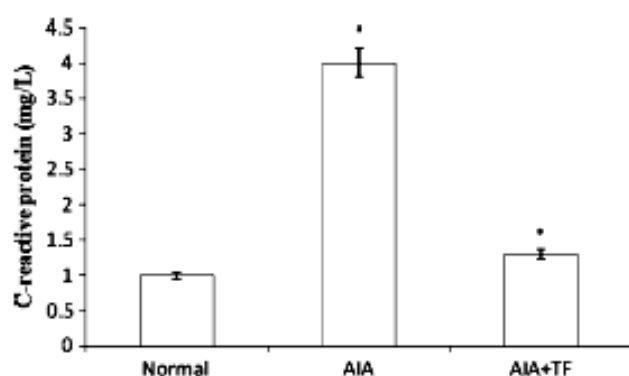


Figure 100: comparaison des taux de protéine C réactive entre les groupe contrôle (souris normales), AIA (souris arthritiques) et AIA + TF (souris arthritiques traitées avec la fraction triterpénique du bacopa, 25 mg/kg p.o. $\times$ 30 jours) [282].

IV.4.2. Effets dans l'arthrite expérimentale

En 2010, le bacopa a manifesté des effets positifs dans un modèle d'arthrite expérimentale provoquée par des injections de collagène de type II à des rats, ce modèle validé ayant par ailleurs l'avantage d'offrir de nombreuses similarités avec la polyarthrite rhumatoïde [24]. En pratique, l'arthrite a été induite par immunisation des rats avec du collagène bovin de type II dans de l'adjuvant complet de Freund (2 injections suivies d'un rappel 7 jours après) et un extrait méthanolique dégraissé de *Bacopa monnieri* a été administré du 14^e au 74^e jour après le développement de l'arthrite, soit pendant une durée de 60 jours. Les critères d'évaluation ont été le gonflement de la patte, le score clinique de la sévérité de l'arthrite, les taux des médiateurs de l'inflammation (COX, LOX et myéloperoxydase), ainsi que les taux d'anticorps anti-collagène II (IgG et IgM). L'induction de l'arthrite a provoqué une augmentation significative de l'œdème et des signes cliniques classiques de l'arthrite ainsi

qu'une augmentation des médiateurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire subséquente. L'extrait de bacopa a été efficace pour inhiber les activités LOX et COX et pour diminuer l'activité de la myéloperoxydase au niveau du cartilage articulaire. Ces résultats ont été confirmés par les données histopathologiques montrant une amélioration significative de l'architecture articulaire (amélioration du pannus, synovium bien défini, diminution de l'infiltration cellulaire, hyperplasie modérée). D'autre part, le bacopa a permis une diminution très significative et temps-dépendante du taux d'anticorps spécifiquement dirigés contre le collagène de type II. En comparaison, l'indométacine a été moins efficace dans la réduction des signes cliniques (notamment l'œdème), n'a pas permis de diminuer significativement la réponse immunitaire à médiation humorale et n'a pas un profil pharmacologique aussi avantageux que le bacopa (pas de double inhibition COX et LOX, ni d'inhibition sélective de COX-2). Seules les données de l'histopathologie ont été comparables. **En conclusion, l'activité anti-arthritique du bacopa apparaît prometteuse, l'inhibition de l'arthrite expérimentale ayant clairement été démontrée dans ce présent modèle. Les effets pourraient être dus à la présence de composés triterpéniques comme les saponosides (bacosides) et/ou de l'acide bétulinique présents dans l'extrait MeOH utilisé.**

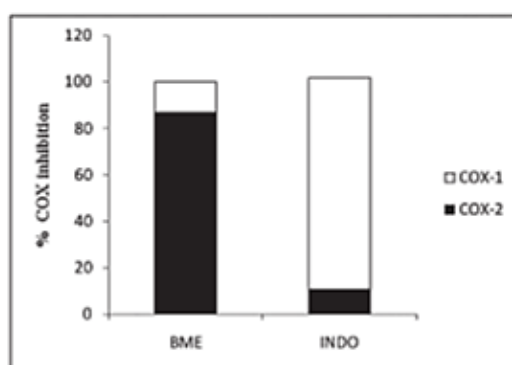


Figure 101 : profils d'inhibition (% relatifs) COX-1/COX-2 de l'extrait MeOH de bacopa (BME) et de l'indométacine dans un modèle d'arthrite expérimentale chez le rat [24].

Fin 2010, dans la suite logique de leurs précédents travaux, Viji *et al.* ont repris sensiblement le même modèle d'arthrite expérimentale (ici, vaccination des rats avec de l'adjuvant complet de Freud contenant des mycobactéries inactivées) pour évaluer tout particulièrement les effets

de la plante sur l'activité des lysosomes [283]. Les lysosomes sont des organites (donc par définition intracellulaires) dont le contenu est acide (pH 4,5-5) et de nombreuses enzymes hydrolytiques y sont présentes [264]. Les lysosomes sont comme des « estomacs cellulaires » [274] permettant de dégrader les bactéries et les débris cellulaires et jouent donc un rôle primordial dans les cellules phagocytaires.

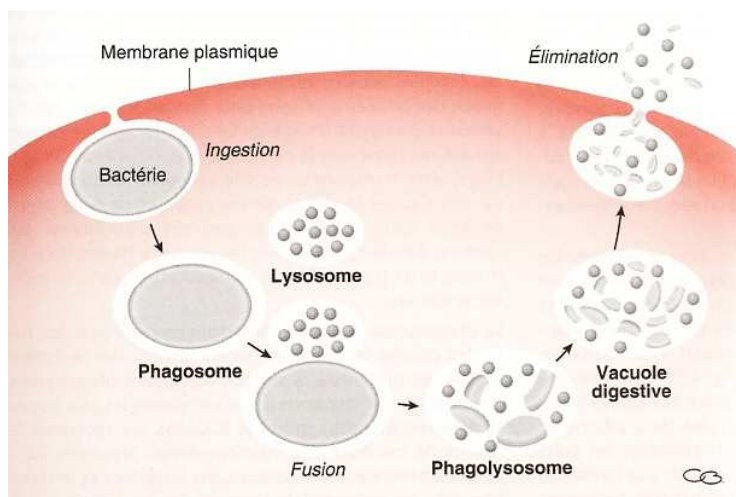


Figure 102: les différentes étapes du processus de phagocytose (ici d'une bactérie) [264].

Après induction de l'arthrite, l'extrait MeOH de bacopa a été administré *per os* pendant 30 jours (100 mg/kg/j). Au niveau du cartilage, l'extrait a permis de diminuer significativement l'activité des enzymes lysosomiales étudiées, à savoir des glucohydrolases (ou glycohydrolases) et des enzymes protéolytiques : β -glucuronidase, β -hexosaminidase, cathepsine D, hyaluronidase et collagénase. Il a aussi été constaté une augmentation significative chez les rats traités du contenu en glycoprotéines dans le liquide synovial, suggérant une possible inhibition des hydrolases à cet endroit. L'extrait a également protégé les rats arthritiques de la perte de glycoaminoglycanes (GAG), des constituants de la matrice extracellulaire, au niveau du tissu cartilagineux, probablement par inhibition des enzymes de dégradation des GAG. **Cette présente étude confirme le potentiel anti-inflammatoire et anti-arthritique déjà rapporté précédemment (amélioration clinique et histopathologique, et modulation des médiateurs de l'inflammation).**

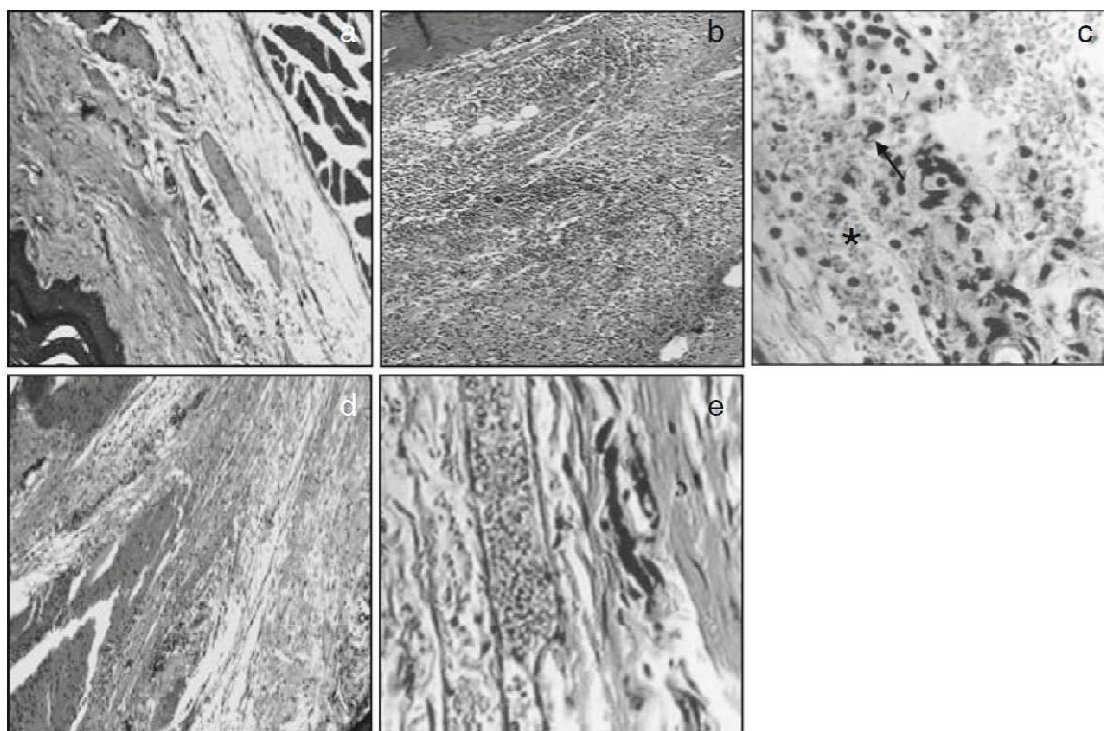


Figure 103 : microscopie optique de sections de patte de rat normal (a), arthritique en $\times 20$ (b) et $\times 40$ (c), et arthritique traité avec du bacopa en $\times 20$ (d) et $\times 40$ (e). On constate une inflammation sévère chez le rat arthritique avec une invasion massive de neutrophiles (points sombres bien visibles en (c)) et une formation de kyste (astérisque). L'inflammation est moindre (diminution de l'infiltration cellulaire et de l'enkystement) lors du traitement avec du bacopa[283].

Les travaux de Viji *et al.* ont fourni quelques bases pharmacologiques essentielles à une meilleure compréhension du mécanisme d'action anti-inflammatoire du bacopa et confortent certains usages traditionnels de cette plante. Les constituants responsables ne sont pas encore clairement identifiés mais le bacopa apparaît bien comme une thérapeutique potentiellement efficace dans la prise en charge de pathologies inflammatoires, notamment ostéo-articulaires. Nous ne pouvons qu'insister sur la nécessité d'entreprendre une évaluation clinique chez l'homme afin de valider ces données expérimentales animales.

IV.5. Propriétés immunomodulatrices

Une étude thaïlandaise a évalué et comparé les effets d'un extrait hydro-alcoolique de bacopa et du bacoside A sur la réponse immunitaire de souris génétiquement modifiées, *in vitro*, en évaluant la prolifération des splénocytes (monocytes immatures retrouvés au niveau de la rate) en présence ou en l'absence de mitogène (lipopolysaccharide (LPS), mitogène pokeweed (issu de la phytolaque), phytohémagglutinine, concanavaline A) ainsi que l'activité phagocytaire des macrophages [284]. Les mitogènes LPS et pokeweed sont utilisés pour stimuler la prolifération des lymphocytes B (L_B) via les voies indépendante et dépendante des lymphocytes T (L_T) respectivement alors que les mitogènes phytohémagglutinine et concanavaline A activent tous les sous-types de lymphocytes T. Sans mitogène, les résultats ont montré que l'extrait de la plante, pour des concentrations comprises entre 0,001 et 1 mg/ml, a légèrement inhibé la prolifération splénocytaire alors qu'au contraire, le bacoside A a stimulé la prolifération splénocytaire d'environ 50 % avec un maximum à 0,001 mg/ml. Les études avec mitogène ont montré que :

- L'extrait de BM a diminué de 40 % la prolifération des L_B via les 2 voies, L_T -dépendante et L_T -indépendante (déduction faite des résultats obtenus avec les mitogènes pokeweed et LPS) et il a également diminué la prolifération des divers sous-types de L_T (phytohémagglutinine et concanavaline A). L'activation maximale (80 %) a été retrouvée avec une forte concentration d'extrait de bacopa (10 mg/ml) et en présence de concanavaline A ;
- Le bacoside A a diminué la prolifération des L_B de 30 % via la voie L_T -indépendante (LPS) et au contraire, a augmenté de 25 % la prolifération des L_T via l'autre voie (mitogène pokeweed). L'activation maximale (environ 100 %) a été retrouvée avec une concentration de 0,1 mg/ml de bacoside A et en présence de concanavaline A.

Donc, ces résultats préliminaires indiquent une augmentation ou à l'inverse une diminution de la prolifération splénocytaire, en fonction de la concentration d'une part et en fonction de l'utilisation de l'extrait ou du bacoside A d'autre part. Une différence de sensibilité en fonction du mitogène utilisé est également notée. De façon similaire, il a par exemple été rapporté que certains flavonoïdes affectaient plus particulièrement la prolifération des L_T plutôt que les L_B , et que d'autres affectaient les deux de façon égale. En comparant les données, à concentration égale en bacoside A, de l'extrait et du bacoside A, on peut supposer que l'effet de l'extrait serait effectivement dû à la présence

de bacoside A, mais avec d'autres composés associés expliquant les différences dans les résultats. En fait, il faudrait dans l'idéal étudier les propriétés des composés individuels du mélange que constitue le bacoside A.

D'autre part, seul le bacoside A (10 mg/ml) a produit une augmentation de l'activité enzymatique lysosomiale (phosphatase acide) d'environ 20 %, reflétant une augmentation modérée de l'activité phagocytaire.

Une autre étude évaluant *in vitro* les effets sur l'immunité d'une fraction riche en saponosides du *Bacopa monnieri*[285] a montré que cette fraction permettait une stimulation significative de la production de NO par les cellules isolées d'un exsudat péritonéal de souris, sachant que la production de NO a été prise comme indicateur de l'activité phagocytaire. Ceci a été confirmé sur ces mêmes cellules d'exsudat péritonéal par la réalisation d'un test de réduction du bleu de nitrotétrazolium (NBT) où la fraction a permis une augmentation de la réduction du NBT. La fraction étudiée a aussi permis de stimuler l'activité enzymatique lysosomiale (phosphatase acide) ainsi que celle de la myéloperoxydase. Enfin, les auteurs ont mis en évidence, grâce à un test utilisant la sulforhodamine B, une stimulation de la prolifération des macrophages, des splénocytes (isolés de la rate des souris) et des cellules de la moelle osseuse (isolées à partir des fémurs des souris). Ce dernier test révèle la nature non toxique de la fraction riche en bacosides sur ces 3 lignées cellulaires d'une part, et suggère une action stimulante du système immunitaire du bacopa d'autre part. **Donc, cette fraction contenant les saponosides du bacopa semble capable d'activer des cellules d'un exsudat péritonéal de souris (macrophages et neutrophiles en majorité) et ainsi d'augmenter leur activité phagocytaire. Cette fraction pourrait également être capable d'augmenter la prolifération des cellules immunitaires, ou au moins d'augmenter leur viabilité. D'autres travaux de recherche sont bien évidemment nécessaires pour comprendre par quel(s) mécanisme(s) les constituants actifs du bacopa stimulent ou modulent le système immunitaire et, dans quelle mesure cela se traduit-il *in vivo*.**

Une équipe a travaillé sur différents extraits de feuilles de bacopa (aqueux, méthanolique, d'éther de pétrole et chloroformique) afin d'évaluer leur effet sur la dégranulation des mastocytes, le cromoglycate disodique, un inhibiteur de dégranulation des mastocytes, ayant été pris comme témoin positif [286]. Les mastocytes sont des cellules tissulaires granuleuses (leur caractéristique histologique est justement de contenir un très grand nombre de vésicules) qui fixent les IgE spécifiques par leurs récepteurs présents en surface et libèrent de multiples

messagers chimiques inflammatoires (entre autres de l'histamine) quand il y a contact avec un allergène. On parle alors de dégranulation mastocytaire et ce phénomène est impliqué dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (ou réactions allergiques immédiates) comme le choc anaphylactique. Un composé nommé 48/80 (inhibiteur de calmoduline) a été utilisé comme référence pour induire une dégranulation des mastocytes. **Aussi, l'étude a montré que l'extrait méthanolique manifestait un puissant effet de stabilisation des mastocytes en empêchant leur dégranulation et que l'activité inhibitrice retrouvée était comparable à celle du cromoglycate de sodium.**

Tableau 20: comparaison de l'activité stabilisante mastocytaire de divers extraits préparés à partir de feuilles de bacopa et du cromoglycate disodique [286].

Composés testés (concentration)	Dégranulation mastocytaire (%)
Aucun (contrôle)	29,7 ± 3,7
Composé 48/80 (4 µg/ml)	85 ± 1,8
Extrait de pétroléique (10 µg/ml)	72,7 ± 3,1
Extrait chloroformique (10 µg/ml)	80,0 ± 2,8
Extrait méthanolique (10 µg/ml)	38,0 ± 4,2
Extrait aqueux (10 µg/ml)	75,3 ± 1,6
Cromoglycate disodique (10 µg/ml)	41,7 ± 3,4

Ces résultats indiquent l'utilité potentielle du bacopa dans les phénomènes allergiques, notamment asthmatiques. Fait intéressant, ce sont des pathologies traditionnellement traitées par cette plante depuis fort longtemps dans l'Ayurvéd.

IV.6. Propriétés cicatrisantes

Une seule étude a pu être retrouvée concernant les propriétés cicatrisantes potentielles du bacopa, il s'agit des travaux de Sharath *et al.* en 2010 concernant l'évaluation comparative des propriétés cicatrisantes d'un extrait méthanolique (MeOH) de *Bacopa monnieri*, cultivar

« Pragyashakthi » (cf. page114), et d'un de ses constituants, le bacoside A, isolé de cet extrait [287]. Trois modèles de plaies ont été utilisés chez des rats : plaie par excision, plaie par incision et plaie avec espace mort (cavité restante après la fermeture incomplète d'une plaie). Deux types de formulation ont été préparés :

- Pour l'administration topique, 200 mg d'extrait MeOH ou de bacoside A dans 100 g d'alginate. Ce gel à 0,2 % m/m a été utilisé dans les plaies par excision et incision ;
- Pour l'administration orale, 30 mg/ml d'extrait MeOH ou 4 mg/ml de bacoside A en suspension dans 1 % m/v de gomme tragacanth. Ces suspensions ont été utilisées pour la plaie avec espace mort (réalisée à côté des vertèbres dorsales).

Une activité de cicatrisation significative a été observée tant avec l'extrait MeOH qu'avec le bacoside A, même si le bacoside A a été plus efficace. Dans le modèle de plaie par excision, une analyse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium) a montré que le bacoside A pouvait cliver les métalloprotéases matricielles et les inactiver. Dans le modèle de plaie par excision, le taux de fermeture de plaie a été significativement augmenté et l'épithélialisation a été plus rapide avec le gel à 0,2 % de bacoside A en comparaison avec le groupe contrôle. La résistance à la tension de la plaie par incision a été augmentée dans le groupe bacoside A. Quant à la plaie avec espace mort, le poids du granulome a été augmenté et l'étude histologique du granulome a montré une augmentation de la réticulation des fibres de collagène, une augmentation du nombre de fibroblastes et de vaisseaux sanguins et une absence de monocytes et donc d'infection. **Aussi, l'activité cicatrisante du gel de bacoside A a été comparable ou supérieure à celle de la pommade à base de nitrofurazone (prise comme référence). Enfin, l'activité d'inhibition des métalloprotéases matricielles peut être utile pour inhiber les protéases du *Staphylococcus aureus* dont sait qu'elles empêchent une cicatrisation correcte en dégradant des composants de la matrice extracellulaire.**

IV.7. Propriétés anti-ulcérogéniques

L'ulcère gastroduodéal se caractérise par une perte de substance localisée de la muqueuse gastrique ou duodénale et qui peut se révéler par des crampes douloureuses épigastriques, souvent rythmées par la prise alimentaire, ou par une complication (perforation, hémorragie

digestive) [243, 264]. Présente chez plus de 90 % des malades, il est maintenant bien établi que la bactérie *Helicobacter pylori*, qui possède des effets pro-inflammatoires, cytotoxiques et qui augmente indirectement la sécrétion acide, joue un rôle déterminant dans la pathogenèse de l'ulcère gastroduodéal. Son éradication est donc indispensable [225].

Il a été rapporté dans une étude indienne de 2000 que le jus frais de *Bacopa monnieri* possédait une activité anti-ulcérogénique significative [288]. Cette activité a été évaluée en utilisant des modèles expérimentaux d'ulcère gastrique provoqué par l'aspirine, l'éthanol, un stress dû au maintien au froid pendant 2 h ou par une ligature du pylore pendant 4 h, chez des rats. A des posologies de 100-300 mg/kg/j, le jus frais de bacopa a produit une activité anti-ulcéreuse dans tous ces modèles animaux sauf dans le cas d'ulcère induit par l'éthanol pour lequel le plus faible dosage (100 mg/kg) s'est révélé inactif. Le jus frais n'a pas permis de diminuer significativement la sécrétion de pepsine et l'acidité gastrique. En revanche, à la fois le jus frais et le sucralfate (sel complexe d'aluminium qui, en formant des liaisons avec les protéines du cratère ulcéreux, forme une sorte d'emplâtre qui adhère au fond de l'ulcère et le protège ainsi des agressions) ont provoqué une augmentation du taux de glycoprotéines constituant le mucus. Le mucus est sécrété par les cellules muqueuses (ou à mucus) et il est essentiellement constitué de mucopolysaccharides complexes (mucine), de bicarbonates et de glycoprotéines très hydrophiles, et sa sécrétion est stimulée par les prostaglandines. Le mucus agit comme un film protecteur à la surface de l'épithélium et protège la muqueuse gastrique contre l'acidité et les enzymes du suc digestif (la pepsine par exemple) [264]. **Ainsi, l'effet anti-ulcéreux du jus frais de bacopa pourrait être dû à son action sur les facteurs de défense de la muqueuse telles l'augmentation de la sécrétion de mucine et des glycoprotéines du mucus ou encore la diminution de la perte cellulaire, plutôt que sur les facteurs offensifs comme les sécrétions acide et de pepsine.**

Quelques mois plus tard, un extrait méthanolique de la plante (38 % de bacoside A), donné à diverses concentrations (10-50 mg/kg, 2 fois par jour, *per os*) pendant 5 jours à des rats, a montré une activité anti-ulcérogénique prophylactique dose-dépendante sur les mêmes modèles expérimentaux d'ulcère que la précédente étude (éthanol, aspirine, stress induit par un maintien au froid pendant 2 h et ligature du pylore pendant 4 h) [289]. Cet extrait donné cette fois pendant 10 jours (à raison de 20 mg/kg, 2 fois par jour) a permis de guérir les ulcères gastriques déjà constitués et provoqués par l'acide acétique à 50 %. **Aussi, l'extrait permettrait non plus simplement de prévenir l'apparition des ulcères mais aussi de les traiter efficacement.** Les auteurs, voulant préciser le(s) mécanisme(s) d'action sous-

jacent(s), n'ont pas réussi à démontrer un effet sur les sécrétions acide et de pepsine, mais ont mis en évidence une augmentation de la sécrétion de mucine et une diminution de la perte muqueuse, probablement par augmentation de la durée de vie des cellules à mucus car aucune augmentation de la prolifération cellulaire n'a été retrouvée. Le bacopa semble donc agir en augmentant les mécanismes de protection endogènes plutôt qu'en agissant directement sur les facteurs d'agression. L'équipe a également montré une diminution du taux de peroxydation des lipides et une augmentation des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) chez les animaux stressés par un maintien au froid comme chez les animaux non stressés (effets *per se*). **Les propriétés antioxydantes du bacopa pourraient constituer une composante importante de son effet anti-ulcérogénique.**

Le bacopa a également été évalué, sous la forme d'un extrait méthanolique, pour ses actions potentielles sur la bactérie *Helicobacter pylori* et sur la sécrétion des prostanoïdes (prostaglandines PG et prostacycline PGI₂) [290], sur cellules humaines muqueuses *in vitro*. L'extrait (1000 µg/ml) a montré une activité anti-*Helicobacter pylori* comparable à celle du citrate de bismuth pris comme référence. Pour mémoire, le citrate de bismuth a été largement utilisé en France pour le traitement des ulcères gastroduodénaux et d'autres pathologies digestives et a été retiré du marché en 1974 en raison de sa toxicité indéniable (encéphalopathies graves). Aussi, l'extrait de bacopa (10 µg/ml) a permis d'augmenter le contenu en PG et PGI₂ des colonies muqueuses humaines en culture. **Ces facteurs (augmentation des prostanoïdes et activité antibactérienne contre *H. pylori*) pourraient également expliquer les effets anti-ulcérogéniques (préventifs et curatifs) manifestés par le bacopa *in vivo* chez l'animal.**

IV.8. Propriétés spasmolytiques

Le terme spasmolytique s'emploie pour toute drogue susceptible d'entraîner un relâchement des fibres musculaires lisses, soit par une action directe au niveau des muscles, soit par une action indirecte.

Les muscles lisses sont présents dans la paroi de tous les organes creux (appareil digestif, appareil génito-urinaire, voies aériennes et les vaisseaux sanguins) et assurent un rôle de tonus et un rôle de raccourcissement [264].

L'action relaxante de muscles lisses d'un extrait éthanolique de bacopa a tout d'abord été étudiée sur des segments isolés d'artères pulmonaires principales de cochon d'Inde et de lapin, d'aorte de lapin et de trachée de cochon d'Inde [291]. L'extrait de la plante n'a pas induit de modification du tonus basal des muscles lisses. En revanche, lorsque les tissus ont été mis en présence d'un agent contractile (phényléphrine ou histamine) l'extrait a permis une diminution significative et dose-dépendante du tonus musculaire. Une relaxation complète a été visible avec les segments trachéaux. D'autre part, les chercheurs se sont aperçus que l'activité spasmolytique de l'extrait n'était pas affectée par un prétraitement des vaisseaux sanguins avec de l'atropine, un parasympatholytique direct (antagoniste direct de l'ACh au niveau des récepteurs muscariniques) ou du propranolol, un sympatholytique bêta dénué de sélectivité bêta-1 (dit communément β -bloquant non cardio-sélectif). Néanmoins, pour les préparations trachéales, le propranolol a bloqué partiellement la réponse. Toujours dans le but de découvrir le mécanisme d'action qui supporte l'action spasmolytique de l'extrait, les auteurs ont montré que l'indométacine (AINS) réduisait la relaxation induite par l'extrait dans tous les tissus étudiés et que l'endothélium vasculaire (couche de cellules endothéliales en regard de la lumière du vaisseau) n'était pas indispensable puisqu'en son absence, la même vasodilatation était obtenue. **Les effets de relaxation des fibres musculaires lisses pourraient être dus à une implication (potentielle) des prostacyclines dans tous les tissus (déduction faite des résultats obtenus avec l'indométacine) et des récepteurs β -adrénergiques pour la trachée. De plus, cette relaxation serait indépendante de l'endothélium et des récepteurs muscariniques.**

Quelques mois plus tard, cette même équipe a également montré que le bacopa possédait des propriétés bronchodilatatrices [292] *in vivo* sur rats anesthésiés. Un extrait de la plante s'est opposé à la bronchoconstriction et à l'hypotension induite par le carbachol (analogue stable de l'ACh). En effet, l'extrait a inhibé l'augmentation des pressions inspiratoires et expiratoires provoquée par le carbachol. En fait, l'extrait a manifesté une double action : une inhibition prédominante de la pression inspiratoire à faible dose et une inhibition prédominante de la pression expiratoire à forte dose. Cela suggère que plus d'un mécanisme est à la base de cette bronchodilatation parmi lesquels on peut citer, une activation des récepteurs β -adrénergiques, un antagonisme muscarinique, une augmentation de la libération de prostaglandines, ou encore une interférence avec la mobilisation calcique. Quand on compare les effets de l'extrait de bacopa avec ceux du salbutamol (β_2 -mimétique très utilisé dans la crise aiguë de l'asthme) et de l'isoprénaline (sympathomimétique β -adrénergique utilisé en clinique en tant

qu'agent inotrope), le bacopa se rapprocherait plus du salbutamol. **En conclusion, le bacopa pourrait exercer une action bronchodilatatrice via des mécanismes dépendants et indépendants des récepteurs β -adrénergiques.**

Le calcium joue un rôle central dans la contraction musculaire lisse [264] et les antagonistes calciques vont justement inhiber l'entrée de Ca^{++} dans les cellules des fibres musculaires lisses diminuant ainsi leur contractilité. Cela se traduira au niveau du cœur par une diminution de la contractilité cardiaque et au niveau des artères par une vasodilatation. Une activité antagoniste calcique d'un extrait éthanolique de bacopa a été mise en évidence, *ex vivo*, sur des muscles lisses intestinaux et vasculaires de lapins et de cochons d'Inde [293]. L'extrait a inhibé les mouvements spontanés à la fois de l'iléum de cochon d'Inde et du jéjunum de lapin. Par ailleurs, il a profondément diminué la réponse contractile induite par l'acétylcholine et l'histamine sur l'iléum et ce, de manière dose-dépendante. Ces résultats semblent indiquer une action directe de certains constituants de l'extrait de bacopa sur la musculature lisse. Aussi, pour investiguer l'interférence potentielle de l'extrait avec la mobilisation calcique, les effets relaxants ont été évalués en présence de chlorure de calcium (CaCl_2). Chez le lapin, toutes les réponses contractiles provoquées par le CaCl_2 ont été diminuées en présence de l'extrait, au niveau intestinal comme au niveau des vaisseaux artériels, de l'aorte et de l'artère pulmonaire principale, ce qui implique clairement une interférence de l'extrait avec l'influx calcique (flux entrant d'ions Ca^{++}). Cependant, il n'a pas été constaté de modification des contractions induites par la caféine ou la noradrénaline et il apparaît donc peu probable que l'extrait agisse directement sur la mobilisation du calcium intracellulaire. **L'effet spasmolytique du bacopa pourrait être principalement dû à une inhibition de l'influx de calcium via les récepteurs calciques à la fois voltage- et ligand-dépendants exprimés au niveau membranaire.**

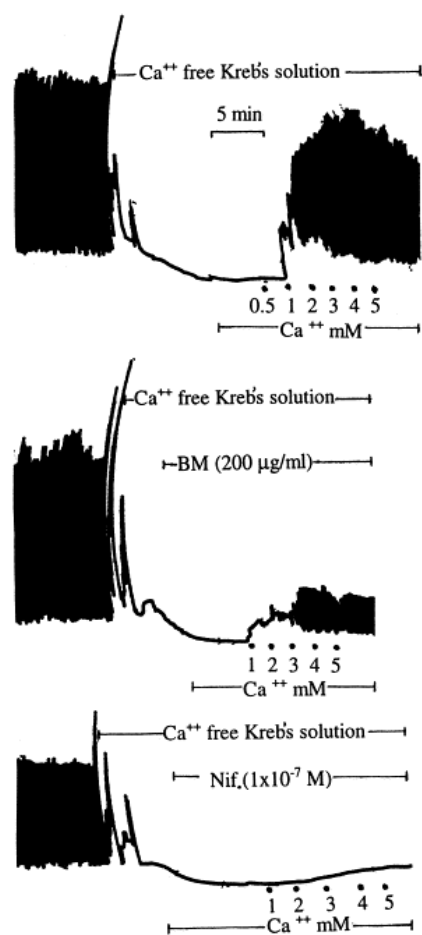


Figure 104: comparaison des effets du bacopa (BM) et de la nifédipine sur la contraction jéjunale provoquée par l'administration de calcium (CaCl_2), chez le lapin. Au préalable, les mouvements spontanés du jéjunum ont été abolis par remplacement de la solution normale de Kreb avec une solution dépourvue de Ca^{++} . Le bacopa et la nifédipine ont été ajoutés au milieu 5 min avant la supplémentation en doses croissantes de Ca^{++} . Le tracé supérieur représente le contrôle [293].

