

TABLE DES MATIÈRES

TABLES DE MATIÈRES.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	iii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	iv
I. INTRODUCTION.....	1
II. MATERIELS ET MÉTHODES.....	4
A. Partie chimique.....	4
1. Préparation de l'extrait	4
2. Criblage phytochimique.....	5
B. Partie pharmacologique.....	7
1. Animaux d'expérimentation.....	7
2. Étude de l'effet de l'extrait HWF92 sur la diarrhée provoquée par l'huile de ricin.....	7
3. Étude de l'effet de l'extrait HWF92 sur le péristaltisme intestinal	8
4. Étude de l'effet de l'extrait HWF92 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine.....	9
C. Expression et analyse des résultats.....	10
III. RÉSULTATS.....	11
A. Partie chimique.....	11
1. Rendement de l'extraction.....	11
2. Résultats du criblage phytochimique.....	11
B. Partie pharmacologique.....	11
1. Effet de l'extrait HWF92 sur la diarrhée provoquée par l'huile de ricin	11
2. Effet de l'extrait HWF92 sur le péristaltisme intestinal	12
3. Effet de l'extrait HWF92 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine	13
IV. DISCUSSION.....	15
CONCLUSION.....	17
BIBLIOGRAPHIE.....	18

LISTE DES FIGURES

Figure1. Distillateur utilisé pour évaporer le filtrat.....	4
Figure 2. Variation du volume du fluide intestinal chez les animaux du lot témoin et les animaux traités avec l'extrait HWF92, administré par voie orale, aux doses de 100, 200, et 400 mg / kg	12
Figure 3. Variation du relâchement de l'iléon de cochon d'Inde contracté avec l'acétylcholine en injectant l'extrait HWF92 dans le bain d'une manière cumulative.	13
Figure 4. Pourcentage de l'amplitude des contractions de l'iléon isolé de cochon d'Inde provoquées par l'acétylcholine en absence et en présence d'extrait HWF92 aux concentrations de 0,25 ; 0,5 et 0,75 mg/ml dans le bain	14

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Tests utilisés pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait HWF 92 (FONG et al., 1977)	6
Tableau II. Composition de la solution de Tyrode.....	8
Tableau III. : Les familles chimiques présentes dans l'extrait HWF92	11

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

< : Inférieur

± : plus ou moins

% : pourcentage

Ach : Acétylcholine

al : alii

AMP_C : adénosine monophosphate cyclique

°C : degré Celsius

CaCl₂ : chlorure de calcium

CE₅₀ : concentration donnant 50 % d'effet

cm : centimètre

EDSM : Enquête Démographique et de Santé de Madagascar

e.s.m : écart type standard moyen

FeCl₃ : chlorure de fer (III)

g : gramme

h : heure

HCl : acide chlorhydrique

H₂SO₄ : acide sulfurique

KCl : chlorure de potassium

Kg : kilogramme

log : logarithme décimal

LPGPC : Laboratoire de Pharmacologie Général de Pharmacocinétique et de Cosmétologie

μ : mu

\bar{m} : Moyenne

MgCl₂ : chlorure de magnésium

mg/kg : milligramme par kilogramme

ml/kg : millilitre par kilogramme

ml : millilitre

mM : millimole

mn : minute

M : mole

mM.l⁻¹ : millimole par litre

\bar{m} : Moyenne

n : nombre d'animaux utilisés

NaCl : chlorure de sodium

NaHCO₃ : bicarbonate de sodium

NaH₂PO₄: phosphate monosodique

NaOH : hydroxyde de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P : Seuil de signification

UNICEF: United Nations International Children's Emergency Fund

UV : ultra-violet

$\bar{\sigma}$: Écart type réduit

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La diarrhée est caractérisée par une émission de selles trop fréquente, trop abondante, de consistance anormalement liquide ou molle à contenu liquidien, de volume supérieur à 200 ml par jour (CESA RD *et al.*, 2002 ; BOURILLON *et al.*, 2008). C'est une des maladies préoccupantes pour la santé publique dans le monde, surtout dans les pays en voie de développement (BALAJI *et al.*, 2012). Tout âge confondu, environ 1,7 milliards de personnes sont atteintes de cette maladie dans le monde (OMS, 2011 ; ASSOGBA *et al.*, 2012), avec 4 millions de décès par an (MOHAMMED *et al.*, 2014). Elle est potentiellement sévère chez les nourrissons et les jeunes enfants, avec 0,5 à 1,9 épisodes par an et plus de 7 à 10 % d'hospitalisation. Elle figure parmi l'une des principales causes de mortalité chez les enfants de moins de 3 ans (HUBER-GIESKE et BICHARD., 2013). Par ailleurs, elle est la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans après les infections respiratoires et elle tue plus de jeunes enfants que le sida, le paludisme et la rougeole réunis (LIU *et al.*, 2010). Le nombre de personnes atteintes de la diarrhée est très élevé dans les pays en développement notamment en Afrique subsaharienne (SCHUBERT *et DIWET.*, 2008). Dans ces pays, elle est due à l'insalubrité, au faible accès à de l'eau potable et à la malnutrition qui rendent les enfants plus vulnérables (LEFLAIVE *et al.*, 2012).

A Madagascar, la diarrhée est une cause majeure de mortalité infantile. Selon l'EDSM en 2009, la prévalence de cette maladie chez les enfants de moins de cinq ans est de 8 % (INSTAT et ICF Macro., 2010). Elle constitue la troisième cause principale de mortalité infantile après la pneumonie et le paludisme (UNICEF, 2014).

