

TABLES DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	i
LISTE DES FIGURES	ii
LISTE DES TABLEAUX	iii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	iv
I- INTRODUCTION.....	1
II- MATERIELS ET METHODES.....	7
A. PARTIE CHIMIQUE.....	7
1. Préparation de l'extrait.....	7
2. Criblage phytochimique.....	7
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	9
1. Animaux d'expérimentation.....	9
2. Préparation de la solution de Tyrode.....	9
3. Etude de l'effet de l'extrait Fdag01 sur la suffocation provoquée par l'histamine	9
4. Etude de l'effet de l'extrait Fdag01 sur la trachée isolée.....	10
5. Etude du mécanisme d'action de l'extrait Fdag01.....	10
C. EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS.....	10
III- RESULTATS	11
A. PARTIE CHIMIQUE.....	11
1. Rendement de l'extraction.....	11
2. Résultats du criblage phytochimique.....	11
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	12
1. Effet de l'extrait Fdag01 sur la suffocation provoquée par l'histamine.....	12
2. Effet de l'extrait Fdag01 sur la trachée isolée	13
3. Mécanisme d'action de l'extrait Fdag01	14
IV- DISCUSSION	15
V- CONCLUSION.....	17
BIBLIOGRAPHIE.....	18

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Variation du temps d'apparition de la détresse respiratoire provoquée par la pulvérisation d'une d'histamine 5%	12
Figure 2. Variation du relâchement de la trachée contractée par l'histamine en fonction de l'extrait injecté dans le bain d'une façon cumulative	13
Figure 3. Variation de la contraction de la trachée isolée de cobaye en fonction de la concentration de l'histamine dans le bain en absence et présence de l'extrait aux concentrations de 100 et 200 μ g/ml	14

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Tests réalisés pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait Fdag01	8
Tableau II. Composition de la solution de Tyrode dans un litre d'eau distillée	9
Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait et leur teneur.....	11

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

- CHRD** : Centre Hospitaliers de Références de District
- CHU** : Centre Hospitaliers Universitaire
- coll.** : Collaborateurs
- DIANA** : DIégo Ambilobe Nosy-Be Ambanja
- Emax** : Effet maximal
- e.s.m** : Ecart-Type Standard à la Moyenne
- h** : Heure
- H₁** : Récepteur histaminique de type 1
- Hist** : Histamine
- IgE** : Immunoglobine E
- ISAAC** : International Study of Asthma and Allergies in Childhood
- LPGPC** : Laboratoire de Pharmacologie Générale et Pharmacocinétique et de Cosmétologie
- M** : Concentration molaire
- M₃** : Récepteur muscarinique de type 3
- ml** : Millilitre
- mm** : Millimètre
- mg/kg** : Milligramme par kilogramme
- mg/ml** : Milligramme par millilitre
- n** : Nombre d'animaux utilisés
- NANC** : Non Adrénergique Non Cholinergique
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- P** : Probabilité

sec : Seconde

USFR : Unité de Soins de Formation et de Recherche

°C : Degré Celsius

% : Pourcent

µg/ml : Microgramme par millilitre

± : Plus ou moins

< : Inférieur à

IgE : Immunoglobine E

INTRODUCTION

I- INTRODUCTION

De nombreuses maladies frappent l'humanité avec différentes proportions. L'asthme en fait partie et prend de l'ampleur ces dernières décennies (NICOLAS J.P., 2013). C'est une maladie de disfonctionnement respiratoire qui a toujours existé. Sa prévalence ne cesse d'augmenter durant les années 1980 et 1990, elle a augmenté de 1% par année depuis 1980 (LAJOIE P. et coll., 2013). Les facteurs environnementaux, notamment la pollution y jouent sans doute un rôle important (BOUVENOT G et coll., 1993 ; RANABIR P et coll., 2013). L'OMS estime que l'asthme affecte près de 300 millions d'individus dans le monde en 2011 (Global initiative for l'asthme, 2011). Il touche toutes les tranches d'âge, mais la prévalence est plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte, soit 1,1 et 0,8% respectivement par an (AUBIER et coll., 2005; MATILONY Y., 2001). Par ailleurs, la prévalence de l'asthme chez l'enfant varie considérablement d'un pays à l'autre (RANABIR P et coll., 2013). Ce sont les pays anglophones qui sont les plus touchés. Aux Etats-Unis, entre 1985 et 1994, la proportion de patients asthmatiques âgés de moins de 18 ans est passée de 4,7 à 7,0% (MAGNUS P. et JAAKKOLA J.J., 1997 ; NYSTAD W. et coll., 1997). En 2010 la prévalence atteint 17% au Royaume-Uni (RANABIR P et coll., 2013). En France, en 2001, la prévalence de l'asthme était de 2,6% chez les enfants de 6-7 ans et de 6,6% chez les enfants de 13-14ans. Chez les adultes, elle varie de 2,9 à 4,6% et chez les personnes âgées de plus de 65ans, elle est de 2,8% (GUIN E., 2001). En 2010, la prévalence cumulée de l'asthme était de 10% chez les enfants âgés de moins de 10 ans. Tandis que l'Europe de l'Est, la Chine et l'Indonésie sont inclus dans la zone de faible prévalence (1-7%) (RANABIR P. et coll., 2013).

Bien que la prévalence soit plus élevée dans les pays développés, les pays en développement ne sont pas épargnés (LEMANSKE RF-JR et coll., 1997). Les maladies respiratoires chroniques sont surtout liées au comportement, au mode vie et à l'environnement, au tabagisme, aux pollutions domestiques, professionnelles et atmosphériques (CHARPIN D. et coll., 1997). D'après l'étude d'ISAAC, c'est au Nigeria, au Paraguay et en Malte que l'on observe les plus fortes prévalences, avec un facteur 30 entre les valeurs extrême (1,4 à 39,7%) (STRACHAN D. et coll., 1997 ; ISAAC Streering Committe Anonym., 1998).

En Afrique, comme dans les autres pays du monde, la prévalence de l'asthme a augmenté au cours de ces dernières années. À la côte d'Ivoire par exemple, elle était à 10% en 2000 (KOFFI N. et coll., 2009). Au Burkina Faso, elle était de 9,6% chez les sujets âgés de 15 à 64 ans en 1998 (MININGOU S.D. et coll., 2002). A Madagascar en 2012, l'asthme faisait partie des dix maladies principales, avec une prévalence de 2,3% (Annuaire des statistiques du

Secteur santé de Madagascar, 2012). D'après les données de l'USFR en Pneumologie du CHU d'Antananarivo, les maladies respiratoires chroniques constituent 22% des maladies recensées dans l'unité en 2006 avec une prédominance de l'asthme (RALAINIRINA P.R., 2013).

L'asthme est une maladie chronique des voies respiratoires, caractérisée par une bronchoconstriction aiguë immédiate suivie d'une hyper réactivité broncho-pulmonaire accompagnée d'une inflammation, d'une production de mucus et d'une augmentation d'IgE sérique. Les symptômes peuvent se manifester plusieurs fois par jour ou par semaine et s'aggravent chez certains sujets lors d'un effort physique ou pendant la nuit (MININGOU S.D. et coll., 2002).

