



DOMAINE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

**MENTION PHYSIOLOGIE ANIMALE,
PHARMACOLOGIE ET COSMETOLOGIE**

**LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE GENERALE, DE
PHARMACOCINETIQUE ET DE COSMETOLOGIE**



**MEMOIRE POUR OBTENTION DU
DIPLOME MASTER
Option : PHARMACOLOGIE**

**ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIDIARRHEIQUE DE
L'EXTRAIT RFA712 CHEZ LE COBAYE**

Présenté par

ANDRIAMIARIMANANA Antsa Tambiniaina

Le 19 avril 2016

Devant le jury composé de :

Président : Mme. RANDRIANAVONY Patricia

Docteur, HDR

Rapporteur : Mr. RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainy

Professeur Titulaire

Examineur : Mr. RAKOTOARISON Olivier

Maître de Conférences

Nom : ANDRIAMIARIMANANA

Prénoms : AntsaTambiniaina

Date et lieu de Naissance : 17 Décembre 1989 à Mté Befelatanana

Adresse: IAH 74 Avaratsena Ambohidrapeto

Telephone: 034 73 903 02

Email: pepetaniaina@gmail.com



**ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIDIARRHEIQUE DE L'EXTRAIT
RFA712 CHEZ LE COBAYE**

Promotion : FANAZAVA

Laboratoire: Laboratoire Pharmacologie de Générale, de Pharmacocinétique et Cosmétologie

Option : PHARMACOLOGIE

Rapporteur : Professeur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenirainy

Email : frandimbi@gmail.com

Domaines des Sciences et Technologies

UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO

REMERCIEMENTS

Au terme de la réalisation de cette mémoire, je tiens à témoigner mes profondes reconnaissances plus particulièrement :

*A **RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy**, Professeur titulaire, Directeur de Laboratoire de Pharmacologie Générale et de Cosmétologie pour m'avoir accueillie pendant les jours de stage au sein de son laboratoire, pour vos multiples corrections et pour votre enseignement de qualité au cours de mes années d'études, acceptez toute ma considération et ma profonde gratitude.*

*A **RANDRIANAVONY Patricia**, Docteur HDR, Chef de Département de Physiologie Animale et de Pharmacologie. Vous n'avez cessé de me prodiguer les plus judicieux conseils au cours de l'élaboration de ce travail. Sans oublier votre grande disponibilité, votre simplicité, votre rigueur scientifique et surtout votre amour du travail bien fait tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici l'assurance de notre sincère reconnaissance et de notre profonde admiration.*

*A **RAKOTOARISON Olivier**, Maître de Conférences, d'avoir accepté de juger ce travail malgré vos lourdes responsabilités. Je tiens adresser mes vifs remerciements et ma profonde gratitude.*

A tout le corps enseignants du département de physiologie animale et de pharmacologie de la faculté des sciences de l'Université d'Antananarivo pour les précieux transferts de connaissance.

A toute l'équipe du LPGPC et la promotion FANAZAVA pour leurs conseils, leurs encouragements et les discussions scientifiques agréables.

A toute ma famille,

A mon père, mes sœurs, ma tante qui ne cessent de m'aider et de m'encourager, surtout pour vos sacrifice que vous avez fait durant mes études. Mille mercis pour tout le soutien moral, affectif et financier.

A mes cousins, cousines et amies proches, merci pour votre grand soutien, vos conseils, vos bénédictions et vos prières. Longue vie à vous !

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Mes sincères remerciements.

Merci de tout cœur et que Dieu vous bénisse !!

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	I
LISTE DES TABLEAUX.....	II
LISTE DES FIGURES.....	III
LES SIGLES ET LES ABREVIATIONS.....	IV
I. INTRODUCTION.....	1
II. MATERIELS ET METHODES	5
A. PARTIE CHIMIQUE.....	5
1. Préparation de l'extrait RFA712	5
2. Criblage phytochimique.....	5
B. PARTIE BIOLOGIQUE	7
1. Étude de l'effet de l'extrait RFA712 sur la diarrhée sécrétoire	7
2. Étude de l'effet de l'extrait RFA712 sur la diarrhée motrice.....	8
a. Préparation et montage de l'organe.....	8
b. Étude de l'effet de RFA712 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine.....	8
c. Etude de l'effet de RFA712 vis-à-vis de l'effet contracturant l'acétylcholine	9
C. EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS	9
III. RESULTATS	10
A. PARTIE CHIMIQUE.....	10
B. PARTIE BIOLOGIQUE	10
1. Effet de l'extrait RFA712 sur la diarrhée sécrétoire	10
2. Activité de l'extrait RFA712 sur la motilité intestinale	11
a. Effet de l'extrait RFA712 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine	11
b. Effet de l'extrait RFA712 vis-à-vis de l'effet contracturant de l'acétylcholine.....	12
IV. DISCUSSION	14
V. CONCLUSION	16
BIBLIOGRAPHIE	17

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Tests utilisés pour déterminer les grandes familles chimiques présentes dans l'extrait	6
Tableau II : Différentes familles chimiques dans la plante RFA712.....	10

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Volume du liquide intestinal provoquée par le Sulfate de Magnésium administré par voie orale, en fonction de la dose de l'extrait 11

Figure 2 : Relâchement de la contraction maximale du duodénum isolé de Cobaye provoqué par l'Ach à 10^{-4} M en fonction de la concentration de l'extrait 12

Figure 3: Contraction du duodénum isolé de cobaye provoquée par l'Acétylcholine en absence et en présence de l'extrait. 13

LES SIGLES ET LES ABREVIATIONS

- **ACh:** acétylcholine
- **°C :** degré Celsius
- **h :** heure
- **mn :** minute
- **cm :** centimètre
- **g :** gramme
- **M :** concentration molaire
- **ml :** millilitre
- **mM :** millimole
- **g/kg :** gramme/kilogramme
- **mg/Kg :** milligramme par kilogramme
- **mg/ml :** milligramme par millilitre
- **ml/kg :** millilitre par kilogramme
- **CE₅₀:** concentration qui donne 50% de l'effet maximal
- **n :** nombre d'animaux utilisés
- **p :** degré de signification
- **β :** bêta
- **% :** pourcent
- **log :** logarithme decimal
- **coll. :** collaborateurs
- **m :** moyenne
- **e.s.m:** erreur standard à la moyenne
- **< :** inférieur
- **UV :** ultra violet
- **Mg:** magnésium
- **FeCl₃ :** chlorure de fer (III)
- **H₂SO₄ :** acide sulfurique
- **MgSO₄ :** sulfate de Magnésium
- **NaCl :** chlorure de Sodium
- **HCl :** acide chlorhydrique
- **NaHCO₃ :** bicarbonate de sodium

- **NaH₂PO₄** : phosphate monosodique
- **MgCl₂** : chlorure de magnésium
- **CaCl₂** : chlorure de calcium
- **KCl** : chlorure de potassium
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **LPGPC** : Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétique.