En 2003, cette même équipe a confirmé les résultats de leurs travaux précédents en essayant toutefois de trouver parmi différentes fractions issues de l'extrait éthanolique celle qui était (le plus) responsable de l'activité antagoniste calcique [294]. **Les fractions polaires ont manifesté une inhibition significative de la bronchoconstriction, de l'hypotension et de la bradycardie provoquées par le carbachol. De plus, les fractions polaires ont montré la plus forte inhibition des contractions iléales provoquées par du CaCl_2 , confirmant l'interférence avec les mouvements calciques d'une part et indiquant que cet**

antagonisme calcique semble être dû à la présence de composés polaires. Il faudrait à l'avenir isoler et clarifier la pharmacologie du ou des composé(s) responsable(s) de cette activité broncho-vasodilatatrice.

IV.9. Effets cardiovasculaires et sur l'ischémie-reperfusion

IV.9.1. Effets généraux cardiovasculaires

Dans la médecine traditionnelle indienne, *Brahmi* est notamment utilisé comme cardiotonique. La littérature scientifique internationale est pauvre en travaux concernant l'investigation directe des propriétés cardiovasculaires du bacopa, hormis une étude locale pakistanaise de 1990 et dont la méthodologie satisfaisante nous a permis d'ouvrir une piste de réflexion [295].

Dans ce travail de recherche, l'évaluation des effets cardiovasculaires a été effectuée avec un extrait alcoolique de bacopa sur cœur isolé de lapin, et les résultats obtenus en termes de force de contraction (contractilité) du ventricule gauche, rythme cardiaque et débit coronarien ont été comparés à ceux de la quinidine (antiarythmique de classe Ia selon la classification de Vaughan-Williams). La contractilité ventriculaire gauche a légèrement augmenté pour des doses allant jusqu'à 8 ng/ml et a ensuite diminué progressivement avec l'augmentation des doses (dépression maximale de 25 %). Mais, les modifications de la contractilité du ventricule gauche n'ont pas été statistiquement significatives. En revanche, l'extrait a permis une baisse significative de la fréquence cardiaque et du débit coronarien, avec une dépression maximale d'environ 50% pour ces 2 paramètres à 132 ng/ml. L'extrait a donc manifesté une action dépressive cardiaque. Les résultats de la quinidine ont montré une diminution dose-dépendante de la contractilité ventriculaire gauche et du rythme cardiaque. Les résultats n'ont pas été significatifs quant au débit coronarien. **Pour les auteurs, les effets du bacopa ressemblent à ceux observés avec la quinidine (effets quinidine-like). Même s'il semblerait que le bacopa puisse entraîner une dépression cardiaque, cette seule étude est en soi trop limitée pour pouvoir définir un quelconque profil d'action du bacopa et donc conforter l'usage folklorique en tant que cardiotonique.**

IV.9.2. Effets protecteurs dans l'ischémie-reperfusion

Il a été rapporté qu'un changement du débit sanguin pouvait entraîner un stress oxydant [176]. L'ischémie correspond à une diminution ou un arrêt de la circulation artérielle dans un territoire localisé et cela se produit quand une artère est obstruée, par exemple par un caillot sanguin. Bien évidemment, le premier geste thérapeutique est le rétablissement de la circulation sanguine pour éviter des dommages cellulaires irréversibles, c'est la reperfusion. La reperfusion est comme une « arme à double tranchant » car, bien qu'elle puisse être salvatrice, elle exerce clairement des effets délétères liés à la libération dans la circulation générale d'une grande quantité de radicaux libres [172]. En effet, durant l'ischémie, le métabolisme mitochondrial diminue et les électrons de la chaîne respiratoire vont favoriser la formation de ROS (anions superoxydes surtout). Certains auteurs ont également montré qu'une diminution brutale de l'oxygénation provoquait une modification de la structure de la xanthine déshydrogénase (enzyme qui permet l'élimination de la xanthine en l'oxydant en acide urique, sans formation de radicaux libres) en xanthine oxydase. Quand la circulation est rétablie, la xanthine oxydase produit des ions superoxydes pour pouvoir oxyder la xanthine en acide urique. Il y a donc, secondairement, production de peroxydes et l'apparition d'un stress oxydant qui dégrade le tissu ou l'organe qui était ischémié. Au final, de nombreuses fonctions cellulaires sont altérées.

Une équipe indienne a mis en évidence une activité thrombolytique significative d'un extrait aqueux de bacopa dans un modèle de thrombose *in vitro*. L'extrait a permis un taux de lyse du caillot de 41,8 % contre 86,2 % pour la streptokinase (thrombolytique transformant le plasminogène inactif en plasmine) prise comme contrôle positif. L'étude ne précise pas les constituants de l'extrait pouvant expliquer cette activité, ni même le mécanisme sous-jacent [296].

Une autre étude a évalué les effets cardioprotecteurs du bacopa (en termes d'apoptose des cardiomyocytes et de statut antioxydant) à la suite d'une lésion d'ischémie-reperfusion dans un modèle expérimental utilisant des cœurs isolés et perfusés de rats (méthode de Langendorff) [297]. L'obstruction de l'aorte suivie d'une reperfusion a provoqué une nécrose cardiaque (objectivée par l'étude histopathologique et par la fuite des CPK du myocarde), une augmentation de l'apoptose des cellules myocardique (augmentation de l'expression de Bax et de la caspase 3 et diminution de l'expression de Bcl-2), une dépression de la fréquence cardiaque, un déclin du statut antioxydant (diminution de l'activité de SOD, CAT et GPx,

déplétion en GSH) et une augmentation du taux de peroxydation lipidique (augmentation des TBARS). L'administration orale d'un extrait alcoolique de bacopa pendant 3 semaines a permis *per se*, chez des rats non ischémiés-reperfusés, d'améliorer le statut antioxydant général. Chez les rats ischémiés-reperfusés traités pendant la même période, l'extrait a permis de restaurer toutes les perturbations biochimiques et histopathologiques en comparaison avec les rats ischémiés-reperfusés non traités. Le bacopa a en particulier réduit l'apoptose des cardiomyocytes et, même si le mécanisme n'est pas totalement élucidé, une augmentation de l'expression de Bcl-2 (inhibiteur de l'apoptose) et une diminution de l'expression de Bax et caspase 3 (inducteurs de l'apoptose) ont bien été mises en évidence. Les propriétés antioxydantes du bacopa pourraient également avoir contribué aux effets cardioprotecteurs observés, de même que l'atténuation du stress cellulaire occasionné (diminution de l'expression de Hsp72 dans les myocytes cardiaques). Enfin, l'extrait de bacopa a permis de préserver le contenu en CPK myocardiques ce qui confirme son effet cardioprotecteur. **Le bacopa pourrait donc s'avérer utile dans la prise en charge thérapeutique d'une ischémie aiguë myocardique.**

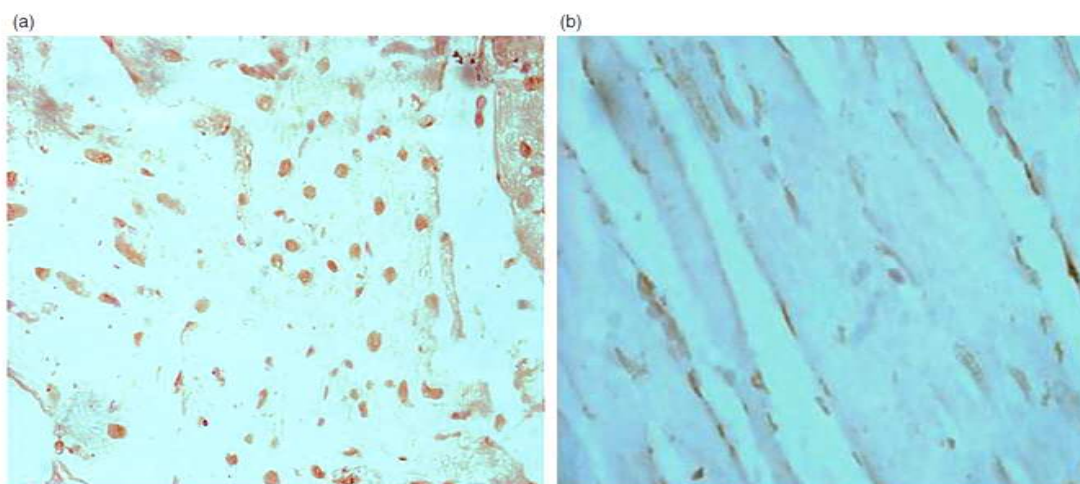


Figure 105 : photomicrographies du tissu ventriculaire de rat après une ischémie-reperfusion. La technique TUNEL permet de visualiser les cellules possédant des coupures de leur ADN. Le contrôle (a) montre beaucoup de cellules apoptotiques (spots rougeâtres). Une diminution significative (b) est observée grâce au traitement avec du bacopa [297].

Saraf *et al.* se sont intéressés aux effets neuroprotecteurs du bacopa dans le cas d'une ischémie cérébrale expérimentale provoquée chez des rats par un blocage de l'artère carotide interne pendant 30 minutes, et ont évalué les dommages cérébraux et les dysfonctionnements cognitifs qui en résultaient [298]. L'extrait de bacopa a été administré par voie orale pendant 7 jours, après provocation de l'AVC expérimental (accident vasculaire cérébral). Comparativement aux rats non traités, l'extrait a permis d'atténuer les troubles de la mémoire (tests neurocomportementaux), le déficit moteur (capacité de préhension et force des membres antérieurs) et, de façon marginale, le déficit neurologique (score de Bederson) provoqués par l'AVC. Il a également amélioré le statut antioxydant (augmentation de l'activité de la CAT), diminué la peroxydation lipidique et réduit la taille de l'infarctus cérébral. **En conclusion, cette étude montre que le bacopa semble atténuer les troubles neurologiques consécutifs à un AVC expérimental ; et elle confirme les effets protecteurs sur les dommages cérébraux observés lors des événements d'ischémie-reperfusion qui avaient été précédemment rapportés [299].**

IV.10. Effets dans le diabète

Le diabète de type 2 se caractérise par une altération de l'insulinosécrétion et des effets de l'insuline sur les tissus cibles. Il multiplie par un facteur 2 à 3 la morbidité cardiovasculaire. L'objectif principal de sa prise en charge est le maintien de l'équilibre glycémique pour stabiliser l'évolution de la maladie et éviter les complications liées à l'hyperglycémie chronique : les microangiopathies (atteintes oculaire, rénale et neurologique) et les macroangiopathies (atteintes coronarienne, vasculo-cérébrale et artérielle) [243].

Des chercheurs indiens (Gosh *et al.*) se sont intéressés à l'activité antidiabétique potentielle d'un extrait éthanolique des parties aériennes de bacopa en évaluant *in vivo* chez des rats rendus diabétiques (« alloxanisés ») ses effets sur la tolérance orale au glucose et son activité antioxydante. Ils ont aussi déterminé *in vitro* le taux de glycosylation de l'hémoglobine (Hb glyquée) et la consommation périphérique de glucose [300]. L'induction du diabète a été réalisée par injection intrapéritonéale d'alloxane (150 mg/kg), un composé toxique pour les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (cellules sécrétant l'insuline). Le glibenclamide à la dose de 600 μ g/kg a été pris comme référence (sulfamide hypoglycémiant, DAONIL®).

L'extrait de bacopa (300 mg/kg) a diminué significativement la glycémie chez les rats diabétiques dans les épreuves dites d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) où l'on gave les animaux avec une solution de glucose, aussi bien en administration unique que lors d'administrations répétées (1 HGPO/j pendant 10 jours). Les résultats sont statistiquement comparables à ceux du glibenclamide. De plus, l'extrait de la plante a inversé la perte de poids induite par l'alloxane (valeurs proches du groupe contrôle). *In vitro*, l'extrait a prévenu significativement l'élévation de la glycosylation de l'Hb avec une CI_{50} de 11,25 µg/ml (résultat comparable au standard α -tocophérol). L'extrait de bacopa et le glibenclamide ont significativement diminué les taux de TBARS et donc la peroxydation lipidique, et ont augmenté les taux de glutathion (GSH) et l'activité des enzymes SOD et CAT, au niveau hépatique. Enfin, l'extrait a amélioré l'utilisation périphérique du glucose, évaluée par la consommation *in vitro* de glucose par le diaphragme. **L'extrait de bacopa semble donc manifester des effets insuline-like et l'effet anti-hyperglycémiant observé pourrait être dû à l'augmentation de la consommation périphérique de glucose aussi bien qu'à une protection contre les dommages oxydatifs.**

Le rôle du stress oxydant dans les complications liées au diabète a motivé les travaux de Kapoor *et al.* concernant les effets du *Bacopa monnieri* sur la modulation des réponses antioxydantes et de la peroxydation des lipides au niveau du cerveau et du rein de rats rendus diabétiques par la streptozotocine [301], une toxine bactérienne entraînant à dose élevée une destruction des cellules β du pancréas. Un extrait éthanolique de la plante entière de bacopa a été administré *per os* pendant 15 jours à des doses de 50, 125 et 250 mg/kg aux rats diabétiques et l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx), les taux de GSH et de TBARS (reflétant la peroxydation lipidique) ont été mesurés au niveau du rein et de différentes régions cérébrales (prosencéphale, mésencéphale et cervelet) et comparés à ceux obtenus avec la drogue de référence, le glibenclamide. L'administration de l'extrait aux rats rendus diabétiques a inversé significativement (jusqu'à atteindre des valeurs proches du groupe contrôle) les altérations du statut antioxydant enzymatique (SOD, CAT et GPx) et non enzymatique (GSH), ainsi que les dommages peroxydatifs tissulaires (TBARS), comparativement aux rats diabétiques non traités. D'autre part, l'équipe a également montré une diminution significative de la glycémie grâce au traitement avec l'extrait, avec une diminution maximale de 49,21 % à 125 mg/kg contre une diminution maximale avec le glibenclamide de 53,77 % (0,6 mg/kg). Enfin, l'extrait a permis la normalisation du poids corporel des animaux. **Globalement, les résultats obtenus avec l'extrait sont comparables**

à ceux du glibenclamide. Cette étude indique que la bacopa, en plus de ses propriétés antioxydantes et anti-lipoperoxydantes, pourrait être utile dans la restauration des activités métaboliques dans le cas du diabète. Son mécanisme d'action antidiabétique reste non élucidé mais ces résultats prometteurs n'excluent pas une possible utilisation thérapeutique du bacopa en tant que traitement adjuvant/d'appoint dans la prévention des complications liées au diabète.

Gosh *et al.* ont décrit tout récemment l'activité anti-hyperglycémiant d'un composé pur isolé du bacopa : la bacosine. Ce composé triterpénique a été isolé de la fraction éthylacétate de l'extrait éthanolique des parties aériennes de la plante [302]. Il a été testé chez des rats alloxanisés en termes d'activité anti-hyperglycémiant, d'activité antioxydante et d'effets sur le contenu hépatique en glycogène *in vivo*, mais aussi *in vitro* pour ses effets sur l'utilisation périphérique du glucose. Aussi, la bacosine (10 et 25 mg/kg, p.o.) a diminué significativement la glycémie en comparaison avec les rats diabétiques non traités dans les épreuves d'HGPO à la fois en administration unique et en administrations répétées (sur 10 jours). La bacosine a inversé la perte de poids constatée chez les animaux diabétiques (valeurs proches de celle du groupe contrôle) et a également prévenu la glycosylation de l'hémoglobine *in vitro* avec une CI_{50} de 7,44 μ g/ml (soit comparable au standard α -tocophérol) (cf. page 264 : CI_{50} de l'extrait éthanolique = 11,25 μ g/ml). L'administration de bacosine a significativement diminué les taux de malondialdéhyde (dosage TBARS) et donc la peroxydation des lipides, augmenté les taux de GSH et les activités de la SOD et de la CAT au niveau du foie des rats diabétiques. Une augmentation du contenu hépatique en glycogène et de la consommation périphérique du glucose a également été observée grâce au traitement avec la bacosine. Les résultats ont tous été statistiquement comparables à ceux de la glibenclamide (drogue de référence). **La bacosine pourrait avoir une activité insuline-like et son effet anti-hyperglycémiant pourrait être dû aussi bien à l'augmentation de l'utilisation périphérique du glucose qu'à la protection des dommages oxydatifs. Une partie au moins de l'activité antidiabétique du bacopa semble donc être supportée par la bacosine.**

IV.11. Protection des effets indésirables des opiacés

Les « opiacés » ou antalgiques centraux morphiniques (antalgiques de palier III selon la classification de l'OMS) sont des drogues qui exercent un contrôle de la douleur en se liant aux récepteurs opiacés endogènes (sous-types μ , κ , λ) situés au niveau du cerveau (tronc cérébral, thalamus médian, système limbique) et de la corne postérieure de la moelle épinière. La morphine, un dérivé de l'opium, est un agoniste pur des récepteurs μ et assure une antalgie dose-dépendante sans plafonnement de son action. Elle constitue un composé de référence dans la prise en charge des douleurs intenses et/ou rebelles aux autres antalgiques. Les principaux effets indésirables de la morphine sont :

- une augmentation du tonus des sphincters musculaires lisses pouvant entraîner une constipation, des nausées et plus rarement des vomissements et une rétention urinaire ;
- une sédation ;
- une dépression des centres respiratoires (diminution de la sensibilité au CO_2) et de la toux ;
- une action psychomotrice avec effet euphorisant ;
- une action psychodysléptique avec tolérance, dépendance physique et psychique, et donc un risque de syndrome de sevrage à l'arrêt ;
- une stimulation vagale avec hypotension, bradycardie, myosis...

La morphine est métabolisée au niveau hépatique et est éliminée par voie urinaire [165, 225, 243].

Un extrait éthanolique de la plante entière de *Bacopa monnieri* a manifesté un effet protecteur contre la perturbation de l'activité des enzymes mitochondriales impliquées dans la phosphorylation oxydative (chaîne respiratoire mitochondriale) et le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique) au niveau du cerveau de rats auxquels on a administré des doses croissantes de sulfate de morphine (10-160 mg/kg/j, i.p.) pendant 21 jours [303]. Alors que l'administration chronique de morphine a diminué le taux des enzymes mitochondriales (isocitrate déshydrogénase, α -kétoglutarate déshydrogénase, succinate déshydrogénase, malate déshydrogénase, NADH déshydrogénase, cytochrome *c* oxydase), le traitement des animaux avec l'extrait de bacopa pendant la même période (40 mg/kg, p.o., 2 h avant chaque administration de morphine) a permis de maintenir des taux proches de ceux du groupe contrôle, permettant ainsi de préserver le métabolisme énergétique cérébral.

D'autre part, le bacopa, toujours sous la forme d'un extrait alcoolique, a montré des effets protecteurs contre l'hépatotoxicité induite par la morphine chez des rats. Une première étude, sur 10 jours, a montré que l'extrait de bacopa (40 mg/kg/j, p.o.) permettait de maintenir à un niveau normal les activités des enzymes antioxydantes SOD, CAT, GPx (glutathion peroxydase) et GR (glutathion réductase) ainsi que les taux de GSH (glutathion réduit) et de la lipoperoxydation chez les animaux ayant reçu du sulfate de morphine (50 mg/kg/j, i.p., pendant la même période) [304]. Dans une seconde étude, sur 21 jours, l'extrait de la plante s'est opposé à l'augmentation des taux sériques des enzymes hépatospécifiques (marqueurs enzymatiques du fonctionnement hépatique : ALAT, ASAT, PAL, LDH et γ -GT) provoquée par l'administration répétée de chlorhydrate de morphine (i.p.) [305]. Les données de l'histopathologie ont corroboré les données de la biochimie. L'architecture hépatique des rats traités avec l'extrait de bacopa était normale contrairement aux rats ayant reçu seulement de la morphine. **Ces deux études ont donc confirmé l'activité hépatoprotectrice du bacopa contre la toxicité de la morphine, tant au niveau de la préservation du statut antioxydant, du contrôle du taux de peroxydation des lipides que des fonctions du foie.**

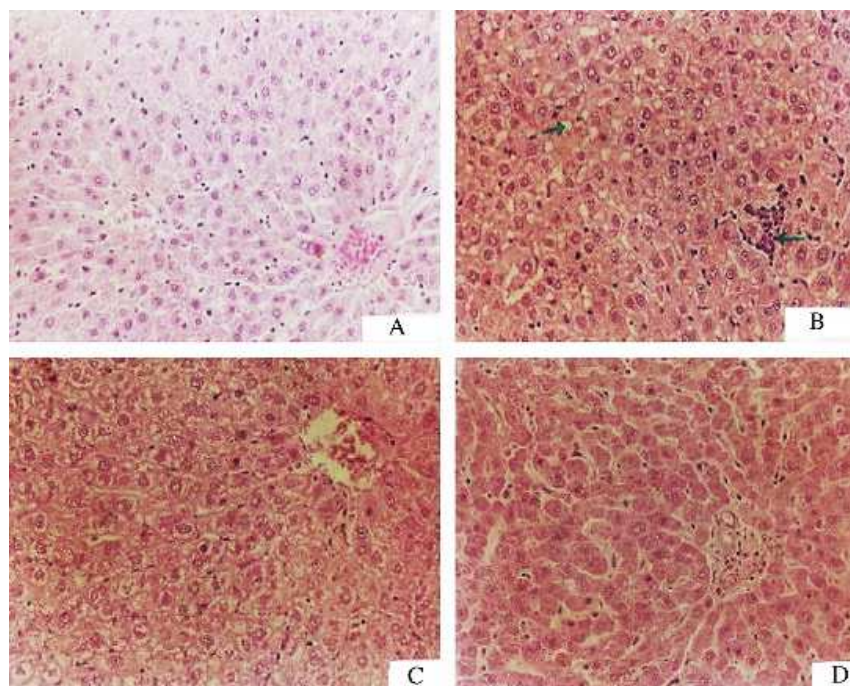


Figure 106: photomicrographies de sections de foie de rat fixées et colorées. (A) = foie normal ou contrôle, au grossissement 400 ; (B) en $\times 320$ = foie altéré par la morphine montrant une dégénérescence des hépatocytes et une infiltration monocyttaire ($\uparrow$ en vert) ; (C) en $\times 320$ = foie de rat ayant pris de la morphine et du bacopa : l'architecture est quasi-normale et l'infiltration cellulaire est moindre ; (D) en $\times 320$ = foie de rat ayant pris du bacopa : le foie est normal [305].

Les métabolites (actifs) de la morphine sont éliminés par les reins et il a été démontré que ce même extrait alcoolique de bacopa s'opposait aussi aux altérations biochimiques (augmentation des taux d'urée, créatinine et acide urique) et histopathologiques (dégénérescence cellulaire) induites par la morphine au niveau rénal, chez le rat [305].

Une étude *in vitro* sur iléum isolé de cochon d'Inde a suggéré des effets bénéfiques du bacopa dans la prise en charge du syndrome de manque [306]. L'état de manque expérimental a consisté en un sevrage brutal par l'administration de naloxone, un antagoniste pur spécifique et compétitif des opiacés (servant d'antidote en cas de surdosage), qui va déplacer la morphine de ses récepteurs centraux μ . Dans cette présente étude, le « manque » a été objectivé par de fortes contractions iléales. L'administration de doses croissantes de l'extrait alcoolique total de bacopa (100-1000 $\mu\text{g/ml}$) a diminué significativement les contractions

induites par la naloxone, de façon dose-dépendante. **Cette étude indique que le bacopa pourrait ainsi s'avérer utile pour soulager certains symptômes liés au sevrage morphinique.**

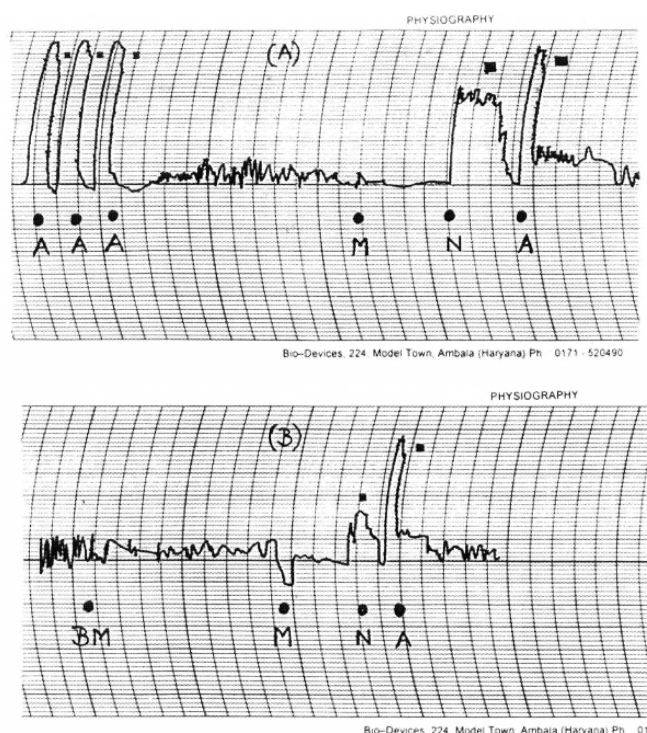


Figure 107: tracés montrant la réduction par le bacopa (BM) de l'état de manque à la morphine (M) sur iléon isolé de cochon d'Inde. Le graphe (A) correspond au tracé contrôle, l'état de manque est caractérisé par une réponse contractile puissante à l'administration de naloxone (N). Le graphe (B) montre que le bacopa (1000 µg/ml), administré 15 min avant la morphine permet de réduire l'amplitude et la durée de la réponse contractile induite par la naloxone et donc le syndrome de manque morphinique (A = acétylcholine) [306].

Aussi, l'extrait alcoolique de la plante exercerait un effet inhibiteur sur la tolérance induite par la morphine [307]. Chez la souris, la tolérance s'est traduite par une diminution de l'effet antalgique de la morphine lors de l'administration répétée d'une même dose et le prétraitement avec l'extrait a maintenu une réponse antalgique normale.

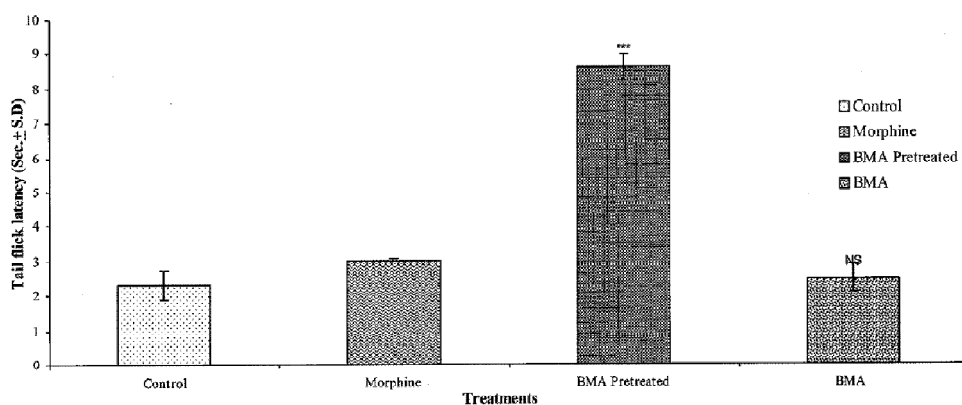


Figure 108: effet inhibiteur de l'extrait alcoolique de bacopa (BMA) sur la tolérance à l'effet antalgique de la morphine causée par une administration chronique de celle-ci, chez la souris. L'antalgie est évaluée par le test de « tail flick » où l'on mesure le temps de latence pour voir la queue du rongeur, soumise à une source de chaleur rayonnante (lampe halogène), réagir par un mouvement brusque. La tolérance analgésique a été testée au 11^e jour, après 10 jours d'injection de morphine à la même dose. Le groupe prétraité avec BMA montre une conservation de l'effet antalgique (latence plus longue) et donc une diminution de la tolérance morphinique. L'administration de BMA seul n'a pas provoqué d'effet antalgique [307].

