Étude de l`activité analgésique périphérique de l`extrait HTTEX

Selon les observations physiques, dans la médecine arabe Avicenne (980 - 1038) , la douleur est un signe qui correspond à un changement des états humoraux. Tandis qu'à l'époque du moyen-âge, elle est considérée comme une punition divine (RIBAU C. et DUCHANGE N., 2003). De nos jours, la douleur est considérée comme un des signes majeurs d'une maladie. Elle constitue un signal d'alerte, une des raisons les plus fréquentes pour lesquelles les patients ont besoin d'une assistance médicale (DEBRIL J., 2012).

La douleur est une sensation pénible ressentie dans une partie du corps et perçue par le cerveau (CORBINAU J. P., 2012). L'IASP définit la douleur comme une «expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou décrite en termes évoquant une telle lésion». Elle est propre pour chaque individu (RIOULT B. et SERVILLAT T., 2009) ; et intègre une dimension sensorielle (nociception), une dimension affective et émotionnelle (UVMAF, 2011 - 2012). La perception de la douleur est influencée en grande partie par le vécu de la personne: une même lésion subie à des périodes différentes de la vie engendrera un ressenti qui ne sera pas forcément le même entre ces deux moments. Le niveau de compréhension et de connaissance du fonctionnement de la douleur, l'état psychique et social ainsi que la culture influencent également la perception de la douleur (DEBRIL J., 2012).

La douleur comprend 3 composantes : la composante sensori-discriminative, la composante affectivo-emotionnelle et comportementale, enfin la composante cognitive. La composante sensori-discriminative permet de décoder la qualité de la douleur, son intensité, sa durée et sa localisation. Ensuite, la composante affectivo-emotionnelle et comportementale de la douleur est le responsable de la sensation désagréable de la douleur : l'anxiété, l'angoisse, la réaction de fuite dont l'aspect comportemental englobe les manifestations diverses telles que la réaction d'évitement et la tentative de soulager la douleur. Enfin, l'aspect cognitif de la douleur qui dépend de la connaissance et de l'interprétation individuelle, il fait référence au passé ; dans ce cas, l'histoire de vie de la personne entre en jeux (BERNARD C., 2004 ; LUIS DEGALDO O., 2006 ; SAULEAU P., 2008).

Suivant le temps d'évolution de la douleur, on distingue la douleur aiguë et la douleur chronique ; et suivant son origine, on distingue la douleur nociceptive, neuropathique,

dysfonctionnelle ou psychogène (SPINEWINE A., 2005 ; FONZO-CHRISTE C., 2006 ; RIOULT B. et SERVILLAT T., 2009).

La douleur aigue est un symptôme, c'est une douleur de courte durée, elle est brusque et engendrée par un excès de nociception ; elle est liée à un traumatisme ou à une anxiété. Une inflammation locale peut l'intensifier à la suite de la sensibilisation périphérique des nocicepteurs. Dans ce cas, elle joue un rôle de signal qui permet à l'organisme d'anticiper les dangers, et peut être soulagée par les analgésiques courants. Tandis que la douleur est chronique lorsqu'elle persiste plus de 3 à 6 mois. Dans ce cas, elle ne constitue plus un signal d'alarme, elle est inutile et devient elle-même une maladie. Elle est engendrée par un excès de nociception ou une lésion neurologique qui entraine des conséquences sur l'état physique, psychologique ou relationnelle de la personne ; telles qu'une dépression, une anxiété ou un trouble du sommeil (FONZO-CHRISTE C., 2006 ; SALEAU P., 2008 ; DEBRIL J., 2012).

Par contre, la douleur nociceptive est une pathologie générée par une lésion ou une réaction inflammatoire au niveau périphérique qui peut être somatique ou viscérale. A Madagascar, une enquête menée auprès du centre hospitalier CHUJRA a montré que parmi le 98 patients algiques, la douleur de type nociceptif était la plus rencontrée (RAKOTOARISOA R. et coll., 2014). Quant à la douleur neuropathique, elle est due au dysfonctionnement du système nerveux périphérique ou central. Elle est caractérisée par de nombreux symptômes comme l'allodynie, l'hyperalgésie. Enfin, la douleur psychogène est due à une fonction anormale du contrôle central qui se manifeste lors d'une décompensation psychologique comme l'anxiété, une dépression ou une névrose (SPINEWINE A., 2005; ALIGNE B., 2012 ; CORBINAU J. P., 2012 ; SUZIE C. et Le BRETON C., 2013).