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

En raison de l'insalubrité, les peuples du tiers monde sont des sujets à plusieurs maladies communes, y compris la diarrhée. En 2010, seulement 42,63% de la population ont accès à l'eau potable et 47,97% à un assainissement de base adéquate. Les décès causés par la diarrhée proviennent surtout de l'insalubrité des aliments et de l'eau (HARI J.R. et LAKSHMINARAYANA M., 2012). Plusieurs facteurs concourent à la fréquence et à la gravité des diarrhées, la difficulté à l'accessibilité à l'eau potable, l'insuffisance alimentaire, le manque d'hygiène et la prévalence élevée des agents pathogènes. La cause la plus fréquente est l'infection gastro-intestinale par différents types de bactéries (choléra, *Escherichia coli*), virus (*Rotavirus*) et parasites. Cette infection peut se propager par la nourriture et l'eau. La diarrhée peut être due aussi à une intolérance alimentaire, une anxiété, un stress ou à une surcharge hydrique (AVRIL J.L. et coll., 1992).

La maladie diarrhéique constitue un problème majeur dans les pays en voie de développement malgré les énormes progrès de la médecine, où elle représente la deuxième cause de mortalité chez les moins de 5 ans (OMS, 1996 ; FARTHING M., LINDBERG G. et coll., 2008). Chaque jour, 6000 personnes meurent à cause des maladies diarrhéiques. En 1998 les maladies diarrhéiques ont tué près de 2,2 millions d'enfant dans le monde. Et plus de 1,5 millions d'enfants en meurent chaque année (WHO, 1999).

De 1984 à 1995 dans la capitale 28% des enfants de 1 à 15 ans sont morts à la suite d'une maladie diarrhéique. En 1999, à Madagascar, le taux de mortalité infanto-juvénile était à 88 pour 1000. En 2008, la diarrhée constitue la 2^{ème} cause principale de consultation dans les centres de santé et 22% des décès des enfants étaient dus à des maladies liées à la diarrhée (OMS, 2012). La prévalence de la diarrhée varie d'un minimum de 2 % dans la région de Vakinankaratra à un maximum de 18 % dans la région de Boeny. A Analamanga, elle est de 10% (ANDRIANJAKA J.C. et RAKOTONDRABE F.P., 2011).

Dans les pays industrialisés, le nombre de décès par diarrhée est relativement faible, mais elle continue cependant à être une importante cause de morbidité et induit des coûts substantiels en matière de soins (FARTHING M., LINDBERG G. et coll., 2008).

La diarrhée est caractérisée par une émission excessive et fréquente de matières fécales liquides ou molles due à une perturbation des échanges hydriques dans l'intestin, et à une augmentation du péristaltisme, entraînant une perte d'eau et d'électrolytes dans les selles. C'est un signe de dérèglement physiologique au niveau du tube digestif (KID A., 1990).

Elle est généralement accompagnée de douleur et de crampes intestinales qui peuvent rendre le sujet mal à l'aise, ainsi que des frissons et de sueurs froides (OMS, 1989).

L'intestin grêle est le siège de deux phénomènes : la première c'est l'absorption ou le transfert d'eau, des électrolytes et des molécules, dans l'intestin vers le sang, nécessaires pour la croissance et la réparation du corps par l'intermédiaire des villosités intestinales, et le second le transfert de l'eau et des électrolytes du sang vers l'intestin ou la sécrétion par la crypte de l'épithélium intestinale. En plus de la digestion des aliments et de l'absorption des nutriments, l'intestin joue un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique de l'organisme humain. Il contient de l'eau provenant des aliments et des sécrétions cellulaires de la muqueuse digestive c'est-à-dire de la salive, du suc gastrique, de la bile, du suc pancréatique et de l'intestin. À l'état normal, l'absorption d'eau et d'électrolytes prédomine celle de leur sécrétion, dans le cas contraire, la diarrhée apparaît à cause de la domination du phénomène sécrétoire qui entraîne une fuite d'eau et d'électrolytes dans les selles (BENBERNOU L., 2000).

Selon la durée de la diarrhée, elle peut être classée en diarrhée aiguë et diarrhée chronique. La diarrhée aiguë est caractérisée par un début brutal et une durée limitée, elle est souvent causée par des entérotoxines produits par des bactéries. Dans ce cas, les mécanismes cellulaires de la diarrhée sont différents suivant les microorganismes en cause : des bactéries entérotoxigènes ou entérotoxogènes. Les bactéries entérotoxigènes sont non invasives, comme le *Vibrio cholerae* et l'*Escherichia coli* entérotoxigènes, elles colonisent la muqueuse de l'intestin grêle grâce à des facteurs d'attachement. Elles élaborent des toxines qui se fixent spécifiquement sur les cellules de la muqueuse et stimulent l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes. La diarrhée est essentiellement aqueuse, sans leucocytes ni mucus. (CATHERINE D., 1997). Par contre, les bactéries enteropathogènes sont des germes invasifs, elles pénètrent dans la muqueuse intestinale du côlon et parfois de l'iléon terminal et se multiplient, entraînant la destruction des entérocytes. La prolifération de ces bactéries entraîne une destruction des entérocytes et provoque des lésions de la muqueuse. Les germes les plus courants sont les Shigelles, les Salmonelles et certaines souches d'*Escherichia coli* (DUPONT H.L. et LAJOUS C.I., 1994).

La diarrhée chronique s'étend sur une période excédant les trois semaines. Elle résulte d'une maladie inflammatoire de l'intestin, d'un problème de mal absorption, d'une intolérance à certains aliments, d'une irritation du côlon (KERHARO J., 1971).

Selon leur étiologie, on peut classer la diarrhée en diarrhée motrice, diarrhée sécrétoire ou osmotique. La diarrhée motrice est due à une stimulation du muscle lisse duodéal par l'acétylcholine qui entraîne une accélération du transit intestinal limitant la réabsorption d'eau provoquant ainsi une hypersécrétion au niveau intestinal ; les excréments sont expulsés sous forme de liquide ou semi liquide (BUISSON Y., 2001).

La diarrhée sécrétoire provoque des pertes excessives en eau et en électrolytes, elle est secondaire liée à la stimulation de l'activité sécrétrice des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale qui aboutit à une augmentation du volume du fluide intestinal et/ou à l'inhibition de l'absorption au niveau du grêle ou du colon. Elle est due à une irritation de la muqueuse intestinale qui provoque un dysfonctionnement du transport d'ions à travers la membrane des cellules épithéliales de l'intestin (BELAICHE J., 2000).

Quant à la diarrhée osmotique, elle est liée à la présence de substances osmotiquement actives dans la lumière intestinale générant des forces osmotiques qui attirent l'eau dans le grêle et le colon (ALBERT M.J. et coll., 1999).