Cette maladie est due au déséquilibre entre l'absorption et la sécrétion intestinale d'eau et d'électrolytes. Cela peut être due à la baisse de la réabsorption d'eau, ou à la hausse de la sécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau de la lumière intestinale (CESARD *et al.*, 2002 ; OMS, 2006). L'intestin est le siège permanent de mouvement d'eau et d'électrolytes qui maintient l'équilibre hydroélectrique de l'organisme (BENBERNOU *et al.*, 2000). La réabsorption d'eau suit les mouvements des électrolytes à travers de la muqueuse intestinale (BOURILLON *et al.*, 2008). Selon son origine, la diarrhée peut être classée en trois types : la diarrhée motrice, la diarrhée osmotique et la diarrhée sécrétoire. La diarrhée motrice est provoquée par une augmentation du péristaltisme intestinal, elle est d'origine nerveuse par l'intermédiaire de l'acétylcholine. Elle peut aussi être causée par la sérotonine ou l'histamine (GUE *et al.*, 1997). Cette hypermotilité intestinale diminue le temps pour assurer la réabsorption d'eau et des électrolytes (DELVAUX et GAY, 2006). Tandis que la diarrhée osmotique est le résultat d'une augmentation de la sécrétion d'eau vers la lumière intestinale

suite à la présence de substances osmotiquement actives, non absorbables dans la lumière intestinale. Ces molécules attirent et retiennent l'eau dans la lumière intestinale, entraînant la formation de selles liquides et molles comme le sulfate de magnésium ($MgSO_4$). Non seulement cette molécule attire l'eau, mais elle provoque la libération de cholécystokinine au niveau de la muqueuse duodénale. La cholécystokinine empêche la réabsorption de chlorure de sodium ($NaCl$) et de l'eau, il augmente aussi la motilité de l'intestin, ce qui provoque une diarrhée à la fois osmotique et sécrétoire (ZAVALA *et al.*, 1998). Par ailleurs, une carence en lactase augmente la quantité de lactose non hydrolysé en glucose et galactose qui sont absorbables par la muqueuse intestinale. Dans ce cas, une quantité de lactose stagne dans la lumière intestinale et y attire l'eau, ce qui entraîne une diarrhée (MARTEAU *et al.*, 2005).

Enfin, la diarrhée sécrétoire est caractérisée par des selles complètement molles et voire liquides. Elle est due à l'irritation de la cellule épithéliale de l'intestin provoquée par les toxines libérées par des germes pathogènes, d'agents irritants comme l'huile de ricin, ou certains médicaments comme les laxatifs irritants. Beaucoup d'aliments non digérés peuvent également produire de l'acide gras qui irrite la paroi intestinale (MARTEAU, 2012). Cette irritation perturbe le mouvement d'eau et d'électrolytes en faveur de la sécrétion (BELAICHE, 2000)

Les recherches sur les produits anti-diarrhéiques visent à réduire le nombre d'émission de selles et d'augmenter leur consistance en ralentissant le transit intestinal ou en inhibant l'hypersécrétion intestinale (CARRE *et al.*, 2001). De nombreux médicaments sont utilisés pour traiter la diarrhée. Selon leur mécanisme d'action, ils sont classés en médicaments anti sécrétaires, antipéristaltiques ou adsorbants.

Les anti-sécrétaires inhibent l'hypersécrétion d'eau et des électrolytes dans la lumière intestinale, comme le racécadotril (Tiorfan \circledR). Dans l'organisme, ce médicament est hydrolysé en thiophan, un inhibiteur de l'enképhalinase, enzyme responsable de la dégradation de l'enképhaline. Or en se fixant sur le récepteur opioïde μ , l'enképhaline empêche la sortie d'eau et des électrolytes, réduisant ainsi la sécrétion intestinale (LAURANS *et al.*, 1999 ; PERLMUTER et PERLMUTER, 2013). Le racécadotril peut aussi se fixer sur le récepteur opioïde μ de l'intestin. L'activation de ce récepteur diminue le taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Or l'AMPc régule l'ouverture des canaux à chlorure de l'entérocyte, et la fermeture de ces canaux diminue la sécrétion d'eau au niveau de la paroi intestinale (TURVILL *et al.*, 1997 ; SCHWARTZ, 2000).

Les antipéristaltiques inhibent l'action de l'acétylcholine, de l'histamine ou de la sérotonine, ralentissant ainsi le transit intestinal. Cela permet à l'intestin de mieux absorber l'eau et les électrolytes

qui se trouvent dans le contenu intestinal. Ils diminuent ainsi le volume de selles émises et augmentent en même temps leur consistance (ALLAIN, 2000). Exemple, la lopéramide (Imodium[©]) est un agoniste du récepteur opioïde μ intestinal, dont l'activation conduit à un effet antispasmodique et atténue l'incontinence par contraction du sphincter anal lors d'une diarrhée aiguë. En se liant aux récepteurs des opiacés, il ralentit le péristaltisme et augmente le temps de transit intestinal et la réabsorption d'eau et d'électrolytes au niveau de la lumière intestinale (KENT et BANKS, 2010).

En plus des médicaments manufacturés, les plantes médicinales sont toujours utilisées (SANOGO, 2006). De nombreuses plantes sont utilisées pour traiter la diarrhée comme *Eciosa Linn.* (RUBIACEAE) (GANDHIMATHI *et al.*, 2009), *Ceratonia siliqua* (FABACEAE), *Psidium guayava* (goavy) (MYRTACEAE), (WONDIMAGEGN *et al.*, 2014), *Persea americana* (LAURACEAE) la partie utilisée de ce dernier est les feuilles.

D'après les enquêtes ethnobotaniques que nous avions effectuées dans la région de Vakinakaratra, le décocté des feuilles de la plante dont l'extrait est codé HWF92, est utilisé pour traiter les "maux de ventre" suivis d'une émission de selles liquides très fréquentes. En analysant ces données, nous avons émis une hypothèse que ces feuilles pourraient avoir une activité anti diarrhéique. Notre objectif est de vérifier cette hypothèse. Cette activité a été étudiée chez le cochon d'Inde. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués. Son effet sur la diarrhée sécrétoire a été étudié *in vivo*, et son effet sur le péristaltisme intestinal a été étudié *in vitro* sur iléon isolé de cochon d'Inde.

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Les feuilles de la plante utilisée dans cette étude ont été récoltées dans la région de Vakinakaratra commune rurale de Betafo au mois d'Octobre 2017. Les feuillées ont été séchées à l'ombre, dans une salle aérée, à la température ambiante, pendant 25 jours. Deux cent grammes des feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau BROOK Crompton © SERIE 2000 au Laboratoire de Pharmacologie Générale, Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC) de la Faculté des Sciences, de l'université d'Antananarivo.

La poudre obtenue a été macérée dans un mélange éthanol-eau (60 : 40), à la température ambiante pendant 72 heures. Ce mélange a été agité une fois par jour. Après cette période, le macérât a été filtré sur du coton hydrophile et le filtrat obtenu a été évaporé à l'aide d'un distillateur à la température de 80° C (Figure 1), puis évaporé à sec dans un bain marie, à la température de 100° C. L'extrait obtenu a été codé HWF 92, puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction selon la formule :

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



Figure 2. Distillateur utilisé pour évaporer le filtrat.