L'arbre bronchique assure la filtration de l'air inhalé, son fonctionnement est assuré par une régulation nerveuse et hormonale qui permet l'adaptation physiologique de son diamètre : c'est le tonus bronchique de base. La sécrétion bronchique est assurée par les glandes sous-muqueuses, elle humidifie les voies respiratoires et participe à la défense muco-ciliaire. Les contrôles nerveux des voies respiratoires sont assurés par la voie efférente parasympathique excitatrice, et des fibres sympathiques et non-adrénergique non-cholinergique, qui peuvent être excitatrices ou inhibitrices (RANG E. et coll., 2003). Les récepteurs cholinergiques muscariniques de type M3 sont localisés sur le muscle lisse bronchique et les glandes. Ils sont les responsables de la bronchoconstriction et la sécrétion glandulaire (RANG E. et coll., 2003). Tandis que les récepteurs adrénérergiques β_2 qui se trouvent au niveau des muscles lisses, l'épithélium, les glandes et les cellules mastocytaires de la voie respiratoire sont responsables de la bronchodilatation, de l'inhibition de la libération de médiateurs par les mastocytes et de l'accroissement de la clairance muco-ciliaire. Pour le système non adrénérergique non cholinergique (NANC), sa stimulation libère des neuropeptides bronchodilatateurs tel que le Vaso Intestinal Peptide ou broncho-constricteurs tels que les tachykinines (substance P, neurokinine A et B) (GILHODE O. et coll., 1994).

L'hyper réactivité bronchique et l'inflammation des voies respiratoires entraînent des épisodes répétés d'essoufflement, d'oppression thoracique et de toux. Ces symptômes sont généralement associés à une obstruction bronchique. Les asthmatiques ont habituellement une réduction du volume expiratoire forcé aussi bien qu'une réduction du débit respiratoire (MININGOU S.D. et coll., 2013 ; DIDIER A. et coll., 2011).

Les causes de l'asthme sont classées en deux catégories : les facteurs inflammatoires et les facteurs irritants. Les facteurs inflammatoires sont les allergènes (poils de chat ou de chien, moisissures, acariens ou pollen) ou les infections ; ils contribuent à la sensibilisation des voies respiratoires et provoquent l'asthme. Tandis que les facteurs irritants comme l'air froid, le changement brusque de température, la fumée de cigarette, les fortes odeurs, la mauvaise qualité de l'air intérieur et extérieur, et les exercices physiques entraînent une bronchoconstriction. Ces symptômes sont généralement immédiats, de courte durée et réversibles, mais peuvent être incommodants (LAJOIE P. et coll., 2013). Par ailleurs, le facteur génétique est non négligeable dans l'apparition de la crise l'asthme (BOUSQUET J. et coll., 2001 ; DIDIER A. et coll., 2011). Bien que l'origine de l'asthme soit multifactorielle, la plupart des asthmatiques ont un taux élevé d'immunoglobulines de type E (IgE) et des anticorps allergènes spécifiques. Ce qui permet de classer l'asthme en deux sous types : l'asthme allergique et l'asthme non allergique. Tous les deux sont caractérisés par une inflammation importante de la muqueuse bronchique, par la présence de lymphocytes T activés, et par un taux élevé de chimiokines et de cytokines (BUSSE W.W. et coll., 2001). Les études épidémiologiques de BRUNTON L. et ses collaborateurs (2005), ont rapporté que dans l'asthme allergique le taux d'IgE est très élevé. Tandis que l'asthme non allergique, se distingue par l'absence d'IgE allergène spécifique et une accumulation de macrophages au niveau de la muqueuse bronchique.

La réaction asthmatique se passe en deux phases : une phase de réaction précoce et une phase de réaction tardive. La phase précoce commence 15 à 30 min après l'inhalation de l'allergène. Elle est caractérisée par une bronchoconstriction et une inflammation bronchique due à l'allergène et l'IgE, fixée sur leur récepteur à la surface des mastocytes, basophiles et des macrophages. Les mastocytes, les basophiles et les macrophages activés libèrent rapidement les médiateurs de l'inflammation, principalement de l'histamine. Cette dernière provoque une contraction du muscle lisse, une sécrétion de mucus et une vasodilatation à l'origine de l'œdème de la paroi bronchique et de l'exsudation dans la lumière des voies aériennes (BOUSQUET J. et coll., 2000 ; GILHODES O. coll., 1994). La réaction tardive est accompagnée d'une infiltration cellulaire polymorphe dans la paroi bronchique comprenant les éosinophiles, les lymphocytes T, les basophiles, les neutrophiles, et les macrophages. Cette infiltration inflammatoire résulte de l'activation des cellules résidentes des bronches : les mastocytes, les macrophages et les cellules épithéliales lors de la phase de réaction précoce (BOUSQUET J. et coll., 2000)

Les formes cliniques de l'asthme peuvent être aigües ou chroniques. L'asthme chronique est caractérisé par des attaques intermittentes de dyspnée réversible et de toux. Tandis que l'asthme aigu sévère ou l'état critique de l'asthme, peut être fatal et n'est pas facilement réversible (RANG L. et coll., 2003).

Le traitement de l'asthme consiste à arrêter la crise, prévenir l'état de mal ou prévenir le passage à la chronicité. La pharmacothérapie de l'asthme fait appel à des médicaments qui réduisent le bronchospasme et des médicaments qui réduisent l'inflammation des voies respiratoires (MINIGOU S.D. et coll., 2002)

D'une part, ceux qui réduisent le bronchospasme sont les bronchodilatateurs comme les analogues de la Noradrénaline : les bêta-2 adrénergiques qui provoquent un relâchement du muscle lisse bronchique par la production d'AMPc et une diminution de la dégranulation mastocytaire. Il existe deux types : les β_2 adrénergiques de courte durée d'action 4 à 6h, par exemple le SALBUTAMOL[®] (DOMINIQUE W., 1997), et les β_2 adrénergiques de longue durée d'action supérieure de 12h, par exemple la FORMOTEROL[®], SALMETEROL[®]. Les deuxièmes bronchodilatateurs sont les anticholinergiques qui agissent sur les récepteurs muscariniques de type M3 exemple IPRATROPIUM[®], OXITROPIUM Bromide[®] (DOMINIQUE W., 2002). Et les inhibiteurs des phosphodiésterases provoquent une bronchodilatation en augmentant le taux de l'AMPc au niveau du muscle lisse, par exemple la THEOPHILLINE[®] et ses dérivés. Les groupes de médicament anti-dégranulants mastocytaires sont représentés par les cromones, par exemple : l'Acide cromoglicique, TILADE[®]. Ils bloquent l'entrée du calcium dans le cytoplasme des basophiles et des mastocytes, et empêchent ainsi la libération de l'histamine responsable de la bronchoconstriction (MININGO S.D. et coll., 2002).

D'autre part, ceux qui réduisent l'inflammation comme les anti-leucotriènes, les anti-inflammatoires stéroïdiens et les corticoïdes. Dans le groupe des anti-leucotriènes, on distingue les antagonistes des récepteurs CysT1 (ACCOLATE[®], ZAFIRLUKAST[®]) et les inhibiteurs de la synthèse des leucotriènes (ZILEUTON[®], ZYFLO[®]). Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes inhibent la synthèse des protéines pro-inflammatoires : les cytokines et les chimiokines. Ils induisent la synthèse de la lipocortine qui inhibe l'infiltration cellulaire, réduisant ainsi l'hyperréactivité bronchique ; par exemple le PREDNISOLNE[®], DEXAMETHASONE[®], BECLMETHASONE[®].