Les médicaments antidiarrhéiques sont des substances capables de réduire la fréquence de l'émission de selles et d'empêcher l'émission de selles liquides. Suivant leur mécanismes d'action, ils peuvent être des antispasmodiques, des adsorbants, et des anti-sécrétoires.

Les antispasmodiques ralentissent ou inhibent le mouvement péristaltique de l'intestin, ce qui ralentit le transit intestinal, y compris les déchets, les germes et les toxines. L'hydrochloride de loperamide est en premier liste de ces médicaments. Il diminue la vitesse du transit et augmente la capacité de l'intestin à retenir les liquides (KENT A.J. et BANKS M.R., 2010).

Les adsorbants se lient aux toxines bactériennes ou d'autres substances et les inactivent. Ils protègent aussi la muqueuse intestinale comme le kaolin. Il améliore ainsi la consistance des selles mais ne réduit ni la durée de la diarrhée ni la fréquence des selles (CUTTING W., 1992).

Les antisécrétoires inhibent l'hypersécrétion au niveau de la muqueuse intestinale, comme le Racecadotril (Tiorfan®) qui augmente le taux d'enképhalines dans la muqueuse intestinale et inhibe ainsi l'hypersécrétion provoquée par les agents infectieux (CARRE D. et coll., 2001).

Malgré les efforts des organisations internationales pour lutter contre cette maladie, l'incidence de la diarrhée est encore très élevée. Certains antibiotiques sont utilisés comme médicaments antidiarrhéiques, mais ils sont toujours liés à des effets indésirables. Par exemple, le Racécadotril® et Lopéramide® sont utilisés pour traiter la diarrhée mais ils produisent du bronchospasme, des vomissements et de la fièvre, et les micro-organismes ont tendances à développer une résistance envers eux (LUTTERODT G.D., 1992 ; THANKURTA P. et coll., 2007). Par ailleurs, les plantes ont été longtemps une source très importante de nouveaux médicaments. Pour traiter la diarrhée, les plantes médicinales sont une source potentielle de médicaments anti diarrhéiques (KOUITCHEU M. et coll., 2006).

Selon l'OMS, 80% de la population mondiale pratiquent encore la médecine traditionnelle, et les plantes médicinales jouent un rôle clé dans la prise en charge de différentes maladies. Depuis longtemps, le recours aux plantes médicinales constitue l'attitude thérapeutique de la population malgache. Cette tendance est renforcée compte tenu du faible niveau socioéconomique de la population et du prix des médicaments ne cessant de s'accroître (ANDRIATSIFERANA R., 1983).

De nombreuses plantes sont utilisées à Madagascar pour leur vertu anti diarrhéique, comme la pulpe du fruit de l'*Andansonia digitata* (baobab) qui ralentit le transit intestinal et inhibe la sécrétion hydro sodée (KENNE FOPA O., 1994), le *Psidium goyava* (goyave) dont les feuilles sont utilisées dans le traitement des diarrhées sécrétoires (RABESA Z. A. et coll., 1986), l'*Euphorbia Hirta*, qui limite la fuite liquidienne au niveau de la muqueuse intestinale par la présence du tanin (ANDRIATSIFERANA R., 1983). Enfin l'*Acridocarpus excelsus* A. Juss ou " *kirajy* ", est utilisée en cas de spasme et de diarrhée sanguinolente (RAKOTOBE A. et coll., 1993).

D'après les enquêtes Ethnopharmacologiques que nous avons effectuées dans la région d'Analamanga et auprès des tradipraticiens d'Ampefy, région Itasy, la décoction des feuilles de RFA712 est utilisée par la population pour traiter la diarrhée. RFA712 est une plante qui appartient à la famille de LAUREACEAE.

Notre objectif est d'étudier l'activité anti-diarrhéique de l'extrait hydro alcoolique des feuilles de cette plante. Pour les tests *in vivo*, la méthode d' "enteropooling" a été utilisée afin d'étudier son effet anti sécrétoire, tandis que des tests *in vitro* sur le duodénum isolé d'un cobaye ont été utilisés pour étudier son action sur la motilité intestinale provoquée par l'acétylcholine

MATERIELS
ET
METHODES

II. MATERIELS ET METHODES

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait RFA712

Les feuilles de la plante appartenant à la famille des LAUREACEAE ont été récoltées dans le District Atsimondrano, région Analamanga le mois de Novembre 2015. Elles ont été séchées à l'ombre dans une salle aérée pendant un mois, à la température ambiante, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Cinq cent grammes de cette poudre ont été macérés dans un mélange éthanol-eau (60 : 40) pendant trois jours à la température ambiante. Le macérât a été filtré avec du papier Whatman, et le filtrat obtenu a été évaporé sous vide à la température de 80°C à l'aide d'un évaporateur rotatif Evapotec®. L'extrait sec a été codé RFA712 puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction suivant la formule :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{poids de l'extrait}}{\text{poids de la poudre}} \times 100$$

2. Criblage phytochimique

Afin de déterminer les grandes familles chimiques présentes dans l'extrait, un criblage phytochimique a été effectué à l'aide des réactifs spécifiques (FONG H.H.S.et coll., 1977). La présence de chaque famille est caractérisée par l'apparition de précipité ou d'un changement de coloration en présence des réactifs correspondants (Tableau I).

Tableau I : Tests utilisés pour déterminer les grandes familles chimiques présentes dans l'extrait (FONG H.H.S.et coll., 1977).

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observation
ALCALOÏDES		DRAGENDORFF, MAYER, WAGNER	précipitation
TANINS		Gélatine + NaCl	Précipitation verte
		Gélatine + FeCl ₃ Méthanol	Précipitation bleue
COMPOSES PHENOLIQUES		Gélatine 1%	précipitation
STEROIDES 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
DESOXY-2-SUCRE	KELLER KILLIANI	FeCl ₃ 10% + acide acétique glacial	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		+ 3 Volumes d'éthanol	trouble
SUCRES REDUCTEURS		Liqueur de Fehling+ Bain-marie	Précipitation rouge brique
SUCRES RARES	PESEZ	Xanthydrol	Coloration rouge
COUMARINES		NaOH 10%	Fluorescence à l'UV
SAPONINES	MOUSSE	HCl + Agitation	persistance d'une mousse (3cm d'épaisseur) après 30mn

B. PARTIE BIOLOGIQUE

Des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués chez le cobaye pour étudier l'activité antidiarrhéique de l'extrait RFA712. Son effet anti sécrétoire a été étudié *in vivo* en utilisant la méthode d' "enteropooling", tandis que son effet sur la motilité intestinale a été étudié avec des tests *in vitro* sur le duodénum isolé d'un cobaye contracté avec l'acétylcholine en absence et en présence de l'extrait.