2. Criblage phytochimique

Pour identifier les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait, un criblage phytochimique a été effectué. Ce test est basé sur des réactions de coloration ou de précipitation, en utilisant des réactifs spécifiques pour chaque famille chimique (FONG *et al.*, 1977) (Tableau I).

Tableau I. Tests utilisés pour identifier les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait HWF 92 (FONG *et al.*, 1977).

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observations
ANTHOCYANES	BATH-SMITH	HCl à froid	Coloration rouge
LEUCOANTHOCYANES		HCl concentré + bain marie	Coloration rouge violacée
SAPONINES	MOUSSE	HCl + Agitation	Persistance d'une mousse (3cm d'épaisseur) après 30mn
SUCRES RÉDUCTEURS		Liqueur de Fehling+ Bain-marie	Précipitation rouge brique
POLYSACCHARIDES		+ 3 Volumes d'éthanol	trouble
COUMARINES		NaOH 10%	Fluorescence à l'UV
ALCALOÏDES		DRAGENDORFF, MAYER, WAGNER	Précipitation
TANINS		Gélatine + NaCl	Précipitation verte
		Gélatine + FeCl ₃ Méthanol	Précipitation bleue
COMPOSÉS PHÉNOLIQUES		Gélatine 1%	Précipitation
FLAVONOÏDES	WIL-STATER	Ruban de Mg + HCl concentré	Coloration rouge
STÉROÏDES ET TRITERPÈNES	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

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

L`activité de l`extrait HWF 92 a été étudiée chez le cochon d`Inde. Son effet sur la sécrétion intestinale a été étudié *in vivo* en utilisant la méthode d`enteropooling provoquée par l`huile de ricin pure administrée par voie orale, et son effet sur le péristaltisme intestinal a été étudié *in vitro* en utilisant l`iléon isolé de cochon d`Inde contracté avec l`acétylcholine.

1. Animaux d`expérimentation

Des cochon d`Inde mâles et femelles, pesant entre 200 et 300 grammes ont été utilisés pour cette étude. Ils ont été élevés à l`animalerie du Laboratoire de Pharmacologie Générale, Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC) de la Faculté des Sciences, de l`Université d`Antananarivo, avec un cycle de lumière et d`obscurité de 12/12 heures et nourris avec des feuilles fraîches de graminées. Les animaux ont été mis à jeun pendant 18 heures avant les tests.

2. Étude de l`effet de l`extrait sur la diarrhée provoquée par l`huile de ricin

L`effet de l`extrait contre la diarrhée provoquée par l`huile de ricin a été étudié *in vivo* en étudiant le volume du fluide intestinal ou « *enteropooling* » (DOHERTY, 1981).

Des animaux mis à jeun pendant 18 heures ont été utilisés. Ils ont été répartis en 4 lots : 1 lot témoin, et 3 lots traités avec l`extrait.

Les animaux du lot témoin ont reçu 10 ml/kg d`eau distillée, par voie orale, et les animaux des trois autres lots ont respectivement reçu 100, 200 et 400 mg/kg d`extrait dans 10 ml/kg d`eau distillée par voie orale (EZEKWESIL *et al.*, 2004).

Après 45 minutes, 1 ml d`huile de ricin pure a été administré par voie orale chez tous les animaux (AKUODOR *et al*, 2011). Trente minutes après l`administration de l`huile de ricin, les cochons d`Inde ont été anesthésiées par inhalation d`éther éthylique et exsanguinés en coupant les deux carotides. Ensuite, une laparotomie a été effectuée. L`intestin grêle a été repéré, puis un nœud a été fixé au niveau du pylore et un deuxième au niveau de la jonction iléococale. Il a ensuite été prélevé dans sa totalité, puis son contenu a ensuite été versé dans un tube et centrifugé à la vitesse de 3000 tours par minute, pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré puis versé dans une éprouvette graduée et son volume a été mesuré (MAMINILAINORO, 1996).

3. Étude de l'effet de l'extrait HWF92 sur le péristaltisme intestinal

Pour étudier l'effet de l'extrait HWF92 sur le péristaltisme intestinal, son effet a été étudié *in vitro* sur la contraction provoquée par l'acétylcholine sur l'iléon isolé de cochon d'Inde (HAMMAD *et al.* 1997).

a. Préparation et montage de l'organe

L'animal a été mis à jeun pendant 18 heures avant la manipulation, puis anesthésié par inhalation d'éther éthylique et exsanguinés en coupant les deux carotides. Une laparotomie a ensuite été pratiquée et l'iléon a été prélevé, puis placé dans une boîte de pétri contenant une solution de Tyrode (Tableau II) à la température ambiante et aéré avec de l'air, à l'aide d'un aérateur électrique (KOKO-108[©]). Il a ensuite été coupé en segments de 2 cm (PRASHANT *et al.*, 2013)

Tableau II. Composition de 1 litre de solution de Tyrode (mM) (KITCHEN, 1984)

Ingrédients	NaCl	KCl	MgCl ₂	Na ₂ PO ₄	CaCl ₂	NaHCO ₃	Glucose
Concentration (mM)	136,75	2,68	1,049	0,35	2,37	11,90	5,55

L'organe a été nettoyé en enlevant les mésentères. Puis il a été monté dans une cuve à organe isolé contenant 20 ml de solution de Tyrode, maintenue à la température de 37°C et aérée avec de l'air. A l'aide d'un fil de coton, une des deux extrémités de l'organe a été fixée au fond de la cuve et l'autre extrémité a été fixée à un capteur isométrique (Statham Gould[©]) sous une tension de 1,5 g (EZIKE *et al.*, 2014).

L'organe a été laissé se stabiliser dans la cuve pendant 45 minutes. Durant cette période, le bain a été renouvelé toutes les 15 minutes. Ensuite, de l'acétylcholine a été injectée dans le bain afin d'obtenir une concentration finale de 10⁻⁵ M pour sensibiliser l'organe (BORGES *et al.*, 2003). Puis, l'organe a été rincé et laissé se stabiliser de nouveau.