Et enfin, les inhibiteurs d'immunoglobuline E : exemple l'omalizumab (XOLAIR®) c'est un anticorps monoclonal dirigé contre les IgE. Sa liaison avec l'IgE provoque la non reconnaissance de l'IgE par ses récepteurs sur les mastocytes et les basophiles. Cette action prévient la réaction allergique dans sa phase précoce (BRUNTON L et coll., 2005).

Dans les pays en voie de développement, beaucoup de patients trouvent les médicaments essentiels au traitement de l'asthme trop chers, et utilisent la médecine traditionnelle (MINIGO S.D. et coll., 2002). L'utilisation des médicaments à base de plantes pour se soigner est toujours courante. D'après les études menées par NEWMAN D.J. et CRAGG G.M. en 2007, deux tiers des médicaments sont d'origine végétale.

Plusieurs plantes médicinales sont connues pour leur vertu antiasthmaticque. Une décoction de *Crescentia cujet* L (BIGNONIACEAE) prise 6 fois/jour est réputée pour soulager une crise d'asthme, et l'infusion de feuilles d'*Acacia cornigera* (FABACEAE) pendant 10min, prise 3 tasses par jour soulage également la crise d'asthme. *Eupatorium morifolium* (ASTERACEAE) est utilisé contre la crise d'asthme aux Etats Unis (ROSITA A. et coll., 1993). En France, l'extrait de bourgeons de Cassis (*Ribes nigrum*) (GROSSULARIACEAE) possède un effet thérapeutique qui rappelle celui des corticoïdes, mais sans effets secondaires. Dans la médecine traditionnelle chinoise, l'*Ephedra sinica* (EPHEDRACEAE) qui contient des alcaloïdes (l'éphédrine) est utilisée depuis 5000 ans contre l'asthme et les crises de bronchite aiguë. Au Japon, la ronce sucrée de chine (*Rubus suavissimus*) (ROSACEAE) est utilisée comme un anti-inflammatoire et aussi un anti allergique grâce aux tanins qu'elle renferme. En Inde, *Tylophora astmatica* (ou *indica*) (APOCYNACEAE) plante toxique contenant des alcaloïdes dont la tylophorine, fait partie de la pharmacopée indienne depuis longtemps, elle possède des propriétés anti inflammatoire et anti-allergique. Le gingembre (*Zingibier officinale*) (ZINGIBERACEAE) est très utilisé en Inde pour son pouvoir anti-inflammatoire. Des essais cliniques montrent que son extrait hydroalcoolique standardisé peut améliorer les performances respiratoires des personnes avec un asthme modéré. L'Euphorbe (*Euphorbia hirta*) (EUPHORBIACEAE) est utilisée en décoction antiasthmaticque au Burkina Faso, au Nigeria et dans plusieurs pays d'Asie (MULLER J-N., 2009).

A Madagascar le décocté de l'écorce de *Harongana madagascariensis* (HYPERICACEAE) est utilisé contre les crises d'asthme et contre les toux avec expectoration sanguinolente. La décoction de *Lygodium lanceolatum* (fadrikakanga) (LYGODIACEAE) utilisée contre les crises d'asthme (NICOLAS J-P., 2013). Le décocté des feuilles et racines de *Gomphocarpus*

fruticosus (fandemy) (ASCLEPIADACEAE), est utilisé dans le traitement de l'asthme aussi. Dans la partie Nord de Madagascar la décoction des feuilles de *Tetracera madagascariensis* (vahimaràgna ou laingomantatsimo) (DILLENACEAE) est utilisée pour soigner l'asthme, les affections gynécologiques, la fièvre et paludisme (NICOLAS J-P., 2013). Et le *Senna alata* (quatre épingles) (FABACEAE) est utilisé pour soigner l'asthme et la bronchite.

D'après les enquêtes ethno-pharmacologiques que nous avons effectuées dans la région nord de Madagascar (DIANA) dans le District d'Ambilobe, l'utilisation des plantes médicinales pour soigner les problèmes respiratoires est encore courante. Plusieurs plantes sont utilisées contre ces problèmes dans cette région, et nous en avons choisi une (Fdag01). L'écorce de cette plante est préparée soit en décoction soit sous forme de cigarette et on la fume pour soulager une crise d'étouffement.

En analysant les données que nous avons récoltées, nous avons émis une hypothèse que cette plante pourrait avoir une activité anti asthmatique. Pour étudier l'activité de cette plante, des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués chez le cobaye.

MATERIELS

ET

METHODES

II-MATERIELS ET METHODES

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Deux cent cinquante grammes d'écorce ont été récoltés dans le district d'Ambilobe le mois de janvier 2016. Ce matériel végétal a été séché à l'ombre dans un endroit aéré, à la température ambiante. Une fois séché, il a été broyé avec un broyeur à marteau au Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC), à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. La poudre obtenue a été macérée dans un mélange éthanol-eau (60 : 40) pendant 72 heures à la température ambiante, en agitant 3 fois par jour. Le macérât a ensuite été filtré sur du coton hydrophile. Puis le filtrat a été évaporé à la température de 80°C. L'extrait obtenu a été codé Fdag01 puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction selon la formule :

$$R(\%) = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de la poudre}} \times 100$$

2. Criblage phytochimique

Celle-ci est indispensable pour déterminer les familles chimiques dans l'extrait de la plante à étudier. La méthode décrite par FONG H.H.S. et ses collaborateurs en 1977 a été utilisée. La famille chimique et les réactifs correspondants réagissent pour donner des complexes insolubles ou colorés (FONG H.H.S. et coll., 1977) (Tableau I).

La teneur en famille chimique observée a été exprimée sous forme de signe :

Absence : (-)

Présence très faible : (±)

Présence faible : (+)

Présence moyenne : (++)

Présence forte : (+++)

Tableau I. Tests réalisés pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait Fdag01.

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observations
ALCALOÏDES		DRAGENDORFF, MAYER, WAGNER	Précipitation
TANINS		Gélatine + NaCl	Précipitation verte
		Gélatine + FeCl ₃ Méthanol	Précipitation bleue
COMPOSES PHENOLIQUES		Gélatine 1%	Précipitation
STEROÏDES ET TRITERPENES	LIERMAN BURCHARD	Anhydride acétique + H ₂ SO ₄	Coloration violette
	BADGET KEDDE	Acide picrique	Coloration rouge
	SALKOWSKI	H ₂ SO ₄	Anneau de séparation rouge
FLAVONOÏDES	WIL-STATER	Ruban de Mg + HCl concentré	Coloration rouge
LEUCOANTHOCYANES	BATH-SMITH	HCl concentré+bain marie	Coloration rouge violacée
ANTHOCYANES		HCl à froid	Coloration rouge
POLYSACCHARIDES		+ 3Volumes d'éthanol	Trouble
SUCRES REDUCTEURS		Liqueur de Fehling+ Bain-marie	Précipitation rouge brique
COUMARINES		NaOH 10%	Fluorescence à l'UV
SAPONINES	MOUSSE	HCl + Agitation	Persistance d'une mousse (3cm d'épaisseur) après 30mn

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

L'activité de l'extrait Fdag01 a été étudiée *in vivo* et *in vitro*. Son effet sur la suffocation provoquée par l'histamine a été évalué *in vivo*, tandis que son effet sur le muscle bronchique a été étudié *in vitro* sur la trachée isolée de cobaye.