1. Étude de l'effet de l'extrait RFA712 sur la diarrhée sécrétoire

L'activité de l'extrait contre la diarrhée sécrétoire a été étudiée par sa capacité d'inhiber l'accumulation du fluide intestinale ou "enteropooling" provoquée par le sulfate de magnésium (DOHERTY N.S., 1981).

Des cobayes des deux sexes pesant de 200 g à 300 g âgés de 3 à 5 mois ont été utilisés. Ils ont été mis à jeun 18 heures avant le test, mais ont eu un accès libre à l'eau. Ils ont été répartis en 3 lots: un lot témoin et deux lots traités respectivement avec l'extrait aux doses de 200 et de 400 mg/kg par voie orale, dans un volume de 10 ml/kg (DIEHL K. H. et coll., 2001).

Quarante cinq minutes après l'administration de ces produits, 2 g/Kg de MgSO₄, dissouts dans de l'eau distillée, ont été administrés chez tous les animaux par voie orale dans un volume de 2 ml par cobaye, pour provoquer l'"enteropooling" (LAKSHMINARAYANA M. et coll., 2011).

Trente minutes après administration du MgSO₄, les animaux ont été sacrifiés et une laparotomie a été pratiquée. Deux ligatures ont été effectuées, la première au niveau du pylore et la deuxième, au niveau du caecum. L'intestin entre ces deux nœuds a été prélevé, et son contenu a été recueilli dans un récipient gradué et son volume a été mesuré (MAMILAINORO L., 1996).

La variation du volume du liquide intestinal a été calculée suivant la formule :

$$E = \frac{(V_o - V_t)}{V_o} \times 100$$

E= effet de l'extrait sur la variation du volume du liquide intestinal (%)

V_o= volume du liquide intestinal dans le lot témoin (en ml)

V_t=volume du liquide intestinal dans le lot traité (en ml)

Une valeur de E<0 indique un effet antidiarrhéique sécrétoire de l'extrait.

2. Étude de l'effet de l'extrait RFA712 sur la diarrhée motrice

Pour étudier l'activité de l'extrait RFA712 sur la diarrhée motrice, son effet sur la motilité intestinale provoquée par l'acétylcholine a été étudié *in vitro* sur le duodénum isolé de cobaye.

a. Préparation et montage de l'organe

Des cobayes des deux sexes âgés de 3 à 5 mois, pesant entre 150 et 250 g ont été utilisés. L'animal a été mis à jeun 18 h avant la manipulation, puis assommé et exsanguiné en coupant les deux carotides. Après une laparotomie médiane, le duodénum de cobaye près du pylore a été prélevé et placé dans une boîte de pétri contenant une solution de Tyrode maintenue à la température de 37°C, et dont la composition en mM est la suivante : NaCl 136,9 ; NaHCO₃ 11,9 ; KCl 2,7 ; MgCl₂ 1,1 ; CaCl₂ 1,8 ; NaH₂PO₄ 0,4 ; glucose 1 et de l'eau distillée (PRASHANT B. et coll., 2012).

Les mésentères et les tissus adipeux ont été enlevés, puis un segment d'organe environ 1,5cm a été monté dans une cuve à organe isolé contenant 20 ml de solution Tyrode maintenue à 37°C et barboté avec de l'air. À l'aide d'un fil à coudre, une des deux extrémités de l'organe a été fixé au fond de la cuve et l'autre extrémité a été fixé au stylet enregistreur avec un contre poids de 1g.

L'organe a été laissé se stabiliser pendant 45 minutes dans le bain. Durant cette période, il a été rincé toutes les 15 minutes. Après la période d'équilibration, la capacité contractile de l'organe a été testée avec de l'acétylcholine à la concentration de 10⁻⁵ M dans le bain.

b. Étude de l'effet de RFA712 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine.

Après la sensibilisation, l'organe a été rincé et laissé se stabiliser pendant 45 mn. Pendant la période d'équilibration, il a été rincé toutes les 15 minutes. Après cette période, l'acétylcholine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative pour obtenir des concentrations croissantes à partir de 10⁻⁸ M dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale. Au plateau de contraction, considéré comme effet maximal, l'extrait RFA712 a été injecté dans le bain d'une manière cumulative, à partir de 0,125 mg/ml jusqu'au relâchement total de l'organe contracté par l'acétylcholine.

L'amplitude des contractions a été mesurée et rapportée sur une échelle semi logarithmique, l'effet maximal de l'acétylcholine et la CE₅₀ de l'extrait ont été déterminés graphiquement.

Après cette manipulation, la préparation a été rincée deux fois et laissée de nouveau se stabiliser pendant 45 minutes.

c. Etude de l'effet de RFA712 vis-à-vis de l'effet contracturant l'acétylcholine

Pour étudier l'effet de RFA712 vis-à-vis de l'acétylcholine, l'organe a été incubé dans le bain contenant l'extrait aux concentrations respectives de 0,125 mg/ml et 0,25 mg/ml dans le bain pendant 15 minutes. Après 15 minutes de contact, l'acétylcholine a été injectée de nouveau de façon cumulative dans le bain pour réaliser des concentrations croissantes à partir de 10^{-8} M dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale. L'amplitude de chaque contraction a été mesurée et rapportée sur une échelle semi logarithmique, l'effet maximal de l'acétylcholine, ainsi que ses CE_{50} en absence et en présence de l'extrait ont été déterminés graphiquement.

C. EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS

Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type standard à la moyenne (moyenne \pm e.s.m). Les moyennes ont été comparées entre elles en utilisant le test «t de Student». La différence est considérée comme significative si la valeur de p est inférieure à 0,05.

RESULTATS

III. RESULTATS

A. PARTIE CHIMIQUE

La macération de 500 g de poudre dans un mélange éthanol : eau (60:40) donne 35 g d'extrait RFA712 sec soit un rendement de 7%. Les résultats du criblage phytochimique effectué sur la plante RFA712 révèlent la présence de tanins, de polyphénols, de stéroïdes et de sucres réducteurs en forte teneur; de flavonoïdes, d'anthocyanes et d'alcaloïdes en teneur moyenne et des polysaccharides en faible teneur (Tableau II).

Tableau II : Différentes familles chimiques dans la plante RFA712

Familles chimiques	Teneur
Sucres réducteurs	+++
Tanins	+++
Stéroïdes	+++
Polyphénols	+++
Alcaloïdes	++
Flavonoïdes	++
Anthocyanes	++
Polysaccharides	+

Légende

+ : présence en faible teneur

++ : présence en teneur moyenne

+++ : présence en forte teneur

B. PARTIE BIOLOGIQUE

1. Effet de l'extrait RFA712 sur la diarrhée sécrétoire

L'administration de RFA712 à différentes doses par voie orale réduit l'accumulation du liquide intestinal provoquée par le sulfate de Magnésium. Chez les cobayes du lot témoin, le volume du liquide intestinal est de $3,23 \pm 0,06$ ml contre $2,16 \pm 0,08$ ml chez les animaux traités avec l'extrait RFA712 à la dose de 200 mg/Kg, ce qui correspond à une inhibition de $33,08 \pm 1,41$ %, et $1,33 \pm 0,14$ ml à la dose de 400mg/Kg, soit une inhibition de $58,82 \pm$

5,13% de l'accumulation de fluide intestinal provoquée par le sulfate de Magnésium chez le lot témoin ($p < 0,05$) (figure 1).