Le capteur est couplé à un ordinateur avec l'interface Signal Monitor, conçu par IOGA. Les signaux correspondant à la contraction et au relâchement de l'organe ont été enregistrés, et l'amplitude de ces signaux a été mesurée et rapportée sur une échelle semi logarithmique, en fonction de la concentration de l'acétylcholine ou de l'extrait dans le bain. Puis, les CE₅₀ de l'acétylcholine et de l'extrait ont été déterminées graphiquement.

b. Etude de l'effet de l'extrait sur la contraction provoquée par l'acétylcholine

L`acétylcholine a été injectée dans le bain de façon cumulative afin de réaliser des concentrations croissantes à partir de 10^{-9} M jusqu`à l`obtention de la contraction maximale de l`organe. Au plateau de contraction, l'extrait a été injecté dans le bain d'une manière cumulative.

3. Etude de l'effet de HWF92 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine

Pour étudier le mécanisme d'action de l'extrait, son effet vis-à-vis de l'acétylcholine a été étudié. Après la période de stabilisation et de sensibilisation, l'organe a été incubé dans le bain contenant l'extrait aux concentrations respectives de 0,125, 0,25 et 0,5mg/ml pendant 15 minutes.

Dans un premier temps, l'acétylcholine a été injectée dans le bain de façon cumulative afin d'obtenir des concentrations croissantes à partir de 10^{-9} M jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de l'organe. Au plateau de la contraction, l'organe a été rincé, puis laissé se stabiliser de nouveau pendant 45 minutes en rinçant toutes les 15 minutes. Puis dans un second temps, l'extrait a été injecté dans le bain afin de réaliser la concentration de 0,125 mg/ml, et l'organe a été incubé dans ce bain pendant 15 minutes avant d'injecter l'acétylcholine dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale. Ensuite l'organe a été rincé puis laissé se stabiliser, et la même manipulation a été réalisée en présence de l'extrait HWF92 à la concentration de 0,25 et 0,5 mg/ml

C. EXPRESSION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne avec écart type réduit ($\bar{m} \pm \bar{\sigma}$). Les moyennes ont été comparées entre elles en utilisant le test ‘t’ de *Student*. La différence a été considérée comme significative pour une valeur de P inférieure à 0,05.

RÉSULTATS

III. RÉSULTATS

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Rendement de l'extraction

En macérant 200 g de poudre de feuilles dans un mélange éthanol-eau (60 : 40), 24 g d'extrait HWF92 pâteux très amère sont obtenus, ce qui donne un rendement de 12%.

2. Résultats du criblage phytochimique

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait HWF92 montre qu'il contient des sucres réducteurs, d'alcaloïdes, de tanins et de composés phénoliques en forte teneur. Par contre, les stéroïdes et les triterpènes sont présents en moyenne teneur et les anthocyanes en faible teneur (Tableau III).

Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait HWF92

FAMILLE CHIMIQUES	TENEURS
Sucres réducteurs	+++
Alcaloïdes	+++
Tanins	+++
Composés phénoliques	+++
Stéroïdes et triterpènes	++
Anthocyanes	+

+++ : Présence en forte teneur

++ : Présence en teneur moyenne

+ : présence en faible teneur

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

1. Effet de l'extrait HWF92 sur la diarrhée provoquée par l'huile de ricin

L'administration de l'huile de ricin par voie orale chez les cochons d'Inde provoque une accumulation de fluide dans la lumière intestinale. Le volume de fluide dans la lumière intestinale des animaux traités avec l'extrait est inférieur à celui des animaux du lot témoin. Ce volume diminue en augmentant la dose de l'extrait administrée. Le volume du fluide intestinal chez les animaux du lot témoin est égal

à 3 ml contre $2,36 \pm 0,051$, $1,96 \pm 0,064$ et $1,13 \pm 0,10$ ml chez les animaux des traités avec l'extrait HWF92 aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg ($P < 0,05$) (Figure 1). Ces résultats montrent que l'extrait HWF92 inhibe la diarrhée sécrétoire provoquée par l'huile de ricin administrée par voie orale.

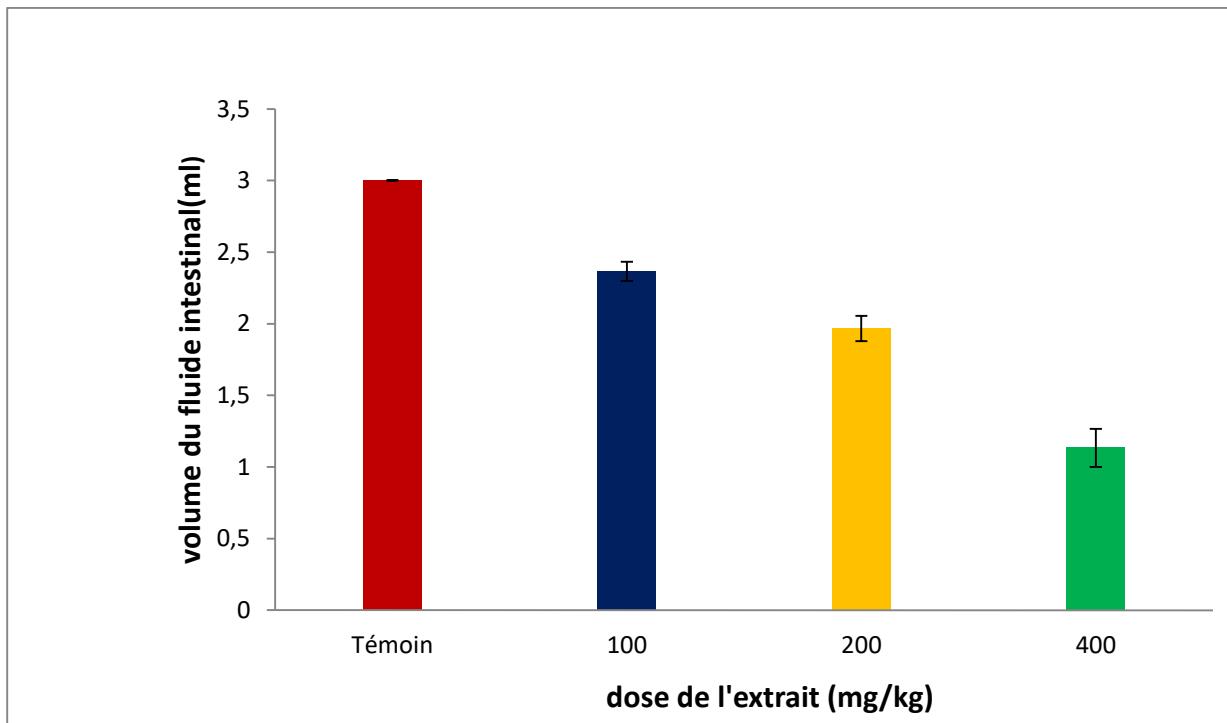


Figure 2. Variation du volume du fluide intestinal chez les animaux du lot témoin ■ et les animaux traités avec l'extrait HWF92, administré par voie orale, aux doses de 100 ■ 200 ■ et 400 mg / kg ■ ($\overline{m} \pm \sigma$; n=3 ; P<0,05).