De plus, les auteurs ont confirmé la réduction des symptômes de sevrage à la morphine (de type sauts, agitation, contorsions, etc.) et ont découvert que l'extrait pouvait inhiber le comportement hyperactif et la tolérance inverse (ou sensibilisation comportementale) liés à l'utilisation chronique de morphine, chez la souris. Enfin, l'extrait a significativement réduit l'hypersensibilisation des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques par l'inhibition de l'augmentation de l'activité ambulatoire des souris provoquée par une injection d'apomorphine (un puissant agoniste des récepteurs dopaminergiques D1 et D2). **Donc, le bacopa semble pouvoir inhiber certains effets pharmacologiques secondaires, suggérant qu'il pourrait être utile dans la prise en charge de certains effets indésirables liés à l'utilisation de morphine.**

Très récemment (2011), une autre équipe s'est intéressée aux effets bénéfiques potentiels du bacopa sur l'acquisition et l'expression d'une tolérance morphinique [308]. La fraction *n*-butanolique (issu d'un extrait méthanolique dégraissé des parties aériennes de la plante), riche en bacoside A, a été testée à doses croissantes (5, 10 et 15 mg/kg/j, p.o.) chez des rats, et l'évaluation des effets antinociceptifs a été réalisée grâce à une plaque chauffante (*hot plate method*). L'administration de cette fraction a permis à la fois d'empêcher le développement

d'une tolérance (en s'opposant à la diminution du temps passé sur la plaque chauffante et donc à la diminution de l'effet antinociceptif) et de diminuer une tolérance acquise (déjà constituée). D'autre part, il est apparu que cette fraction riche en bacoside A possédait par elle-même un effet antinociceptif sans développement d'une tolérance et qu'elle potentialisait l'effet propre de la morphine. **Toutes ces données sont prometteuses et le *Bacopa monnieri* pourrait s'avérer efficace dans la prise en charge de la tolérance morphinique chez l'homme.**

IV.12. Effets protecteurs dans le tabagisme

Le tabagisme est nocif à bien des égards [243] : augmentation du risque de survenue d'un cancer (poumon, oropharynx, langue, œsophage, vessie) ou d'une maladie cardiovasculaire (accident vasculaire, infarctus du myocarde, etc.), bronchite chronique, insuffisance respiratoire...

Le tabac non brûlé contiendrait plus de 2500 substances et la fumée de cigarette plus de 4000 ! Et c'est la nicotine qui est à l'origine d'une dépendance à la fois physique et psychologique. Le tabac serait responsable d'un stress oxydant important [172].

Une équipe de chercheurs, Anbarasi *et al.*, s'est particulièrement intéressée aux effets protecteurs potentiels du bacopa vis-à-vis de la fumée de cigarette. Des rats ont été exposés à de la fumée de cigarette (2 séances de 3 heures quotidiennement, correspondant à 8-10 cigarettes par jour) pendant 12 semaines, et certains ont reçu simultanément du bacoside A en suspension aqueuse dans 1 % de gomme acacia à la dose de 10 mg/kg/j. L'activité totale de la LDH (lactate déshydrogénase) a été mesurée au niveau du sérum, du cœur, du cerveau, du foie et du rein, ainsi que celle de ses différentes isoformes (LDH-1 à LDH-5) au niveau sérique [309]. Alors que la fumée de cigarette a provoqué une augmentation significative de l'activité sérique de la LDH et de ses isoformes avec une diminution concomitante de l'activité LDH totale au niveau des organes étudiés, le bacoside A a prévenu ces altérations et a permis de maintenir des valeurs proches du groupe contrôle (rats non exposés à la fumée de cigarette). La LDH est une enzyme cytosolique ubiquitaire et une augmentation de ses taux sériques est le témoin d'une destruction tissulaire. Aussi, la fumée de cigarette a pu générer des substances radicalaires qui ont augmenté le taux de peroxydation des lipides

membranaires occasionnant ainsi des dommages cellulaires et la fuite de la LDH dans le milieu extracellulaire. **Le bacoside A pourrait avoir protégé les organes en stabilisant les membranes cellulaires et donc avoir prévenu la sortie de LDH dans la circulation générale, probablement par ses propriétés de neutralisation des radicaux libres et anti-lipoperoxydante.**

De façon similaire, le bacoside A s'est opposé à l'augmentation sérique de l'activité totale CK (créatine kinase) et de celle de ses isoformes CK-MM (présente surtout dans les muscles striés squelettiques), CK-MB (surtout dans le myocarde) et CK-BB (surtout dans le cerveau) et à la diminution concomitante de l'activité CK au niveau du cœur et du cerveau des rats exposés à la fumée de cigarette [310]. **Là encore, la CK (et ses isoformes) étant une enzyme cytosolique, le bacoside A a probablement protégé la structure et l'intégrité fonctionnelle des membranes cellulaires et évité leur relargage dans la circulation sanguine en exerçant des effets antioxydants et en diminuant la peroxydation des lipides membranaires subséquente.**

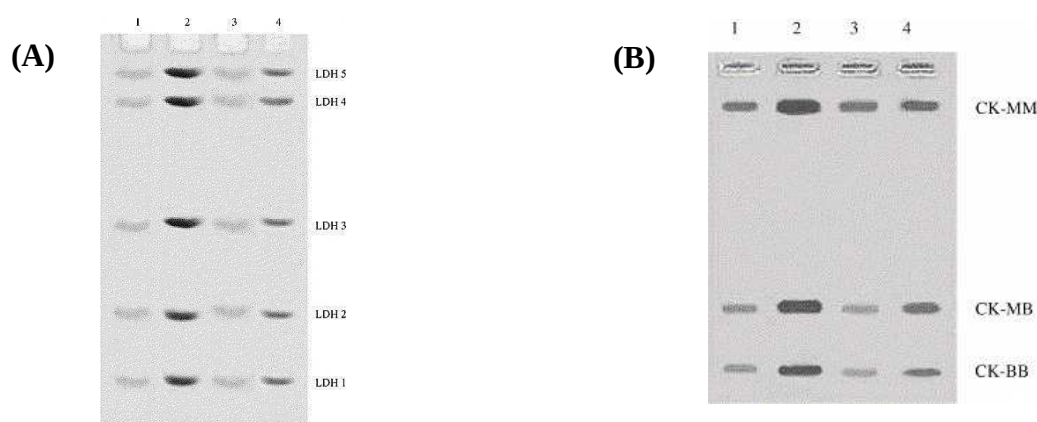


Figure 109: migrations électrophorétiques des isoenzymes de la lactate déshydrogénase, LDH-1 à LDH-5 (graphe A) et des isoenzymes de la créatine kinase, CK-MM, CK-MB et CK-BB (graphe B), des groupes contrôle (tracés 1), tabagisme (tracés 2), bacoside A (tracés 3) et tabagisme + bacoside A (tracés 4) [310].

Pour mieux évaluer l'impact néfaste de la fumée de cigarette et les effets protecteurs du bacoside A sur les membranes cellulaires, Anbarasi *et al.* ont étudié l'activité des pompes

membranaires ATPases au niveau du cerveau de rats exposés à la fumée de cigarette [311]. Les pompes ATPases sont des enzymes qui assurent le transport actif d'ions au travers des membranes cellulaires, contre leur gradient de concentration. Et c'est l'hydrolyse de l'ATP (d'où leur nom) qui leur fournit l'énergie nécessaire à ce transport [274]. Ces pompes ATPases jouent donc un rôle vital pour les cellules en maintenant leur potentiel membranaire et, en ce qui concerne les neurones, elles assurent également la propagation de l'influx nerveux. L'équipe de chercheurs a ainsi étudié l'activité des pompes Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{++} -ATPase et Mg^{++} -ATPase, dosé les ions Na^+ , K^+ , Ca^{++} et Mg^{++} et déterminé le niveau de peroxydation des lipides (dosage des TBARS), sur homogénats de cerveau. En effet, la fluidité et l'intégrité de la bicouche membranaire influence fortement l'activité des pompes ATPases, toute altération comme la peroxydation des phospholipides peut les inactiver. L'altération des membranes neuronales par la fumée de cigarette a été objectivée par l'élévation des taux de peroxydes lipidiques, la diminution de l'activité des différentes ATPases et par une perturbation de l'équilibre électrolytique (accumulation de Na^+ et Ca^{++} et déplétion en K^+ et Mg^{++}). **L'administration de bacoside A aux rats exposés à la fumée de cigarette a significativement diminué la peroxydation lipidique, amélioré l'activité des ATPases et maintenu un équilibre ionique normal. Les résultats de cette étude indiquent donc que le bacoside A a protégé les membranes neuronales des altérations induites par la fumée de cigarette.**

Un traitement avec le bacoside A a également protégé la structure et les fonctions mitochondriales des dommages occasionnés par la fumée de cigarette au niveau du cerveau des rats [312]. En effet, le bacoside A a significativement augmenté l'activité des enzymes mitochondriales (isocitrate déshydrogénase, α -kétoglutarate déshydrogénase, succinate déshydrogénase, malate déshydrogénase, NADH déshydrogénase, cytochrome-c-oxydase), le niveau de phosphorylation oxydative (évalué notamment par les taux d'ATP et d'oxydation du succinate), le taux de phospholipides et a diminué la peroxydation des lipides, le taux de cholestérol et le ratio cholestérol/phospholipides, en comparaison avec les rats non traités avec le bacoside A. **En maintenant l'intégrité structurelle et fonctionnelle des mitochondries cérébrales, le bacoside A a protégé le cerveau des rats exposés à la fumée de cigarette.**

Une étude a clairement montré que c'est le statut antioxydant global du cerveau qui est affecté par la fumée de cigarette. Le stress oxydant généré par la fumée de cigarette s'est traduit par une diminution des défenses antioxydantes endogènes enzymatiques (diminution de l'activité

de SOD, CAT, GPx, GR) et non enzymatiques (diminution des taux de GSH, vitamine C, vitamine E et vitamine A). L'exposition à la fumée de cigarette a également altéré les taux des éléments traces avec une accumulation du fer et du cuivre et une déplétion en zinc et sélénium. Enfin, la fumée de cigarette a entraîné une diminution de l'activité de la céruléoplasmine au niveau sérique et cérébral. **Le bacoside A est apparu comme un puissant antioxydant en permettant d'améliorer le statut antioxydant cérébral (amélioration de tous les paramètres d'étude en comparaison avec les rats non traités) et en maintenant des taux normaux d'éléments traces [313].**

La neuroprotection offerte par le bacoside A contre la toxicité de la fumée de cigarette a été confirmée par l'inhibition de la surexpression de la protéine de choc thermique Hsp70 et de l'apoptose neuronale induites par la fumée de cigarette chez le rat [314].

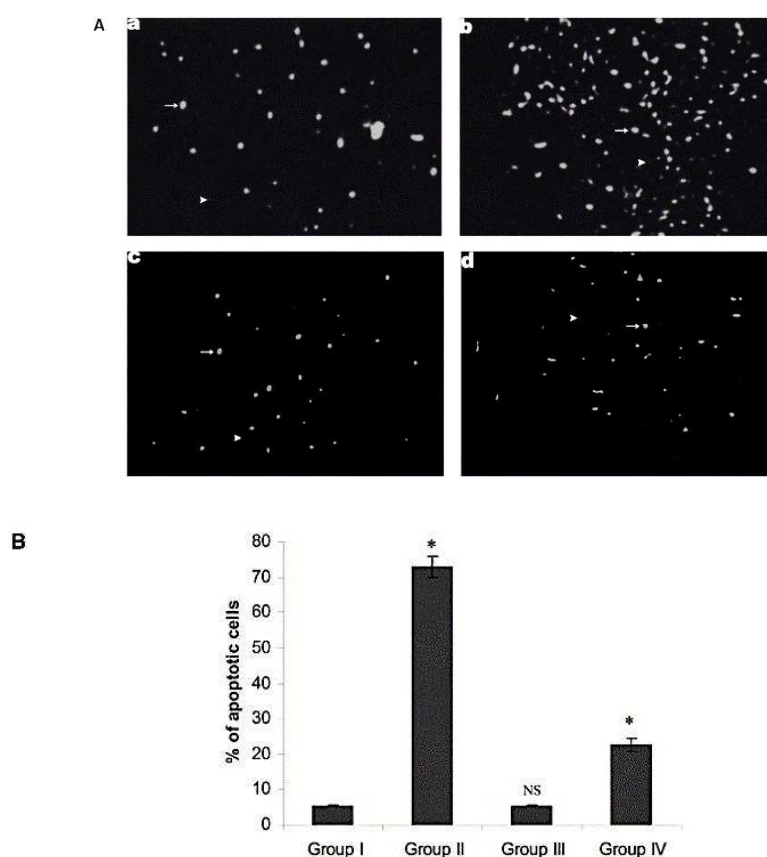


Figure 110: comparaison du nombre de cellules apoptotiques au niveau du cortex cérébral de rat entre les groupes contrôle (a et I), tabagisme (b et II), bacoside A (c et III) et tabagisme + bacoside A (d et IV). En grossissement $\times 100$, les cellules apoptotiques sont identifiées par des spots lumineux à l'aide de la technique TUNEL (A). Les pourcentages de cellules apoptotiques peuvent alors être calculés (B) [314].

Une autre équipe de chercheurs, plutôt que de s'intéresser à la fumée de cigarette, s'est concentrée sur l'évaluation des effets propres de la nicotine, en termes de toxicité hépatique et de génotoxicité (toxicité envers l'ADN), et a testé les effets protecteurs potentiels d'un extrait aqueux de bacopa. L'étude s'est déroulée sur 7 jours. Des souris ont reçu de la nicotine 0,6 mg/kg/j, i.p. et certaines d'entre elles ont également reçu l'extrait de bacopa (50 mg/kg/j) durant la même période [315]. La nicotine a altéré le fonctionnement hépatique comme en témoignent l'augmentation des transaminases (ALAT et ASAT) et la diminution du statut antioxydant hépatique (baisse de l'activité des enzymes SOD, CAT et GPx). Les souris traitées avec l'extrait de bacopa ont conservé un fonctionnement hépatique normal et également un statut antioxydant hépatique proche du groupe contrôle. **Le bacopa a ainsi protégé le foie de la toxicité liée à la nicotine, probablement par ses effets antioxydants.**

D'autre part, l'extrait de bacopa a significativement réduit l'incidence des érythrocytes polychromatiques micronucléés [315]. Autrement dit, il a réduit l'augmentation de l'apparition de micronuclei (critère pris comme indice de la génotoxicité) induite par la nicotine. **Donc, le bacopa a manifesté un effet génotecteur contre la toxicité liée à la nicotine.**

IV.13. Propriété antalgique

Des chercheurs indiens ont testé la bacosine, composé triterpénique qu'ils ont isolé des parties aériennes du bacopa, pour ses effets antalgiques potentiels [107]. Trois types de stimuli nociceptifs ont été utilisés sur des rats et des souris : mécanique (pression exercée sur la queue avec une pince), chimique (acide acétique appliqué sur la peau) et thermique (l'animal est placé sur une place chauffante). Les résultats obtenus avec la bacosine (25 mg/kg, i.p.) ont été comparés à ceux de deux drogues prises comme références, le salicylate de sodium (50 mg/kg, i.p.) et la morphine (2,5 mg/kg, i.p.). **La bacosine a manifesté une activité antalgique modérée sauf dans le cas du stimulus mécanique où aucun effet significatif n'a été retrouvé. De plus, l'effet de la bacosine a été partiellement bloqué par la naloxone et la bacosine a potentialisé l'antalgie induite par la morphine, suggérant une implication possible du système opioïdique dans son mécanisme d'action.**

La bacosine a alors été évaluée pour ses possibles effets indésirables centraux et il s'est avéré qu'elle n'entraînait pas de sédation (pas de potentialisation du temps de sommeil induit par le pentobarbital), aucune modification de l'activité motrice spontanée, pas d'effet sur la catalepsie induite par l'halopéridol, ni même une modification de la réponse conditionnée d'évitement. Pour des doses de 10 à 300 mg/kg (i.p.), aucun effet inattendu n'a été observé et la mortalité à 48 h était nulle.

En 2011, des chercheurs ont montré que la fraction *n*-butanolique d'un extrait méthanolique de bacopa possédait une action antalgique et qu'elle potentialisait celle de la morphine [308]. La CLHP (chromatographie liquide haute performance) de cette fraction a révélé qu'elle contenait 3,49 µg/mg de bacoside A₃, 2,4 µg/mg de bacopasaponine C et 3,6 µg/mg de bacopaside II, qui sont 3 des 4 principaux saponosides majeurs du bacoside A. Les auteurs n'ont pas précisé si cette fraction riche en bacoside A contenait de la bacosine. **Donc, en plus d'une implication possible de la bacosine, l'activité antalgique modérée du bacopa pourrait également être supportée par les saponosides du bacoside A.**

IV.14. Propriété hyperthyroïdienne potentielle

Kar *et al.* ont évalué les effets modulateurs sur les hormones thyroïdiennes d'un extrait hydro-alcoolique de feuilles de *Bacopa monnieri* (200 mg/kg/j, p.o., pendant 15 jours) chez des souris [316]. La concentration sérique de T4 (tétra-iodothyronine ou thyroxine) a été significativement augmentée (+ 41%), suggérant une action de stimulation de la thyroïde. La concentration sérique de T3 (tri-iodothyronine) a seulement augmenté de façon marginale et non significativement. **Les auteurs ont conclu sur une utilisation possible du bacopa en tant que nouvel agent thérapeutique dans l'hypothyroïdisme. Bien évidemment, il faudrait d'abord isoler le(s) composé(s) responsable(s) de cet effet, définir le site d'action (périphérique ou glandulaire) et le mécanisme précis.**

IV.15. Discussion

En dehors des activités antioxydantes et neuropsychopharmacologiques, de nombreuses autres propriétés sont attribuées au *Bacopa monnieri*. Mais, il apparaît un fait redondant, à savoir la participation, supposée ou vérifiée, des propriétés antioxydantes dans nombre de ces « autres » propriétés ; et nous l'avions envisagé précédemment (cf. page 174) en postulant que le bacopa manifesterait des effets bénéfiques dès lors qu'un stress oxydant est présent et qu'il pourrait donc s'avérer utile dans la réduction de la composante oxydative de diverses maladies ou dysfonctions biologiques. Du fait que les radicaux libres peuvent affecter, lorsqu'ils sont en excès et que les systèmes de défense endogènes sont saturés et/ou initialement déficitaires, des fonctions cellulaires importantes telles la réplication du génome ou l'apoptose, les pathologies possibles sont nombreuses. La nature du trouble dépendra alors du tissu ou de l'organe concerné. Ainsi, les propriétés hépatoprotectrices [265-271], anticancéreuses [270, 277], anti-inflammatoires [23, 281, 282] et anti-arthritiques [24, 283], immunomodulantes [284, 285], anti-ulcéreuses [288-290], protectrices dans l'ischémie-reperfusion [297, 298], antidiabétiques [300-302] et de protection des effets néfastes des opiacés [303-308] et du tabagisme [309, 314] étaient, sans être pour autant caricatural, prévisibles. Bien évidemment, cela ne signifie pas que l'activité antioxydante constitue le mécanisme d'action unique du bacopa, à même titre que le stress oxydant ne représente qu'une composante pathogénique parmi d'autres dans les pathologies et troubles concernés. Et nous invitons le lecteur à se reporter au chapitre correspondant pour obtenir de plus amples détails sur les mécanismes d'action invoqués.

D'autre part, certaines études ont indiqué des résultats prometteurs et les bacosides, particulièrement, ont manifesté des propriétés originales. Ainsi, le bacoside A semble notamment pouvoir moduler favorablement l'axe corticotrope [263] et l'expression des médiateurs de l'inflammation [280-282] et de l'immunité [284], posséder une activité antagoniste calcique [293, 294], exercer une cytotoxicité envers différentes lignées cancéreuses [21, 275, 276] et être doués de propriétés antimétastatiques [21, 271] et anti-apoptotiques [297,314]. Les voies de recherche futures devraient s'orienter tout particulièrement à confirmer ces activités biologiques, à essayer d'en élucider les mécanismes d'action au niveau cellulaire et moléculaire et, à en évaluer leur traduction clinique chez l'homme.

Enfin, la possibilité de découvrir de nouvelles propriétés non encore explorées du bacopa ou de ses constituants actifs ne peut être exclue, et nous ne pouvons qu'inciter la communauté scientifique internationale à continuer leurs investigations.

Partie 3 : efficacité thérapeutique et sécurité d'emploi

I. Etudes toxicologiques

Comme lors du développement préclinique d'un médicament, avant de tester une plante/drogue végétale chez l'homme, il est indispensable de réaliser des études chez l'animal afin d'établir les meilleures conditions d'efficacité (études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques) et de sécurité (études toxicologiques) de cette espèce ou drogue végétale [317]. Les études toxicologiques animales doivent être réalisées dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire (définies selon les lignes directrices de l'OCDE, Organisation de Coopération et de Développement Économiques) qui sont des règles strictes décrivant les conditions précises de réalisation des tests.

I.1. Toxicité aiguë

Par définition, la toxicité aiguë ou toxicité par administration unique est « l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques et de leur apparition en fonction du temps après administration unique de la substance ou d'une association de substances » (*Journal officiel de l'Union européenne* N° L 73/2 du 16 mars 1987 ; consultable sur eur-lex.europa.eu/fr). Le calcul de la dose létale médiane (DL₅₀) est l'épreuve de toxicité aiguë la plus utilisée et consiste en l'expression statistique de la dose de produit qui est supposée tuer 50 % des animaux d'un lot d'expérience [144]. La DL₅₀ permet de fournir des indications sur les effets probables d'un surdosage aigu chez l'homme et peut être utile pour la conception des études animales de toxicité par administration répétée, même si on lui préfère actuellement la dose maximale non létale (ou DMM, dose minimale mortelle) et la dose maximale pour laquelle aucun effet toxique n'est observé (ou NOAEL, *no observed adverse effect level*). En pratique, les études de toxicité aiguë sont pratiquées chez au moins deux espèces de mammifères, des deux sexes et avec 2 voies d'administration différentes dont l'une est identique à la voie qui sera préconisée en thérapeutique humaine [318]. Parallèlement, les animaux sont observés pendant 14 jours ou plus (dans le cas de l'évaluation d'un médicament) après l'administration unique et les signes d'intoxication sont colligés pour chaque animal. Tous les animaux

doivent être autopsiés à la fin de l'essai et un examen histopathologique doit être envisagé pour tout organe révélant des modifications macroscopiques à l'autopsie [317, 144].

Le Bacomind[®], une composition phytochimique enrichie préparée à partir d'extraits de bacopa (brevet déposé par Natural Remedies Pvt. Ltd.), a été évalué pour sa sécurité d'emploi chez des rats Sprague-Dawley en 2007 [20]. Une étude de toxicité aiguë *per os* a été réalisée : des doses uniques de 1400, 2000 et 2800 mg/kg ont été administrées par gavage et la mortalité à 30 min, 1, 2, 4 et 6 h puis 2 fois/j pendant 14 jours ainsi que les signes cliniques ont été observés. D'autre part, une autopsie de tous les rats morts ou sacrifiés en fin d'expérience a été réalisée. **La DL₅₀ était de 2400 mg/kg de poids corporel par voie orale (ou 2,4 g/kg).** La mortalité est apparue dose-dépendante jusqu'à 24 h post-administration avec des signes de toxicité (hypoactivité, diarrhées, polyurie...) qui ont débuté 1 h après l'administration du Bacomind[®]. Les animaux survivants n'ont globalement pas manifesté de signes d'intoxication. L'extrait de bacopa n'a pas semblé porter atteinte au poids corporel et l'autopsie n'a révélé aucune pathologie apparente. **La NOAEL a été établie à 500 mg/kg.**

Dans une autre étude, des extraits bruts aqueux et éthanolique ont été testés sur des rats mâles suisses albinos [19] et la DL₅₀ a été de 1 g/kg pour l'extrait aqueux et de 15 g/kg pour l'extrait alcoolique, par voie intrapéritonéale. Par voie orale, les DL₅₀ ont respectivement été de 5 g/kg et de 17 g/kg pour les extraits aqueux et alcoolique. Les deux extraits n'ont pas provoqué de changements comportementaux (pas de sédation ni d'incoordination motrice). Cependant, 30 min après l'administration, une diminution de l'activité motrice spontanée a été notée chez la souris, et l'effet a persisté pendant 60 min.

D'autres travaux, généralement dans le cadre d'une étude préliminaire de choix de dose, se sont intéressés à l'évaluation de la toxicité aiguë du bacopa (cf. tableau 21).

Tableau 21 : résultats des études de toxicité aiguë (compilation personnelle).

Animal	Voie d'administration	Drogue testée	DL ₅₀	Signes d'intoxication	Réf.
Grenouille	Sac lymphatique ventral	Extrait alcoolique brut des parties aériennes	431 mg/kg	Diminution du réflexe nociceptif	166
Rat	i.p.		331 mg/kg	Dépression centrale	
Rat	i.p.	Extrait aqueux brut de la plante entière	1 g/kg	Réduction de l'activité motrice spontanée	19
	p.o.		5 g/kg		
	i.p.	Extrait alcoolique brut de la plante entière	15 g/kg		
	p.o.		17 g/kg		
Souris	i.p.	Extrait alcoolique brut des parties aériennes	520 mg/kg	Néant	291
Souris	p.o.	Extrait alcoolique des parties aériennes	> 3 g/kg (aucune mortalité)	Sédation et défaut postural	265, 266
Rat	p.o.	Bacomind®	2,4 g/kg	Hypoactivité, diarrhées, polyurie	20
Souris	p.o.	Extraits méthanolique et lipidique, et un <i>ghrita</i> ayurvédique, de la plante entière	> 2 g/kg (aucune mortalité)	Néant	216

I.2. Toxicité par administrations répétées

Par définition, la toxicité chronique à doses répétées est « l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques et de leur apparition en fonction du temps après administration répétée de la substance ou d'une association de substances » (J.O.). Les objectifs de ces études sont multiples : rechercher les effets toxiques potentiels après expositions répétées quotidiennes, observer les éventuels effets cumulatifs ou retardés, mettre en évidence des effets réversibles ou irréversibles et fournir une base d'appréciation pour le choix des doses pour les études à plus long terme [144, 317]. En général, il est souhaitable de réaliser deux types d'épreuves, l'une, dite de toxicité subaiguë, qui dure de 2 à 4 semaines et l'autre, dite de toxicité chronique, qui dure plus de 3 mois et dont la durée dépend de la durée prévisible de

prescription thérapeutique humaine. Le choix de l'espèce animale dépend du métabolisme de la drogue étudiée, qui doit être proche du métabolisme prévisible chez l'homme, et la voie d'administration doit être celle prévue pour l'emploi thérapeutique chez l'homme. Une observation des animaux à la recherche des signes de toxicité est effectuée, tant sur le plan clinique (comportement, prise de nourriture ou de boisson, poids corporel et de certains organes...) que biologique (paramètres hématologiques, biochimiques, histopathologie des organes avec examen macroscopique à l'autopsie...) [319].

Le Bacomind[®], dans une étude de toxicité à doses répétées (250, 500 et 1000 mg/kg/j) de 14 jours réalisée chez des rats Sprague-Dawley (toxicité subaiguë), a été bien toléré jusqu'à une dose de 500 mg/kg/j, à l'exception d'une légère diminution du poids corporel chez les rats mâles, mais sans que la prise de nourriture n'ait jamais été altérée. Aucun autre signe de toxicité n'a été observé, ni même à l'examen nécrologique. Dans une étude de toxicité chronique conduite sur 90 jours (+ 28 jours supplémentaires d'observation avant de sacrifier les rats), cet extrait de bacopa, à des doses de 85, 210 et 500 mg/kg/j, n'a manifesté aucune toxicité en termes de signes cliniques, d'examen neurologique, de consommation de nourriture, de poids corporel et de paramètres hématologiques et biochimiques sanguins. Aucune différence significative n'a été retrouvée concernant le poids absolu et relatif des organes étudiés (foie, reins, surrénales, testicules et ovaires) en comparaison avec le groupe contrôle. Enfin, l'autopsie et les examens histopathologiques n'ont révélé aucun changement imputable au traitement [20]. **Donc, le Bacomind[®] administré oralement et quotidiennement à des rats pendant 90 jours à des doses jusqu'à 500 mg/kg n'a provoqué aucun signe marquant de toxicité et est apparu comme sûr d'emploi.**

I.3. Toxicité génique

Il s'agit d'études dites de mutagenèse, la mutagenèse correspondant à toute modification brusque et permanente des caractères héréditaires par changement dans le nombre et la qualité des gènes [317]. Ainsi, l'objectif général de ces études est de rechercher toute modification du matériel génétique (mutagenèse, clastogenèse...) induite par une drogue et qui indiquerait un risque génétique potentiel pour les générations futures et un risque potentiel de cancer pour la

génération actuelle [318]. Plus précisément, sachant que les lésions causées au patrimoine génétique peuvent être classées en mutations géniques et chromosomiques, l'évaluation de la génotoxicité se fera grâce à une batterie de tests normalisés *in vivo* et *in vitro*[144] :

- Des essais relatifs aux mutations géniques, dont le plus utilisé est le test d'Ames ;
- Des essais relatifs aux aberrations chromosomiques (mutations chromosomiques), comme l'analyse des chromosomes des cellules en métaphase ou encore le test du micronoyau ;
- Des essais relatifs aux mutations génomiques résultant de la modification du nombre de chromosomes, tel le test d'échange des chromatides sœurs.