Les terminaisons nerveuses à l' origine de sensations douloureuses sont appelées des nocicepteurs. Ils se trouvent dans les tissus cutanés, les muscles striés, les muscles lisses (viscères, vaisseaux), les articulations et les parties osseuses (PAYEN J. F., 2012). Ils sont beaucoup plus nombreux dans la partie cutanée et se présentent sous 2 formes: les mécano nocicepteurs unimodaux et les nocicepteurs polymodaux ; tandis qu'ils sont peu nombreux au niveau des articulations, les viscères, les tendons ; c'est pour cela que la perception de la douleur est mal identifiée dans ces zones.

Ces nocicepteurs peuvent être stimulés par des stimuli mécanique, thermique, chimique, comme les ions H^+, K^+, ou par des substances algogènes comme les Bradykinines, Histamine, Sérotonine, Prostaglandines, substances P, ATP… (CAILLOCE, 2009). Les mécano

nocicepteurs unimodaux répondent au stimulus mécanique intense sur la peau, comme les piqûres, le pincement et la coupure, ces nocicepteurs sont associés à des fibres Aδ. Les nocicepteurs polymodaux sont des récepteurs qui répondent aux stimuli thermique et mécanique intense, mais aussi à des stimuli chimiques algogènes libérés au cours d'une lésion cellulaire. Ces nocicepteurs sont liés à des fibres C (UVMaf, 2011 - 2012 ; PAYEN J. F., 2012). Les messages nociceptifs sont véhiculés par ces différentes fibres jusqu'à la corne postérieure de la moelle épinière (UVMaf, 2011 - 2012). La vitesse de transmission des fibres Aδ est rapide, tandis que celle des fibres C est lente (UVMaf, 2011 - 2012). Les fibres Aδ sont des fibres myélinisées de moyen calibre, et leur vitesse de conduction est de 4 à 30 m/s. Tandis que les fibres C sont des fibres amyélinisées, très fines, et conduisent les influx nerveux à une vitesse de 0,5 à 2,5 m/s (PAYEN J. F., 2012 ; UMFT, 2014 - 2015).

A partir de stimuli nociceptifs jusqu`à la perception de la douleur, le message suit 3 étapes successifs qui peuvent se présenter et marquer par une série des réactions chimiques et électriques: la transduction à la transmission, la modulation et la perception de la douleur ou l'intégration (PAYEN J. F., 2012).

La transduction sensorielle correspond à la transformation du stimulus mécanique, thermique ou chimique en énergie chimio-électrique dans les terminaisons nerveuses sensorielles spécialisées (MARC R. et ISABELLE D., 2007 ; SAULEAU P., 2008). Le message nociceptif fait l'objet de modulation qui peut être facilitatrice ou inhibitrice. Mais, souvent le contrôle inhibiteur prime sur le contrôle facilitateur (GUIRIMAND F., 2003). Le contrôle inhibiteur consiste à *la théorie du contrôle de la porte* ou *théorie de portillon* et au contrôle de la voie inhibitrice descendante par les systèmes opioïdes (SAULEAU P., 2008). La théorie de portillon correspond à une diminution de la perception de la douleur au niveau des neurones périphériques. Une fois que le message nociceptif véhiculé par les fibres Aδ et les fibres C arrive au niveau de la moelle épinière, les fibres Aα et Aβ qui conduisent les messages non nociceptifs ferment la porte et bloquent les messages nociceptifs. Ce mécanisme est sous-contrôle des enképhalines (BERNARD C., 2004 ; UMFT, 2014 - 2015). Après le relais de la corne dorsale de la moelle épinière, la transmission de l'influx douloureux emprunte 2 voies : par les fibres Aδ ou les fibres C. Les fibres Aδ, se lancent dans le thalamus jusqu'au cortex sensitif et les fibres C se projettent dans le thalamus puis dans les structures limbiques jusqu'au cortex ; c'est le support de la dimension affective et émotionnelle, mémorisation, qui déclenche la réaction de fuite ou de défense suite à la