2. Effet de l'extrait HWF92 sur le péristaltisme intestinal

L'acétylcholine injectée dans le bain contracte l'iléon isolé du cochon d'Inde. En augmentant sa concentration dans le bain, l'amplitude de la contraction augmente. La contraction maximale est obtenue à la concentration de 10^{-3} M d'acétylcholine. L'injection de l'extrait HWF92 dans le bain relâche l'iléon du cochon d'Inde contracté avec l'acétylcholine, et ce relâchement augmente avec la concentration de l'extrait dans le bain. A la concentration de 0,25 mg/ml, l'extrait provoque un relâchement de $41,66 \pm 1,51\%$ et 100 % à la concentration de 0,75 mg/ml ($P < 0,05$), les valeurs de la CE₅₀ de l'extrait est égale à 0,37 mg/ml (Figure 2). D'après ces résultats, il apparaît que l'extrait HWF92 inhibe le péristaltisme intestinal.

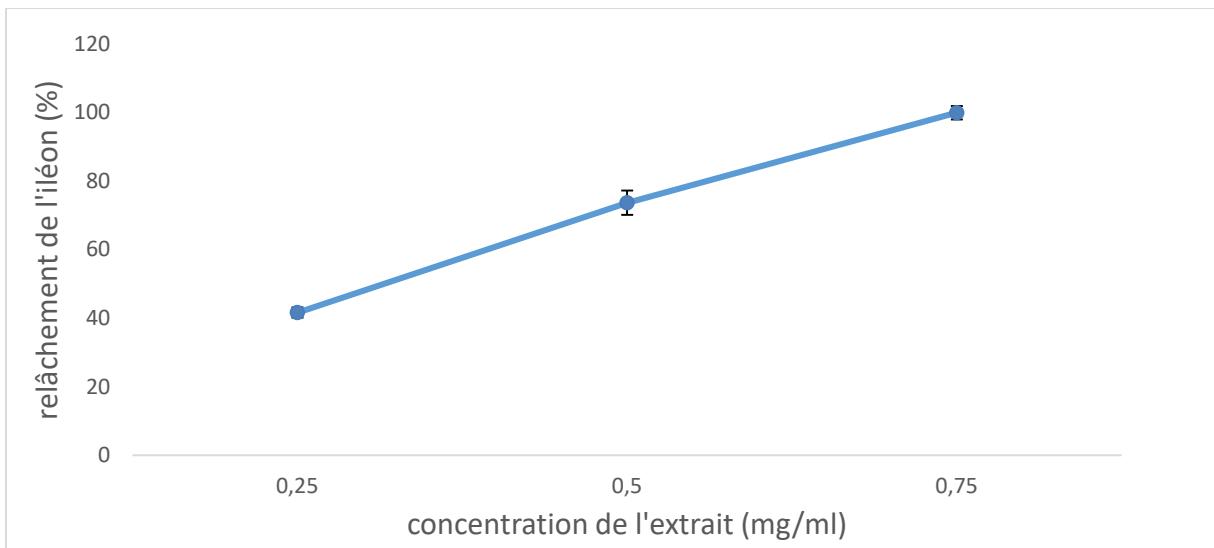


Figure 3. Variation du relâchement de l'iléon de cochon d'Inde contracté avec l'acétylcholine en injectant l'extrait HWF92 dans le bain d'une manière cumulative ($\bar{m} \pm \sigma$; n=3 ; P < 0,05).

3. Mécanisme d'action de l'extrait HWF92

En absence de l'extrait, l'amplitude de la contraction maximale de l'iléon de cochon d'Inde provoquée par l'acétylcholine est égale à 100 % et la CE₅₀ de l'acétylcholine est égale à $5,45 \cdot 10^{-6}$ M. En incubant l'iléon dans le bain avec de l'extrait avant d'injecter l'acétylcholine, l'amplitude maximale de la contraction de l'iléon provoquée par l'acétylcholine diminue et la valeur de CE₅₀ de l'acétylcholine augmente. En présence de l'extrait aux concentrations respectives de 0,25, 0,50 et 0,75 mg/ml dans le bain, l'effet maximal diminue à $69,73 \pm 1,05$, $44,73 \pm 1,14$ et $26,31 \pm 0,30$ % (P < 0,05) et la CE₅₀ augmente respectivement de $5,45 \cdot 10^{-6}$ M à $7 \cdot 10^{-6}$, $1,52 \cdot 10^{-5}$ et $4,83 \cdot 10^{-5}$ M (P < 0,05) (Figure 3). Ces résultats montrent que l'extrait HWF92 inhibe l'effet de l'acétylcholine d'une manière non compétitive.