En 1996, des chercheurs ont évalué la génotoxicité des bacosides A et B *in vivo* chez la souris selon 3 critères cytogénétiques (cf. figures 111 et 112) : les aberrations chromosomiques, l'échange de chromatides sœurs et la formation de micronuclei [320]. Pour l'étude des aberrations chromosomiques, une suspension aqueuse d'un mélange de bacosides A et B (20, 40 et 80 mg/kg) a été injectée en intrapéritonéale (75 µl/souris). De la colchicine, ici utilisée en tant que perturbateur du fuseau mitotique, est administrée 22 h après pour bloquer les cellules en métaphase, et 2 h après, les animaux ont été sacrifiés et les chromosomes des cellules hématopoïétiques (moelle osseuse) ont été préparés et colorés pour permettre l'analyse de ceux-ci (caryotype). Pour rappel, la métaphase est la phase de la mitose durant laquelle les chromosomes sont condensés et sont tous situés dans le plan équatorial de la cellule ; l'établissement du caryotype se fait donc durant cette phase. Un groupe contrôle négatif (injection d'eau distillée) et un groupe contrôle positif (injection de cyclophosphamide, un agent alkylant utilisé en cancérologie) ont également été constitués. Aucune différence significative n'a été retrouvée dans le groupe bacosides en comparaison avec le groupe contrôle négatif en ce qui concerne les paramètres d'étude des aberrations chromosomiques (indice mitotique et fréquences d'apparition des aberrations chromosomiques et chromatidiennes). L'échange de chromatides sœurs se déroule spontanément lors de la mitose mais tout particulièrement avec des clastogènes. Le test d'échange de chromatides sœurs repose sur le marquage du brin d'ADN nouvellement formé lors d'une première mitose avec de la bromodésoxyuridine (BrdUrd) et, alors que le marquage ne devrait apparaître que sur le brin marqué à la mitose suivante, un clastogène va provoquer un échange de chromatides sœurs et une distribution anormale du marquage [321]. La

suspension aqueuse de bacosides A et B, aux 3 doses testées, n'a pas induit d'augmentation significative du taux d'échange de chromatides sœurs/cellule hématopoïétique comparativement au groupe contrôle négatif, contrairement à la mitomycine C (groupe contrôle positif), un agent alkylant également utilisé en cancérologie. Le test du micronoyau (ou micronucleus) repose sur le principe que des micronuclei se forment de manière accrue en présence d'un agent génotoxique. En effet, à la suite d'une mitose erronée, il se peut que les chromosomes ne soient pas correctement répartis dans les cellules filles et qu'il subsiste du matériel génétique (ADN) extranucléaire ; c'est ce que l'on appelle des micronuclei. Ainsi, il suffit de compter les micronuclei dans les érythrocytes polychromatiques pour évaluer les effets génotoxiques d'une drogue [144, 321]. Dans la présente étude, les bacosides A et B n'ont pas provoqué d'augmentation de l'incidence des micronuclei au sein des érythrocytes polychromatiques en comparaison avec le groupe contrôle négatif. **En conclusion, aucune différence significative n'a été retrouvée pour les bacosides A et B versus contrôle négatif à ces trois tests cytogénétiques et aucune relation dose/effet n'a été mise en évidence. Les bacosides, dont on sait qu'ils supportent une grande partie de l'activité biologique du *Bacopa monnieri*, apparaissent dénués d'une quelconque génotoxicité envers les cellules de la moelle osseuse murines et semblent donc sûrs pour une utilisation thérapeutique de ce point de vue.**

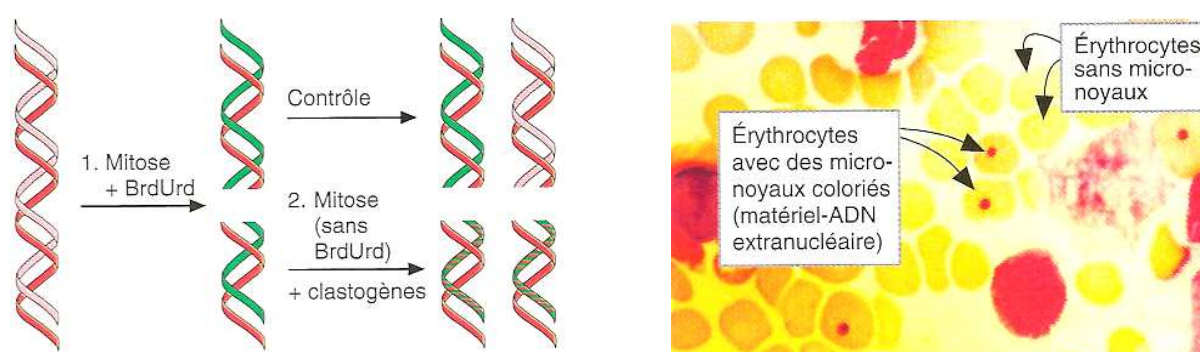


Figure 111: représentation schématique du test d'échange des chromatides sœurs (A) et du test du micronoyau (B) [321].

Le Bacomind® a également été évalué *in vitro*, sur lymphocytes humains, pour sa toxicité génique potentielle en général, pour son pouvoir mutagène en particulier [322]. Aux doses testées (31,2, 62,5 et 125 µg/mL) le Bacomind® n'a pas manifesté d'effet clastogénique sur les lymphocytes, n'a pas provoqué d'aberrations chromosomiques ni induit la formation de micronuclei. Au contraire, il a offert une protection significative et dose-dépendante contre divers mutagènes et clastogènes testés (comme le benzo[a]pyrène). Cet effet protecteur du matériel génétique pourrait être attribué à l'activité antioxydante de l'extrait de bacopa, surtout depuis que l'on sait que les radicaux libres sont impliqués dans les processus de mutagenèse/cancérogenèse. D'autre part, un test d'Ames (dit aussi test de mutation inverse sur les bactéries) a été réalisé. Il s'agit d'un test de mutagénicité utilisant des bactéries de souches spécifiques de *Salmonella typhimurium* porteuses d'une mutation qui les rend incapable de se développer sur un agar normal (dépourvu d'histidine) et qui ont besoin d'un milieu supplémenté en histidine pour pousser. Un agent mutagène peut permettre à ces salmonelles de récupérer la capacité originelle de l'espèce naturelle et donc de former des colonies sur de l'agar normal. On parle alors de mutation inverse. Du fait que nombre de mutagènes n'agissent qu'après une activation métabolique, une fraction de microsomes hépatiques (S9-Mix, activateur métabolique) est ajoutée durant l'incubation. Le Bacomind® (61,72, 185,18, 555,55, 1666,67 et 5000,00 µg/plaque) n'a montré aucun effet mutagénique significatif en comparaison avec le contrôle négatif, sur toutes les souches de *S. typhimurium* considérées. **Le bacopa ne semble donc manifester aucune toxicité génique particulière.**

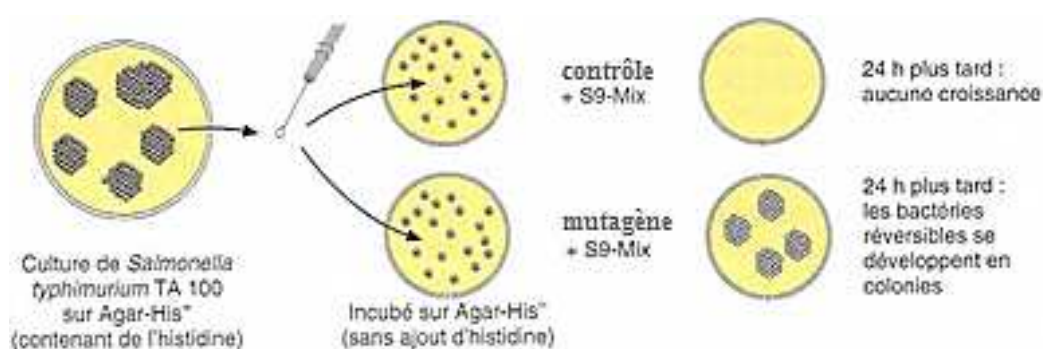


Figure 112: représentation schématique du test d'Ames [321].

I.4. Repro-toxicité

L'évaluation de la toxicité d'une drogue vis-à-vis de la reproduction doit idéalement comporter 3 segments : des études de fertilité et d'embryogenèse, des études d'embryo-fœto-toxicité et de tératogenèse (malformations congénitales) et des études de péri- et postnatalité [317]. Ces études doivent impliquer deux espèces de mammifères dont l'une est « non-rongeur » et métabolise la drogue de manière proche du métabolisme prévisible chez l'homme [318].

En ce qui concerne le bacopa, seule une étude sur la fertilité de souris mâles a pu être retrouvée, il existe ainsi des lacunes quant à l'investigation de ses effets sur la fonction de reproduction.

Un extrait aqueux de bacopa a été administré *per os* à des souris mâles pendant 28 et 56 jours, à raison de 250 mg/kg/j. L'effet du traitement sur les organes reproducteurs mâles et sur la fertilité a été évalué. Une étude de récupération (suppression de l'extrait) a également été conduite afin de constater la réversibilité ou au contraire l'irréversibilité des effets constatés [323]. L'extrait de la plante a provoqué une réduction de la motilité, de la viabilité et du nombre de spermatozoïdes au niveau de la queue de l'épididyme, ainsi que des altérations morphologiques. Sur le plan histologique, les testicules des souris traitées ont montré des altérations au niveau des tubules séminifères avec une vacuolisation intra-épithéliale, un détachement de l'épithélium germinale, une exfoliation des cellules germinales et l'apparition de cellules géantes contenant 2 à 7 spermatocytes. Dans les cas sévères, les tubules n'étaient bordés plus que par des cellules de Sertoli (cellules de soutien) ou, au mieux, par des cellules de Sertoli, des spermatogonies et des spermatocytes (mais toujours une absence de spermatides et de spermatozoïdes), ce qui indique une altération profonde de la spermatogenèse. De plus, l'extrait de bacopa a induit une réduction significative de l'épaisseur de l'épithélium germinale et du diamètre des tubules séminifères, en comparaison avec le groupe contrôle. L'épididyme des rats traités n'a révélé que de légères modifications histologiques. Le traitement n'a en revanche pas eu d'effet sur les taux sériques de testostérone. Certes, la libido n'a pas été affectée, mais la fertilité a été significativement diminuée (voire supprimée) comme en témoigne le faible taux d'implantation des femelles en période de pro-œstrus mises au contact des mâles traités. Une période de 56 jours sans traitement (étude de récupération) a permis la réversibilité de toutes les altérations mentionnées précédemment ; les paramètres étudiés ont tous retrouvé des valeurs proches de

celles du groupe contrôle. **En conclusion, les résultats obtenus chez les souris mâles suggèrent que le bacopa provoque une suppression réversible de la spermatogenèse et de la fertilité.**

II. Essais cliniques

Le but premier d'un essai clinique est d'apporter la preuve scientifique de l'efficacité clinique d'un traitement. Il doit permettre de confronter à la réalité des hypothèses thérapeutiques basées sur le mécanisme d'action de la substance [317].

Du point de vue terminologique [317, 318, 319] :

- L'essai est décidé par un « promoteur », qui est une personne physique ou morale qui prend l'initiative d'une recherche biomédicale ; et les médecins chargés du recrutement des participants, de la réalisation concrète de l'essai et du recueil des données sont des « investigateurs ». Ces derniers sont aidés des ARC (attachés de recherche clinique) ;
- Un essai respecte toujours un « protocole » préalablement établi et qui définit l'objectif de l'essai et le plan expérimental (modalités pratiques de mise en œuvre de l'étude) ;
- La sélection des participants doit répondre à des « critères d'inclusion » et ne pas remplir les « critères d'exclusion ». Les groupes doivent être homogènes afin de réduire la variabilité de la réponse et rendre plus sensible la comparaison statistique, et représentatifs de la population cible. Le nombre de sujets à inclure (N) tient compte de nombreux facteurs et garantira la « puissance » désirée de l'essai ;
- Qui dit évaluation dit comparaison, et l'on ne peut conclure à l'efficacité d'un médicament sans une comparaison à une « molécule de référence » ou à un « placebo ». La constitution des groupes (et donc l'attribution des traitements) se fait par tirage au sort, c'est la « randomisation ». La comparaison entre 2 groupes peut se faire en « groupes parallèles » (essai dit « contrôlé » où un des groupes joue le rôle de témoin) ou en « cross-over » (essai dit « croisé » où le patient est son propre témoin) ;
- L'étude peut se dérouler en « double-aveugle » (ni le patient ni le médecin ne connaissent le traitement attribué, et cela évite tout biais de jugement), en « simple-aveugle » (le médecin connaît le traitement reçu par le patient) ou encore « en ouvert » (patient et médecin connaissent le traitement attribué) ;

- Au cours de l'essai tout effet indésirable grave (EIG) ou inattendu, et qui remettrait en cause la sécurité des participants, doit être déclaré au promoteur.

Les essais cliniques chez l'homme comportent différentes phases : la phase I qui correspond à la première administration chez l'homme et qui doit permettre d'évaluer l'innocuité et la tolérance, la phase II qui correspond à l'étude de l'efficacité pharmacologique et la phase III qui est l'étude de l'efficacité thérapeutique. Les études post-commercialisation sont parfois dites de phase IV et visent à assurer le suivi du médicament (pharmacovigilance) ou du complément alimentaire (nutrivi-gilance) après sa mise sur le marché.

II.1. Etudes d'innocuité et de tolérance

Ce sont les essais cliniques de phase I. Ils se font sur un nombre restreint de volontaires sains, avec une escalade de doses (la première dose étant déterminée en fonction des résultats de l'expérimentation animale) ou une dose unique répétée, pour déterminer la tolérance humaine et mettre en évidence les premiers effets indésirables [318, 319].

En 1997, une étude clinique en double-aveugle, contre placebo et en groupes parallèles a été conduite sur 31 participants, volontaires sains humains de sexe masculin, afin d'évaluer la sécurité d'emploi et la tolérance vis-à-vis d'une dose orale unique d'un mélange de bacosides A et B (20 à 300 mg) : 6 participants dans le groupe placebo, 4 dans chacun des groupes 20, 75, 100, 150 et 200 mg, et 1 seul a reçu une dose unique de 300mg [324]. L'essai a été complété par une étude de tolérance d'une dose orale répétée quotidiennement pendant 4 semaines, sur 20 volontaires sains : 10 ont reçu 100 mg/j de bacosides A et B et 10 autres ont reçu 200 mg/j de bacosides A et B. Une surveillance détaillée pré- et post-administration des paramètres cliniques, hématologiques et biochimiques n'a révélé aucune anomalie liée à l'administration unique ou répétée des bacosides A et B aux différentes posologies testées. Les bacosides ont été bien tolérés et aucun effet indésirable ou inattendu n'a été mis en évidence. **Les investigateurs ont alors conclu que l'administration orale unique (20-300 mg) et répétée (100 et 200 mg/j pendant 1 mois) des bacosides A et B était sûre chez l'homme sain.**

Le Bacomind[®] a également été évalué chez des volontaires sains quant à sa sécurité d'emploi à court terme dans le cadre d'un essai clinique de phase I conduit en 2007 [325]. Il s'agit d'un essai randomisé, en ouvert, avec une escalade de doses. Sur les 31 volontaires de départ, 23 (19 hommes et 4 femmes) ont satisfait les critères d'inclusion (notamment un âge compris entre 18 et 45 ans) et d'exclusion et ont reçu une dose orale matinale (entre 8 et 9h) de 300 mg/j pendant 15 jours et 450 mg/j les 15 jours suivants. L'observance, le monitoring des effets indésirables ainsi que de nombreux paramètres cliniques, hématologiques, biochimiques et électrocardiographiques ont été évalués. Sur les 23 volontaires enrôlés, tous ont terminé l'essai avec une bonne observance. Les investigations détaillées pré- et post-administration n'ont révélé aucun effet indésirable grave ou inattendu, à part de légers troubles gastro-intestinaux (3 volontaires sur 23), lesquels ont régressé spontanément sans avoir à interrompre le traitement. Il s'agissait précisément de brûlures épigastriques (1/23), de nausées (1/23) et de ballonnements (1/23). D'autre part, il a été noté des modifications statistiquement significatives de quelques paramètres biochimiques, même si tous sont restés dans des valeurs normales : une diminution de la glycémie à jeun (mais sans hypoglycémie), de la créatininémie et de l'ASAT et une augmentation de l'ALAT. Précisément, en ce qui concerne le foie (les transaminases ALAT et ASAT), les changements ont été considérés comme n'ayant aucune pertinence clinique. Le Bacomind[®] n'a manifesté aucun signe de toxicité neurologique. **L'escalade de doses apporte la preuve de la bonne tolérance et de l'innocuité d'emploi de cet extrait enrichi dans la fourchette 300-450 mg/j p.o., lors d'une utilisation pendant 30 jours ; il apparaît donc comme sûr en administration humaine dans ces conditions. En revanche, on peut regretter que l'étude n'ait pas été menée contre placebo ou contre une drogue de référence et que la durée n'ait pas été plus longue afin de s'assurer de l'absence d'effets indésirables liés à une utilisation à plus long terme.**

II.2. Etudes d'efficacité thérapeutique

II.2.1. Troubles neuropsychiatriques

Une étude clinique indienne de 1966 s'est intéressée à évaluer le potentiel thérapeutique d'un extrait aqueux brut et d'un extrait alcoolique dégraissé, tous deux préparés à partir de la plante entière de bacopa séchée et pulvérisée, chez 24 enfants et adultes (7-34 ans) des deux sexes souffrant de divers troubles neuropsychiatriques, essentiellement l'épilepsie (seule ou accompagnée d'autres affections), la paralysie cérébrale, les troubles anxieux et le retard mental [326]. Deux groupes ont été constitués, un premier (N = 16) a reçu l'extrait aqueux (64 ml/j) et un second (N = 8) a reçu l'extrait alcoolique (2-4 mg/j, la dose ayant été ajustée en fonction de la sévérité des troubles). Après une période d'observation de 4 semaines durant laquelle tous les traitements médicamenteux ont été arrêtés (*wash out*) et des investigations cliniques, biochimiques et radiologiques ont été effectuées, l'étude proprement dite a débuté et les 2 groupes ont reçu leur traitement respectif pendant 12 semaines. Chez les patients épileptiques, l'extrait aqueux a été efficace dans 50 % des cas (3/6) dans le soulagement des crises épileptiques (2 avec une réduction significative de la fréquence des crises et 1 avec une protection complète). Pour les 3 patients épileptiques non améliorés avec l'extrait aqueux, la thérapie conventionnelle a été réintroduite, en association avec l'extrait aqueux. L'extrait alcoolique à quant à lui montré une efficacité antiépileptique supérieure avec une amélioration dans 60 % des cas (3/5) et un soulagement complet chez 2 patients. De la même manière, une thérapie conventionnelle a été co-administrée avec l'extrait alcoolique chez les patients non protégés par l'extrait seul. Dans les cas de paralysie cérébrale, il a été noté une diminution de l'hypersalivation, de l'agitation, de l'agressivité et des tendances destructrices et, dans les cas de retard mental, une amélioration du QI (quotient intellectuel) a été mise en évidence. D'autre part, les 2 extraits ont apparemment augmenté les temps de sommeil. Aucune altération n'a été décelée au niveau des paramètres biochimiques et hématologiques. Seuls des troubles gastro-intestinaux modérés ont été rapportés dans environ 20 % des cas. **Même s'il semble que l'extrait alcoolique est plus efficace que l'extrait aqueux dans la réduction des crises épileptiques, cette étude comporte malheureusement trop d'aspects limitants pour pouvoir en tirer une quelconque conclusion : très petits échantillons, groupes non homogènes, méthodologie « empirique » et non rigoureuse, etc. Le *Bacopa monnieri* est traditionnellement recommandé dans le traitement de troubles**

neurologiques variés (l'épilepsie, la « folie »...) et il est surprenant qu'aucun essai clinique correctement mené n'ait cherché à évaluer la véracité de ces revendications folkloriques !

II.2.2. La cognition

II.2.2.1. Chez l'adulte jeune

Une étude pilote sur un petit échantillon (N = 11) de jeunes adultes sains (16-28 ans) a été conduite en 1966 dans le but d'évaluer les effets d'une administration pendant 16 semaines d'un extrait alcoolique sur la mémoire immédiate et sur la concentration. **Mais, cet essai a échoué à montrer une amélioration statistiquement significative de ces deux critères d'évaluation[327].**

En 2001, une étude australienne a examiné les effets d'une administration unique d'un extrait de bacopa (KeenMind®) sur les fonctions cognitives d'adultes sains. Il s'agit d'un essai randomisé, en double-aveugle, en groupes parallèles et contre placebo où 38 volontaires ont été enrôlés (18-60 ans, 11 hommes et 27 femmes) ; 18 ont reçu deux capsules de Keenmind® (2 × 150 mg) en prise unique et 20 autres un placebo [328]. Une batterie de tests neuropsychologiques validés évaluant les processus d'apprentissage et de mémorisation ont été effectués avant et 2 h après l'administration du traitement. Le Keenmind® est un extrait hydro-alcoolique préparé à partir des tiges et des feuilles d'une variété de *Bacopa monnieri* cultivée dans l'Ouest du Bengale. Il contient au minimum 55 % de bacosides. Aucun effet significatif sur les fonctions cognitives étudiées (attention, mémoire de travail, mémoire à court terme, apprentissage verbal, consolidation de la mémoire, processus exécutifs, planification, résolution de problèmes, vitesse de traitement de l'information, réponse motrice, prise de décision) n'a pu être mise en évidence suite à l'administration unique de cet extrait (300 mg), en comparaison avec le groupe placebo. Plusieurs hypothèses pouvant expliquer cette absence d'effet « aigu » du bacopa peuvent être émises :

- La dose employée n'était peut-être pas suffisante, comme cela a été rapporté chez l'animal ;

- Le moment des tests n'était peut-être pas adéquat (2 h post-administration) : ce délai était censé coïncider avec le maximum des effets pharmacodynamiques observés lors des évaluations précliniques animales, mais l'extrapolation à l'homme reste toujours délicate. D'autre part, le profil cinétique des constituants actifs du bacopa n'avait jamais été étudié chez l'homme par le passé et surtout, rien n'avait indiqué la possibilité d'effets pharmacodynamiques aigus chez l'homme ;
- Peut-être les effets auraient-ils été significatifs chez des sujets présentant des déficits cognitifs ;
- Aucune relation effet/âge n'a pu être montrée mais peut-être que les échantillons ne permettaient pas d'observer un effet lié à l'âge (maximum 60 ans).

Bien évidemment, rien n'exclut à ce stade la possibilité d'effets sur les fonctions cognitives liés à une administration chronique ; et c'est justement ce que cette même équipe a voulu examiner dans le cadre d'un second essai clinique.

Dans un essai randomisé, en double-aveugle, en groupes parallèles et contre placebo, 46 volontaires sains (18-60 ans, 11 hommes et 35 femmes) ont satisfait les critères d'inclusion/exclusion et ont reçu pendant 12 semaines du Keenmind® (300 mg/j) pour la moitié d'entre eux, et un placebo pour l'autre moitié [329]. Des tests neuropsychologiques ont été effectués avant (*baseline*), à la 5^e et à la 12^e semaine. L'extrait de bacopa a permis d'améliorer significativement la vitesse de traitement des informations visuelles, le taux d'apprentissage, la consolidation de la mémoire et l'état d'anxiété [330], et a diminué le taux d'oubli, comparativement au groupe placebo. Les effets maximums sont apparus après 12 semaines de traitement. Le recueil des effets indésirables n'a pas montré de différence significative à part une incidence plus élevée de nausées, sécheresse buccale et fatigue dans le groupe KeenMind®.

En conclusion, une dose unique standard de KeenMind® n'a pas permis de mettre en évidence un effet facilitateur cognitif chez l'individu sain, alors qu'une administration chronique de la même dose pendant 12 semaines a amélioré les processus cognitifs fortement tributaires des informations en provenance de notre environnement tels l'apprentissage et la mémoire.

Cherchant à évaluer une possible synergie d'action entre le *Bacopa monnieri* et le *Ginkgo biloba*, ces mêmes chercheurs australiens ont réalisés deux études cliniques, l'une évaluant les effets aigus liés à une administration combinée unique et l'autre évaluant les effets chroniques

liés à une administration combinée réitérée dans le temps. Le premier essai a inclus 12 volontaires sains, 6 ont reçu une association de bacopa (300 mg) et de ginkgo (120 mg), et les 6 autres ont reçu un placebo [331]. Les tests neuropsychologiques ont été effectués avant administration puis répétés 90 et 180 minutes post-administration. Les résultats n'ont pas montré d'amélioration significative dans le groupe bacopa + ginkgo en comparaison avec le groupe placebo, l'étude a donc échoué à mettre en évidence des effets d'amélioration cognitive et une quelconque synergie d'action entre ces deux espèces végétales lorsqu'une dose unique est administrée. Le second essai (N = 85, avec 41 dans le groupe placebo et 44 dans le groupe bacopa + ginkgo) a été réalisé selon le même plan expérimental sauf que les participants ont été soumis à la batterie de tests neuropsychologiques au départ puis à la 2^e semaine (évaluation des effets subchroniques) et à la 4^e semaine (évaluation des effets chroniques) de traitement[332]. Contrairement au postulat initial des auteurs selon lequel, le bacopa et le ginkgo étant tous deux considérés dans la littérature scientifique comme des antioxydants, des modulateurs du système cholinergique central et des plantes douées de propriétés nootropes, une administration combinée devrait permettre une synergie d'action, non seulement aucun effet synergique n'est apparu mais l'administration combinée des 2 extraits n'a pas apporté de supériorité statistiquement significative dans aucun des tests utilisés (tests qui pourtant permettent l'investigation de nombreux processus cognitifs) par rapport au placebo. Le monitoring des effets indésirables n'a pas révélé de différence entre les deux groupes expérimentaux. **En conclusion, l'association du bacopa et du ginkgo ne permet pas d'amélioration cognitive chez les individus sains en traitement mono-dose, ni même en traitement de 2 ou 4 semaines. La synergie possible « mécaniquement » parlant n'a pas été retrouvée cliniquement. Et, même si des compléments alimentaires actuellement commercialisés contiennent cette association, elle ne semble pas pertinente du point de vue thérapeutique, dans l'état actuel des connaissances scientifiques.**

Cette même équipe australienne a réalisé une dernière étude clinique en 2008, d'une puissance supérieure aux précédentes. Il s'agit là encore d'un essai randomisé, en double-aveugle, en groupes parallèles et contre placebo mais d'une durée de 90 jours et ayant recruté 107 volontaires sains adultes (18-60 ans) [333]. 62 participants arriveront jusqu'au terme de l'essai avec une observance du traitement d'au moins 80 %, 37 ont été exclus en raison d'une mauvaise observance, 3 ont été exclus à cause d'un événement médical indépendant et 5 ont quitté l'essai en raison d'effets indésirables (3 dans le groupe bacopa et 2 dans le groupe placebo). Le groupe placebo est constitué de 12 hommes et 17 femmes (N = 29, âge moyen de

44,3 ans) et le groupe bacopa (KeenMind®) de 9 hommes et 24 femmes (N = 36, âge moyen de 41,6 ans). Les participants ont été soumis à des tests neuropsychologiques (version adaptée du système d'évaluation cognitive CDR, *Cognitive Drug Research*) au début et à la fin de l'essai. Aussi, toutes les semaines, il a été effectué un recueil téléphonique des symptômes positifs et négatifs (effets indésirables) ressentis par les participants suite à leur traitement. L'extrait de bacopa (2 × 150 mg/j) a permis une amélioration significative des performances à la tâche « mémoire de travail », plus particulièrement de la mémoire de travail spatiale, et du traitement rapide d'informations visuelles, comparativement au groupe placebo. Le recueil hebdomadaire des symptômes subjectifs a mis en évidence une incidence supérieure dans le groupe bacopa des symptômes : « énergie augmentée », « réduction du nombre de rêves » et « diarrhées », et dans le groupe placebo des symptômes : « troubles dentaires » et « tendance aux ecchymoses ». Sinon, aucun autre symptôme n'a différé statistiquement entre les 2 groupes, preuve d'une bonne tolérance générale du bacopa. **Cette étude confirme donc les effets d'amélioration cognitive du bacopa chez des individus sains après un traitement de 90 jours. Néanmoins, d'autres études semblent nécessaires notamment pour établir précisément l'index thérapeutique, le délai pour atteindre des taux thérapeutiques et pour connaître les effets à encore plus long terme.**

Quelques années auparavant, Roodenrys *et al.*, d'autres chercheurs canadiens avaient également rapporté des effets bénéfiques sur la mémoire liés à une utilisation chronique de ce même extrait de bacopa (KeenMind®). 76 adultes âgés de 40 à 65 ans ont participé jusqu'au terme d'un essai randomisé contrôlé, en double-aveugle et contre placebo, d'une durée de 3 mois [334]. L'extrait a été administré à la posologie de 300 mg/j pour les personnes pesant moins de 90 kg (2 capsules) et de 450 mg pour celles dépassant les 90 kg (3 capsules). Trois sessions de tests neuropsychologiques ont eu lieu : au départ, à l'issue des 3 mois et 6 semaines après l'essai. Les résultats n'ont pas montré de différence significative dans les tests de mesure de l'attention, de la mémoire à court terme (visuelle et verbale) ou encore de la récupération d'informations à partir de la mémoire à long terme, entre les groupes bacopa et placebo. L'échelle d'évaluation subjective de l'état de santé psychologique (DASS, *Depression, Anxiety and Stress Scale*) ainsi que le questionnaire d'appréciation subjective des performances mnésiques au quotidien n'ont pas été significativement améliorés par l'administration chronique de bacopa. En revanche, comme en témoigne l'épreuve de rappel de paires de mots non liés après un court délai, l'extrait a permis une amélioration significative de la rétention de nouvelles informations. **En fait, il semblerait que le bacopa**

n'agisse pas sur l'acquisition des informations (pas de différence dans les tests d'apprentissage) mais plutôt en permettant une réduction de l'oubli des informations récentes.

II.2.2.2. Chez l'enfant

Dans nombre de revues de la littérature concernant le *Bacopa monnieri*, il est fait état de deux essais cliniques relatifs au renforcement des capacités cognitives d'une part, et à l'amélioration des symptômes du trouble de déficit de l'attention/hyperactivité (TDAH) d'autre part, chez des enfants [17, 71, 126, 288, 335-338]. N'ayant pu se procurer ces deux publications indiennes par tous les moyens mis à notre disposition, et devant le fait que les auteurs de ces revues ont en fait pour la plupart travaillé sur les résumés d'étude, la méthodologie employée et les résultats restent, à notre plus grand regret, invérifiables. Nous ne ferons alors que les expliciter brièvement [339, 340].