sensation douloureuse (SAULEAU P., 2008 ; PAYEN J. F., 2012). Au niveau du tronc cérébral existent aussi des mécanismes qui contrôlent les messages nociceptifs. Une fois que le système de contrôle endogène de la douleur est stimulé par des messages nociceptifs, de nombreux neuromédiateurs sont libérés et inhibent les neurones nociceptifs médullaires (SAULEAU P., 2008) ; comme les endorphines qui se fixent sur les récepteurs opiacées : Mu (μ) , Delta (δ) et Kappa (κ), et ce mécanisme inhibe la sensation douloureuse (PAYEN J. F., 2012). Des produits exogènes peuvent aussi agir de la même manière, ce sont les analgésiques, des médicaments qui préviennent la sensation de douleur (FONZO-CHRISTE C., 2006). Ils interrompent la transmission du signal neuronal de douleur depuis la zone lésée, en souffrance, vers le cerveau (http://www.chups.jussieu.fr/polys/nivA/DouleurNivA.html).

De tous les temps, les chercheurs donnent de l'importance à la douleur et s'y attèlent pour trouver des substances analgésiques qui sont des médicaments capables de soulager ou supprimer la sensation douloureuse (FONZO-CHRISTE C., 2006). Au V^{ème} siècle avant Jésus Christ , Hippocrate utilisait déjà l'écorce de saule contre les douleurs ressenties lors de l'accouchement (HOSTETTMANN K., 2012). Et plus tard, d'autres produits issus des plantes ont aussi trouvé leur place dans la prise en charge de la douleur comme l'opium, le saule, et la mandragore (RIBAU C. et DUCHANGE N., 2003). Le plus connu dans l'histoire est l'aspirine dont le procédé de fabrication a été mis au point en 1899 par le laboratoire allemand Dreser. Cette avancée médicale est l'œuvre du chimiste Felix Hoffmann qui a réussi à synthétiser le dérivé acétylé de l'acide salicylique en 1893, doté de grandes propriétés analgésiques. La firme Bayer a ensuite commercialisé le médicament et donne naissance à un nouveau marché : l'industrie pharmaceutique (Le'VESQUE H. et LAFONT 0., 2000) .

Suivant leur site d'action, les analgésiques sont classés en analgésiques périphériques et analgésiques centraux (FONZO-CHRISTE C., 2006). Et selon l'OMS, ils sont classés en 3 paliers : le palier I qui regroupe les analgésiques non opioïdes ; ce sont des analgésiques périphériques utilisés pour les douleurs légères comme l'aspirine, le paracétamol, et les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Tandis que le palier II regroupe les analgésiques opioïdes faibles qui sont des analgésiques centraux, ils soulagent les douleurs modérées à sévères qui ne sont pas soulagées par les antalgiques de niveau I ; ce sont la codéine, le tramadol, le paracétamol. Enfin, les analgésiques du palier III soulagent les douleurs intenses de type nociceptif, ce sont les opioïdes forts comme la morphine, fentanyl qui occupent les récepteurs opioïdes (SPINEWINE A., 2005 ; COFER, 2010 - 2011).

La plupart des médicaments actuellement sur le marché sont des analgésiques périphériques, ils agissent sur la phase de transduction et inhibent l'action des prostaglandines et d'autres substances algogènes dans le processus de l'inflammation (GUIRIMAND F., 1998). Généralement, l'action majeure des analgésiques périphériques porte sur la synthèse des prostaglandines ; comme l'aspirine et ses dérivés qui inhibent la cyclo oxygénase périphériques (COX), enzyme responsable de la synthèse des prostaglandines. Ces analgésiques périphériques peuvent également renforcer le contrôle médullaire pour soulager la douleur (GUIRIMAND F., 2003). Des recherches sont en cours pour trouver d'autres molécules capables d'antagoniser sélectivement les récepteurs de la bradykinine, sérotonine, ou histamine.