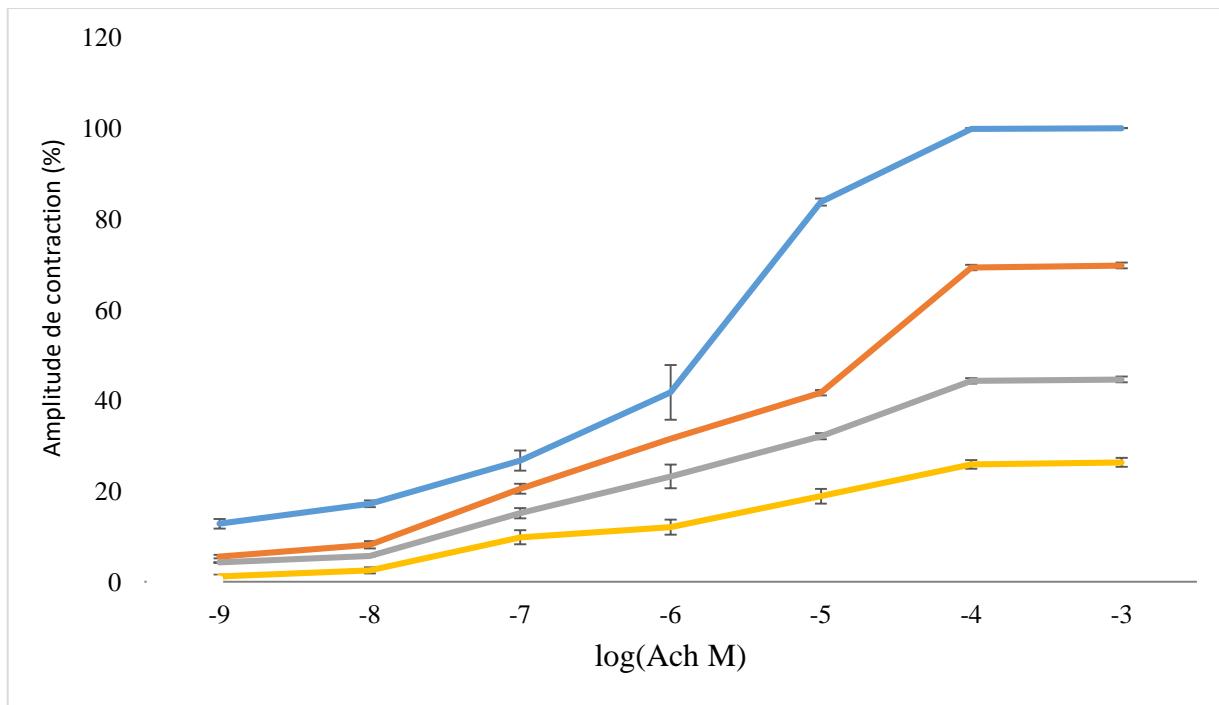


Figure 4. Pourcentage de l'amplitude des contractions de l'iléon isolé de cochon d'inde provoquées par l'acétylcholine en absence ■ et en présence d'extrait HWF92 aux concentrations de 0,25 ■, 0,5 ■■ et 0,75 mg/ml ■■■ dans le bain ($\bar{m} \pm \sigma$, n=3, P < 0,05).

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

Les résultats des deux tests que nous avions effectués montrent que l'extrait HWF92 diminue l'accumulation de fluides dans la lumière intestinale provoquée par l'administration par voie orale de l'huile de ricin et la contraction de l'iléon isolé de cochon d'Inde provoquée par l'acétylcholine.

L'huile de ricin contient de l'acide ricinoléique qui irrite la paroi intestinale provoquant un déséquilibre entre la sécrétion et la réabsorption de l'eau et des électrolytes au niveau de la paroi intestinale, en faveur de la sécrétion (UKWUANI *et al.*, 2012), et accélère le transit intestinal (GALVEZ *et al.*, 1993 ; SARANGI, 2011). Dans nos expériences, l'extrait HWF92 diminue l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale. Cela pourrait être dû à la diminution de la sécrétion d'eau et d'électrolyte dans la lumière intestinale ou à l'augmentation de leur réabsorption. Les travaux effectués sur l'extrait d'*Indigofera pulchra* (FABACEAE) montrent qu'il possède une activité anti sécrétoire, et que cette activité a été attribuée aux tanins. A cause de leur propriété astringente, ils ferment les pores et diminuent la perméabilité de la muqueuse intestinale, empêchant l'eau de sortir dans la lumière intestinale. En plus, les tanins précipitent les protéines de la muqueuse intestinale et donnent des tannates qui la protègent et la rendent imperméable à l'eau, ce qui diminue la sortie d'eau et l'accumulation du fluide dans la lumière intestinale (HAVAGIRAY *et al.*, 2004 ; MOHAMMED *et al.*, 2009). Le criblage phytochimique effectué sur HWF92 révèle la présence de tanins en forte teneur. Nous avançons une hypothèse que les tanins qu'il contient en sont les responsables. Cela expliquerait la baisse du volume de fluide accumulé dans la lumière intestinale chez les animaux traités avec l'extrait. L'effet anti sécrétoire de l'extrait HWF92 pourrait être dû aux tanins.

La diarrhée peut aussi être due à l'augmentation du péristaltisme intestinal entraînant la diminution de la réabsorption d'eau et des électrolytes dans la lumière intestinale, et qui provoque l'augmentation du volume du liquide intestinal (INAYATHULLA *et al.*, 2010). Le ralentissement du mouvement péristaltique intestinal donne à l'intestin le temps de mieux réabsorber l'eau et diminue ainsi l'accumulation d'eau dans la lumière intestinale (DANGOUMAU *et al.*, 2006). Afin d'étudier l'effet de l'extrait sur le péristaltisme intestinal, nous avons utilisé l'iléon isolé de cochon d'Inde contracté avec l'acétylcholine.

Les résultats de ce test *in vitro* montrent que l'extrait HWF92 relâche l'iléon isolé contracté par de l'acétylcholine. Ce relâchement de l'iléon isolé montre que l'extrait diminue le péristaltisme intestinal. Cette diminution de la motilité intestinale augmente la durée du transit intestinal, laissant à l'organisme le temps d'absorber l'eau, ce qui aboutirait à la diminution de l'accumulation de fluide