En 1987, un essai en ouvert contre placebo et en groupes parallèles a été conduit sur 40 enfants de l'Inde rurale, scolarisés et âgés de 6 à 8 ans, pour déterminer les effets du bacopa dans l'amélioration de leurs capacités mentales [339]. La moitié d'entre eux a reçu 1 cuillère à café de sirop de bacopa 3 fois par jour pendant 3 mois, chaque cuillère à café étant équivalente à 350 mg de poudre totale de la plante (groupe bacopa), et l'autre moitié a seulement reçu du sirop simple à la même fréquence et pendant la même durée (groupe placebo). Au début et à la fin de l'expérimentation, une série de tests validés d'évaluation de l'intelligence ont été effectués :

- Deux sous-tests du WISC (*Weschler Intelligence Scale for Children*), l'un pour évaluer le raisonnement perceptif visuel (mémoire visuelle à court terme, vitesse de traitement de l'information, coordination visuo-motrice, concentration) et l'autre pour mesurer les capacités de la mémoire immédiate en général ;
- Un test utilisant les matrices de Raven qui mesure la capacité à développer un système de raisonnement logique à partir d'éléments abstraits (une série de figures abstraites doit être complétée par l'enfant) ;

- Un test d'intégration visuo-motrice dit de Bender-Gestalt, qui sert notamment à dépister les troubles du développement et à évaluer les capacités cognitives plus largement.

Les résultats ont indiqué une amélioration significative des capacités mentales des enfants du groupe bacopa en comparaison avec ceux du groupe placebo, en termes de vitesse de réaction et de traitement des informations, de performance, de taux d'erreur et de mémoire immédiate.

Le sirop de bacopa aurait donc permis, semble-t-il, d'améliorer les fonctions cognitives des enfants, plus particulièrement les capacités d'apprentissage discriminatif et de mémorisation.

Un essai en double-aveugle, randomisé, avec groupe parallèles et contrôlé par placebo incluant 36 enfants avec un diagnostic de TDAH a été mené sur une période de 16 semaines [340] en 2000. 19 enfants (âge moyen de 8,3 ans) ont reçu un extrait normalisé de bacopa, contenant au minimum 20 % de bacosides, à la posologie de 50 mg 2 fois par jour pendant 12 semaines. Les 17 autres enfants (âge moyen de 9,3 ans) ont reçu un placebo pendant la même période. Il a ensuite été administré un placebo aux enfants des deux groupes pendant 4 semaines (*wash out*) afin d'évaluer la rémanence des effets du bacopa dans le temps. Des tests d'appréciation des fonctions cognitives ont été conduits au départ, à la 4^e, 8^e, 12^e et 16^e semaine de l'essai. Un bénéfice significatif a été rapporté dans le groupe bacopa à la 12^e semaine avec une amélioration de la mémoire logique, des performances aux tâches de répétition de phrases et de rappel de paires de mots liés, comparativement au groupe placebo. Les améliorations constatées dans le groupe bacopa se sont maintenues à la 16^e semaine ; autrement dit, les effets facilitateurs/d'amélioration du bacopa sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation des enfants sont restés significatifs même après 4 semaines d'arrêt du traitement. **En conclusion, le bacopa pourrait s'avérer efficace dans l'amélioration des fonctions cognitives dans le cadre d'un trouble de déficit de l'attention/hyperactivité.**

En 2008, le Bacomind[®] a été administré à 28 enfants (13 garçons et 15 filles) âgés de 4 à 18 ans (10,5 ans en moyenne) possédant un niveau d'intelligence dans la moyenne basse ou limite (QI entre 70 et 90) et éligibles pour un programme d'éducation individualisé spécifiquement prévu pour les élèves dits « lents » [341]. Il s'agit d'un essai clinique en ouvert et non contrôlé dans lequel les enfants ont reçu 225 mg d'extrait titré de bacopa tous les matins pendant 4 mois. L'étude a été conduite en ambulatoire avec une surveillance

clinique étroite et régulière en milieu hospitalier pour vérifier l'absence d'apparition d'éventuels effets indésirables, la tolérance générale et l'observance du traitement, et également pour soumettre les jeunes participants à toute une batterie de tests neuropsychologiques (WISC et *Memory Scale Test*). Parmi les 27 enfants enrôlés, 24 ont terminé l'étude (dont 2 sorties d'étude sans raison connue). Il n'y a eu aucun effet indésirable majeur observé à l'exception de 3 enfants qui ont manifesté des vomissements ou des maux d'estomac qui cessèrent spontanément après 2 ou 3 jours d'interruption du traitement. Le Bacomind[®] a donc globalement été bien toléré tout au long de cette étude. D'autre part, le score global des tests d'évaluation de l'apprentissage et de la mémoire ont indiqué une amélioration significative pour 83,33 % des participants (en comparaison avec leur score personnel calculé au début de l'étude) avec la distribution suivante : 54,17 % ont montré une augmentation jusqu'à 20 % de leur score global, 20,83 % avec 21 à 50 % d'amélioration et 8,33 % ont connu une augmentation remarquable, entre 51 et 75 %, de leurs performances cognitives. Plus exactement, ce sont la mémoire de travail et la mémoire verbale à court terme (amélioration significative pour 70,83 % des membres de l'échantillon), mais aussi la mémoire logique, la mémoire en lien avec la vie personnelle et les mémoires visuelle et auditive qui ont été le plus améliorées au terme des 4 mois de traitement. **Par conséquent, cet extrait de bacopa est apparu sûr d'emploi et efficace dans l'amélioration des capacités mentales des enfants nécessitant un programme éducationnel personnalisé.**

II.2.2.3. Lors du vieillissement

Un extrait standardisé de bacopa développé par le CDRI d'Inde (*Central Drug Research Institute*, Lucknow) a été testé chez des personnes de plus de 55 ans présentant des troubles de la mémoire liés à l'âge (AAMI, *Age Associated Memory Impairment*) dans le cadre d'un essai clinique conduit en ambulatoire et réalisé en double-aveugle, avec randomisation et contrôlé par placebo, d'une durée totale de 16 semaines. Pour être recrutés, les patients devaient manifester des plaintes mnésiques, avoir un score < 6 à l'échelle d'évaluation de la mémoire WMS (*Wechsler Memory Scale*) et un score > 24 au MMS (*Mini-Mental State*). En revanche, ils ne devaient pas manifester un quelconque trouble psychiatrique. Aussi, sur les 86 personnes criblées, 40 (37 hommes 3 femmes) ont satisfait tous les critères d'inclusion/exclusion et ont réellement participé à l'essai. La moitié d'entre eux a reçu

l'extrait de bacopa (125 mg, 2 fois par jour) pendant 12 semaines, l'autre moitié a simplement reçu un placebo durant la même période. Il a ensuite été administré un placebo à tous les participants pendant 4 semaines afin de déterminer la persistance des effets du bacopa dans le temps, après arrêt du traitement [342]. L'évaluation cognitive et mnésique a été réalisée grâce aux tests précités (WMS et MMS) au début et à la 4^e, 8^e, 12^e et 16^e semaine. Il y a eu 5 sorties d'étude (2 dans le groupe bacopa et 3 dans le groupe placebo). Comparativement au groupe placebo, les volontaires du groupe bacopa ont montré une amélioration significative de la mémoire logique (à partir de la 4^e semaine), du calcul mental, de l'apprentissage indicé (8^e semaine) et de l'attention (12^e semaine). Ainsi, dès la 4^e semaine les scores globaux individuels étaient significativement différents entre les 2 groupes et n'ont cessé de progresser jusqu'à la fin du traitement dans le groupe bacopa. De plus, les effets d'amélioration cognitive ont perduré après l'arrêt de traitement, les bénéfices mnésiques acquis ayant été conservés durant les 4 semaines de « wash-out ». Dans le groupe bacopa, 8 personnes (44,3 %) ont amélioré leur score global jusqu'à 20 % et 10 (55 %) de 21 % et plus, alors que dans le groupe placebo, l'augmentation n'a jamais atteint les 20 %. A part un sujet qui a développé un rash maculopapuleux en région péri-anale durant la 8^e semaine de traitement avec l'extrait de bacopa, les autres effets secondaires rapportés (1 personne avec des diarrhées et 2 avec des maux de tête) ont concerné le groupe placebo. **A la lecture de ces résultats, le bacopa apparaît bien toléré et efficace pour combattre les troubles de la mémoire liés à l'âge.**

En 2008, des chercheurs américains ont réalisé un essai clinique randomisé, en groupes parallèles, contre placebo et en double-aveugle, pour évaluer chez la personne âgée les effets d'un extrait titré de *Bacopa monnieri* sur les performances cognitives, l'anxiété et la dépression, ainsi que son innocuité et sa tolérance [343]. 54 volontaires de 65 et plus (âge moyen de 73,5 ans) ont été recrutés par annonce publique au sein de la communauté de Portland (Oregon, USA). Seuls 48 d'entre eux termineront l'étude. Tous ont d'abord reçu un placebo pendant 6 semaines et ensuite, ils ont été randomisés pour recevoir soit l'extrait de bacopa (24 personnes) sous la forme d'un comprimé contenant 300 mg d'extrait sec (et correspondant à une dose minimale de 150 mg de bacosides A et B) soit un comprimé placebo similaire, en une prise orale quotidienne pendant 12 semaines. Le principal critère d'évaluation était un test d'apprentissage audio-verbal qui consiste en la mémorisation et au rappel différé d'une liste de 15 mots (AVLT, *Rey Auditory Verbal Learning Test*), complété par le test de Stroop (ou test de résistance à l'interférence, *Stroop Task*) qui étudie la capacité du sujet à ignorer les informations non pertinentes, un test d'évaluation de l'attention (DAT,

Divided Attention Task) et l'échelle d'intelligence de Wechsler (mémoire de travail immédiate). Des échelles de mesure de l'affect ont permis d'évaluer l'humeur (*Profile of Mood State*), l'état d'anxiété (*State-Trait Anxiety Inventory*) et le niveau de dépression (CESD-10) des personnes. Une surveillance des signes vitaux et des effets secondaires a également été effectuée. Les résultats ont montré une amélioration significative des scores initiaux (et donc de la performance) des individus du groupe bacopa aux tests AVLT et Stroop, alors que les scores de ceux du groupe placebo sont restés statistiquement inchangés durant toute la durée de l'essai. Parallèlement, il a été noté une diminution progressive du niveau dépressif et de l'état d'anxiété, ainsi que du rythme cardiaque, dans le groupe bacopa ; et à l'inverse, une augmentation de ces paramètres dans le groupe placebo. En revanche, l'humeur, les scores au test DAT et la pression artérielle n'ont pas été significativement modifiés, quel que soit le groupe. Le recueil des effets indésirables a confirmé la bonne tolérance générale de l'extrait et l'innocuité de la dose employée (9 rapportés dans le groupe bacopa contre 10 dans le groupe placebo), avec principalement des troubles digestifs et des symptômes grippaux chez les sujets ayant pris du bacopa. **Cette étude fournit ainsi une preuve supplémentaire du potentiel du bacopa pour améliorer ou restaurer en toute sécurité les performances cognitives dégradées au cours du vieillissement physiologique.**

Une autre étude s'est également intéressée à l'évaluation de l'efficacité du bacopa à combattre le déclin cognitif modéré lié à l'âge, dans un essai d'une grande puissance, en double-aveugle, randomisé et contrôlé par placebo, impliquant 98 participants en bonne santé (sur 136 volontaires au départ) de 55 ans et plus, recrutés parmi la population générale de la région du New South Wales en Australie [344]. Un extrait de bacopa (Bacomind®, 300 mg) ou un placebo a été administré pendant 12 semaines, quotidiennement. Les tests neuropsychologiques suivants ont été utilisés : le test AVLT (mesure de la mémoire audio-verbale et visuelle), le test TMT (*Reitan Trail Making Test*, mesure de l'attention et de la flexibilité attentionnelle) et le test CFT (*Rey-Osterrieth Complex Figure Test*, évaluation de la performance visuo-constructive). Ces tâches ont été complétées par un questionnaire d'appréciation subjective de la performance de la mémoire (MAC-Q, *Memory Complaint Questionnaire*). A l'issue des 12 semaines de traitement, l'extrait de bacopa a permis d'augmenter significativement *versus* placebo l'apprentissage verbal, l'acquisition de la mémoire et le délai de rappel (AVLT). Les scores aux autres tests (CFT, TMT) et au questionnaire MAC-Q ont aussi été améliorés mais non significativement statistiquement. Malgré une bonne tolérance de l'extrait, le bacopa a occasionné des troubles gastro-

intestinaux (nausées, augmentation de la fréquence des selles et crampes abdominales), comparativement au placebo. **En conclusion, comme il l'a été montré dans de précédentes études, le bacopa semble pouvoir améliorer certains processus cognitifs comme l'acquisition et la rétention d'informations, chez des individus sains et lors d'une administration chronique. Il pourrait donc se révéler des plus utiles dans la prise en charge du déclin cognitif progressif lié au vieillissement et peut-être aussi dans tout autre cause de déclin cognitif modéré (les anglo-saxons parlent de MCI, *Mild Cognitive Impairment*), supportant ainsi une des indications traditionnellement reconnues de cette plante dans la médecine ayurvédique.**

II.2.3. Le syndrome de l'intestin irritable

Le syndrome de l'intestin irritable (dit aussi « du côlon irritable ») fait partie des colopathies fonctionnelles et se manifeste par des douleurs ou un inconfort chroniques de l'abdomen, associés à des troubles du transit (constipation, diarrhées ou alternance des deux) et/ou des météorismes. Les objectifs du traitement sont le soulagement de la douleur abdominale d'une part et l'amélioration des troubles du transit et du ballonnement abdominal d'autre part (worldgastroenterology.org).

En 1989, un essai clinique randomisé mené en double-aveugle et contrôlé a permis d'évaluer l'efficacité d'une formulation ayurvédique composée d'un mélange en proportion 2/3 d'une poudre sèche totale de *Bacopa monnieri* et d'une poudre sèche du fruit de *Aegle marmelos correa* (« pomme du bengale » ou « fruit de Bael », Rutaceae) dans la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable [345]. Il est à noter que le fruit de *A. marmelos correa* est traditionnellement utilisé en Inde en tant qu'antidiarrhéique. Aussi, parmi les 169 patients atteints du syndrome de l'intestin irritable participant à cette étude, 57 ont reçu cette formulation ayurvédique, 60 ont reçu une thérapie conventionnelle à base de bromure de clidinium, de chlordiazépoxide et d'ispaghul, et 52 ont reçu un placebo. L'étude a duré 6 semaines et les drogues ont été administrées une fois par jour. La formulation ayurvédique n'a pas été plus efficace que la thérapie conventionnelle. En effet, à l'issue des 6 semaines de traitement, la préparation traditionnelle a été efficace dans environ 65 % des cas, surtout dans la forme de syndrome de l'intestin irritable à diarrhée prédominante, alors que les drogues

conventionnelles l'ont été dans environ 78 % des cas, surtout dans les formes avec une prédominance douloureuse. Le placebo a permis un soulagement dans 32 % des cas. D'autre part, dans la forme du syndrome de l'intestin irritable où prédomine un excès de gaz digestifs, les effets des thérapies conventionnelles et ayurvédique n'ont pas été plus efficace que le placebo. Enfin, la poursuite du traitement à plus long terme (plus de 6 mois) n'a pas prouvé de supériorité des deux thérapies dans la prévention des rechutes. **En conclusion, les effets bénéfiques propres du bacopa ne peuvent être confirmés car les deux espèces végétales n'ont pas été évaluées séparément.**

II.3. Discussion

Le bacopa semble posséder un profil de sécurité satisfaisant [324, 325]. La tolérance générale parmi les populations étudiées est bonne et la surveillance des paramètres cliniques, biochimiques, hématologiques et électrocardiographiques n'a pas révélé de toxicité particulière, ni même d'effet indésirable grave ou inattendu pouvant remettre en cause la santé des consommateurs. Des troubles gastro-intestinaux modérés et sans gravité apparente constituent les effets indésirables les plus fréquents [333, 341, 343, 344]. Mais, les études d'innocuité et de tolérance proprement dites sont très peu nombreuses et aucune n'a jamais été conduite sur une période excédant 30 jours ; aussi, ce sont les études d'évaluation de l'efficacité clinique du bacopa qui sont finalement les plus informatives sur la iatrogénie éventuelle à plus long terme (3 mois pour les plus longs essais). Dès lors, on peut dire que la mise en œuvre d'études de phase I apparaît nécessaire.

Les résultats des essais cliniques ont globalement montré une amélioration des fonctions cognitives parmi les différentes tranches d'âge (enfants, adultes, personnes âgées). Mais, les conditions d'utilisation pour lesquelles il semble y avoir une efficacité optimale doivent être précisées. En effet, il apparaît que le bacopa est dénué d'effets en administration sur une courte durée [9] et c'est en général à partir de la 4^e semaine de traitement que les résultats deviennent significatifs. Surtout, c'est lors d'une utilisation sur des durées plus longues (12 semaines en général) que les meilleurs résultats ont été obtenus [329, 333, 334, 340]. D'autre part, les effets facilitateurs cognitifs que l'on pouvait espérer chez l'homme suite aux résultats prometteurs des études précliniques animales sont peut-être plus mitigés en réalité.

L'amélioration cognitive concerne les processus d'apprentissage et de mémorisation, notamment l'apprentissage verbal, la mémoire épisodique, l'acquisition et la rétention d'informations visuelles [330, 333, 339, 341]. Le niveau d'attention apparaît également plus élevé [342]. Néanmoins, les processus cognitifs semblent être d'autant plus améliorés qu'il y a un déficit initial avéré, comme en témoignent les essais réalisés avec les enfants ayant un retard mental [341] et ceux souffrant de TDAH (trouble de déficit de l'attention/hyperactivité) [340], ou encore chez les adultes ayant un déclin cognitif lié au vieillissement [342-344] ; ce sont les populations chez qui les bénéfices apportés par le traitement ont été les plus visibles. Le bacopa serait ainsi plus efficace dans la restauration des capacités mentales déficitaires que dans l'amélioration des capacités mentales « normales ». Les essais cliniques ont suggéré que les bénéfices du traitement subsisteraient jusqu'à 4 semaines après l'arrêt du traitement. Enfin, une diminution du niveau dépressif et de l'état d'anxiété est généralement constatée [329, 330, 343], supportant ainsi les propriétés tranquillisantes du bacopa observées chez l'animal.

En conclusion, les essais cliniques ont montré une bonne tolérance et une relative efficacité nootrope du bacopa chez l'homme. Il pourra être conseillé en toute sécurité, dans le respect des conditions normales d'emploi, dans la prise en charge des troubles cognitifs bénins apparaissant entre autres lors du vieillissement normal, mais aussi en situation de fragilité particulière tel un état d'anxiété, un stress chronique, un surmenage physique et/ou intellectuel. Une cure initiale de 3 mois apparaît souhaitable.

Les compléments alimentaires généralement proposés dans les troubles bénins de la mémoire contiennent [209] :

- des plantes comme le *Ginkgo biloba* qui semble favoriser la circulation cérébrale ;
- des acides gras essentiels du type oméga-3 dont l'acide docosahexaénoïque (DHA), que l'on retrouve dans les poissons gras et qui sont importants pour le développement et le fonctionnement du système nerveux central ;
- des phospholipides comme la phosphatidylsérine ;
- ou encore, de la vitamine B12 (cobalamine).

A présent, le bacopa trouvera certainement une place légitime aux côtés de ces divers composés !

Il est également conseillé d'adopter quelques règles hygiéno-diététiques simples [243] comme d'avoir une alimentation équilibrée (fruits et légumes frais, poissons gras, huiles végétales variées, fruits oléagineux), stimuler sa mémoire au quotidien pour l'entretenir, ne pas s'isoler et se replier sur soi mais au contraire privilégier les contacts sociaux, dormir suffisamment, etc.

III. Sécurité d'emploi

III.1. Effets indésirables

D'après les investigations précliniques animales et cliniques humaines, les effets indésirables liés à une administration de *Bacopa monnieri* sont rares et la tolérance générale est bonne, y compris chez les enfants et les personnes âgées. Le rapport bénéfice/risque semble donc, dans l'état actuel des connaissances scientifiques, tout à fait favorable.

Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés concernent la sphère digestive. Ce sont des troubles gastro-intestinaux d'intensité modérée, transitoires et de rémission spontanée [325, 333, 341, 343, 344] :

- Douleurs et crampes abdominales ;
- Nausées et vomissements ;
- Diarrhées.

Plus rarement, il peut apparaître une somnolence (à fortes doses), une sécheresse buccale avec soif excessive, une fatigue musculaire et un syndrome pseudo-grippal.

En cas de surdosage, la possibilité d'une dépression centrale ne peut être exclue.

Des réactions allergiques (ou d'hypersensibilité) peuvent théoriquement apparaître. Il est fait état dans la littérature d'un cas de rash maculopapuleux développé en région péri-anale après une prise chronique de 8 semaines ; aucune précision quant à l'étiologie précise de cette manifestation cutanée n'a pu être retrouvée. Il pourrait s'agir d'une réaction d'hypersensibilité retardée [342].

III.2. Contre-indications

Aucune contre-indication n'est à signaler aux doses thérapeutiques habituelles, sauf chez :

- Les personnes ayant un antécédent connu de réaction d'hypersensibilité associée au bacopa
- La femme enceinte et allaitante : en l'absence d'études, l'utilisation du bacopa est par précaution formellement contre-indiquée (cf. page 287) ;
- Les nourrissons : également par précaution, l'innocuité du bacopa n'étant pas établie, nous ne pouvons qu'en interdire l'usage dans la tranche d'âge 0-30 mois ;

D'autre part, il convient de rappeler que les formes orales solides sont contre-indiquées avant 6 ans (risque de fausse route).

Cela ne constitue pas une contre-indication *stricto sensu* mais l'utilisation du bacopa n'est pas souhaitable lorsqu'un couple désire concevoir en raison de son potentiel « anti-fertile » chez l'homme (suppression de la spermatogenèse et de la fertilité chez la souris mâle [323]), d'autant plus si une stérilité conjugale est présente.

III.3. Interactions médicamenteuses

Certes, aucune interaction médicamenteuse n'est réellement connue pour l'instant, mais un certain nombre de précautions doivent être émises :

- Avec les médicaments dépresseurs du système nerveux central : potentialisation potentielle de leur effet sédatif [167, 170] ;
- Avec les médicaments métabolisés par les enzymes du cytochrome P450 : le bacopa est un inducteur enzymatique potentiel [261] et pourrait ainsi augmenter la métabolisation de médicaments pris conjointement et donc diminuer leur demi-vie. Ce risque est à prendre en compte particulièrement pour les médicaments à marge thérapeutique étroite ;
- Avec les hormones thyroïdiennes et les antithyroïdiens de synthèse : déséquilibre possible de l'état d'euthyroïdie avec risque de passage en hyperthyroïdie [316] ;
- Avec les inhibiteurs calciques : effet additif potentiel en raison d'une activité antagoniste calcique supposée du bacopa [293, 294] ;

- Avec les médicaments de l'hémostase : possibilité de déséquilibre du traitement avec risque d'accidents graves en raison d'une activité fibrinolytique potentielle du bacopa [296].
- Avec les médicaments radiopharmaceutiques : De *et al.* ont montré qu'un extrait alcoolique de bacopa administré chez la souris pouvait modifier la biodistribution dans l'organisme de deux médicaments radiopharmaceutiques contenant du technétium-99m ($^{99m}\text{Tc-ECD}$ et $^{99m}\text{Tc-CDM}$). Le comptage de la radioactivité au sein de différents organes et tissus (cœur, poumons, reins, foie, rate, intestin, urines...) a en effet révélé que la capture des radiotraceurs avait été significativement affectée (augmentation ou diminution en fonction de l'organe étudié) [346]. Cette même équipe a également constaté *in vitro* une réduction de la fixation du Tc-99m au niveau des globules rouges et des protéines plasmatiques en présence de bacopa [347]. En médecine nucléaire, la prise en compte d'une telle perturbation représente une information clinique primordiale afin d'obtenir le diagnostic correct et la meilleure décision thérapeutique. Aussi, il apparaît souhaitable que le patient avertisse au préalable son médecin s'il prend du bacopa.

L'utilisation concomitante de la phytothérapie et de la pharmacothérapie conventionnelle (allopathie) est très répandue. Pourtant, les médicaments à base de plantes sont des mélanges de plus d'un ingrédient actif et la multitude de composés pharmacologiquement actifs augmente la probabilité d'interactions. En conséquence, la probabilité d'interactions plante-médicament est théoriquement plus élevée que celle de deux médicaments entre eux (les drogues synthétiques contiennent généralement des entités chimiques uniques). Justement, de nombreuses interactions entre les plantes médicinales et les médicaments conventionnels ont été rapportées et documentées, et certaines peuvent avoir des conséquences cliniques graves [348]. Toutefois, la compréhension des mécanismes impliqués est souvent incomplète et nous ne pouvons qu'encourager la communauté scientifique à continuer leurs investigations, bien-sûr concernant le bacopa, mais pas seulement.

Donc, devant le risque potentiel pour les patients, il est primordial lors de la délivrance de toujours considérer la possibilité d'interactions bacopa-médicaments allopathiques.

III.4. Recommandations posologiques

Traditionnellement, les feuilles et les tiges fraîches de bacopa étaient pressées pour en obtenir un jus, ou séchées et réduites en poudre. Le jus frais et la poudre de bacopa servaient également de base, souvent en association avec d'autres ingrédients, pour la réalisation d'infusions, décoctions, sirops, pâtes, etc. Le goût amer était masqué par un fort ajout de sucre [77].

Les posologies journalières adultes recommandées par les tradipraticiens sont les suivantes : 5 à 10 g de poudre non titrée, 8 à 16 ml d'infusion, 30 ml de sirop et 5 à 12 ml d'extrait fluide [5, 18, 336, 337]. Les doses sont généralement réduites de moitié pour les enfants.

Actuellement, les formes commercialisées utilisent des poudres et extraits titrés, les teneurs en bacosides A et B étant le plus souvent comprises entre 20 % et 55 %. Pour un extrait titré à 20 % de bacosides, la posologie moyenne est de 200 à 400 mg/j chez l'adulte et de 100 à 200 mg/j chez l'enfant, en 2 à 3 prises [336].

En France, le bacopa est disponible en pharmacie (et dans d'autres circuits de distribution) dans la gamme Arkogélules du laboratoire pharmaceutique Arkopharma® (ACL 4660236). Ce complément alimentaire se présente sous la forme de gélules dont la composition unitaire est la suivante (sachant que m = 396 mg pour 1 gélule) :

- 215 mg (54,3 %) de poudre de *Bacopa monnieri* obtenue par cryobroyage ;
- 75 mg (18,9 %) d'extrait de *Bacopa monnieri* titré à 20 % minimum en bacosides ;
- Des stabilisants : mono et diglycérides d'acides gras (provenant du soja) ;
- Le tout dans une enveloppe d'origine végétale composée d'hydroxypropylméthyl-cellulose (HPMC).



Figure 113: visuel des Arkogélules® de *Bacopa monnieri* (arkopharma.fr).

Le fabricant indique ce produit pour augmenter la concentration, favoriser les capacités d'apprentissage et de mémorisation, et aider à se relaxer. La posologie est de 2 gélules matin et soir à prendre au moment des repas avec un grand verre d'eau.

Ces indications, de même que celles des fabricants ou des distributeurs d'autres formulations à base de bacopa disponibles sur internet (seul ou associé à d'autres plantes comme du *Ginkgo biloba* ou à des vitamines), sont en accord avec les revendications de certaines publications internationales et les indications reconnues dans l'Inde actuelle, à savoir tout ce qui se rapporte aux fonctions cognitives (mémoire, concentration, capacités intellectuelles, vigilance, etc.), à l'anxiété et à la lutte contre le vieillissement, que ce soit chez l'enfant, l'adulte ou la personne âgée. Le bacopa serait par exemple la plante idéale pour les étudiants en période d'examens ou pour toute personne en activité cérébrale soutenue. Néanmoins, gardons à l'esprit que les conclusions des études cliniques peu nombreuses n'ont pas toujours été très concluantes et que les résultats prometteurs des expérimentations précliniques demandent à être confirmés par des études complémentaires. Un intérêt industriel n'est jamais loin !

III.5. Aspects réglementaires

III.5.1. Les plantes médicinales

Les médicaments et les compléments alimentaires à base de plantes font l'objet d'une réglementation européenne spécifique, transposée en droit national dans tous les états membres.

Depuis 1941 et jusqu'en 2008, les plantes dites médicinales étaient soumises au monopole de vente par les pharmaciens et rassemblaient toutes les plantes inscrites à la Pharmacopée française, à l'exception de 34 plantes qui ont été libérées de ce monopole en 1979. Mais, devant le fait que certaines plantes de la Pharmacopée sont d'un usage commun alimentaire, mais aussi dans un souci d'harmonisation des législations des états membres, la directive européenne « compléments alimentaires » de juillet 2002 a permis de reconnaître le statut alimentaire des plantes considérées. En France, il faudra attendre le décret du 20 mars 2006 (transcription française de la directive européenne de 2002 ; directive 2002/46CE) pour que les compléments alimentaires soient réellement réglementés (composition, étiquetage, qualité et sécurité) et que ceux-ci soient définis d'une façon claire et précise : « denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité ». Les « nutriments » correspondent aux vitamines et minéraux et sont soumis à une liste positive (dont l'emploi est autorisé) régulièrement mise à jour. Les « autres substances » sont notamment les plantes et préparations à base de plantes et il a été choisi d'établir des listes de substance interdites ou limitées d'emploi (risque démontré pour la santé publique), liste dont ne fait pas partie le *Bacopa monnieri*. Le décret français « compléments alimentaires » de 2006 a permis d'adopter des règles nationales strictes concernant les plantes et produits à base de plantes et autres substances.