1- Animaux d'expérimentation

Des cobayes sans distinctions de sexes âgés de 3 mois environ, pesant entre 172 à 269g ont été utilisés. Ils ont été élevés à l'animalerie du L.P.G.P.C avec 12/12H de cycle de lumière et d'obscurité et à la température ambiante. Ils ont été nourris avec des feuilles fraîches de graminées. Ces animaux ont été mis à jeun pendant 12 heures avant chaque manipulation.

2- Préparation de la solution de Tyrode

Pour effectuer les tests *in vitro*, l'organe a été placé dans un bain constitué d'une solution de survie de Tyrode (Tableau II).

Tableau II. Composition de la solution de Tyrode dans 1litre d'eau distillée

Ingrédients	NaCl	KCl	MgCl ₂	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄	Glucose	CaCl ₂
Concentration (mM)	137	2,7	1	11,9	0,40	11,1	2,5

3- Etude de l'effet de l'extrait Fdag01 sur la suffocation provoquée par l'histamine

Des animaux sensibles à l'histamine ont été utilisés pour effectuer ce test. Pour les sélectionner, un test préliminaire a été effectué. Les cobayes ont été placés dans une enceinte fermée de 24cm de hauteur et de 28cm de diamètre, puis une solution d'histamine 5% y a été pulvérisée. Ceux qui ont manifesté un signe d'étouffement en moins de 5 min ont été considérés comme sensibles à l'histamine et retenus pour le test (KUMAR D. et coll., 2010). Les cobayes sélectionnés ont été répartis en 3 lots : 1 lot témoin et 2 lots traités avec l'extrait. Les animaux du lot 1 ont reçu 10ml/kg d'eau distillée administrée par voie orale, et ceux des 2 autres ont reçu l'extrait par voie orale aux doses de 50 et 150 mg/kg respectivement. Une heure après l'administration, un représentant des trois lots ont été placés dans l'enceinte fermée (STEPHEN O. et coll., 2012 ; KUMAR D. et coll., 2010). Puis une solution d'histamine 5% a été pulvérisée dans l'enceinte. Le temps mis par chaque animal pour montrer un signe de détresse respiratoire a été chronométré et enregistré (STEPHEN O. et coll., 2012).

4- Etude de l'effet de l'extrait Fdag01 sur la trachée isolée

L'effet de l'extrait sur la trachée a été étudié par son effet sur la contraction provoquée par l'Histamine.

Des cobayes mis à jeun pendant 12 heures ont été utilisés. L'animal a été euthanasié puis exsanguiné, une thoracotomie a été effectuée, puis la trachée a été isolée et placée dans une boîte de pétri contenant une solution de Tyrode. L'organe a été nettoyé en enlevant les tissus conjonctifs, adipeux et les mésentères. Puis il a été découpé en anneaux de 2 cm de longueur. Chaque anneau a été découpé en spirale, puis montée dans une cuve à organe contenant 20 ml de solution de Tyrode maintenue à la température de 37°C et aérée avec de l'air à l'aide d'un aérateur électrique. Une extrémité de l'organe a été fixé au fond de la cuve à organe, et l'autre a été reliée à un stylet enregistreur avec une contre poids de 1,5 g (BRUNELLESCHI S. et coll., 1987). L'organe a été laissé s'équilibrer pendant 45 min tout en renouvelant le milieu de survie toutes les 15 min. Pendant cette période, la tension du l'organe a été réajustée. Ensuite un test de viabilité et de sensibilisation a été effectué avec l'histamine à la concentration de 10^{-4} M dans le bain. Après ce test, la solution de Tyrode a été renouvelée et la trachée a été laissée se stabiliser pendant 45min et sa tension a été réajustée. A la fin de cette période, l'histamine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative pour réaliser des concentrations croissantes à partir de 10^{-10} M dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de l'organe. Lorsque le plateau de contraction a été atteinte, l'extrait Fdag01 a été injecté dans le bain de façon cumulative pour réaliser des concentrations croissantes jusqu'au relâchement total de l'organe contracté par l'histamine (BIGONIYAL P. et coll., 2008).

5- Etude du mécanisme d'action de l'extrait Fdag01

Pour étudier le mécanisme d'action de l'extrait, la trachée isolée de cobaye a été pré incubée pendant 10 minutes dans un bain contenant l'extrait aux concentrations de 100 et 200µg/ml dans le bain, puis contractée avec l'histamine injectée dans le bain de façon cumulative, jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de l'organe (KULKARNI S.K., 2005).

C. EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS Les résultats obtenus ont été exprimés en moyenne \pm écarts types réduits ($m \pm e.s.m$). Les moyennes ont été comparées entre elles en utilisant le *t*-test de Student avec un degré de signification ($P < 0,05$).

RESULTATS

III- RESULTATS

A- PARTIE CHIMIE

1- Rendement de l'extraction

Avec les 250g de poudre d'écorce du Fdag01 macérés dans le mélange éthanol-eau (60 : 40), 28 g d'extrait sont obtenus, ce qui donne un rendement de 11,2%.

2- Résultats du criblage phytochimique

Le criblage chimique effectué sur Fdag01 révèle la présence d'alcaloïdes en forte teneur, de tanins, de stéroïdes, de triterpènes, de saponines et de flavonoïdes en teneur moyenne ; les anthocyanes et les sucres réducteurs y sont présents en faible teneur et enfin les polysaccharides en très faible teneur (Tableau III).

Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait Fdag01 et leur teneur

FAMILLES CHIMIQUES	TENEUR
ALCALOÏDES	+++
TANINS	++
STEROÏDES ET TRITERPENES	++
SAPONINES	++
FALAVONOÏDES	++
ANTHOCYANES	+
SUCRES REDUCTEURS	+
POLYSACCHARIDES	±

B- PARTIE PHARMACOLOGIQUE

1. Effet de l'extrait Fdag01 sur la suffocation provoquée par l'histamine

L'administration de l'extrait Fdag01 par voie orale chez les cobayes augmente le temps d'apparition de détresse respiratoire provoquée par la pulvérisation d'histamine chez ces animaux. L'apparition de la détresse augmente avec la dose administrée, chez les témoins il est égal à $129,33 \pm 13,77$ secondes contre $189 \pm 40,66$ et $261,67 \pm 32,22$ secondes chez les animaux ayant reçu l'extrait aux doses respectives de 50 et 150 mg/kg ($P < 0,05$) (Figure 1).