dans la lumière intestinale (JOHN et QUADRA, 2003 ; KENT et BANKS, 2010). En présence de HWF92, l'effet maximal de l'acétylcholine diminue et sa CE₅₀ augmente en fonction de la concentration de l'extrait dans le bain. Cette diminution est de type non compétitif c'est-à-dire la molécule active de HWF92 se fixe sur des récepteurs autres que les récepteurs muscariniques (RAJAMANICKA et al., 2010). Les études effectuées sur l'extrait *Cratae vanurvala* (CAPPARACEAE) ont montré qu'il possède une activité anti péristaltique, et que cette activité est due aux tanins qu'ils renferment (INAYATHULLA et al., 2010) parce que les tannins précipitent les protéines et diminuent l'excitabilité des fibres musculaires lisses. De nombreuses plantes comme *Carum copticum* (APIACEAE) (BALAJI G. et al., 2012), *Vitexdoniana* (VERBENACEAE) (UKWANI et al., 2012) et *Andansonia digitata* (BOMBACACEAE) (KENNE, 1994) contenant ce composé ont aussi une propriété anti-motilité intestinale par leur propriété astringente qui diminue l'excitabilité des fibres musculaires lisses intestinales (HAVAGIRAY et al., 2004 ; KUMAR et al., 2010). Il se peut que l'extrait agisse de la même manière. Mais, il est encore prématué de donner avec précision les principes actifs de l'extrait et leur mécanisme d'action exact, parce que l'extrait HWF92 n'est pas encore pur.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les résultats des tests que nous avions effectués montrent que l'extrait HWF92 diminue la motilité intestinale et inhibe l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale. Cet effet anti-diarrhéique pourrait être attribué aux tanins présents dans l'extrait. Une purification chimique bioguidé permettrait de déterminer le principe actif responsable de l'activité anti diarrhéique de HWF92 ainsi que son mécanisme d'action.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AKUODOR G. C., MUAZZAM I., USMAN-IDRIS M., MEGWAS U. A., AKPANJ L., CHILAKA K. C., OKOROAFOR D. O., OSUNKWO U. A. (2011). Evaluation of the Antidiarrheal activity of methanol leaf Extract of *Bombax Buonopozense* in rats. *Ibnosina J. Med. Biomed. Sci.*, 3(1) :15 – 20.
- ALLAIN P. (2000). Les médicaments. *Ed. CdM, (France)*, 50-54.
- ASSOGBA A.L., EHUI E., MAÏGA M.F., N'GUETTA, NIAMKE E.E., RANDREMANANA R.V., SEHONOU J., SEUKAP E. (2012). Initiation contre les maladies diarrhéiques et entériques en Afrique : une contribution à la lutte contre le choléra. *Médecine d'Afrique Noire*.1-7.
- BALAJI G., CHALAMAIAH M., RAMESH B., AMARNATH R. Y. (2012). Antidiarrhoeal activity of ethanol and aqueous extracts of *Carumopticum* seeds in experimental rats. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.*, 1151-1155.
- BELAICHE J. (2000). Physiopathology of acute infectious diarrhea. *Acta Endoscopica*, 30 (3): 177-184.
- BENBEROU L., BOUDINAR F., CHAOU M., GRANGAUD J.P., KADDACHE C., KHIARI M.E., LAMDJADANI N., MERBOUT G., OUAMAR O., ZEBIRI A., ZEROUAL Z. (2000). Guide de prise en charge de la diarrhée chez l'enfant, 1-45. *Ministère de la santé et de la population en Afrique. Direction de la prévention. Sous-direction santé maternelle et infantile*, 1-45.
- BORGES E.L., MACHADO A.D., HAIBARA A.S., PETROIANU A. (2003). Effects of vasoactive intestinal polypeptide microinjected into the nucleus tractus solitaires on jejuna glucose absorption in rats. *Automic. Neurosci.: Basic and Clinical*, 107: 111- 113.

BOURILLON A. (2000).

Diarrhée aigüe du nourrisson. In collection pour le praticien : Pédiatrie.

5^{eme} Ed. Elsevier Masson (Paris), 324-330.

BOURILLON A., CHOURAQUI J.P., DEHAN M., LECEVALLIER J., CHANTEPIE A., JOB-DESLANDRE C. (2008).

Diarrhée aigüe du nourrisson. In collection pour le praticien : Pédiatrie.

5^{eme} Ed. Elsevier Masson (Paris), 315-320.

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

Diarrhées aiguës infectieuses : traitement actuel et perspectives.

Rev. Gen. Med. Trop., **61**(6): 521-528.

CESARD J. P., CHOURAQUI J. P., GIRARDET J. P., GOTTRAND F., BENHAMOU P. H., BOIGE N., FAURE C., GINIES J. L., LENEARTS C., MAHERZI., MORALI A., MOUGENOT J. F., MOUTERDE O., OLIVES J. P., SARLES J., SCAILLON M., TURCK D. (2002).

Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant.

Rev. Gen. Med. Trop., **61**(6): 521-528.

DANGOUUMAU 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.

DELVAUX M., GAY G. (2006).

Approche du malade avec une diarrhée fonctionnelle.

Gastroentéro. Clin. Biol., **30**(3) : 415-420.

DOHERTY N.S. (1981).

Inhibition of arachidonic acid release as the mechanism by which glucocorticoids inhibit endotoxin-induced diarrhoeal.

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

EZEKWESILI C.N, K. A. OBIORA, UGWO O. P. (2004).
Evaluation of Anti-Diarrhoeal Property of Crude Aqueous Extract of Ocimumgratissimum L. (Labiat)
In Rats
BIOKEMISTRI **16**(2):122-131

EZIKE A.C., AKAH P.A., OKOLI C.O., UFERE I.K., EZEUDU E., OKOYOE C.F., ASHARAC.,
IGOKWEN I.N. (2014).

Studies on gastrointestinal effects of *Desmodium velutinum*: a traditional remedy for diarrhea.
Am. J. Pharmacol. Toxicol., **9** (2): 114-124.

FONG H.H.S, TIN-WA M., FARNSWORTH N.R. (1977).
Phytochemical screening.
Rev. College of Pharmacy, University of Illinois Chicago (USA), 275-277.

GALVEZ J., ZAZRZUELO A., CRESPO M.E., LORENTE M.D., OCETTE M.A.,
JIMENEZ J. (1993).
Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid
Constituent.
Planta Medica., **59** : 333-336.

GANDHIMATHI R., SARAVANA K. A., SENTHIL K. K., KOSUMA P. K., UMAMAHESWARI
J. (2009)
Pharmacological studies of anti-diarrhoeal activity of Guattarda speciosa in experimental animals.
J. Pharm. Sci. Res., 1(2): 61 - 66.

GUE M., RIO-LACHEZE C., EUTAMENE H., THEODOROU V., FIORAMONTI J., BUENO L.
(1997).
Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells.
Neurogastroenterol. Motil., **9**: 271-279.

HAMMAD H.M., ABDALLAH S.S. (1997).
Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship.
J. Pharmacol., **28** (5): 767-771.