Et c'est en 2008 que deux décrets apportent une réelle ouverture réglementaire concernant les plantes médicinales (décrets du 22 août n° 2008-839 et n° 2008-841, et publiés au JO du 26

août 2008). Le premier institue la sortie du monopole de vente pharmaceutique des compléments alimentaires comportant des plantes inscrites à la Pharmacopée française, le second officialise la sortie du monopole de vente pharmaceutique de 148 plantes inscrites à la Pharmacopée française et qui pourront donc être utilisées « librement » dans les compléments alimentaires. Les plantes non libérées, sauf dans le cas d'un médicament disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), continuent à répondre à l'usage en l'état sous forme de vrac, de tisane ou de décoction [349]. Pour rappel, selon le Code de la Santé Publique, les plantes médicinales relevant du monopole des pharmaciens ne peuvent être distribuées que par un établissement pharmaceutique de distribution en gros de plantes médicinales autorisé par l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) et cette distribution ne peut s'adresser qu'à des pharmaciens. Récemment, une société située à Chemillé a été condamnée pour des infractions à ces règles et interdite de distribution des plantes médicinales non libérées jusqu'à l'ouverture d'un établissement pharmaceutique dûment autorisé par l'Afssaps (décision du directeur de l'Afssaps du 25 janvier 2011, publiée au JORF le 6 mars 2011).

Concernant les médicaments à bases de plantes, la directive européenne 2004/24/CE du 31 mars 2004 (dite THMPD, *Traditional Herbal Medicinal Products Directive*), adoptée par l'Assemblée nationale en avril 2007 et entrée en vigueur le 30 avril 2011, prévoit une procédure simplifiée d'enregistrement des médicaments traditionnels à base de plantes. Ce « régime simplifié » permet à ces médicaments de sauter l'étape des essais cliniques. La principale condition est que le phytomédicament ait un usage antérieur de plus de 30 ans dont 15 ans minimum dans l'Union européenne. Les références sur le marché devaient faire une demande d'enregistrement ou d'actualisation d'AMM au plus tard le 30 avril 2011. Légiférer sur les médicaments à base de plantes donne des garanties en termes de contrôle des matières premières, de procédé de fabrication, de teneur en métaux lourds... et mettra à terme de l'ordre dans la « jungle » des centaines de produits en circulation qui n'ont pas à être assimilés à des médicaments. Or, depuis la libération des quelques 148 plantes médicinales, nombre de compléments alimentaires n'ont pas respectés le cadre réglementaire du décret « compléments alimentaires » et ont été requalifiés en médicaments par la Justice, à l'image des arrêts prononcés par les Cours d'appel de Lyon et d'Orléans en février 2010 ayant abouti à la requalification en médicaments de 3 compléments alimentaires. Les juges ont estimé que ces produits constituaient bien des médicaments par présentation et qu'ils revendiquaient des

allégations thérapeutiques. La commission des affaires sociales de l'Assemblée nationale a estimé que sur les 600 médicaments concernés, seuls 200 resteront sur le marché.

Le bacopa possède un historique d'utilisation certes très ancien, dont peu de plantes peuvent se prévaloir, mais il n'a été introduit en Europe que tout récemment et n'entre donc pas dans le cadre réglementaire de cette procédure communautaire simplifiée d'enregistrement des médicaments traditionnels de phytothérapie. En revanche, un médicament de phytothérapie à base de bacopa pourrait en théorie être commercialisé si une demande « standard » d'AMM était effectuée. Mais, la procédure est très lourde et onéreuse, et les parts de marché que représentent les ventes de bacopa ne permettent certainement pas d'envisager l'amortissement d'une telle demande. Aussi, à moins d'une procédure de reconnaissance des produits de la Pharmacopée indienne et d'un travail de coopération avec les autorités locales, il est peu probable qu'un phytomédicament contenant du bacopa voit le jour dans un avenir proche.

Conformément au règlement européen sur les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires, un travail d'harmonisation des allégations s'est engagé. Deux types d'allégations sont autorisés pour les denrées alimentaires dont font partie les compléments alimentaires :

- Les allégations fonctionnelles génériques qui portent sur le rôle des nutriments et autres substances sur le développement et les fonctions de l'organisme, la croissance, les fonctions psychologiques et comportementales, l'amaigrissement et le contrôle du poids, l'augmentation de la sensation de satiété ou la réduction de la valeur énergétique du régime alimentaire ;
- Les allégations relatives à la réduction d'un risque de maladie et qui nécessitent une autorisation préalable rassemblant les preuves scientifiques de l'allégation considérée.

Concernant la première famille d'allégations, un énorme travail a été entrepris depuis 2008 par les 27 états membres afin d'établir une liste commune de plus de 44 000 allégations à évaluer. Après un travail de consolidation, la Commission européenne a présenté fin 2008 une liste comportant environ 4 700 allégations à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, *European Food Safety Authority* ; liste divisée en 4 lots et disponible sur le site de l'agence : efsa.europa.eu/fr/). Le groupe NDA (*Nutrition, Dietetic and Allergy*) de l'EFSA a ensuite débuté les évaluations et publie régulièrement depuis octobre 2009 des séries de résultats (positifs ou négatifs) relatifs à l'évaluation des allégations de santé fonctionnelles génériques. Le *Bacopa monnieri* fait partie du 4^e lot de la liste consolidée avec l'allégation de

santé ID 3986 : « Memory enhancer » (amélioration de la mémoire). Au moment de la rédaction de ce présent travail, l'avis scientifique concernant le bacopa n'a pas encore été publié (dernière requête effectuée le 30/05/2011 sur la base de données mise à jour en avril 2011). Fait intéressant, peu d'avis favorables sont prononcés sur la base des 6 critères d'évaluation que le groupe d'experts a convenu d'appliquer pour garantir un examen approfondi et normalisé de toutes les allégations de santé.

III.5.2. La nutriviigilance

Devant la forte augmentation de la consommation de compléments alimentaires dans la population française et devant le fait que cette consommation peut induire des effets indésirables (réaction nocive se produisant dans les conditions normales d'emploi, ou résultant d'un mésusage), un dispositif national de vigilance sur les compléments alimentaires a été mis en place en septembre 2009 par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses, ex-Afssa), dans le cadre de la loi HPST (loi Hôpital, Patients, Santé et Territoires) de juillet 2009. En fait, il s'agissait là d'une phase pilote d'un système plus large de nutriviigilance. Ce dispositif s'est élargi courant 2010 à toutes les denrées alimentaires (nouveaux aliments et ingrédients, aliments et boissons enrichis, compléments alimentaires, denrées destinées à une alimentation particulière). Schématiquement, la nutriviigilance est aux denrées alimentaires ce que la pharmacovigilance est aux médicaments, c'est-à-dire un dispositif de veille sanitaire où les professionnels de santé ont un devoir de déclaration de tout effet indésirable pour la santé humaine possiblement lié à la consommation d'une denrée alimentaire. Toute autre personne souhaitant faire une déclaration à titre individuel doit prendre contact avec un professionnel de santé. La déclaration peut se faire directement sur le site internet de l'Anses *via* le formulaire mis en ligne (anses.fr) ou en téléchargeant la fiche de déclaration et en la renvoyant complétée à l'Anses par mail, fax ou voie postale. La déclaration préserve bien évidemment l'anonymat du consommateur. Les signalements sont ensuite enregistrés par l'Anses et analysés par sa cellule de nutriviigilance avec l'appui d'autres agences (Afssaps, InVS, CAPTV, AFLD...). En France, nous disposons de peu de recul en ce qui concerne la surveillance post-commercialisation et les effets indésirables potentiels liés à la consommation de compléments alimentaires contenant du bacopa. Aussi, un tel dispositif de

veille sanitaire permettra d'encore mieux assurer la sécurité des consommateurs de cette plante.

Conclusion

Le *Bacopa monnieri* L. possède une longue tradition d'utilisation dans la médecine ayurvédique en tant que fortifiant cérébral destiné à augmenter la mémoire et la concentration et à lutter contre divers troubles centraux. Aussi, il acquit la réputation de promouvoir une longue vie saine et de lutter contre les effets du vieillissement. Victime de son succès et de l'enthousiasme mondial grandissant pour les phytomédicaments ayurvédiques, des techniques de domestication du bacopa ont été élaborées afin de pouvoir faire face à la demande croissante et éviter l'épuisement de la ressource naturelle.

L'évaluation de ses propriétés biologiques montre qu'il est doué de propriétés antioxydantes et qu'il peut s'opposer aux dommages oxydatifs cellulaires générés par le stress oxydant, avec une efficacité comparable à celle d'antioxydants conventionnels telles les vitamines C et E. Il manifeste également, à posologie suffisante, des effets facilitateurs cognitifs chez l'animal comme chez l'homme, essentiellement sur les processus d'apprentissage et de mémorisation. D'autre part, il pourrait moduler positivement les grands systèmes de neurotransmission endogènes et s'opposer à la dégénérescence neuronale, faisant de cette plante une drogue-candidate potentielle dans nombre de pathologies neuropsychiatriques, notamment neurodégénératives. En conséquence, le potentiel « anti-vieillesse » du bacopa s'expliquerait d'une part, par sa capacité à améliorer le statut antioxydant global et à réduire la composante oxydative de certaines maladies et d'autre part, en raison de son action nootrope. Il faut cependant rester prudent quant aux conclusions quelque peu optimistes de certaines études. Certes des résultats préliminaires sont prometteurs mais ils doivent être confirmés par des études supplémentaires. La mise en œuvre d'essais cliniques apparaît également nécessaire afin de mieux évaluer la pertinence thérapeutique du bacopa chez l'homme.

Le bacoside A, mélange de saponosides triterpéniques, semble supporter la majorité de l'activité biologique du bacopa et il est donc conseillé d'utiliser des extraits titrés afin de garantir la teneur en composés actifs et donc un bénéfice thérapeutique. La bonne tolérance générale et l'absence de toxicité particulière, en l'état actuel des connaissances et dans le respect des précautions d'emploi, permettent de sécuriser la consommation humaine de bacopa. Néanmoins, nous disposons d'un faible recul quant à son utilisation en Europe. Le système français de nutrivigilance permettra certainement d'encore mieux assurer la sécurité des consommateurs de compléments alimentaires à base de bacopa.

Dans le cadre d'une supplémentation antioxydante ou de la prise en charge de troubles cognitifs modérés, le *Bacopa monnieri* se révèle être une alternative intéressante aux compléments alimentaires plus généralement dispensés à l'officine.

Glossaire

[Définitions extraites de 54, 61].

Alterne : s'agissant des feuilles, chacune s'insère isolément à chaque nœud.

Androcée : organe mâle ou ensemble des étamines, qui se situe dans la fleur entre les pétales et le gynécée.

Anthère : partie terminale d'une étamine renfermant les grains de pollen.

Axillaire : qualifie un bourgeon ou une fleur situé à l'aisselle du pétiole d'une feuille ou d'un rameau.

Bilabié : se dit d'une fleur dont le calice ou la corolle ont leurs pièces soudées et forment deux lèvres, l'une au-dessus de l'autre.

Calice : ensemble des sépales, constituant l'enveloppe protectrice la plus externe de la fleur.

Capsule : fruit sec déhiscent provenant d'un ovaire à plusieurs carpelles soudés entre eux.

Carpelle : unité de base d'un gynécée d'Angiosperme, différencié en stigmate, style et ovaire.

Corolle : ensemble des pétales, situé entre le calice et l'androcée.

Cuticule : revêtement externe de la paroi des cellules de l'épiderme de la tige et des feuilles, constituée par une couche de cutine.

Décussée : se dit des feuilles opposées dont les paires successives forment entre elles un angle droit.

Didyname : se dit d'un androcée réduit à 4 étamines dont 2 plus grandes que les 2 autres.

Dormance : inaptitude à la germination.

Étamine : organe mâle d'une fleur, porté par le réceptacle floral et placé entre la corolle et le pistil. Une étamine est formée d'un filet et d'anthères.

Filet : partie inférieure effilée de l'étamine.

Gynécée : organe femelle ou ensemble des carpelles, situé au centre d'une fleur ; comprend l'ovaire, le style et le stigmate.

Grappe : inflorescence constituée d'un ensemble de fleurs porté par un pédoncule et des pédicelles sensiblement de même longueur et fixés eux-mêmes à des niveaux distincts sur un axe commun.

Hermaphrodite : espèce végétale dont chaque fleur possède à la fois étamines et carpelles fonctionnels.

Hypogyne : se dit d'une fleur dont les pièces florales sont insérées au-dessous de l'ovaire qui est dit supère.

Infère : qualifie un ovaire situé au-dessous du niveau d'insertion des autres pièces florales.

Inflorescence : regroupement de fleurs en un ensemble morphologiquement bien individualisé.

Lancéolé : se dit d'une feuille en forme de lance.

Loculicide : mode d'ouverture des capsules par des fentes se situant au milieu de chaque carpelle.

Loge : cavité d'une anthère, d'un fruit ou d'un gynécée, délimitée par des cloisons.

Nœuds : lieu d'insertion des feuilles sur la tige. L'espace de tige entre deux nœuds consécutifs est appelé entre-nœud.

Obovale : se dit d'une feuille ayant une forme à l'extrémité supérieure plus large que la base.

Ombelle : inflorescence chez laquelle les pédoncules floraux, tous de même taille sont insérés au même niveau, les fleurs se trouvant disposées dans un même plan.

Opposé : se dit de deux feuilles insérées l'une en face de l'autre au niveau d'un même nœud.

Ovaire : partie basale, creuse et renflée du gynécée correspondant à un ou plusieurs carpelles et renfermant un ou plusieurs ovules. Après fécondation et maturation, les ovules se transforment en graines et l'ovaire en fruit.

Pédoncule : axe portant des fleurs ou des fruits.

Penninervé : se dit d'une feuille ayant une nervure principale et des nervures secondaires de chaque côté.

Périanthe : ensemble des enveloppes florales : calice et corolle.

Pétale : élément interne du périanthe, de couleurs et de formes variées, dont l'ensemble constitue la corolle.

Placentation : mode d'insertion des ovules sur la paroi de l'ovaire. Dans la placentation axile les ovules sont fixés au centre d'un ovaire formé de plusieurs loges.

Poricide : mode de déhiscence qui se traduit par l'apparition de pores au sommet de certaines anthères.

Rampante : se dit d'une tige complètement couchée sur le sol mais non enracinée au niveau de ses nœuds.

Schizocarpe : fruit sec indéhiscent provenant d'un ovaire à plusieurs carpelles soudés dont les loges se transforment en akènes.

Sépale : élément constitutif de la fleur situé à l'extérieur de la corolle et dont l'ensemble forme le calice.

Septicide : mode d'ouverture d'une capsule par des fentes se situant au niveau de la soudure des carpelles.

Sessile : se dit de tout organe dépourvu de pédoncule, pédicelle ou pétiole et s'insérant directement sur l'axe principal.

Stigmate : extrémité du style du gynécée adaptée à la réception des grains de pollen.

Stipule : appendice se trouvant de part et d'autre du point d'insertion d'une feuille sur la tige.

Style : partie effilée du gynécée prolongeant l'ovaire et à l'extrémité duquel est situé le stigmate.

Supère : qualifie un ovaire dont l'insertion est située au-dessus de la base des autres pièces florales.

Vivace : qualifie un végétal dont le développement peut s'étendre sur plusieurs années.

Zygomorphe : se dit d'une fleur irrégulière à symétrie bilatérale.

Bibliographie

1. FILLIOZAT J. La Doctrine Classique de la Médecine Indienne : ses origines et ses parallèles grecs. Imprimerie nationale Paris 1949 : chapitre 1.
2. JOSHI H., PARLE M. Brahmi rasayana improves learning and memory in mice. Evidence-based complementary and alternative medicine 2006 ; 3(1) : 79-85.
3. CORNILLLOT P. Encyclopédie des Médecines Naturelles. Phytothérapie-Aromathérapie. Paris : édition techniques 1991-1992.
4. SIGALEA R. La Médecine traditionnelle de l'Inde. Olizane 1995.
5. KAPOOR L.D. Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. Herbal Reference Library. 2001.
6. SINGH R.H., NARSIMHAMURTHY K., SINGH G. Neuronutrient impact of Ayurvedic rasayana therapy in brain aging. Biogerontology 2008 ; 9 : 369-374.
7. MAZARS G. Les phytomédicaments ayurvédiques. Phytothérapie 2003 ; 6 : 162-168.
8. STORK H. Classification des maladies mentales dans l'Ayurveda, aspects thérapeutiques et préventifs. Scientia orientalis 1977 ; 6 : 1-7.
9. PAPIN J. Traité fondamental de la médecine ayurvédique. Les thérapeutiques. Caraka Samhita. Paris Almora 2009.
10. SHANMUGASUNDARAME E.R.B., MOHAMMED AKBAR G.K., RADHA SHANMUGASUNDARAM K. Brahmighritham, an ayurvedic herbal formula for the control of epilepsy. Journal of Ethnopharmacology 1991 ; 33 : 269-276.
11. TIWARI B.G., UPADHYAY B.N. Concept of aging in Ayurveda. Indian Journal of Traditional Knowledge 2009 ; 8(3) : 396-399.
12. GOVINDARAJAN R., VIJAYAKUMAR M., PUSHANGADAN P. Antioxydant approach to disease management and the role of "Rasayana" herbs of Ayurveda. Journal of Ethnopharmacology 2005 ; 99 : 165-178.
13. ROSU A. Considérations sur une technique du rasayana ayurvédique. Indo-Iranian Journal 1975 ; 17 : 1-29.
14. SAIRAM K., DORABABU M., GOEL R.K., BHATTACHARYA S.K. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. Phytomedicine 2002 ; 9 : 207-211.
15. MACIUK A., BOUCHET M.J., MAZARS G., UM B.H., ANTON R. Nootropic (medhya) plants from ayurvedic pharmacopoeia. Des sources du savoir aux médicaments du futur. Paris IRD Editions 2002 : 401-411.

16. Government of India, Ministry of health and family welfare department of Ayush. The ayurvedic pharmacopoeia of India. First edition 1999.
17. KUMAR V. Potential medicinal plants for CNS disorders : an overview. *Phytotherapy research* 2006 ; 20 : 1023-1035.
18. KHARE C.P. Indian herbal remedies : rational western therapy, ayurvedic and other traditional usage, botany. Springer 2004.
19. MARTIS G., RAO A., KARANTH K.K. Neuropharmacological activity of *Herpestis monniera*. *Fitoterapia* 1992 ; 63(5) : 399-404.
20. ALLAN J.J., DAMODARAN A., DESHMUKH N.S., GOUDAR K.S., AMIT A. Safety evaluation of a standardized phytochemical composition extracted from *Bacopa monnieri* in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 2007 ; 45 : 1928-1937.
21. PENG L., ZHOU Y., KONG D.Y., ZHANG W.D. Antitumor activities of dammarane triterpene saponins from *Bacopa monniera*. *Phytotherapy Research* 2010 ; 24(6) : 864-868.
22. SINGH H.K., DHAWAN B.N. Effect of *Bacopa Monniera* Linn. (*Brahmi*) extract on avoidance responses in rat. *Journal of Ethnopharmacology* 1982 ; 5 : 205-214.
23. CHANNA S, DAR A, ANJUM S, YAQOOB M, SULTANI Z, RAHMAN A. Anti-inflammatory activity of *Bacopa monniera* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 2006 ; 104 : 286-289
24. VIJI V., KAVITHA S.K., HELEN A. *Bacopa monniera* (L.) Wettst inhibits type II collagen-induced arthritis in rats. *Phytotherapy research* 2010 ; 24(9) : 1377-1383.
25. ROUILLARD G., GUEHO J. Les plantes et leur histoire à l'île Maurice. M.S.M Port Louis 2000.
26. GRENAND P., MORETTI C., JACQUEMIN H. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Paris IRD 2004 : 617.
27. POTHIER J. Le bacopa ou hysope d'eau : une plante adaptogène issue de la médecine ayurvédique. *La phytothérapie européenne* 2009 ; 53 : 17-19.
28. ACHLIYA G., WADODKAR S., DORLE A. Evaluation of sedative and anticonvulsant activities of *Unmadnashak Ghrita*. *Journal of Ethnopharmacology* 2004 ; 94 : 77-83.
29. ACHLIYA G., WADODKAR S., DORLE A. Evaluation of CNS activity of *Brahmi Ghrita*. *Indian journal of pharmacology* 2005 ; 37(1) : 33-36.
30. ACHLIYA G., BARABDE U., WADODKAR S., DORLE A. Effect of *Brahmi Ghrita*, an polyherbal formulation on learning and memory paradigms in experimental animals. *Indian journal of pharmacology* 2004 ; 36(3) : 159-162.
31. SHUKIA B., KHANNA N.K., GODHWANI J.L. Effect of *Brahmi Rasayan* on the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology* 1987 ; 21 : 65-74.
32. PRASAD R., BAGDE U.S., PUSPANGADAN P., VARMA A. *Bacopa monnieri* L.: pharmacological aspects and case study involving *Piriformospora indica*. *International Journal of Integrative Biology* 2008 ; 3(2) : 100-110.

33. SHAH J.S., GOYAL R.K. Usage trends for memory and vitality-enhancing medicines: a pharmacoepidemiological study involving pharmacists of the Gujarat region. *International Journal of Ayurveda Research* 2010 ; 1(3) : 138-143.
34. WHO , 'WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005', Geneva, WHO, 2002.
35. DESAI S., KORGAONKAR D., GADRE P., GHOGARE A. Effect of bacopamine, a polyherbal formulation on learning and memory. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2009 ; 3(1) : 31-36.
36. BHATTACHARYA S.K., KUMAR A., JAISWAL A.K. Effect of Mentat[®], a herbal formulation, on experimental models of Alzheimer's disease and central cholinergic markers in rats. *Fitoterapia* 1995 ; 66(3) : 216-222.
37. JAGETIA G.C., RAO S.K., BALIGA M.S., BABU K. The evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain herbal formulations *in vitro* : a preliminary study. *Phytotherapy Research* 2004 ; 18(7) : 561-565.
38. VINEKAR A.S., ANDRADE C., SRIPRADA V.T, GEORGE J., JOSEPH T., CHANDRA J.S. Attenuation of ECS-induced retrograde amnesia by using an herbal formulation. *The Journal of ECT* 1998 ; 14(2) : 83-88.
39. FARUQI S., ANDRADE C., RAMTEKE S., JOSEPH J, VENKATARAMAN B.V., RANI M.A. Herbal pharmacotherapy for the attenuation of electroconvulsive shock-induced anterograde and retrograde amnesic deficits. *Convulsive Therapy* 1995 ; 11(4) : 241-247.
40. JOSEPH J, VENKATARAMAN B.V., RANI M.A., ANDRADE C. BR-16A protects against ECS-induced anterograde amnesia. *Biological Psychiatry* 1994 ; 1(36) : 478-481.
41. KULKARNI S.K., SHARMA A. Reversal of diazepam withdrawal induced hyperactivity in mice by BR 16-A (Mentat[®]), a herbal preparation. *Indian Journal Experimental of Biology* 1994 ; 32(12) : 886-888.
42. BHATTACHARYA S.K. Behavioural studies on BR-16A (Mentat[®]), a herbal psychotropic formulation. *Indian Journal Experimental of Biology* 1994 ; 32(1) : 37-43.
43. KUMAR A., KULKARNI S.K. Protective effect of BR-16A, a polyherbal preparation against social isolation stress : possible GABAergic mechanism. *Phytotherapy Research* 2006 ; 20(7) : 538-541.
44. BHATTACHARYA S.K. Nootropic effect of BR-16A (Mentat[®]), a psychotropic herbal formulation, on cognitive deficits induced by prenatal undernutrition, postnatal environmental impoverishment and hypoxia in rats. *Indian Journal Experimental of Biology* 1994 ; 32(1) : 31-36.
45. VERMA A., KULKARNI S.K. Effect of a herbal psychotropic preparation, BR-16A (Mentat[®]), on performance of mice on elevated plus-maze. *Indian Journal Experimental of Biology* 1991 ; 29(12) : 1120-1123.
46. DAVE U.P., CHAUVAN V., DALVI J. Evaluation of BR-16A (Mentat[®]) in cognitive and behavioural dysfunction of mentally retarded children, a placebo-controlled study. *Indian Journal of Pediatric* 1993 ; 60(3) : 423-428.

47. LIU J., GU X., ROBBINS D., LI G., SHI G., McCORD J.M., ZHAO Y. Protandim, a fundamentally new antioxidant approach in chemoprevention using mouse two-stage skin carcinogenesis as a model. PLoS ONE 2009 ; 4(4) : 1-8.
48. NELSON S., BOSE S.K., GRUNWALD G.K., MYHILL P., McCORD J.M. The induction of human superoxide dismutase and catalase *in vivo* : a fundamentally new approach to antioxidant therapy. Free Radical Biology and Medicine 2006 ; 40 : 341-347.
49. VELMURUGAN K., ALAM J., McCORD J.M., PUGAZHENTHI S. Synergistic induction of heme oxygenase-1 by the components of the antioxidant supplement Protandim. Free Radical Biology and Medicine 2009 ; 46 : 430-440.
50. QURESHI M.M., McCLURE W.C., AREVALO N.L., RABON R.E., MOHR B., BOSE S.K., McCORD J.M., TSENG B.S. The dietary supplement Protandim decreases plasma osteopontin and improves markers of oxidative stress in muscular dystrophy mdx mice. Journal of Dietary supplement 2010 ; 7(2) : 159-178.
51. ROBBINS D., GU X., SHI R., LIU J., WANG F., PONVILLE J., McCORD J.M., ZHAO Y. The chemopreventive effects of Protandim : modulation of p53 mitochondrial translocation and apoptosis during skin carcinogenesis. PLoS One 2010 ; 5(7) : 119-122.
52. DUPONT F., GUIGNARD J.L. Botanique : systématique moléculaire. Masson 2007.
53. LABERCHE J.C. Biologie végétale. Dunod 2004.
54. MAROUF A., REYNAUD J. La botanique de A à Z. Dunod 2007.
55. SPICHER R., SAVOLAINEN V., FIGEAT M., JEANMONOD D. Botanique systématique des plantes à fleurs. Presses polytechniques et universitaires romandes 2002.
56. CRONQUIST A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press 1981.
57. The Angiosperm Phylogenetic Group. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. Annals of the Missouri Botanical Garden 1998 ; 85(4) : 531-553.
58. The Angiosperm Phylogenetic Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society 2003 ; 14 : 399-436.
59. CHASE M., REVEAL J. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 2009 ; 161 : 122-127.
60. The Angiosperm Phylogenetic Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society 2009 ; 161 : 106-121.
61. BOTINEAU M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier 2010.
62. JUDD, CAMPBELL, KELLOGG, STEVENS. Botanique systématique, une perspective phylogénétique. De Boeck Université 2002.
63. BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Lavoisier 2009.
64. AUDOUIN. Dictionnaire classique d'histoire naturelle. Tome 2. Rey et Gravier 1831.

65. PULLE A. An enumeration of the vascular plants known from Surinam, together with their distribution and synonymy. Leiden-E.J. Brill 1906 : 415.
66. SHU J. *Bacopa Aublet*. Flora of china 1998 ; 18 : 21-22.
67. DAROKAR M.P., KHANUJA S., SHASANY A., KUMAR S. Low levels of genetic diversity detected by RAPD analysis in geographically distinct accessions of *Bacopamonneri*. Genetic Resources and Crop Evolution 2001 ; 48 : 555-558.
68. SARMAH R.K. Hand book on medicinal and aromatic plants. Nedfi 2005.
69. National medicinal plants board. Department of Ayush, ministry of health and family welfare. Government of India, chandralok building. Agro-techniques of selected medicinal plants. TERI Press 2008.
70. ZEHL M., PITTENAUER E., JIROVETZ L., BANDHARI P., SINGH B., KAUL V.K., RIZZI A., ALLMAIER G. Multistage and tandem mass spectrometry of glycosylated triterpenoid saponins isolated from *Bacopa monnieri*: comparison of the information content provided by different techniques. Analytical Chemistry 2007 ; 79 : 8214-8221.
71. MATHEW J., PAUL J., NANDU M.S., PAULOSE C.S. *Bacopa monnieri* and bacoside A for ameliorating epilepsy associated behavioural deficits. Fitoterapia 2009.
72. KISHORE K, SINGH M. Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. Indian Journal of Experimental Biology 2005 ; 43 : 640-645.
73. MATHUR S., GUPTA M.M., KUMAR S. Expression of growth and bacoside A in response to seasonal variation in *Bacopa monnieri* accessions. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 2001 ; 22(4A), 23(1A) : 320-326.
74. GANJEWALA D., SRIVASTAVA A.K., LUTHRA R. Ontogenic and seasonal variation in accumulation of bacoside A in *Bacopa monnieri* (L.). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 2000 ; 22(4A), 23(1A) : 233-237.
75. DAROKAR M.P., KHANUJA S.P.S., GUPTA A.K., KUMAR S., GUPTA M.M., SINGH A.K., SHASANY A.K., RAJU B.V., MISHRA P.K. *et al.* "CIM-Jagriti" a variety of *Brahmi* (*Bacopa monnieri*) with high herbage and bacoside A yield potential. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 2007 ; 29 : 90-93.
76. PHILCOX D. Clarification of the name *Bacopa monnieri* (Scrophulariaceae). Kew Bull 1979 ; 33 : 679-680.
77. ROMBI M., ROBERT D., GUEDON D. 120 plantes médicinales. Alpen 2007 : 62-65.
78. PRASAD S. Pharmacognostical studies of *Brahmi* stem and leaf characteristics of *Herpestis monniera* H.B. and K. and *Hydrocotyle asiatica* Linn. Journal of the American Pharmaceutical Association 1947 ; 36(12) : 393-401.
79. TIWARI V., SINGH B.D., TIWARI K.N. Shoot regeneration and somatic embryogenesis from different explants of Brahmi [*Bacopa monniera* (L.) Wettst.]. Plant Cell Reports 1998; 17 : 538-543.