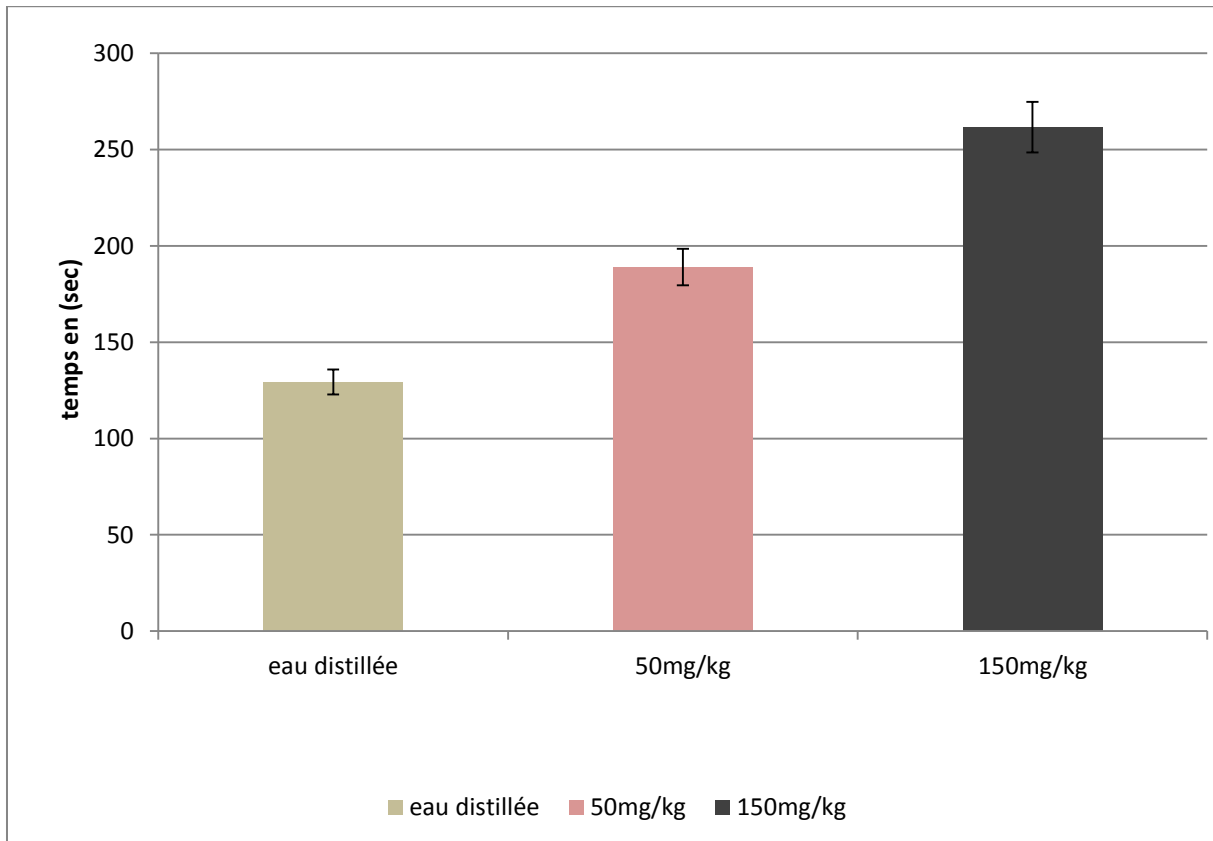


Figure 1. Variation du temps d'apparition de la détresse respiratoire provoquée par la pulvérisation d'une solution d'histamine 5% chez les témoins et les animaux traités avec l'extrait de l'e l'extrait Fdag01, administré par voie orale aux doses respectives de 50 et 150 mg/kg ($\bar{x} \pm e.s.m$; $n = 5$; $P < 0,05$).

2. Effet de l'extrait Fdag01 sur la trachée isolée

L'injection d'histamine de façon cumulative augmente sa concentration dans le bain. Cette concentration croissante provoque une contraction de la trachée, dont l'amplitude augmente en fonction de la concentration. En injectant l'extrait FDag01 dans le bain, il relâche la trachée contractée par l'histamine à partir de 0,01mg/ml. Ce relâchement augmente avec la concentration de l'extrait dans le bain. Il est total à 0,04mg/ml et la CE50 de l'extrait est égale 0,014 mg/ml (Figure 2).

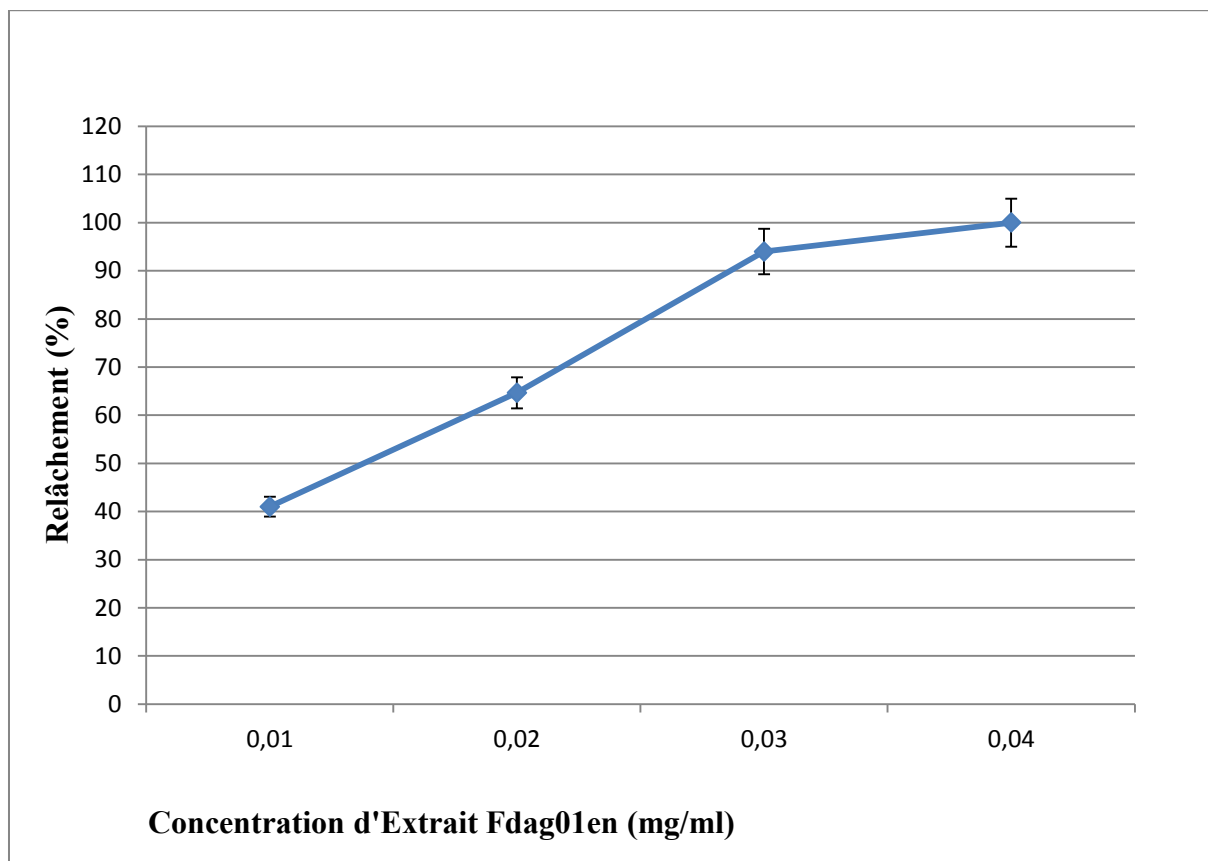


Figure 2. Variation du relâchement de la trachée contractée par l'histamine en fonction de la concentration de l'extrait Fdag01 injecté dans le bain de façon cumulative ($m \pm e.s.m$; $n= 5$).