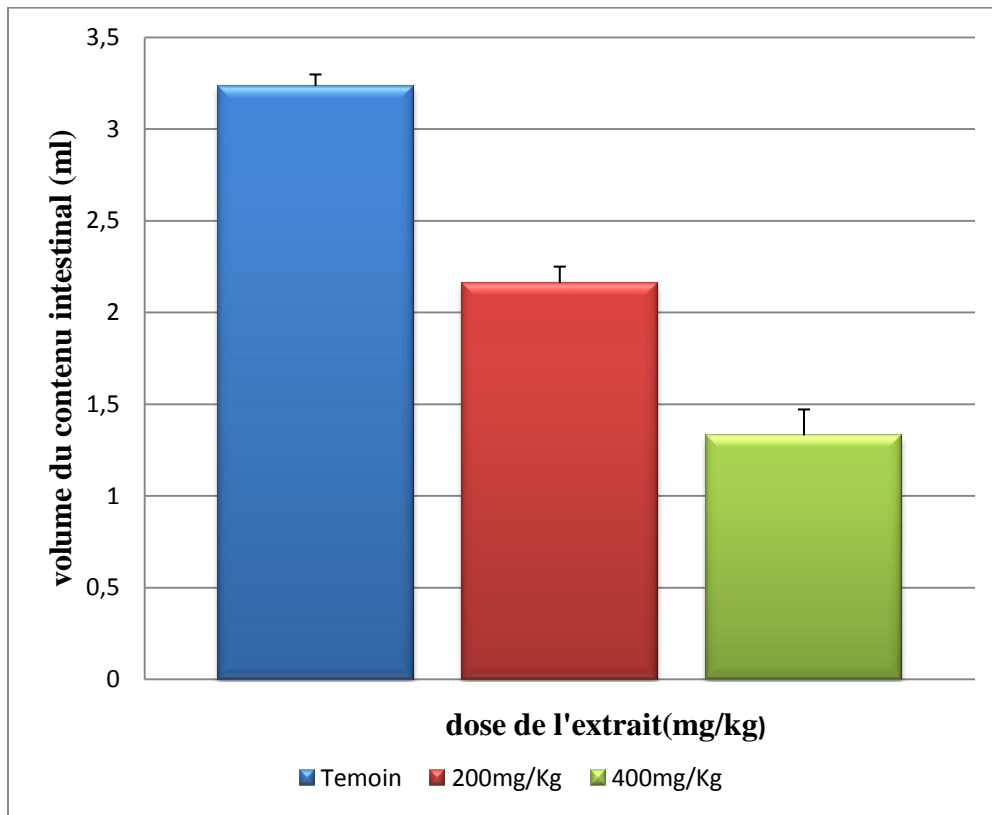


Figure 1: Volume du liquide intestinal provoquée par le Sulfate de Magnésium administré par voie orale, en fonction de la dose de l'extrait RFA712 (200 ■ et 400 ■ mg/kg) administré par voie orale chez le cobaye ($m \pm e.s.m$; $n=3$; $p < 0,05$).

2. Activité de l'extrait RFA712 sur la motilité intestinale

a. Effet de l'extrait RFA712 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine

En administrant l'acétylcholine dans le bain d'une manière cumulative, la contraction maximale du duodénum isolé de cobaye est obtenue à la concentration de 10^{-4} M dans le bain. L'administration de l'extrait RFA712 de manière cumulative dans le bain relâche complètement cette contraction à la concentration finale de 0,375 mg/ml dans le bain avec une CE_{50} égale à 0,178 mg/ml (figure 2).

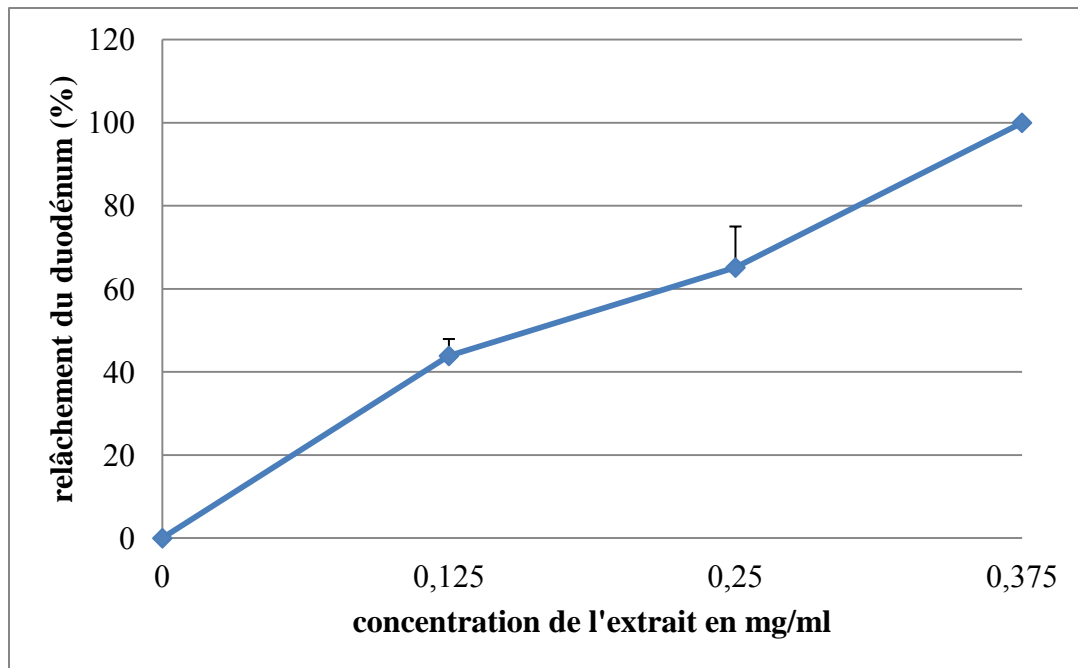


Figure 2 : Relâchement de la contraction maximale du duodénum isolé de Cobaye provoqué par l'Ach à 10^{-4} M en fonction de la concentration de l'extrait RFA712 à 0,125 et à 0,25 mg/ml dans le bain d'une manière cumulative ($m \pm e.s.m.$ $n=5$, $p<0,05$).

b. Effet de l'extrait RFA712 vis-à-vis de l'effet contracturant de l'acétylcholine

En pré incubant le duodénum avec l'extrait, sa contraction provoquée par l'acétylcholine est inhibée : l'effet maximal de l'acétylcholine diminue et d'autre part sa CE_{50} augmente. En présence de l'extrait à 0,125 mg/ml, l'effet maximal est déprimé à $63,25 \pm 3,14$ %, et à $46,67 \pm 2,56$ % en présence de 0,25mg/ml de RFA712 ($p<0,05$). D'autre part, la CE_{50} de l'acétylcholine augmente de $1,6 \times 10^{-6}$ M à $2,4 \times 10^{-5}$ M et $1,6 \times 10^{-4}$ M en présence de 0,125 mg/ml et 0,25 mg/ml de RFA712 dans le bain ($p<0,05$) (figure 3).