Malgré l'existence de ces produits sur le marché, la majorité de la population africaine n'a pas accès aux médicaments dits « modernes », 75 % de cette population ont recours à la médecine traditionnelle pour se soigner (SEREME A. et coll., 2008). A Madagascar de nombreuses plantes sont utilisées pour soulager la douleur, comme *Ageratum Conyzoides* (Bemaimbo, hanitrinipantsaka) de la famille des ASTERACEES, utilisé sous formes de décoction pour soulager les règles douloureuses ; le gel de *Aloe vera* (vahona, sakoakenkigny) de la famille de XANTHORRHOEACEES appliqué sur les parties douloureuses ; *Aphloia theaeformis* (ravimboafotsy, voafotsy) de la famille des APHLOIACEES dont la décoction de ses feuilles ou de son écorce est consommée pour soulager les douleurs musculaires ; la pâte de fruit de *Capsicum annuum* (sakay ou pilopilo) de la famille des SOLANACEES, en usage externe pour soulager les douleurs articulaires ; la décoction des feuilles de *Cymbopogon citrus* (veromanitra, fatakamanitra) de la famille des POACEES possèdent des effets analgésiques; la décoction de l'écorce de *Ficus marmorisa* (lazo, Mandresy) de la famille des MORACEES pour soulager la lombalgie ; la décoction du rhizome de *Zingiber officinale* (sakaitany, sakamalaho) de la famille des ZINGIBERACEES pour traiter les maux de gorge (JEAN-PIERRE N., 2012) ; le décocté des feuilles de *Ricinus communis* (Ricin ou Tanatanana) (EUPHORBIACEES) est indiqué pour soulager les règles douloureuses ; la poudre de l'écorce de *Cedrelopsis grevei* (katrafay) (MELIACEES) en application locale pour soulager les douleurs lors d'une fracture (DEBRYAY M., 1971).

D'après les enquêtes ethnobotaniques que nous avions effectuées dans la commune d'Andasibe, les feuilles de la plante sujet de notre mémoire sont utilisées pour soulager les maux de tête, les douleurs cervicales, la lombalgie, les douleurs articulaires et musculaires. D'après ces données, les feuilles de cette plante pourraient avoir une activité analgésique, et

notre objectif a été d'étudier cette activité analgésique potentielle. Des études de l'activité analgésique périphérique ainsi que l'activité analgésique centrale de l'extrait hydro alcoolique des feuilles de cette plante chez la souris ont fait l'objet du présent mémoire.

II. MATERIELS ET METHODES

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Des feuilles de la plante ont été récoltées à Ambolokandrina dans la région d'Antananarivo au mois de décembre 2015. Les feuilles fraîches ont été séchées dans un endroit aéré, à l'ombre et à la température ambiante pendant 3 mois. Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique à marteau au LPGPC, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. Deux cent cinquante grammes (250 g) de la poudre obtenue ont été macérés dans un mélange éthanol - eau (60 : 40) à la température ambiante pendant trois jours. Le macérât a été filtré à l'aide d'un coton hydrophile, puis le filtrat a été évaporé à sec à l'aide d'un distillateur.

L'extrait obtenu a été codé HTTEX puis pesé pour calculer le rendement selon la formule :

$$\textbf{Rendement}(\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse du matériel végétal}} \text{x } 100$$

2. Criblage phytochimique

Divers tests ont été effectués pour détecter les familles chimiques présentes dans l'extrait HTTEX. Des réactifs spécifiques ont été utilisés ; chaque réactif réagit avec la famille chimique correspondante en produisant un complexe coloré ou insoluble (FONG H. H. S. et coll., 1977) (Tableau I).

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

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
STEROIDES ET TRITERPENES	LIBERMAN BURCHARD	Anhydride acétique + H_2SO_4	Coloration violette
	BADGET KEDDE	Acide picrique	Coloration rouge
	SALKOWSKI	H_2SO_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 (3 cm d'épaisseur) après 30 mn

Pour exprimer la quantité de la famille chimique observée, les signes suivants ont été utilisés :

+++ : Famille chimique présente en forte quantité

++ : Famille chimique présente en quantité moyenne

+ : Famille chimique présente en faible quantité

B. TESTS BIOLOGIQUES

L'activité analgésique de l'extrait HTTEX a été testée *in vivo* chez la souris. Son activité analgésique périphérique a été étudiée en injectant du formaldéhyde dans la voûte plantaire de l'animal, tandis que son activité analgésique centrale a été évaluée en immergeant la queue de la souris dans l'eau chaude.