3. Mécanisme d'action de l'extrait Fdag01

L'injection de l'histamine dans le bain d'une manière cumulative provoque une contraction croissante de la trachée isolée de cobaye. À 10^{-8} M, la contraction de la trachée atteint à sa maximale 100% (E_{max}), avec une CE_{50} est égale à 4.10^{-10} M. En présence de l'extrait aux concentrations de 100 et 200 μ g/ml, l'effet maximal de l'histamine est réduit de 100% à $65,55 \pm 0,27\%$ et $35 \pm 0,12\%$ respectivement, et la CE_{50} passe de 4.10^{-10} M à $1,4.10^{-9}$ M et 2.10^{-9} M respectivement ($P < 0,05$) (Figure 3).

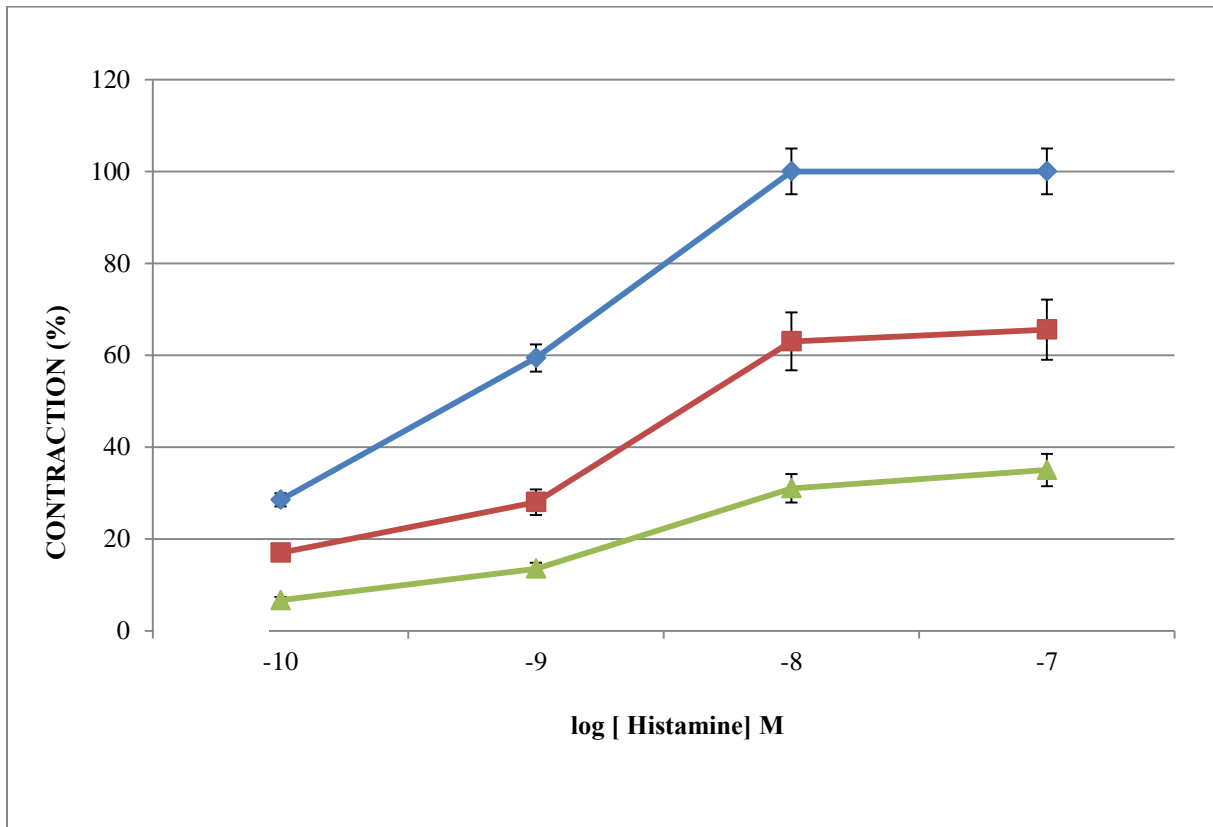


Figure 3. Variation de la contraction de la trachée isolée de cobaye en fonction de la concentration de l'histamine dans le bain, en absence ■ et en présence de l'extrait aux concentrations de 100 ■ 200 μ g/ml ■ ($m \pm e.s.m$; $n = 5$; $P < 0,05$).

DISCUSSION

IV- DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'activité d'une plante utilisée dans la médecine traditionnelle dans la prise en charge de détresse respiratoire que les gens décrivent comme crise d'asthme. Un extrait hydro alcoolique des feuilles de cette plante a été utilisé, et il a été testé *in vivo* contre la détresse respiratoire provoquée par l'histamine, chez le cobaye. Son mécanisme d'action a été étudié *in vitro* avec la trachée isolée de cobaye. Le cochon d'inde a été choisi comme animal d'expérimentation parce que c'est une espèce sensible à l'histamine (PRACHI S. et coll., 2014). Les principaux agents contracturant au niveau du muscle lisse bronchique sont l'acétylcholine en se fixant sur son récepteur M3 et l'Histamine en se fixant sur son récepteur H1 (RANG E. et coll., 2003 ; ANBU J.S.S. et coll., 2010), et nous avons choisi l'histamine pour réaliser nos tests, parce qu'elle entre dans le déclenchement de la crise d'asthme (BOUSQUET J. et coll., 2001).

Nous avons étudié l'effet de l'extrait Fdag01 sur la gêne respiratoire provoquée par l'histamine qui se traduit par une convulsion chez les cobayes (KUMAR D. et coll., 2010). L'activité de l'extrait a été étudiée en chronométrant le temps d'apparition de ces signes. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'administration de l'extrait chez les animaux, retarde l'apparition de ces signes de suffocation chez les animaux traités avec l'extrait par rapport aux animaux témoins. PRACHI S. et PRIYANKA S. (2014) ont utilisés la même méthode que nous, et ils ont aussi trouvé que l'extrait des feuilles d'*Acorus Calamus* augmente le temps d'apparition des signes de suffocation, et ils ont rapports que cette augmentation de temps d'apparition de suffocation est due à la protection de l'extrait vis-à-vis de l'effet contracturant de l'Histamine. Ce qui nous permet d'avancer l'hypothèse que l'extrait Fdag01 protège les animaux contre l'action de l'histamine. Une autre hypothèse serait que l'extrait protège les animaux contre la bronchoconstriction provoquée par l'histamine.

Deux cas peuvent être envisagés, soit l'extrait provoque une broncho-dilatation, soit il inhibe la libération de l'histamine. Dans notre test, nous avons utilisé de l'histamine exogène, ce qui nous permet d'écarter l'inhibition de la dégranulation et dire qu'il pourrait provoquer une broncho-relaxante. Pour vérifier cette hypothèse des études *in vitro* ont été effectuées sur la trachée isolée de cobaye, en utilisant l'histamine comme agent contracturant.

Les résultats des tests *in vitro* montrent que l'extrait relâche la trachée contractée par l'histamine. Ceci confirme l'hypothèse précédente que l'extrait Fdag01 possède une activité

bronchodilatatrice. Et pour étudier cette activité, nous avons pré incubé la trachée dans un bain contenant l'extrait Fdag01 avant de la contracter avec l'histamine. En augmentant la concentration de l'extrait dans le bain l'effet maximal de l'histamine n'est plus atteint, et sa CE₅₀ augmente. Ces résultats sont caractéristiques d'un antagonisme non compétitif (PRAVIN S. et coll., 2014), cela veut dire que l'extrait n'occupe pas les récepteurs H1 de l'histamine.