80. MATHUR S., SHARMA S., GUPTA M.M., KUMAR S. Evaluation of an Indian germplasm collection of the medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) Pennell by use of multivariate approaches. *Euphytica* 2003 ; 133 : 255-265.
81. SHRIVASTAVA N., RAJANI M. Multiple shoot regeneration and tissue culture studies on *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Plant Cell Reports* 1999 ; 18 : 919-923.
82. TIWARI V., TIWARI K.N., SINGH B. Comparative studies of cytokinins on *in vitro* propagation of *Bacopa monniera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2001 ; 66 : 9-16.
83. Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources. Catégories et Critères de l'UICN pour la Liste Rouge. 2001
84. TIWARI V., TIWARI K.N., SINGH B.D. Shoot bud regeneration from different explants of *Bacopa monniera* (L.) Wettst. by trimethoprim and bavistin. *Plant Cell Reports* 2006 ; 25 : 629-635.
85. BANERJEE M., SHRIVASTAVA S. An improved protocol for *in vitro* multiplication of *Bacopa monnieri* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008 ; 24 : 1355-1359.
86. SHIKHA S., NIDHI M., UPAMA M. *Bacopa monniera*, a future perspective. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2009 ; 1(3) : 154-157.
87. BOSE K.C., BOSE N.K. Observation on the action and uses of *Herpestis monnieri* (*Scrophulariaceae*). *Journal of the Indian Medical Association* 1931 ; 1: 60-64.
88. BASU N.K., PABBAI P.R. *Quart Journal Pharm Pharmacology* 1947 ; 20 : 135.
89. SASTRI M.S., DHALLA N.S., MALHOTRA C.L. Chemical investigation of *Herpestis monniera* Linn (*Brahmi*). *Indian Journal of Pharmacology* 1959 ; 21 : 303-304.
90. CHATTERJI N., RASTOGI R.P., DHAR M.L. Chemical examination of *Bacopamonniera* Wettst. Part I, isolation of chemical constituents. *Indian Journal of Chemistry* 1963 ; 1 : 212-215.
91. DATTA T., BASU U.P. Terpenoids : Part II, isolation of a new triterpene saponin, Monnierin, from *Bacopa monniera* Wettst. *Indian Journal of Chemistry* 1963 ; 1: 408-409.
92. CHATTERJI N., RASTOGI R.P., DHAR M.L. Chemical examination of *Bacopa monniera* Wettst. Part II : the constitution of bacoside A. *Indian Journal of Chemistry* 1965 ; 3 : 24-29.
93. BASU N., RASTOGI R.P., DHAR M.L. Chemical examination of *Bacopa monniera* Wettst. Part III : bacoside B. *Indian Journal of Chemistry* 1967 ; 5 : 84-86.
94. SCHULTE K.E., RUCKER G., EL-KERSCH. Nicotin und 3-formyl-4-hydroxy-2H-pyranus *Herpestis monniera*. *Phytochemistry* 1972 ; 11 : 2649-2651.
95. KAWAI K., IITAKA Y., SHIBATA S. The crystal and molecular structure of bacosinA₁ dibromoacetate. *Acta Crystallographica* 1973 ; 29 : 2947-2953.
96. KULSHRESHTHA D.K., RASTOGI R.P. BacosinA₁: a novel dammarane triterpene sapogenin from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1973 ; 12 : 887-892.

97. KULSHRESHTHA D.K., RASTOGI R.P. BacogeninA₂: a new sapogenin from bacosides. *Phytochemistry* 1974 ; 13 : 1205-1206.
98. KULSHRESHTHA D.K., RASTOGI R.P. Identification of ebelin lactone from bacoside A and the nature of its genuine sapogenin. *Phytochemistry* 1973 ; 12 : 2074-2076.
99. KAWAI K., AKIYAMA T., OGIHARA Y., SHIBATA S. A new sapogenin in the saponins of *Zizyphus jujuba*, *Hovenia dulcis* and *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1974 ; 13 : 2829-2832.
100. KAWAI K., IITAKA Y., SHIBATA S. Jujubogenin *p*-bromobenzoate. *Acta Crystallographica* 1974 ; 30 : 2886-2888.
101. CHANDEL R.S., KULSHRESHTHA D.K., RASTOGI R.P. Bacogenin-A₃: a new sapogenin from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1977 ; 16 : 141-143.
102. KAWAI K., SHIBATA S. Pseudojujubogenin, a new sapogenin from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1978 ; 17 : 287-289.
103. JAIN P., KULSHRESHTHA K. BacosideA₁, a minor saponin from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1993 ; 33(2) : 449-451.
104. RASTOGI S., PAL R., KULSHRESHTHA K. Bacoside A₃, a triterpenoid saponin from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1994 ; 36(1) : 133-137.
105. GARAI S., MAHATO S.B., OHTANI K., YAMASAKI K. Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1996 ; 42(3) : 815-820.
106. GARAI S., MAHATO S.B., OHTANI K., YAMASAKI K. Bacopasaponin D, a pseudojujubogenin glycoside from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 1996 ; 43(2) : 447-449.
107. VOHORA S.B., KHANNA T., ATHAR M., AHMAD B. Analgesic activity of bacosine, a new triterpene isolated from *Bacopa monnieri*. *Fitoterapia* 1997 ; 68(4) : 361-365.
108. RASTOGI S., KULSHRESHTHA K. Bacoside A₂, a triterpenoid saponin from *Bacopamonniera*. *Indian Journal of Chemistry* 1998 ; 38B : 353-356.
109. RENUKAPPA T., ROOS G., KLAIBER I., VOGLER B., KRAUS W. Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectrometry, mass spectrometry and bioassay for the determination of active saponins from *Bacopa monniera* Wettst. *Journal of Chromatography A* 1999 ; 847 : 109-116.
110. MAHATO S.B., GARAI S., CHAKRAVARTY A.K. Bacopasaponins E and F: two jujubogenin bisdesmosides from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 2000 ; 53 : 711-714.
111. CHAKRAVARTY A.K., SARKAR T., MASUDA K., SHIOJIMA K., NAKANE T., KAWAHARA N. Bacopaside I and II: two pseudojujubogenin glycosides from *Bacopamonniera*. *Phytochemistry* 2001 ; 58 : 553-556.
112. HOU C.C., LIN S.J., CHENG J.T., HSU F.L. Bacopaside III, bacopasaponin G and bacopasides A,B and C from *Bacopa monniera*. *Journal Natural Product* 2002 ; 65 : 1759-1763.

113. CHAKRAVARTY A.K., SARKAR T., NAKANE T., KAWAHARA N., MASUDA K. New phenylethanoid glycosides from *Bacopa monniera*. Chemical Pharmaceutical Bulletin 2002 ; 50(12) : 1616-1618.
114. CHAKRAVARTY A.K., GARAI S., MASUDA K., NAKANE T., KAWAHARA N. Bacopasides III-V: three new triterpenoid glycosides from *Bacopa monniera*. Chemical Pharmaceutical Bulletin 2003 ; 51(2) : 215-217.
115. SRINIVASA H., BAGUL M.S., PADH H., RAJANI M. A rapid densitometric method for the quantification of luteolin in medicinal plants using HPTLC. Chromatographia 2004 ; 60 : 131-134.
116. DEEPAK M., SANGLI G.K., ARUN P.C., AMIT A. Quantitative determination of the major saponin mixture bacoside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. Phytochemical Analysis 2005 ; 16 : 24-29.
117. SIVARAMAKRISHNA C., RAO C.V., TRIMURTULU G., VANISREE M., SUBBARAJU G.V. Triterpenoid glycosides from *Bacopa monnieri*. Phytochemistry 2005 ; 66 : 2719-2728.
118. ZHOU Y., SHEN Y.H., ZHANG C., SU J., LIU R.H., ZHANG W.D. Triterpene saponins from *Bacopa monnieri* and their antidepressant effects in two mice models. Journal of natural products 2007 ; 70 : 652-655.
119. BHANDARI P., KUMAR N., SINGH B., KAUL V.K. Bacosterol glycoside, a new 13,14-seco-steroid glycoside from *Bacopa monnieri*. Chemical Pharmaceutical Bulletin 2006 ; 54(2) : 240-241.
120. PAWAR R.S., BHUTANI K. New dammarane triterpenoidal saponins from *Bacopa monniera*. Indian Journal of Chemistry 2006 ; 45 : 1511-1514.
121. PAWAR R.S., KHAN S.I., KHAN I.A. Glucosides of 20-deoxy derivatives of jujubogenin and pseudojujubogenin from *Bacopa monniera*. Planta Medica 2007 ; 73(4) : 380-383.
122. BHANDARI P., KUMAR N., SINGH B., KAUL V.K. Cucurbitacins from *Bacopa monnieri*. Phytochemistry 2007 ; 68 : 1248-1254.
123. BHANDARI P., KUMAR N., GUPTA A.P., SINGH B., KAUL V.K. A rapid RP-HPTLC densitometry method for simultaneous determination of major flavonoids in important medicinal plants. Journal of Separation Science 2007 ; 30 : 2092-2096.
124. ZHOU Y., PENG L., ZHANG W-D., KONG D-Y. Effect of triterpenoid saponins from *Bacopa monniera* on scopolamine-induced memory impairment in mice. Planta Medica 2009 ; 75 : 568-574.
125. ZHOU Y., KONG D.Y., PENG L., ZHANG W.D. A new triterpenoid saponin from *Bacopa monniera*. Chinese Chemical Letters 2009 ; 20 : 569-571.
126. RAJANI M. *Bacopa monnieri*, a nootropic drug. Bioactive Molecules and Medicinal Plant. Springer 2008.
127. PRAT R. Expérimentation en biologie et physiologie végétales. Quae 2007.

128. PHROMPITTAYARAT W, PUTALUN W, TANAKA H, JETIYANON K, WITTAYA S, INGKANINAN K. Comparison of various extraction methods of *Bacopa monnieri*. Naresuan University Journal 2007 ; 15(1) : 29-34.
129. DAS P.K., MALHOTRA C.L., DHALLA N.S. Studies on alkaloids of *Herpestis monniera* Linn. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 1961 ; 5 : 136-143.
130. ZHOU Y., SHEN Y.H., ZHANG C., ZHANG W.D. Chemical constituents of *Bacopa monnieri*. Chemistry of Natural Compounds 2007 ; 43(3) : 355-357.
131. SINGH, SARMA B., SRIVASTAVA R. Phenolic acid analysis and biological activity of methanolic extracts of some medicinal plants against some phytopathogenic fungi. The internet journal of alternative medicine 2009 ; 6(2).
132. AHMAD S., RAHMAN A., FATIMA K., BADER Y. Amino acid analysis of intellan, a herbal product used in enhancing brain function. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 1994 ; 7(2) : 17-24.
133. MENDHAM. Analyse chimique quantitative de Vogel. De Boeck 2006.
134. AGRAWAL H., KAUL N., PARADKAR A.R., MAHADIK K.R. Separation of bacoside A₃ and bacoside II, major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri*, by HPTLC and SFC. Application of SFC in implementation of uniform design for herbal drug standardization, with thermodynamic study. Acta Chromatographica 2006 ; 17 : 125-150.
135. OGIHARA Y., INOUE O. Droplet counter-current chromatography for the separation of plant products. Journal of Chromatography 1976 ; 128 : 218-223.
136. GANZERA M., GAMPENRIEDER J., PAWAR R.S., KHAN I.A., STUPPNER H. Separation of the major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography. Analytica Chimica Acta 2004 ; 516 : 149-154.
137. PRAKASH O., SINGH G.N., SINGH R.M., MATHUR S.C., BAJPAI M., YADAV S. Determination of bacoside A by HPTLC in *Bacopa monnieri* extract. Central Indian Pharmacopoeia Laboratory, Indian Pharmacopoeia Commission 2008 ; 2(3) : 173-175.
138. BHANDARI P., KUMAR N., GUPTA A.P., SINGH B., KAUL V.K. Micro-LC determination of swertiamarin in *swertia* species and bacoside A in *Bacopa monnieri*. Chromatographia 2006 ; 64 : 599-602.
139. LETONTURIER P. Immunologie générale. Masson 2007.
140. PHROMPITTAYARAT W., PUTALUN W., TANAKA H., WITTAYA-AREEKUL S., JETIYANON K., INGKANINAN K. An enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies against bacoside I. Analytica Chimica Acta 2007 ; 584 : 1-6.
141. PHROMPITTAYARAT W., PUTALUN W., TANAKA H., JETIYANON K., WITTAYA-AREEKUL S., INGKANINAN K. Determination of pseudojubilogenin glycosides from *Brahmi* based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacoside I. Phytochemical Analysis 2007 ; 18 : 411-418.
142. TOTHIAM C., PHROMPITTAYARAT W., PUTALUN W., TANAKA H., SAKAMOTO S., KHAN I.A., INGKANINAN K. An enzyme-linked immunosorbent assay

using monoclonal antibody against bacoside A₃ for determination of jujubogenin glycosides in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Phytochemical analysis 2011.

143. IMSUNGNOEN N, PHROMPITTAYARAT W, INGKANINAN K, TANAKA H, PUTALUN W. Immunochromatographic assay for the detection of pseudojujubogenin glycosides. Phytochemical Analysis 2008 ; 20 : 64-67.

144. VAUBOURDOLLE M. Toxicologie Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques. Wolters Kluwer 2007.

145. PHROMPITTAYARAT W., WITTAYA S., JETIYANON K., PUTALUN W., TANAKA H., INGKANINAN K. Determination of saponin glycosides in *Bacopa monnieri* by reversed phase high performance liquid chromatography. Thai Pharmaceutical and health Science Journal 2007 ; 2(1) : 26-32.

146. RAJANI M., KANAKI N.S. Phytochemical standardization of herbal drugs and polyherbal formulations. Bioactive molecules and medicinal plants. Springer 2008 : 349-369.

147. MURTHY P.B.S., RAJU V.R., RAMAKRISANA T., CHAKRAVARTY M.S., KUMAR K.V., KANNABABU S., SUBBARAJU G.V. Estimation of twelve bacopa saponins in *Bacopa monnieri* extracts and formulations by high-performance liquid chromatography. Chemical Pharmaceutical Bulletin 2006 ; 54(6) : 907-911.

148. DEEPAK M, AMIT A. The need for establishing identities of bacoside A and B, the putative major bioactive saponins of India medicinal plant *Bacopa monnieri*. Phytomedicine 2004 ; 11 : 264-268.

149. RADHAKRISHNAN V.V., REDDY V.V., MINI S., LATHA A. Assessment of variability in *Brahmi* (*Bacopa monnieri*). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 2008 ; 30 : 361-365.

150. TOURTE Y., BORDONNEAU M., HENRY M., TOURTE C. Le monde des végétaux. Dunod 2005.

151. BRANGER A. Microbiologie et alimentation. Educagri 2007.

152. HAICOUR R. Biotechnologies végétales Techniques de laboratoire. Lavoisier 2002.

153. NAIK P.M., MANOHAR S.H., PRAVEEN N., MURTHY H.N. Effects of sucrose and pH levels on in vitro shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2010 ; 100 : 235-239.

154. BINITA B., ASHOK M., YOGESH T. *Bacopa monnieri* (L.) Pennell: a rapid, efficient and cost effective micropropagation. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2005 ; 15(2) : 167-175.

155. PRAVEEN N., NAIK P.M., MANOHAR S.H., NAYEEN A., MURTHY H.N. In vitro regeneration of *brahmi* shoots using semisolid and liquid cultures and quantitative analysis of bacoside A. Acta Physiologiae Plantarum 2009 ; 31 : 723-728.

156. SCHMID R. Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique. Médecine-Sciences Flammarion 2002.

157. CEASAR S.A., MAXWELL S.L., PRASAD K.B., KARTHIGAN M. Highly efficient shoot regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) using a two-stage culture procedure and assessment of genetic integrity of micropropagated plants by RAPD. *Acta Physiologiae Plantarum* 2009 ; 32(3) : 443-452.
158. PRIMROSE, TWYMAN, OLD. Principes de génie génétique. De Boeck 2004.
159. PATIL G.S., SHIMPI T.S., DESHPANDE H.A., NARKHEDE J.D., BHALSING S.R. Tissue culture studies on *Bacopa monnieri* (L.) Pennell, a threatened medicinal herb. *International Research Journal* 2009 ; 1(1) : 29-31.
160. RAHMAN L, VERMA P, SINGH D, GUPTA M, BANERJEE S. Bacoside production by suspension cultures of *Bacopa monnieri* (L.). *Biotechnology letters* 2002 ; 24 : 1427-1429.
161. RAMESH M., VIJAYAKUMAR K.P., KARTHIKEYAN A., PANDIAN S.K. RAPD based genetic stability analysis among micropropagated, synthetic seed derived and hardened plants of *Bacopa monnieri* (L.) : a threatened Indian medicinal herb. *Acta Physiologiae Plantarum* 2011 ; 33 : 163-171.
162. NISHA K.K., SEETHA K., RAJMOHAN K., PURUSHOTHAMA M.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brahmi* [*Bacopa monniera* (L.) Wettst.], a popular medicinal herb of India. *Current Science* 2003 ; 85(1) : 85-89.
163. MAJUMDAR S., GARAI S., JHA S. Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant Cell Rep* 2011 ; 30(5) : 941-954.
164. ESCANDON A., HAGIWARA J., ALDERETE L. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by in vitro polyploidization. *Electronic Journal of Biotechnology* 2006 ; 9(3).
165. DURAND V., LE JEUNNE C. Guide pratique des médicaments. Dorosz 2009. Maloine.
166. MALHOTRA C.L., DAS P.K. Pharmacological studies of *Herpestis monniera* Linn. (*Brahmi*). *Indian Journal of Medicine Research* 1959 ; 47(3) : 294-305.
167. MALHOTRA C.L., DAS P.K., DHALLA N.S. Some neuro-pharmacological actions of hersaponin, an active principale from *Herpestis monniera* Linn. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie* 1960 ; 129 : 290-302.
168. DHALLA N.S., SASTRY M.S., MALHOTRA C.L. Some *in vitro* effects of *Herpestis monniera* Linn. on the respiration of rat brain. *Indian Journal of Medicinal Research* 1961 ; 49(5) : 781-787.
169. MALHOTRA C.L., PRASAD K., DHALLA N.S., DAS P.K. Effect of hersaponin and acurus oil on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine content of rat brain. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical* 1961 ; 13 : 447-449.
170. GANGULY D.K., MALHOTRA C.L. Some behavioural effects of an active fraction from *Herpestis monniera* Linn (*Brahmi*). *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 1967 ; 55 (5) : 473-482.
171. GANGULY D.K., MALHTORA C.L. Some neuropharmacological and behavioural effects of an active fraction from *Herpestis monniera* Linn. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 1967 ; 11 (1) : 33-43.

172. DELATTRE J., BEAUDEUX J.L., BONNEFONT-ROUSSELOT D. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier 2005.
173. MASSION P., PREISER J.C., BALLIGAND J.L. Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. Nutrition clinique et métabolisme 2002 ; 16 : 248-252.
174. MURRAY, GRANNER, MAYES, RODWELL. Biochimie de Harper. De Boeck 2002.
175. PINCEMAIL J., BONJEAN K., CAYEUX K., DEFRAIGNE J.O. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition clinique et métabolisme 2002 ; 16 : 233-239.
176. HOUEE-LEVIN C., SICARD-ROSELLI C. Chimie et biochimie radicalaires. Belin 2005.
177. HABER F., WEISS J. Uber die katalase des hydroperoxydes. Die Naturwissenschaften 1932 ; 20(51) : 948-950.
178. FENTON H.J.H. Oxidation of tartic acid in presence of iron. Journal of the chemical society 1894 ; 65(65) : 899-911.
179. BERGER M. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme 2006 ; 20 : 48-53.
180. MICHEL F., BONNEFONT-ROUSSELOT D., MAS E., DRAI J., THEROND P. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. Annales de Biologie Clinique 2008 ; 66(6) : 605-620.
181. LEFEVRE G. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. Annales de Biologie Clinique 1998 ; 56(3) : 305-319.
182. FAVIER A. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Annales de Biologie Clinique 1997 ; 55(1) : 9-16.
183. LAWRENCE J., MACHLIN, BENDICH A. Free radical tissue damage : protective role of antioxidant nutrients. The FASED Journal 1987 ; 1 : 441-445.
184. AKYOL O., ISCI N., TEMEL I., OZGOCMEN S., UZ E., MURAT M., BUYUKBERBER S. Relations entre les enzymes anti-oxydantes plasmatiques et érythrocytaires et la peroxydation des lipides chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Revue du Rhumatisme 2001 ; 68 : 601-608.
185. TRIPATHY Y.B., CHAURASIA S., TRIPATHI E., UPADHYAY A., DUBEY G.P. *Bacopa monniera* Linn. as an antioxidant : mechanism of action. Indian Journal of Experimental Biology 1996 ; 34 : 523-526.
186. DASGUPTA N., DE B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study. Food Chemistry 2007 ; 101 : 471-474.
187. PAWAR R., GOPALAKRISHNAN C., BHUTANI K. Dammarane triterpene saponin from *Bacopa monniera* as the superoxide inhibitor in polymorphonuclear cells. Planta Medicine 2001 ; 67 : 752-754.

188. BHATTACHARYA S.K., BHATTACHARYA A., KUMAR A., GHOSAL S. Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytotherapy Research* 2000 ; 14 : 174-179.
189. RUSSO A., IZZO A., BORRELLI F., RENIS M., VANELLA A. Free radical scavenging capacity and protective effect of *Bacopa monniera* L. on DNA damage. *Phytotherapy Research* 2003 ; 17 : 870-875.
190. RUSSO A. BORRELLI F., CAMPISI A., ACQUAVIVA R., RACITI G., VANELLA A. Nitric oxide-related toxicity in cultured astrocytes: effect of *Bacopa monniera*. *Life Science* 2003 ; 73 : 1517-1526.
191. SHINOMOL G., MURALIDHARA. *Bacopa monnieri* modulates endogenous cytoplasmic and mitochondrial oxidative markers in prepubertal mice brain. *Phytomedicine* 2011 ; 18 : 317-326.
192. DHANASEKARAN M., THARAKAN B., HOLCOMB L., HITT A., YOUNG K., MANYAM B. Neuroprotective mechanisms of ayurvedic antidementia botanical *Bacopamonnieri*. *Phytotherapy Research* 2007 ; 21 : 965-969.
193. MATHISEN E., DIALLO D., ANDERSEN O.M, MALTERUD K.E. Antioxidants from the bark of *Burkea Africana*, an African medicinal plant. *Phytotherapy Research* 2002 ; 16 : 148-153.
194. HOSAMANI R., MURALIDHARA. Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 2009 ; 30(6) : 977-985.
195. BETARBET R., SHERER T.B., MACKENZIE G., GARCIA-OSUNA M., PANOV A.V. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* 2000 ; 3 : 1301-1306.
196. RAVIKUMAR, HOSAMANI, MURALIDHARA. Prophylactic treatment with *Bacopamonnieri* leaf powder mitigates paraquat-induced oxidative perturbations and lethality in *Drosophila melanogaster*. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 2010 ; 47 : 75-82.
197. GUTTERIDGE J.M., QUINLAN G.J., CLARK L., HALLIWELLI B. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochimica Biophysica Acta* 1985 ; 835 : 441-447.
198. JYOTI A., SHARMA D. Neuroprotective role of *Bacopa monnieri* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. *Neurotoxicology* 2006 ; 27 : 451-457.
199. JYOTI A., SETHI P., SHARMA D. *Bacopa monniera* prevents from aluminium neurotoxicity in the cerebral cortex of rat brain. *Journal of Ethnopharmacology* 2007 ; 111 : 56-62.
200. BICKFORD P.C., ADAMS C.E., BOYSON S.J., CURELLA P., GERHARDT G.A., HERON C. Long term treatment of male F344 rats with deprenyl : assessment of effects on longevity, behaviour, and brain function. *Neurobiology of Aging* 1997 ; 18 : 309-318.

201. FUKUI K., ONODERA K., SHINKAI T., SUZUKI S., URANO S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000 : 169-173.
202. GAJARE K.A., DESHMUKH A. A., PILLAI M.M. Protective effect of *Bacopamonniera* on the brain of D-galactose induced aging in female albino mice. *Indian Journal of Gerontology* 2006 ; 20(3) : 181-192.
203. VATIER C., FEVE B. Place des produits de glycation avancés (AGEs) dans les complications du diabète. *Médecine des Maladies Métaboliques* 2010 ; 4(6) : 637-642.
204. KALAMADE V., PILLAI M., KALAMADE I. Effect of *Bacopa monniera* (Linn.) on lipid peroxidation and lipofuscinogenesis in prostate gland of D-galactose induced aging mice, *Mus musculus*. *Indian Journal of Experimental Biology* 2008 ; 46 : 547-549.
205. PATIL R., VORA S., PILLAI M. Antioxidant effect of plant extracts on phospholipids levels in oxidatively stressed male reproductive organs in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2009 ; 7(1) : 35-39.
206. HARMAN D. Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journal of Gerontology* 1956 ; 11 : 298-300.
207. GARG A., KUMAR A., NAIR A., REDDY A. Element analysis of brahmi (*Bacopamonnieri*) extracts by neutron activation and its bioassay for antioxidant, ratio protective and anti-lipid peroxidation activity. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2009 ; 281 : 53-58.
208. HERCBERG S. Antioxydant vitamins and minerals in prevention of cancers : lessons from the su.vi.max study. *British Journal of Nutrition* 2006 ; 96(1) : 28-30.
209. CORNILLIERY, KORSIA-MEFFRE, SENART S. Le guide des compléments alimentaires. Vidal 2008.
210. CHAPOUTIER G. Biologie de la mémoire. Odile Jacob 2006.
211. KOLB B., WHISHAW I. Cerveau et comportement. De Boeck 2008.
212. SINGH H.K, RASTOGI R.P, SRIMAL R.C, DHAWAN B.N. Effect of bacosides A and B on avoidance responses in rats. *Phytotherapy research* 1988 ; 2(2) : 70-75.
213. SINGH H.K., DHAWAN B.N. Neuropsychopharmacological effects of the ayurvedic nootropic *Bacopa monnieri* Linn. *Indian Journal of Pharmacology* 1997 ; 29(5) : 359-365.
214. KASTURE S.B., KASTURE V.S., JOSHUA A.J., DAMODARAN A., AMIT A. Nootropic activity of Bacomind™, an enriched phytochemical composition from *Bacopamonnieri*. *Journal of Natural Remedies* 2007 ; 7 : 166-173.
215. STAHL S. Psychopharmacologie essentielle. Flammarion Médecine-Science 2002.
216. LOHIDASAN S, PARADKAR A.R, MAHADIK K.R. Nootropic activity of lipid-based extract of *Bacopa monniera* Linn. compared with traditional preparation and extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009 ; 61 : 1537-1544.

217. VOLLALA V.R., UPADHYA S., NAYAK S. Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on learning and memory in rats : a behavioural study. *Journal of Veterinary Behavior* 2010 ; 5 : 69-74.
218. CHARLES P.D., AMBIGAPATHY G., GERALDINE P., AKBARSHA M.A., RAJAN K.E. *Bacopa monniera* leaf extract up-regulates tryptophan hydroxylase (TPH2) and serotonin transporter (SERT) expression : implications in memory formation. *Journal of Ethnopharmacology* 2011 ; 134(1) : 55-61.
219. KATZUNG. *Pharmacologie fondamentale et clinique*. Piccin 2006.
220. VOLLALA V.R., UPADHYA S., NAYAK S. Enhanced dendritic arborization of amygdala neurons during growth spurt periods in rats orally intubated with *Bacopa monniera* extract. *Anatomical Science International* 2011.
221. REVEST P., LONGSTAFF A. *Neurobiologie moléculaire*. Dunod 2000.
222. ANDRADE C., CHANDRA J.S. Anti-amnestic properties of *Brahmi* and *Mandookaparni* in a rat model. *Indian Journal of Psychiatry* 2006 ; 48(4) : 232-237.
223. PRABHAKAR S., SARAF M.K., PANDHI P., ANAND A. *Bacopa monniera* exerts antiamnesic effect on diazepam-induced anterograde amnesia in mice. *Psychopharmacology* 2008 ; 200 : 27-37.
224. LÜLLMANN H., MOHR K., HEIN L. *Atlas de poche de pharmacologie*. Lavoisier 2010.
225. JOLLIET P. *Pharmacologie et soins infirmiers*. Masson 2002.
226. HALL Z.W. *Introduction à la neurobiologie moléculaire*. Flammarion Médecine-Science 1994.
227. SARAF M.K., PRABHAKAR S., PANDHI P., ANAND A. *Bacopa monniera* ameliorates amnesic effects of diazepam qualifying behavioural-molecular partitioning. *Neuroscience* 2008 ; 155 : 476-484.
228. SARAF M.K., ANAND A., PRABHAKAR S. Scopolamine induced amnesia is reversed by *Bacopa monniera* through participation of kinase-CREB pathway. *Neurochemical Research* 2009 ; 35(2) : 279-287.
229. SARAF M.K., PRABHAKAR S., ANAND A. *Bacopa monniera* alleviates *N*-nitro-L-arginine-induced but not MK-801-induced amnesia : a mouse morris water maze study. *Neuroscience* 2009 ; 160 : 149-155.
230. ANAND A., SARAF M.K., PRABHAKAR S. Antiamnesic effect of *Bacopa monniera* on L-NNA induced amnesia involves calmodulin. *Neurochemical Research* 2010 ; 35(8) : 1172-1181.
231. HOTA S.K., BARHWAL K., SINGH S.B., SAIRAM M., ILLAVAZHAGAN G. NR1 and GluR2 expression mediates excitotoxicity in chronic hypobaric hypoxia. *Journal of Neuroscience Research* 2008 ; 86(5) : 1142-1152.