1. Animaux utilisés

L'activité analgésique de l'extrait HTTEX a été étudiée chez les souris de race SWISS âgées de 6 à 8 semaines, pesant entre 25 à 30 g (AZADEH S. et coll., 2010). Ces animaux ont été élevés à l'animalerie du LPGPC (Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie), à la faculté des sciences de l'Université d`Antananarivo. Ils ont eu un accès libre à la nourriture (provende LFL1420) et à l'eau, et soumis aux mêmes conditions : à la température de 20°C, un cycle de lumière et d'obscurité de 12 h/12 h. Avant l'expérience, les animaux ont été mis à jeun pendant 12 heures avec de l'eau *ad libitum* (SOOK-HA F. et coll., 2014 ; NIRMAL K. et coll., 2016). Tous les jours, pendant une semaine avant le test , les souris ont été habituées aux appareils pendant 5 minutes (ELHABAZI K. et coll., 2014).

Étude de l`activité analgésique périphérique de l`extrait HTTEX

L'activité analgésique de l'extrait HTTEX a été étudiée *in vivo* chez la souris sur la douleur provoquée par la solution de formaldéhyde à la concentration de 1 % injectée sous l'aponévrose plantaire (ZULLIES I. et coll., 2014).

Des souris mises à jeun pendant 12 h ont été utilisées. Elles ont été réparties en 3 lots : 1 lot témoin et 2 lots traités avec l'extrait HTTEX. Les souris du lot témoin ont reçu 10 ml/kg d`eau distillée, tandis les animaux des deux autres lots ont reçu l`extrait HTTEX aux doses de

300 mg/kg et 600 mg/kg par voie orale dans un volume de 10 ml/kg (figure 1) (DALLY LABBA I. et coll., 2010).

Figure 1: administration de l'extrait par voie orale chez la souris.

Trente minutes après, 20 µl d'une solution de formaldéhyde (1 %) ont été injectées sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite de chaque souris (ZULLIES I. et coll., 2014).

Après cette injection, chaque animal a été placé dans un bocal en verre transparent (22,5 x 22,5 x 23 cm) pour observer leurs réactions. La durée du léchage ou de morsure de sa patte a été enregistrée entre 0 - 5 minutes et 10 - 30 minutes après l'injection de la solution de formaldéhyde (ZULLIES I. et coll., 2014).

L'inhibition de la douleur a été exprimée en pourcentage pour chaque phase, et elle a été calculée selon la formule:

$$\mathbf{ID}\ (\%) = \frac{\mathbf{T0 - T}}{\mathbf{T0}} \mathbf{X\ 100}$$

Avec:

T_0 : Temps moyen de léchage et de morsure de la patte du lot témoin (secondes).

T : Temps moyen de léchage et de morsure de la patte du lot traité (secondes).

ID: Inhibition de la Douleur (%).

(IDID S. Z. et coll., 1998 ; SOOK-HA F. et coll., 2014).

3. Etude de l'activité analgésique centrale de l'extrait HTTEX

L'activité analgésique centrale de l'extrait HTTEX a été étudiée *in vivo* chez la souris, sur la douleur provoquée par un stimulus thermique (IDID S. Z. et coll., 1998).

Un test préliminaire a été effectué pour sélectionner les animaux utilisés dans le test. Les souris ont été placées dans des petites cages individuelles comportant un trou qui laisse sortir leur queue. Un à deux centimètres du bout de la queue a été marqué et plongé dans l'eau chaude maintenue à la température de 50° C (figure 2) (IDID S. Z. et coll., 1998). Le temps d'immersion maximal de la queue de chaque souris a été fixé à 15 secondes pour éviter des dommages tissulaires (ELHABAZI K. et coll., 2014). Seuls les animaux ayant un temps de réflexe inférieur ou égal à 3 secondes ont été retenus pour l'expérience (AMOUR F. et SMITH D., 1941).

Figure 2. Dispositif expérimental montrant la queue de la souris plongée dans un bain thermostaté à la température de 50˚C.

Les souris sélectionnées ont été réparties en 3 lots: 1 lot témoin et 2 lots ont reçu l`extrait HTTEX aux doses de 300 mg/kg et 600 mg/kg *per os* dans un volume de 10 ml/kg (JAYANTHI M. K. et coll., 2012).

Quinze, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes après l'administration de l'eau distillée chez les animaux du lot témoin et de l'extrait aux doses de 300 mg/kg ou 600 mg/kg chez les animaux