Dans ce cas, nous pouvons avancer deux mécanismes pour expliquer le relâchement des muscles bronchiques provoqué par l'extrait Fdag01, soit il stimule les récepteurs β 2 adrénergiques, soit il inhibe les récepteurs cholinergiques M3.

Par ailleurs, lorsque KOFFI N. G. et ses collaborateurs (2009) ont étudié l'activité de l'extrait de *Boerhavia diffusa L.*, ont rapporté que les alcaloïdes dans cet extrait provoquent une broncho-dilatation. D'après l'étude *in-vitro* et *in-vivo* effectuées par KUMAR D en (2010) sur l'activité antiasthmatique de l'extrait de *Ailanthus exelsa* chez le cochon d'inde, les flavonoïdes et les saponines contenus dans cet extrait qui sont responsables du relâchement le muscle lisse de la trachée.

Les résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait Fdag01 montrent la présence de saponines, d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de stéroïdes, de triterpènes et de tanins. La forte teneur en alcaloïdes, en flavonoïdes et en saponines dans l'extrait Fdag01 nous permet d'avancer que ces familles chimiques pourraient être responsables de la bronchodilatation provoquée par Fdag01. Pour le moment, nous ne pouvons pas affirmer ces hypothèses car l'extrait est encore brut, et c'est difficile de dire exactement la famille ou molécule responsable de cette activité. Des études ultérieures porteront sur la purification de cet extrait pour déterminer le(s) principe(s) de cet extrait et d'étudier son (leur) mécanisme d'action.

CONCLUSION

V- CONCLUSION

Les résultats des tests pharmacologiques obtenus montrent que l'extrait Fdag01 protège les animaux contre la détresse respiratoire provoquée par l'histamine, et relâche la trachée contractée avec l'histamine. Cela nous permet de conclure qu'il peut protéger les cobayes contre la crise d'asthme provoquée par l'histamine. Il inhibe l'effet contracturant de l'histamine d'une façon non compétitive. Son effet bronchodilatateur pourrait être dû à la présence des saponines, des alcaloïdes et des triterpènes.

Ces résultats montrent que l'extrait Fdag01 peut soulager la crise d'asthme aiguë d'origine allergique, qui consiste à une bronchoconstriction. Cela justifie l'utilisation de la plante dans la médecine traditionnelle contre la crise d'asthme. Le mécanisme d'action de l'extrait n'est pas encore clair, car il contient plusieurs familles chimiques. Une purification est nécessaire pour expliquer son mécanisme d'action.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ANBU JEBA S.J., ANANDARAJAGOPA K., ANBDULLAH K., KHAJA PASHA., QUESRO B.H., PUSPA. (2010).

Antihistaminic evaluation of formulated polyherbal cough syrup.

J. Med. Plants. Res., **4** (14): 1482-1484.

Annuaire des statistiques du Secteur Santé de Madagascar. (2012).

Ministère de la Santé Public., 137- 140.

BIGONIAL P., SHUKLA A., AGRAWAL G.P., RANA A.C. (2008).

Pharmacological Screenig of *Wrightia Tinctoria* Bark Hydro-Alcoholic Extract.

Asian J. Exp. Sci., **22** (3): 235-244.

BOULET L-P. (2011).

Poket guide for asthma management and prevention (for adults and children Older than 5 years).

J. Global INitiative for Asthma (GINA), 5- 26.

BOUSQUET J., VAN CAUWENBERGE P. (2001).

Les nouvelles recommandations internationales sur la rhinite allergique.

Ed (EAACI). Paris., 5-8.

BOUVENOT G., DEVULDER B., GUILLEVIN L., QUENEAU P., SCHAEFFER A. (1964).

Pathologie médicale.

Ed. Masson., Paris., 120-126.

BRUNELLESCHI S., HAYE-LEGRAND I., CARLOS L., NOREL X., BENVENISTE J., BRINX C. (1987).

Platelet-Activating Factor-acether-induced relaxation of guinea pig airway muscle: Role of prostaglandin E2 and the epithelium.

J. Pharmacol. Exp. Ther., **234**: 356-362.

Clicours.COM

BUSSE W.W., LEMANSKE R.F. (2001).

Asthma.N.

Engl. J. Med., **344**: 350-362.

Delmas M.C., Fuhrman C. (2010).

Pour le groupe épidémiologie et recherché Clinique, l'asthme en France: synthèse des données épidémiologiques descriptives.

Rev. Mal. Resp., **27**: 151-159.

DIDIER., GODARD., TILLIE-LEBOND, CHARPIN., CHANEZ., MARQUETTE. (2011).

ASTME DE l'ADULTE Item 226.

Université Médicale virtuelle Francophone. Paris., 3-10.

DOMINIQUE W. (1997).

Pharmacologie bronchopulmonaire Médicaments de l'asthme Voie inhalée.

Faculté de médecine, Pierre et Marie Curie, Paris., 11-26.

Charpin D., Vervolet D. (1997).

New aero-allergènes, Interaction between allergens and the environnement.

Bull. Acad. Natl. Med., **181**: 1551-1561.

CRAGG G.M., NEWMAN D.J. (2007).

Natural Products as sources of antitumor agents.

Encyclopedia of Life support systems, 2-8.

FONG H.H.S., TIN-WA M., FARNSWORTH N.R. (1977).

Manual for Phytochemical Screening.

Rev. College of Pharmacy, University of Illinois, USA, 6-7.

GILHODES O., IGUAL J. (1994).

Pneumologie.

Collection internat. Ellipses, Paris., 160-175.

GUIN E. (2000).

Analyse de l'évolution des prescriptions et des consommations des antiasthmatiques en France en ambulatoire et en milieu hospitalier.

Agence Française de sécurité Sanitaire des produits de santé.

Direction des Etudes Médico-Economiques et de l'Information Scientifique. Paris., 13-15.

KOFFI N., BEUGRE K., GUEDE N.Z., DASSAHOUA T., LAURENT A. (2009).

Screening phytochimique de quelque plante médicinale ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire).

Sc. Nat. Université de Cocody-Abidjan., **6** (1) : 1-15.

KULKARNI S.K. (2005).

Handbook of Experimental Pharmacology.

Ed Vallabha Prakashan. 3th New Delhi, 92-93.

KUMAR D., BHUJBAL S.S., DEODA R.S., MUDGADE S.C. (2010).

In-vitro and In-vivo Antiasthmatic Studies *Ailanthus excelsa* Roxb. On Guinea Pigs.

Int. J. Pharmacol, Asia., **6** (3) : 284-289.

LAJOIE P., LECLERC J.M., CHEVALIER P. (2013).

Asthme et allergies chez l'enfant : rôle des facteurs environnementaux et programmes de prévention.

Inst. Nat. San. Pub., Quebec, 26-30.

LEMANSKE RF JR., BUSSE W.W. (1997).

Asthma.

JAMA., **278**: 1855-1873.

MAGNUS P., JAAKKOLA J.J. (1997).

Secular trend in the occurrence of asthma among children and young adult: critical appraisal of repeated cross sectional surveys.