232. HOTA S.K., BARHWAL K., SINGH S.B., ILLAVAZHAGAN G. Ceftriaxone rescues hippocampal neurons from excitotoxicity and enhances memory retrieval in chronic hypobaric hypoxia. *Neurobiology of Learning and Memory* 2008 ; 89(4) : 522-532.
233. HOTA S.K., BARHWAL K., BAITHARU I., PRASAD D., SINGH S.B., ILAVAZHAGAN G. *Bacopa monniera* leaf extract ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial memory impairment. *Neurobiology of Disease* 2009 ; 34 : 23-39.
234. CALOP J., LIMAT S., FERNANDEZ C. *Pharmacie clinique et thérapeutique*. Masson 2008.
235. DUJARDIN K., LEMAIRE P. *Neuropsychologie du vieillissement normal et pathologique*. Masson 2008.
236. BHATTACHARYA S.K, KUMAR A, GHOSAL S. Effect of *Bacopa monniera* on animal models of Alzheimer's disease and perturbed central cholinergic markers of cognition in rats. *Research Communications in Pharmacology and Toxicology* 1999 ; 4(3) : 111-112.
237. DAS A., SHANKER G., NATH C., PAL R., SINGH S., SINGH H. A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2002 ; 73(4) : 893-900..
238. MUKHERJEE P.K., KUMAR V., MAL M., HOUGHTON P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 2007 ; 14 : 289-300.
239. HOLCOMB L.A., DHANASEKARAN M., HITT A.R., YOUNG K.A., RIGGS M., MANYAM B.V. *Bacopa monniera* extract reduces amyloid levels in PSAPP mice. *Journal of Alzheimer's Disease* 2006 ; 9 : 243-251.
240. LIMPEANCHOB N., JAIPAN S., RATTANAKARUNA S., PHROMPITTAYARAT W., INGKANINAN K. Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *Journal of Ethnopharmacology* 2008 ; 120 : 112-117.
241. UABUNDIT N., WATTANATHORN J., MUCIMAPURA S., INGKANINAN K. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *Journal of Ethnopharmacology* 2010 ; 127(1) : 26-31.
242. SINGH M., MURTHY V., RAMASSAMY C. Modulation of hydrogen peroxide and acrolein-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunctions and redox regulated pathways by the *Bacopa monniera* extract : potential implication in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 2010 ; 21 : 229-247.
243. CAULIN C *et al.* (Comité scientifique). *Recommandations et Pratique*. Vidal Recos 2007.
244. PANDEY R., GUPTA S., TANDON S., WOLKENHAUER O., VERA J., GUPTA S.K. Bacoside A suppresses epileptic-like seizure/convulsion in *Caenorhabditis elegans*. *Seizure* 2010 ; 19 : 439-442.
245. MATHEW J., KUMAR T.P., KHAN R.S., PAULOSE C.S. Behavioral deficit and decreased GABA receptor functional regulation in the cerebellum of epileptic rats : effect of *Bacopa monnieri* and bacoside A. *Epilepsy and Behavior* 2010 ; 17(4) : 441-447.

246. MATHEW J., SOMAN S., SADANANDAN J., PAULOSE C.S. Decreased GABA receptor in the striatum and spatial recognition memory deficit in epileptic rats : effect of *Bacopa monnieri* and bacoside A. Journal of Ethnopharmacology 2010 ; 130 : 255-261.
247. MATHEW J., GANGADHARAN G., KURUVILLA K.P., PAULOSE C.S. Behavioral deficit and decreased GABA receptor functional regulation in the hippocampus of epileptic rats : effect of *Bacopa monnieri*. Neurochemical Research 2011 ; 36 : 7-16.
248. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurements and the folin phenol reagent. The Journal of Biology Chemistry 1951 ; 193 : 265-275.
249. PAULOSE C.S., CHATHU F., KHAN S.R., KRISHNAKUMAR A. Neuroprotective role of *Bacopa monnieri* extract in epilepsy and effect of glucose supplementation during hypoxia : glutamate receptor gene expression. Neurochemical research 2008 ; 33 : 1663-1671.
250. KHAN R., KRISHNAKUMAR A., PAULOSE C.S. Decreased glutamate receptor binding and NMDA R1 gene expression in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats : neuroprotective role of *Bacopa monnieri* extract. Epilepsy and Behavior 2008 ; 12 : 54-60.
251. KRISHNAKUMAR A., ABRAHAM P.M., PAUL J., PAULOSE C.S. Down-regulation of cerebellar 5-HT_{2C} receptors in pilocarpine-induced epilepsy in rats : therapeutic role of *Bacopa monnieri* extract. Journal of the Neurological Sciences 2009 ; 284 : 124-128.
252. KRISHNAKUMAR A., NANDHU M.S., PAULOSE C.S. Up-regulation of 5-HT_{2C} receptors in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats : antagonism by *Bacopa monnieri*. Epilepsy and Behavior 2009 ; 16 : 225-230.
253. MATHEW J., PAUL J., NANDHU M.S., PAULOSE C.S. Increased excitability and metabolism in pilocarpine induced epileptic rats : effect of *Bacopa monnieri*. Fitoterapia 2010 ; 81(6) : 546-551.
254. VOHORA D., PAL S.N., PILLAI K.K. Protection from phenytoin-induced cognitive deficit by *Bacopa monniera*, a reputed Indian nootropic plant. Journal of Ethnopharmacology 2000 ; 71 : 383-390.
255. BHATTACHARYA S.K., GHOSAL S. Anxiolytic activity of a standardized extract of *Bacopa monniera* : an experimental study. Phytomedicine 1998 ; 5(2) : 77-82.
256. SHANKER G., SINGH H.K. Anxiolytic profile of standardised brahmi extract. Indian Journal of Pharmacology 2000 ; 32(2) : 152.
257. CHATTERJEE M., VERMA P., PALIT G. Comparative evaluation of *Bacopa monniera* and *Panax quinquefolium* in experimental anxiety and depressive models in mice. Indian Journal of Experimental Biology 2010 ; 48 : 306-313.
258. MISSLIN R., GOETZ P., MAZARS G. Plantes neurotropes. Modes d'action de certaines plantes médicinales à propriétés neurotropes. Ethnopharmacologia 2004 ; 34 : 8-12.
259. KISHORE K, SINGH M. Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. Indian Journal of Experimental Biology 2005 ; 43 : 640-645.

260. HOSTETTMANN K, MARSTON A. Saponins : triterpene saponins, pharmacological and biological properties. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products* 1995 : 232-286.
261. KAR CHOWDHURI D., PARMAR D., KAKKAR P., SHUKLA R., SETH P.K., SRIMAL R.C. Antistress effects of bacosides of *Bacopa monnieri*: modulation of Hsp70 expression, superoxide dismutase and cytochrome P450 activity in rat brain. *Phytotherapy Research* 2002 ; 16 : 639-645.
262. RAI D, BHATIA G, PALIT G, PAL R, SINGH S, SINGH H.K. Adaptogenic effect of *Bacopa monniera* (Brahmi). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003 ; 75 : 823-830.
263. SHEIKH N., AHMAD A., SIRIPURAPU K.B., KUCHIBHOTLA V.K., SINGH S., PALIT G. Effect of *Bacopa monniera* on stress induced changes in plasma corticosterone and brain monoamines in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2007 ; 111 : 671-676.
264. GUENARD H. *Physiologie humaine*. Pradal 2009.
265. GHOSH T., MAITY T.K., DAS M., BOSE A., DASH D.K. In vitro antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Bacopa monnieri* Linn. aerial parts. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 2007 ; 6 : 77-85.
266. GHOSH T., MAITY T.K., DASH G.K., BOSE A., NAYAK S.S., DASH D.K. Hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Bacopa monnieri* Linn. aerial parts against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Natural Product Sciences* 2007 ; 13(1) : 61-67.
267. SUMATHI T., RAMAKRISHNAN S. Hepatoprotective activity of *Bacopa monniera* on D-galactosamine induced hepatotoxicity in rats. *Natural Product Sciences* 2007 ; 13(3) : 195-198.
268. SUMATHI T., NONGBRI A. Hepatoprotective effect of bacoside-A, a major constituent of *Bacopa monniera* Linn. *Phytomedicine* 2008 ; 15 : 901-905.
269. JANANI P., SIVAKUMARI K., PARTHASARATHY C. Hepatoprotective activity of bacoside A against N-nitrosodiethylamine-induced liver toxicity in adult rats. *Cell Biology and Toxicology* 2009 ; 25 : 425-434.
270. JANANI P., SIVAKUMARI K., GEETHA A., RAVISANKAR B., PARTHASARATHY C. Chemopreventive effect of bacoside A on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2009 ; 11-17.
271. JANANI P., SIVAKUMARI K., GEETHA A., YUVARAJ S., PARTHASARATHY C. Bacoside A downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 in DEN-induced hepatocellular carcinoma (abstract). *Cell Biochemistry and Function* 2010 ; 28(2) : 164-169.
272. D'SOUZA P., DEEPAK M., RANI P., KADAMBOOR S., MATHEW A., CHANDRASHEKAR A.P, AGARWAL A. Brine shrimp lethality assay of *Bacopa monnieri*. *Phytotherapy Research* 2002 ; 16 : 197-198.
273. VENU T., VISHWANADHAM D., JAYASREE P.R., KUMAR P.R.M. Ethanolic extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) induces shortening of cell-cycle durations in naturally synchronous *Physarum polycephalum*. *Current Science* 2003 ; 85(3) : 245-247.

274. WIDMAIER E.P., RAFF H., STRANG K.T. Physiologie humaine, les mécanismes du fonctionnement de l'organisme. Maloine 2009.
275. ELANGO VAN V., GOVINDASAMY S., RAMAMOORTHY N., BALASUBRAMANIAN K. In vitro studies on the anticancer activity of *Bacopa monnieri*. Fitoterapia 1995 ; 66(3) : 211-215.
276. ROHINI G., DEVI C.S. *Bacopa monniera* extract induces apoptosis in murine sarcoma cells (S-180). Phytotherapy Research 2008 ; 22 : 1595-1598.
277. ROHINI G., SABITHA K.E., DEVI C.S. *Bacopa monniera* Linn. extract modulates antioxidant and marker enzyme statues in fibrosarcoma bearing rats. Indian Journal of Experimental Biology 2004 ; 42 : 776-780.
278. MASTAN M, PRASAD U.V, PARTHASARATHY P.R. Protective effect of *Bacopa monniera* L. on cytarabine induced biochemical changes in chick embryo. Indian Journal of Clinical Biochemistry 2007 ; 22(1) : 122-127.
279. COHEN. Pharmacologie 2008.
280. VIJI V., SHOBHA B., KAVITHA S.K., RATHEESH M., KRIPA K., HELEN A. Betulinic acid isolated from *Bacopa monniera* (L.) Wettst suppresses lipopolysaccharide stimulated interleukin-6 production through modulation of nuclear factor- κ B in peripheral blood mononuclear cells. International Immunopharmacology 2010 ; 10 : 843-849.
281. VIJI V., HELEN A. Inhibition of lipoxygenases and cyclooxygenase-2-enzymes by extracts isolated from *Bacopa monniera* (L.) Wettst. Journal of Ethnopharmacology 2008 ; 118 : 305-311.
282. VIJI V., HELEN A. Inhibition of pro-inflammatory mediators : role of *Bacopa monniera* (L.) Wettst. Inflammopharmacology 2010.
283. VIJI V., SHYNI G.L., HELAN A. Efficacy of *Bacopa monniera* (L.) Wettst in alleviating lysosomal instability in adjuvant-induced arthritis in rats. Inflammation 2010.
284. SARAPHANCHOTIWITTHAYAN A., INGGANINAN K., SRIPALAKIT P. Effect of *Bacopa monniera* Linn. extract on murine immune response *in vitro*. Phytotherapy Research 2008 ; 22 : 1330-1335.
285. HULE A.K., JUVEKAR A.R. In vitro immune response of saponin rich fraction of *Bacopa monnieri* Linn. International Journal of PharmTech Research 2009 ; 1(4) : 1032-1038.
286. SAMIULLA D.S., PRASHANTH D., AMIT A. Mast cell stabilising activity of *Bacopamonnieri*. Fitoterapia 2001 ; 72 : 284-285.
287. SHARATH R, HARISH B.G, KRISHMA V, SATHYANARAYANA B.N, KUMARA SWAMY H.M. Wound healing and protease inhibition activity of bacoside-A isolated from *Bacopa monnieri* Wettst. Phytotherapy Research 2010 ; 24(8) : 1217-1222.
288. RUSSO A., BORRELLI F. *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant : an overview. Phytomedicine 2005 ; 12 : 305-317.
289. SAIRAM K, RAO CH.V, DORA BABU M, GOEL R.K. Prophylactic and curative effects of *Bacopa monniera* in gastric ulcer models. Phytomedicine 2001 ; 8(6) : 423-430.

290. GOEL R.K., SAIRAM K., DORABABU M., TAVARES I.A., RAMAN A. *In vitro* evaluation of *Bacopa monniera* on anti-*Helicobacter pylori* activity and accumulation of prostaglandins. *Phytomedicine* 2003 ; 10 : 523-527.
291. DAR A., CHANNA S. Relaxant effect of ethanol extract of *Bacopa monniera* on trachea, pulmonary artery and aorta from rabbit and guinea-pig. *Phototherapy Research* 1997 ; 11 : 323-325.
292. DAR A., CHANNA S. Bronchodilatory and cardiovascular effects of an ethanol extract of *Bacopa monniera* in anaesthetized rats. *Phytomedicine* 1997 ; 4(1) : 319-323.
293. DAR A., CHANNA S. Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *Journal of Ethnopharmacology* 1999 ; 66 : 167-174.
294. CHANNA S., DAR A., YAQOUB M., ANJUM S., SULTANI Z., RAHMAN A. Broncho-vasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from *Bacopa monniera*. *Journal of Ethnopharmacology* 2003 ; 86 : 27-35.
295. RASHID S., LODHI F., AHMAD M., USMANGHANI K. Cardiovascular effects of *Bacopa monnieri* (L.) Pennel extract in rabbits. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990 ; 3(2) : 57-62.
296. PRASAD S., KASHYAP RS., DEOPUJARI J.Y., PUROHIT H.J., TAORI G.M., DAGINAWALA H.F. Effect of *Fagonia Arabica* (Dhamasa) on in vitro thrombolysis. *BMC Complementary and alternative medicine* 2007 : 1-6.
297. MOHANTY I.R., MAHESHWARI U., JOSEPH D., DESHMUKH Y. *Bacopa monniera* protects rat heart against ischaemia-reperfusion injury : role of key apoptotic regulatory proteins and enzymes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010 ; 62 : 1175-1184.
298. SARAF M.K., PRABHAKAR S., ANAND A. Neuroprotective effect of *Bacopa monniera* on ischemia brain injury. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2010 ; 97 : 192-197.
299. REHNI A.K, PANTLYA H.S, SHRI R, SINGH M. Effect of chlorophyll and aqueous extracts of *Bacopa monniera* and *Valeriana wallichii* on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury in mice. *Indian Journal of Experimental Biology* 2007 ; 45 : 764-769.
300. GHOSH T., MAITY T.K., SENGUPTA P., DASH D.K., BOSE A. Antidiabetic and *in vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of *Bacopa monnieri* Linn. aerial parts : a possible mechanism of action. *Iranian Journal of Pharmaceutical research* 2008 ; 7(1) : 61-68.
301. KAPOOR R., SRIVASTAVA S., KAKKAR P. *Bacopa monnieri* modulates antioxidant responses in brain and kidney of diabetic rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009 ; 27 : 62-69.
302. GHOSH T., MAITY T.K., SINGH J. Antihyperglycemic activity of bacosine, a triterpene from *Bacopa monnieri*, in alloxan-induced diabetic rats. *Planta Medicine* 2010.
303. SUMATHY T, GOVINDASAMY S, BALAKRISHNA K, VELUCHAMY G. Protective role of *Bacopa monniera* on morphine-induced brain mitochondrial enzyme activity in rats. *Fitoterapia* 2002 ; 73 : 381-385.

304. SUMATHY T., SUBRAMANIAN S., GOVINDASAMY S., BALAKRISHNA K., VELUCHAMY G. Protective role of *Bacopa monniera* on morphine induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research* 2001 ; 15 : 643-645.
305. SUMATHI T., DEVARAJ S.N. Effect of *Bacopa monniera* on liver and kidney toxicity in chronic use of opioids. *Phytomedicine* 2009 ; 16 : 897-903.
306. SUMATHI T., NAYEEM M., BALAKRISHNA K., VELUCHAMY G., NIRANJALI DEVARAJ S. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* reduces the in vitro effects of morphine withdrawal in guinea-pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology* 2002 ; 82 : 75-81.
307. SUMATHI T., BALAKRISHNA K., VELUCHAMY G., DEVARAJ S.N. Inhibitory effect of *Bacopa monniera* on morphine induced pharmacological effects in mice. *Natural Product Sciences* 2007 ; 13(1) : 46-53.
308. RAUF K., SUBHAN F., ABBAS M., BADSHAH A., ULLAH I., ULLAH S. Effect of bacopasides on acquisition and expression of morphine tolerance. *Phytomedicine* 2011.
309. ANBARASI K., SABITHA K.E., SHYAMALA DEVI C.S. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: Protective effect of bacoside A. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005 ; 20 : 345-350.
310. ANBARASI K., VANI G., BALAKRISHNA K., SHYAMALA DEVI C.S. Creatine kinase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: Protective effect of bacoside A. *Vascular Pharmacology* 2005 ; 42 : 57-61.
311. ANBARASI K., VANI G., BALAKRISHNA K., SHYAMALA DEVI C.S. Effect of bacoside A on membrane-bound ATPases in the brain of rats exposed to cigarette smoke. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 2005 ; 19(1) : 59-65.
312. ANBARASI K., VANI G., DEVI C.S. Protective effect of bacoside A on cigarette smoking-induced brain mitochondrial dysfunction in rats (abstract). *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2005 ; 24(3) : 225-234.
313. ANBARASI K., VANI G., BALAKRISHNA K., SHYAMALA DEVI C.S. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sciences* 2006 ; 78 : 1378-1384.
314. ANBARASI K., KATHIRVEL G., VANI G., JAYARAMAN G., SHYAMALA DEVI C.S. Cigarette smoking induces heat shock protein 70 kDa expression and apoptosis in rat brain: modulation by bacoside A. *Neuroscience* 2006 ; 138 : 1127-1135.
315. VIJAYAN V., HELEN A. Protective activity of *Bacopa monniera* Linn. on nicotine-induced toxicity in mice. *Phytotherapy Research* 2007 ; 21 : 378-381.
316. KAR A., PANDA S., BHARTI S. Relative efficacy of three medicinal plant extracts in the alteration of thyroid hormone concentrations in male mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2002 ; 81 : 281-285.
317. MOLIMARD M., CHARBIT B. Initiation à la connaissance du médicament. Collège de Pharmacologie Médicale. Vernazobres-Grego 2008.
318. BOUVENOT G., VRAY M. Essais cliniques, théorie, pratique et critique. Médecine-Sciences Flammarion 2006.

319. ALLAIN P. Les médicaments. CdM 1999.
320. GIRI A.K, KHAN K.A. Chromosome aberrations, sister chromatid exchange and micronuclei formation analysis in mice after in vivo exposure to bacoside A and B. *Cytologia* 1996 ; 61 : 99-103.
321. REICHL F-X. Guide pratique de toxicologie. De Boeck 2010.
322. DEB D.D., KAPOOR P., DIGHE R.P., PADMAJA R., ANAND M.S., D'SOUZA P., DEEPAK M., MURALI B., AGARWAL A. In vitro safety evaluation and anticlastogenic effect of BacoMind™ on human lymphocytes. *Biomedical and Environmental Sciences* 2008 ; 21 : 7-23.
323. SINGH A., SINGH S.K. Evaluation of antifertility potential of Brahmi in male mouse. *Contraception* 2009 ; 79 : 71-79.
324. ASTHANA O.P., SRIVASTAVA J.S., GHATAK A., GAUR S.P.S., DHAWAN B.N. Safety and tolerability of bacosides A and B in healthy human volunteers. *Indian Journal of Pharmacology* 1996 ; 28(1) : 37.
325. PRAVINA K., RAVINDRA K.R., GOUDAR K.S., VINOD D.R., JOSHUA A.J., WASIM P., VENKATESHWARLU K., SAXENA V.S., AMIT A. Safety evaluation of BacoMind™ in healthy volunteers: a phase I study. *Phytomedicine* 2007 ; 14 : 301-308.
326. MUKHERJEE G.D., DEY C.D. Clinical trial on *Brahmi* part I. *Journal of Experimental Medical Sciences* 1966 ; 10(1) : 5-11.
327. GHOSH S., KAR S.K. Clinical trial on *Brahmi* part II. *Journal of Experimental Medical Sciences* 1966 ; 10(1) : 12-13.
328. NATHAN P.J, CLARKE J, LLOYD J, HUTCHISON C.W, DOWNEY L, STOUGH C. The acute effects of an extract of *Bacopa monnieri* (*Brahmi*) on cognitive function in healthy normal subjects. *Human Psychopharmacology Clinical and Experimental* 2001 ; 16 : 345-351.
329. STOUGH C., LLOYD J., CLARKE J., DOWNEY L.A., HUTCHISON C.W., RODGERS T., NATHAN P.J. The chronic effects of an extract of *Bacopa monnieri* (*Brahmi*) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology* 2001 ; 156 : 481-484.
330. ERNST E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomedicine* 2006 ; 13 : 205-208.
331. MAHER B.F., STOUGH C., SHELMEARDINE A., WESNES K., NATHAN P.J. The acute effects of combined administration of *Ginkgo biloba* and *Bacopa monniera* on cognitive function in humans. *Human Psychopharmacology* 2002 ; 17(2) : 163-164.
332. NATHAN P.J., TANNER S., LLOYD J., HARRISON B., CURRAN L., OLIVIER C., STOUGH C. Effects of a combined extract of *Ginkgo biloba* and *Bacopa monniera* on cognitive function in healthy humans. *Human Psychopharmacology* 2004 ; 19(2) : 91-96.
333. STOUGH C., DOWNEY L.A., LLOYD J., SILBER B., REDMAN S., HUTCHISON C., WESNES K., NATHAN P.J. Examining the nootropic effects of a special extract of *Bacopa monniera* on human cognitive functioning: 90 day double-blind placebo-controlled randomized trial. *Phytotherapy Research* 2008 ; 22 : 1629-1634.

- 334.ROODENRYS S, BOOTH D, BULZOMI S, PHIPPS A, MICALLEF C, SMOKER J. Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. Neuropsychopharmacology 2002 ; 27(2) : 279-281.
335. KIDD P.M. A review of nutrients and botanicals in the integrative management of cognitive dysfunction. Alternative Medicine Review 1999 ; 4(3) : 144-161.
336. Anonymous. *Bacopa monniera* , Monograph. Alternative Medicine Review 2004 ; 9(1) : 79-85.
337. GOHIL K.J., PATEL J.A. A review on *Bacopa monniera* : current research and future prospects. Intenational Journal of Green Pharmacy 2010 ; 4(1) : 1.9.
338. HUSAIN G.M., MISHRA D., SINGH P.N., RAO C.V., KUMAR V. Ethnopharmacological review of native traditional medicinal plants for brain disorders. Pharmacognosy Reviews 2007 ; 1(1) : 19-29.
339. SHARMA R., CHATURVEDI C., TEWARI P.V. Efficacy of *Bacopa monnieri* in revitalizing intellectual functyions in children. The Journal of Research Education and Indian Medicinal 1987 : 1-12.
340. NEGI K.S., SINGH Y.D., KUSHWAHA K.P., RASTOGI C.K., RATHI A.K., SRIVASTAVA J.S., ASTHANA O.P., GUPTA C.K. Clinical evaluation of memory enhancing properties of Memory Plus in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. Indian Journal of Psychiatry Supplement 2000 ; 42 (2).
341. USHA P.D., WASIM P., JOSHUA J.A., GEETHARANI P., MURALI B., MAYACHARI A.S., VENKATESHWARLU K., SAXENA V.S., DEEPAK M., AMIT A. BacoMind®: a cognitive enhancer in children requiring individual education programme. Journal of Pharmacology and Toxicology 2008 ; 3(4) : 302-310.
342. RAGHAV S., SINGH H., DALAL P.K., SRIVASTAVA J.S., ASTHANA O.P. Randomized controlled trial of standardized *Bacopa monniera* extract in age-associated memory impairment. Indian Journal of Psychiatry 2006 ; 48(4) : 238-242.
343. CALABRESE C., GREGORY W.L., LEO M., KRAEMER D., BONE K., OKEN B. Effects of a standardized *Bacopa monnieri* extract on cognitive performance, anxiety, and depression in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Journal of Alternative and Complementary Medicine 2008 ; 14(6) : 707-713.
344. MORGAN A., STEVENS J. Does *Bacopa monnieri* improve memory performance in older persons? Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. The Journal of Alternative and Complementary medicine 2010 ; 16(7) : 753-759.
345. YADAV S.K., JAIN A.K., TRIPATHI S.N., GUPTA J.P. Irritable bowel syndrome: therapeutic evaluation of indigenous drugs. Indian Journal of Medical Research 1989 ; 90 : 496-503.
346. DE K., CHANDRA S., MISRA M. Evaluation of the biological effect of *Brahmi* (*Bacopa monnieri* Linn.) extract on the biodistribution of technetium-99m radiopharmaceuticals. Life Science Journal 2008 ; 5(2) : 45-49.

347. DE K., CHANDRA S., MISRA M. Assessment of the effect of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. extract on the labelling of blood elements with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2009 ; 19(3): 664-671.
348. IZZO A.A., ERNST E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs : a systematic Review. *Drugs* 2001 ; 61(15) : 2163-2175.
349. Académie Nationale de Pharmacie. Séance académique ; compte rendu du mercredi 07 avril 2010.

Bibliographie électronique

Partie 1

http://alokapari.free.fr/danses_de_l'inde.html

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Brahm%C4%81>

<http://www.ayur-vedas.com/2010/11/charaka-samhita-introduction/>

<http://www.dentalveda.com/>

<http://www.indiawebmall.com/>

http://www.ayurvediccenter.com/shop/index.php?main_page=product_info&products_id=706

<http://www.lifevantage.com/>

<http://www.helpfulhealthtips.com/bacopa-monniery-information-uses-and-benefits/>

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacopa_monniery_Flower_10.jpg

<http://www.sports-sante.com/index.php/tag/que-prendre-pour-augmenter-les-capacites-de-memorisation>

<http://www.ayurvedaherbalmedicine.com/>

http://www.hallandsbotan.org/bildsidor/2007_januari_april.htm

<http://www.tropica.com/plants/plantdescription.aspx?pid=044>

http://www.mon-herboristerie.com/gelules-bacopa-brahmi-arkogelules-p-847.html?manufacturers_id=17

<http://www.lookfordiagnosis.com/images.php?term=Bacopa&lang=1&from2=24&from=32>

http://lepotager-demesreves.fr/Boutique/product_info.php?products_id=231

<http://www.eol.org/pages/5664483>

<http://lepidoptera.butterflyhouse.com.au/plants/apia/apiaceae.html>

<http://www.efloras.org/index.aspx>

<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://lepidoptera.butterflyhouse.com.au/plants/apia/centella-asiatica.jpg&imgrefurl>

<http://www.eol.org/pages/581713>

<http://www.bacopin.com/>

<http://sis.nlm.nih.gov/chemical.html>

<http://www.chimix.com/an7/bac7/fran73.htm>

<http://www.pharmacie-fleurentin.fr/pages/herboristerie/divers/divers4.html>

<http://www.biotech-ecolo.net/micropropagation-culture-in-vitro.html>

<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transgenese/agrobacterium/agro.htm>

Partie 2

<http://www.quotipharm.com/Archives/Actualites+produits-85/OxyTest-433545.cfm>

<http://www.sidnsante.com/#gammes/gamme-oxytest>

<http://www.lanutrition.fr/bien-dans-son-age/vieillessement/radicaux-libres-antioxydants-et-vieillessement/la-famille-des-radicaux-libres.html>

<http://maketechnologies.com/gotlegacy/tag/skinner-box/>

http://www.bioseb.com/bioseb/francais/default/item_id=41_cat_id= Boites%20de%20Skinner.php

<http://www.ymedical.com/>

<http://www.bioprobeshk.com/>

<http://www.medicalfacts.nl/2009/08/03/een-moleculaire-hoofdschakelaar-voor-de-overgang-van-eicel-naar-embryo/>

<http://www.ugobasileusa.com/uploads/ds47700.pdf>

http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2003/DupertuisYM/these_body.html

Partie 3

<http://eur-lex.europa.eu/fr/index.htm>

<http://www.ansespro.fr/nutrivigilance/>

<http://www.arkopharma.fr/produits/complements-alimentaires/arkogelules-bacopa.html>

<http://www.efsa.europa.eu/fr/>

<http://www.worldgastroenterology.org/>

Vu, le Président du jury,

Nicole GRIMAUD

Vu, le Directeur de thèse,

Claire SALLENAVE-NAMONT

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom - Prénom : Zonfrillo Boris

Titre de la thèse : Le bacopa, *Bacopa monnieri* L.

Résumé de la thèse :

Le bacopa (*Bacopa monnieri* L.) est une petite plante succulente, rampante et très ramifiée de la famille des Plantaginacées, commune dans les zones chaudes et humides du globe où elle pousse à proximité des points d'eau. Connu sous le nom de *Brahmi*, le bacopa possède une tradition d'utilisation de plus de 3000 ans dans la médecine ayurvédique et intervient dans de nombreuses formulations destinées notamment à améliorer les facultés cognitives et à promouvoir une longue vie saine et un rajeunissement. Des études ont montré qu'il est doué de propriétés antioxydantes intéressantes et qu'il manifeste, chez l'homme comme chez l'animal, des effets facilitateurs sur les processus d'apprentissage et de mémorisation. Diverses autres activités biologiques prometteuses ont été rapportées mais méritent, pour la plupart, d'être plus amplement investiguées. Les principes actifs sont des saponosides triterpéniques, essentiellement le bacoside A. La bonne tolérance générale et l'absence de toxicité particulière, en l'état actuel des connaissances, permettent d'assurer la sécurité des consommateurs de compléments alimentaires à base de bacopa.

MOTS CLÉS : BACOPA MONNIERI, BACOSIDES, ANTIOXYDANT, COGNITION, MÉDECINE AYURVÉDIQUE

JURY

PRÉSIDENT : Mme Nicole GRIMAUD, Maître de Conférences de Pharmacologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mme Claire SALLENAVE-NAMONT, Maître de Conférences de
Botanique et de Mycologie
Faculté de Pharmacie de Nantes
Mme Bernadette MASSONNET, Docteur en Pharmacie
48 rue Alsace-Lorraine, 44400 REZÉ

Adresse de l'auteur : 1 rue Adolphe Moitié, 44000 NANTES