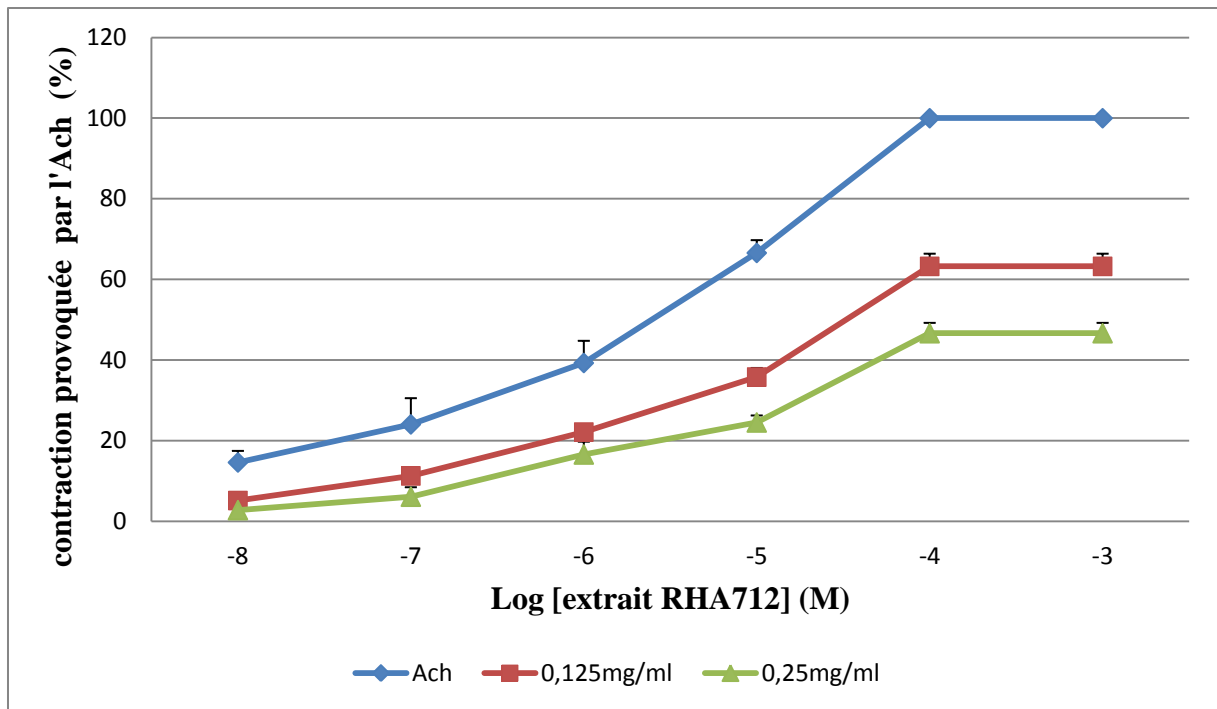


Figure 3: Contraction du duodénum isolé de cobaye provoquée par l'Acétylcholine en absence et en présence de l'extrait RFA712 à 0,125 ■ et 0,25 ■ mg/ml dans le bain (m ± e.s.m, n=5 (p < 0,05)).

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

Notre objectif a été d'étudier l'activité antidiarrhéique de l'extrait RFA 712. Comme un antidiarrhéique est un médicament qui ralentit le transit intestinal et/ou inhibe la sécrétion d'eau dans la lumière intestinale (CARRE D. et coll., 2001), ses effets antisécrétoires et sur la motilité intestinale ont été étudiés. *In vivo* la méthode d'"enteropooling" est utilisée pour étudier l'activité antisécrétoire et des tests *in vitro* sur le duodénum isolé de cobaye ont été effectués pour étudier son activité sur la motilité intestinale.

Les résultats des tests *in vivo* montrent que RFA712 diminue l'accumulation du fluide intestinal provoquée par le sulfate de magnésium. Cette diminution de l'accumulation du fluide intestinal provoquée par le $MgSO_4$ observée chez les lots traités avec l'extrait RFA712 par rapport au lot témoin indique que l'extrait RFA712 est efficace contre la diarrhée sécrétoire. En effet le sulfate de magnésium est une molécule osmotiquement active, il est peu absorbable au niveau de l'intestin et retient l'eau dans la lumière intestinale (GALVEZ J. et coll., 1993). La diminution de l'accumulation du fluide intestinal provoquée par RFA 712 signifie qu'il empêcherait la sortie d'eau vers la lumière intestinale provoquée par le sulfate de magnésium. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer cet effet : l'extrait pourrait inhiber la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale ou augmenter l'absorption des électrolytes et de l'eau au niveau de la muqueuse intestinale. Dans le premier cas, c'est-à-dire l'inhibition de la sécrétion d'eau, ce pouvoir antisécrétoire pourrait être dû à la présence de tanins et des flavonoïdes dans l'extrait. Les tanins précipitent les protéines et réduisent ainsi la sécrétion d'eau et d'électrolytes à travers la membrane intestinale (ABDULKARIM A. et coll., 2005), et rendent les couches externes de la muqueuse intestinale imperméable à l'eau et aux électrolytes (HAVAGIRAY R. et coll., 2004). Quant aux flavonoïdes, ils modifient la perméabilité des muqueuses intestinales et augmentent l'absorption des électrolytes et de l'eau au niveau de la muqueuse intestinale (MAHA Y.A. et coll., 2013).

Par ailleurs, ANUPAMA S. et ses collaborateurs (2013), en étudiant l'activité antidiarrhéique de l' "*Elytraria acaulis*" en utilisant la même méthode, ont conclu que l'activité antisécrétoire de l'extrait de la plante est due aux tanins et flavonoïdes que cette plante contient.