Br. Med. J., **314**: 1795-1799.

MATILLON Y. (2001).

Education thérapeutique du patient asthmatique-adulte et adolescent.

ANAES., Service des recommandations et références professionnelles. Paris., 36-38.

MININGOU S.D., ZOUBGA A.Z., MEDA N., TIENDREBEOGO H. (2002).

Prévalence de l'asthme du sujet de 15 à 64 ans à Bobo Dioulasso.

Rev. Pneumol. Clin., **58** (1), 341-345.

NICOLAS J.P. (2013).

Plantes médicinales du Nord de Madagascar, Ethnobotanique Antakarana et informations scientifiques.

15^{ème} Ed. Jardin du monde. France., 256-257.

NYSTAD W., MAGNUS P, GULSVIK A., SKARPAAS I.J., CARLSEN K.H. (1997).

Changing prevalence of asthma in school children: evidence for diagnostic change in asthma in two surveys 13years.

Eur Respir., **10**: 1046-1051.

PRACHI S., PRIAYANKA S. (2014).

In-Vitro and in-Vivo Evaluation of Anti Asthmatic Activity of Rhizomes Extract of *Acorus Calamus* (Linn.) in Guinea Pigs.

J. Pharmac. Sci., **3** (5): 1-6.

PIERRE B., LUCILE A-B. (1993).

Plante médicinales de Madagascar.

Ed KARTHALA. Tananarivo, 42; 68- 72.

PRAVIN S., DILIPRANO D., NIKITA D., JYOTI V. (2014).

Preclinical Evaluation and Antiasthmatic Activity of *Euphorbia hirta* Linn.

Int. J. Pure App. Biosci., **2** (2): 262-266.

RALAINIRINA P.R. (2013).

Politique nationale de prévention et lutte intégrées contre les maladies chroniques non transmissibles.

Ministère de la Santé et du planning familial et de la protection sociale.

Rev. Tananarivo., 16-18.

RANABIR P., SANJAY D. (2009).

Prevalence of Bronchial Asthma in India Children.

Ind. J. Community Med., **34** (4): 310-316.

RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M., MOORE P.K. (2003).

Pharmacology.

5th Ed Churchill Livingstone, Edinburgh, **4** (2): 151-151.

RIVIERE C., NICOLA J.P., CARADEC M.L., DESIRE O., SCHMITT A. (2005).

Les plantes médicinales de la région nord de Madagascar : une approche ethnopharmacologique.

Ethnopharmacologia, **36** : 36-50.

ROSITA A., MICHAEL B. (1993).

RAINFOREST REMEDIES one Hunder Healing of Belize.

Ed lotus Press, Twin Laker, USA. 33; 47; 85.

STEPHEN O.O., GERALD I.E., IFEANYI H.A., OGOCHUKWU L.I., DICKSON O.U., VIONA OLOGE. (2012).

Evaluation of the Anti-asthma activity of Aqueous Root, bark Extract of *Ficus exasperata* Vahl (*Monarceae*).

Int. J. Health. Res., **5** (1), 5-12.

STRACHAN D., SIBBALD B., WEILAND S., AIT-KHALED N., ANABWANI. (1997).

Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC).

Ped. Aller. Imm., **8**: 161-176.

WEBOGRAPHIE

<http://www.hippocratus.com/metasite/web site/1.../memoire2 mulerasthma.pdf>

MULLER J-N. (2009).

Les plantes de l'asthme.

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-ASTHMATIQUE DE L'EXTRAIT

Fdag01 CHEZ LE COBAYE

Nom : ANGATAHI Fonty Douglas

Tel : 0325714164 / 0347176110

Année : 2015-2016

Adresse : VS 56 BDE BIS

AMBOLOKANDRINA

Rapporteur: Professeur

RANDRIANAVONY Patricia

Laboratoire : Laboratoire de

Pharmacologie Générale, de

Pharmacocinétique et de Cosmétologie

B.P : 8357

E-mail : dougfonty@gmail.com

Domaine des science et Technologies

Univercité de d'Antananarivo

RESUME

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'activité de l'extrait Fdag01 chez le cobaye.

Son activité protectrice a été évaluée *in vivo* par son effet à retarder l'apparition de la détresse respiratoire provoquée par l'Histamine (5%) pulvérisée dans une enceinte fermée. Son activité bronchodilatatrice et son mécanisme d'action ont été étudiés *in vitro* sur la contraction de la trachée isolée provoquée par l'Histamine.

L'administration de l'extrait par voie orale augmente le temps d'apparition de la détresse respiratoire provoquée par l'histamine. Chez les témoins, il est égal à $129,33 \pm 13,77$ sec, contre $189 \pm 40,66$ et $261,67 \pm 32,22$ sec respectivement chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 50 et 150 mg/kg ($P < 0,05$).

L'extrait relâche la trachée contractée avec l'extrait avec une CE_{50} égale à 0,014 mg/ml relaxante. Il inhibe l'histamine de façon non compétitive. En pré incubant la trachée isolée dans le bain contenant de 100 et 200 μ g/ml d'extrait pendant 10 min, la contraction maximale obtenue avec l'histamine passe de 100% à $65,55 \pm 0,27\%$ et $35 \pm 0,12\%$ respectivement, et la CE_{50} passe de $4.10^{-10}M$ à $1,4.10^{-9}M$ et $2.10^{-9}M$ respectivement ($P < 0,05$). Ces résultats montrent que Fdag 01 pourrait avoir une activité anti asthmatique.

L'extrait contient des alcaloïdes, des tanins, des stéroïdes, des triterpènes, des saponines, des flavonoïdes, des anthocyanes, des sucres réducteurs et des polysaccharides. Les alcaloïdes, flavonoïdes et saponines pourraient être responsables de l'activité de Fdag01.

Mots clés : asthme, bronchodilatateur, cobaye.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the activity of the extract Fdag01 in guinea pig. *In vivo* test was carried out to evaluate the effect of the extract on experimental asthma crisis induced by spraying histamine while *in vitro* test was done to investigate the effect of extract on histamine-induced trachea constriction and to determine the mechanism of action.

Oral administration of Fdag01 delays the time of the appearance of respiratory distress in animals provoked by histamine. In the control group, it appears at 129.33 ± 13.77 sec, versus 189 ± 40.66 and 261.67 ± 32.22 sec respectively in animals treated with Fdag01 at the dosages of 50 and 150 mg/kg ($P < 0.05$).

Fdag01 relaxes the isolated trachea contracted by histamine with CE_{50} of 0.014 mg/ml. It inhibits histamine in a non-competitive manner. Pre-incubating the isolated trachea in a bath containing the extract at concentrations 100 and 200 μ g/ml reduces the maximal effect of histamine from 100% to $65.55 \pm 0.27\%$ et $35 \pm 0.12\%$ respectively, with EC_{50} from $4.10^{-10}M$ to $1.4.10^{-9}M$ and $2.10^{-9}M$ respectively ($P < 0.05$). These results show that Fdag01 has an anti-asthmatic activity. Fdag01 contains alkaloids, tannins, stéroïdes, triterpenoids, saponines, flavonoïdes, anthocyanins, reducing sugars and polysaccharids. The presence of alkaloids, flavonoids and saponines in the extract could be responsible for this activity.

Key words: asthma, bronchodilator, guinea pig