D'autre part, les résultats des tests *in vitro* montrent que l'extrait relâche le duodénum isolé contracté par l'acétylcholine, ce qui signifie que l'extrait RFA712 pourrait inhiber la motilité intestinale provoquée par l'acétylcholine. Et puisque l'extrait inhibe la contraction du duodénum du cobaye, on pourrait dire alors que l'extrait RFA712 possède une activité anti péristaltique. Les antispasmodiques qui ralentissent ou inhibent le mouvement péristaltique de

l'intestin augmentent le temps de contact entre l'intestin et son contenu, ce qui permet à l'intestin de réabsorber l'eau et diminue ainsi la quantité d'eau excrétée (DANGOUMAU J. et coll., 2006). Or c'est la stimulation des récepteurs muscariniques qui provoque la contraction du muscle lisse intestinale. Mais après incubation du duodénum dans un bain contenant l'extrait RFA 712 l'effet maximal de l'acétylcholine diminue et la valeur de sa CE_{50} augmente. On pourrait dire que l'extrait inhibe l'acétylcholine d'une manière non compétitive. Il pourrait agir sur d'autres récepteurs, par exemple les récepteurs β -adrénergiques (RAJAMANICKA M. et coll., 2010).

Certaines familles chimiques comme les alcaloïdes, les tanins et les flavonoïdes pourraient être responsables de cette activité. Les tanins diminuent l'excitabilité des fibres musculaires lisses intestinales (HAVAGIRAY R. et Coll., 2004). Les flavonoïdes sont capables d'inhiber les spasmes intestinaux induits par l'acétylcholine. De ce fait, les flavonoïdes ont capacité d'inhiber la motilité intestinale (IZZO A.A. et coll., 1993).

L'activité antidiarrhéique de l'extrait de RFA712 pourrait donc être due à la présence de tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes. Mais le mécanisme d'action exacte pourrait être connu en isolant ces familles chimiques

CONCLUSION

V.CONCLUSION

Les résultats obtenus chez les cobayes montrent que RFA 712 diminue l'hypersécrétion intestinale et inhibe la contraction du duodénum isolé de cobaye provoquée par l'acétylcholine. D'après ces résultats RFA712 possède une activité antidiarrhéique. Ces effets pourraient être dus à la présence des tanins ou des flavonoïdes dans l'extrait. Les résultats de nos recherches renforcent les données empiriques sur l'utilisation traditionnelle de la plante à partir de laquelle RFA712 a été extrait. Mais des études approfondies apporteraient l'explication de son mécanisme d'action.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ABDULKARIM A., SADIQ Y., GABRIEL O.A., ABDULKADIR U.Z., EZZELDIN M.A. (2005).

Evaluation of five medicinal plants used in diarrhea treatment in Nigeria.

J. Ethnopharmacol., **101**: 27-30.

ALBERT M.J., FARUQUE A.S.G., SACK R.B., MAHLANBIS D. (1999).

“Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhoea in Dhaka”.

J. Clin. Microbiol., **37**: 3458 – 3464.

ANDRIATSIFERANA R. (1983).

Contribution à l'étude des plantes médicinales anti diarrhéiques.

Archives CNRP, 45-48.

ANDRIANJAKA J.C., RAKOTONDRABE F.P. (2011).

Enquête Démographique et de Santé de Madagascar 2008-2009.

INSTAT et ICF Macro, 156-159.

ANUPAMA S., VIKAS A. S., VEERMA R., ANIL B. (2013).

Evaluation of antidiarrhoeal activity of *Elytraria acaulis* extracts on magnesium sulphate-and oil-induced diarrhea in wistar rats.

Malays. J. Pharm. Sci., **11**(2): 31–39.

AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H. (1992).

Bactériologie clinique.

Ed., Ellipses-Marketing, Amherst, Massachussets, 2^{ème} édition, pp 511.

BELAICHE J. (2000).

Pathophysiology of acute infectious diarrhea.

ActaEndoscopica., **30**(3) : 177-184.

BENBERNOU L., BOUDINAR F., CHAOU M., GRANGAUD J. P., KADDACHE C., KHIARI M. E. (2000).

Guide de prise en charge de la diarrhée aigue chez l'enfant.

Ministère de la santé de la population, (Alger). Direction de la prévention. Sous direction santé maternelle et infantile, 20-21.

BUISSON Y. (2001).

“Les diarrhées, un problème de santé publique”.

Méd. Trop., 61: 205-209.

CARRE D., COTON T., DELPY R., GUISSSET M., DEBONNE J. M. (2001).

Diarrhées aigües infectieuses : traitement actuel et perspectives.

Rev. Gén. Med. Trop., 61(6): 521-528.

CATHERINE D. (1997).

Les diarrhées aigües bactériennes : causes et mécanismes.

Développement et santé, Créteil, n°128, avril 1997.

CUTTING W. (1992).

Médicaments et diarrhée.

Diarrhée dialogue.44 :2-3.

DANGOUMAU J., MOORE N., MOLIMARD M., FOURRIER-REGLAT A., LATRY K., HARAMBURU F., MIREMONT-SALAME G., TITIER K. (2006).

Pharmacologie générale.

Ed. Université Victor Segalen (Bordeaux 2), 171-175.

DOHERTY N.S. (1981).

“Inhibition of arachidonic acid release as the mechanism by which glucocorticoids inhibit endotoxin – induced diarrhoea.”

Br. J. Pharmacol., 73: 549-554.

DIEHL K.H., ROBIN H., DAVID M., RUDOLF P., RABEMAMPIANINA Y., DAVID S., VIDAL J.M., COR V.V. (2001).

A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes.

J. Appl. Toxicol., **21**, 15–23.

DUPONT H.L., LAJOUS C.I. (1994).

“Review article: Infectious diarrhoea”.

*Aliment.Pharmacol.Ther.***8**: 3-13.

FARTHING M., LINDBERG G., DITE P., KHALIF I., SALAZAR-LINDO E., RAMAKRISHNA B. (2008).

Recommandations pratiques de l’Organisation Mondiale de Gastroentérologie: Diarrhée aiguë.

World Gastroenterol.Organ.(WGO).Mars 2008.

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

Phytochemical screening.

College of pharmacy, University of Illinois, Chicago (USA), 6-7.

GALVEZ J, ZARZUELO A, CRESPO M.E., LORENTE M.D., OCETE M.A., JIMENEZ J. (1993).

“Antidiarrhoeal activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoidal constituent”.

Planta Med, **59**: 33-36.

HARI J. R., LAKSHMINARAYANA M. (2012).

Antidiarrhoeal Activity of the Aqueous Extract of the Bark of *Cinnamomum Zeylanicum* Linn in Mice.

J. Clin. Diagn. Res., **6**(2): 215-219.

HAVAGIRAY R., RMAESH C., SADHNA K. (2004).

“Study of antidiarrhoeal activity of *Calotropis gigantean* ; in experimental animals”.

J. Pharmacol. Pharmaceut. Sci., **7**: 70 -75.

IZZO A. A., Di CARLO G., AUTORE G. (1993).

“Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships,”

J. Pharma. Pharmacol., **45**(12): 1054–1059.

KENT A. J., BANKS M. R. (2010).

Pharmacological management of diarrhea.

Gastroenterol.Clin.North. Am., **3**(39): 495-507.

KERHARO J. (1971).

Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales et toxiques de la pharmacopée sénégalaise traditionnelle.

Thèse : Méd. Pharm., Dakar, 21.

KENNE FOPA O. (1994).

Contribution à l'étude de l'activité anti diarrhéique de la pulpe de fruit d'*Adansonia digitata* L. (BOMBACACEAE).

Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie.

Université Cheikh Anta Diop (Dakar), 3-26.

KID A. (1990)

Les diarrhées, étude générale et quelques données statistiques chez les enfants d'âge scolaire.

Mémoire CAPEN, Université de Tananarive, pp 70.

KOUITCHEU M., PENLAP B., KOUAM J., NGADJUI B., FOMUM Z., ETOA F. (2006).

Evaluation of antidiarrhoeal activity of the stem bark of *Cylocodiscus ganbunensis* (Mimosaceae).

Afr. J.Biotechnol., **5**(11): 1062–1066.

LAKSHMINARAYANA M., SHIVKUMAR H., RIMABEN P., BHARGAVA V. (2011).

Antidiarrhoeal activity of leaf extract of *Moringa Oleifera* in experimentally induced diarrhoea in rats.

Int. J. Phytomed., **3**: 68-74.

LUTTERODT G. D. (1992).

Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease.

J. Ethnopharmacol., **25**(3): 235–247.

MAMILAINORO L. (1996).

Etude de l'activité anti diarrhéique des extraits bruts de la plante D2.

Mémoire de DEA en Pharmacologie.

Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, 14-20.

MAHA Y. A., BABIKER M. E., DALIA J. K., SAMIA E. M. B. (2013).

Activité antidiarrhéique de l'extrait éthanolique de *Adansonia digitata* pâtes de fruits chez les rats.

J. Pharm. Phy. Adv., **3** (6): 172-178.

OMS (1989).

Traitement et prévention des diarrhées aiguës.

Manuel pratique, service de production des documents de l'OMS, Genève, Suisse, 2ème édition, 1-29.

OMS (1996).

Les maladies de l'enfant en Afrique: maladies diarrhéiques.

Bull. World Health Organ., Scientific working Group, **71**: 335-336.

OMS (2012).

Lutte contre la diarrhée de l'enfant: combler l'écart entre les connaissances et leur mise en pratique.

Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, **90**:635-636.

PRASHANT B. S., SADHANA R. S., SUVARNA T. J. (2012).

Evaluation of antidiarrheal effect of Black pepper (*Piper nigrum L.*).

Asian. J. Plant. Sci. Res., **2** (1):48-53.

RAJAMANICKA M., RAJASEKARAN A., ANANDARAJAGOPAL K., SRIDHARAN D., SELVAKUMAR K., STEPHEN B. R. (2010).

Activité anti-diarrhéique de *Dodonaea viscosa* root extraits v.
Int. J. Pharma. Bio. Sci., **1**(4):182-185.

RABESA Z. A., RANDRIANASOLO S.S., RASOLOMANANA C.J. C., RANDRIAMIZANA J. P. (1986).

Pharmacopée de l'Alaotra.
Ed. CIDST (Antananarivo), pp 285.

RAKOTOBE A. E., RASOLOMANANA C. J. C., RANDRIANASOLO S. S. (1993).

Pharmacopée de l'Ambongo et du Boina.
Ed. CIDST (Antananarivo), 16-21.

THANKURTA P., BHOWMIK P., MUKJERJEE S., HAJRA T., PATRA A., BAG P. (2007).

Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India.
J. Ethnopharmacol., **111** (3): 607-612.

WHO (1999).

La diarrhée persistante chez les enfants dans les pays en développement: mémorandum d'une réunion de l'OMS.

Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, **67**(2) : 123-132

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIDIARRHEIQUE DE L'EXTRAIT

RFA 712 CHEZ LE COBAYE

Auteur: ANDRIAMIARIMANANA Antsa
Tambiniaina

Lot: IAH 74 Avaratsena Ambohidrapeto

Année : 2014 - 2015

Tél : 034 73 903 02

E-mail: pepetaniaina@gmail.com

Rapporteur : Pr. RANDIMBIVOLOLONA F.

Laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie
Générale, de Pharmacocinétique et de
Cosmétologie

B.P : 8351

E-mail : frandimbi@gmail.com

Domaine des Sciences et Technologies

Université d'Antananarivo

RESUME

Le but de ce travail a été d'étudier l'activité anti-diarrhéique de RFA712. Son activité antisécrétoire a été étudiée *in vivo* en utilisant la méthode d'*enteropooling* provoquée par le MgSO_4 (2 g/kg, per os). Des tests *in vitro* sur le duodénum isolé contracté avec de l'acétylcholine (10^{-8} à 10^{-4} M) ont été utilisés pour étudier son effet antipéristaltique. RFA712 possède une activité antisécrétoire, il diminue l'accumulation du fluide intestinal provoquée par MgSO_4 de $33,08 \pm 1,41$ % à $58,82 \pm 5,13$ % aux doses de 200 et 400 mg/kg ($p < 0,05$). *In vitro*, RFA712 inhibe d'une manière non compétitive l'effet contracturant de l'acétylcholine, il réduit son effet maximal à $53,33 \pm 2,56$ % et $36,75 \pm 3,14$ % en présence de RFA712 à 0,125 et 0,25 mg/ml dans le bain, et il augmente la CE_{50} de l'acétylcholine de $1,6 \times 10^{-6}$ à $1,6 \times 10^{-4}$ M. Les tanins et flavonoïdes présents dans l'extrait pourraient être responsables de l'activité antidiarrhéique de RFA712.

Mots clés : diarrhée, antipéristaltique, antisécrétoire, enteropooling, cobaye

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the anti-diarrheic activity of RFA712. Its antisecretory activity was studied *in vivo* by using the method of "enteropooling" provoked by the MgSO_4 (2g / kg, per os). *In vitro* test on the isolated duodenum contracted with the acetylcholine (10^{-8} in 10^{-4} M) were realized to study its antipéristaltique effect. RFA712 possesses an activity antisecretory, he decreases the accumulation of the intestinal fluid caused by MgSO_4 of 33.08 ± 1.41 % in 58.82 ± 5.13 % in the doses of 200 and 400 mg / kg ($p < 0,05$). *In vitro*, RFA712 inhibits in a not competitive way the effect contracturant of the acetylcholine, he reduces his maximal effect to 53.33 ± 2.56 % and 36.75 ± 3.14 % in the presence of RFA712 in 0.125 and 0.25 mg / ml in the bath, and he increases the CE_{50} of the acetylcholine to $1,6 \times 10^{-4}$ in $1,6 \times 10^{-6}$ M. The presence of tannins and flavonoids in the extract RFA712 could be responsible for its effect anti-diarrheic.

Keywords: diarrhea, antipéristaltic, antisecretory, enteropooling, guinea pig.