HAVAGIRAY R., RMAESH C., SADHNA K. (2004).
“Study of antidiarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* in experimental animals”.
J. Pharmacol. Pharmac. Sci., 7 : 70 -75.

HUBER-GIESKE, BICHARD P. (2013).
Diarrhée aigüe.

Service médicale de premiers recours : 15-18.

INAYATHULLA, SHARIFF W.R., KARIGAR A.A., SIKARWAR, MUKESH S. (2010).
Evaluation of antidiarrhoeal activity of *Cratae vanurvala* bark in experimental animals.
J. Pharm. Pharmac. Sci., 2 (1) : 4-12.

INSTAT, ICF Macro. (2010).
Enquête Démographique et de Santé de Madagascar.
(EDSM) 2008-2009 (MADAGASCAR et USA), 156-164.

JOHN G., QUADRA I. (2003).
Le traitement de la diarrhée.
Pediatr. Child Health, 8 (7): 463-466.

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), 48-72.

KENT A. J., BANKS M. R. (2010).
Pharmacological management of diarrhea.
Gastroenterol. Clin. North. Am., 3 (39): 495-507.

KUMAR R., SHARMA R., BAIRWA K., ROY R. (2010).
Pharmacological review on natural antidiarrhoeal agents.
Der.Pharma. Chemica, 2: 66 - 93.

LAURANS M., DAUGER S., De SCHREVEL G., ARION A., DUHAMEL J. (1999).

Traitement médicamenteux des diarrhées aigües de l'enfant.

Neontologie, 1-4.

LIU C., XU W., WANG H., LIN N. (2014)

Rhubarb tannins extract inhibits the expression of aquaporins 2 and 3 in magnesium sulphate induced diarrhea model

Bio. Med. Res. Int., 2014 (3): 619 - 645

LEFLAIVE X., WITMER M., MARTIN H.R., BAKKER M., KRAM T., BOUWAN L., VISSER H., BOUWAN A., HILDERINK H., KIM K. (2012).

Perspective de l'environnement de l'OCDE à l'horizon 2050. Les conséquences de l'inaction. *OCDE, Pays Bas*. 5 :1-7.

MAMILAINORO L. (1996).

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

Mémoire de DEA en Pharmacologie. Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, 14-20.

MARTEAU A., MARTEAU P.H. (2005).

Entre intolérance au lactose et maldigestion.

Cah. Nutr. Diet., 40(1): IS121-IS123.

MARTEAU P. (2012).

Physiopathologie des diarrhées chroniques.

Hépato-gastro et oncologie digestive, 19(8) :580- 585.

MOHAMMED A., AHMED H., GOJIAD T., OKPANACHI A. O., EZEKIEL I., TANKO Y. (2009).

Preliminary anti-diarrhoeal activity of hydromethanolic extract of aerial part of *Indigofera pulchra* in rodents.

Asian. J. Med Sci., 1(2):22-25.

MOHAMMED M. S., MOHAMMED M., IBRAHIM H., SHAMSU G., MOHAMMED U. K., PATRICIA I. K. (2014).

Antidiarrhoeal effect of the crude methanol extract of the dried fruit of *Andansonia digitata L.* (MALVACEAE).

Vet. World., 7(7) :495-500.

OMS (2006).

Manuel à l'usage des médecins et autres personnels de santé qualifiés.

Service de Production des Documents de l'OMS, Genève, Suisse, 1-52.

PERLEMUTER L., PERLEMUTER G. (2013).

Guide thérapeutique.

Ed. Elsevier, (Paris), 526-541.

PRASHANT B. SHAMKUWAR, DEEPAK P. PAWARET PRASHANT B. A. (2013).

Potential of *Myristica fragrans* (Myristicaceae) in Ayurvedic antidiarrheal formulation.

Pelagia Research Library Der Pharmacia Sinica, 4(1):93-96.

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

Activité anti-diarrhéique de *Dodonaea viscosa* root extraits.

Int. J. Pharma. Bio. Sci., 1(4):182-185.

SANOGO R. (2006).

Le rôle de plantes médicinales en médecine traditionnelle.

Développement, Environnement et santé.

Faculté de Médecine et d'Odonto Stomatologie, Université de Bamako, Mali, 1-53.

SARANGI R. R., MISHRA U. S., PANDA S. K., BEHERA S. (2011).

Evaluation de l'activité anti-diarrhéique de *Sida rhombifolia linn.*root.

Rech. Int. Rev. Pharm., 2(9): 157-160.

- SCHUBERT J. DIWET J. (2008).
Etude quantitative sur la prise en charge de la diarrhée et l'introduction du zinc en RDC (Katanga, Kasaï, oriental, Kinshasa).
Ed. BASICS, USAID, 1-50.
- SCHWARTZ J.C. (2000).
Racecadotril: a new approach to the treatment of diarrhea.
Int. J. Antimicrob. Agents, **14**: 75 -79.
- TURVILL J., FARTHING M. (1997).
Enkephalins and enképhalinase inhibitor in intestinal fluid and electrolyte transport.
Eur.J.Gastroenterol.Hepatol., **9**: 877-880.
- UKWUANI A. N., SALIHU S., ANYANWU F. C., YANAH Y. M., SAMUEL R.(2012).
Antidiarrhoeal activity of aqueous leaves extract of *Vitex doniana*.
Int. J. Toxicol. Pharmacol. Res., **4**(3):40-44.
- UNICEF (2011).
L'eau potable et l'assainissement en Afrique, 1-9.
- UNICEF (2014).
Les enfants en Afrique
Statistiques clés sur la survie, la protection et le développement de l'enfant
- ZAVALA M.A., PEREZ S., PEREZ C., VARGAS R., PEREZ R.M. (1998).
Antidiarrhoeal activity of *Watharia Americana*, *Commelina coelestis* and *Alternantherarepens*.
J.Ethnopharmacol., **61**: 41-47.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE L'EXTRAIT HWF92 SUR LA DIARRHÉE CHEZ LE COCHON D'INDE

Auteur: RASOLOMANANA Hasimbola Willy Florent
Adresse : CU Ankafotsy 1 bloc hangar P.21
Contact : 0347605465
Email : wrasolomanana@gmail.com
Année : 2016-2017
Rapporteur : RANDRIANAVONY Patricia

Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo
Email : frandimbi@gmail.com
BP : 8357

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'activité de l'extrait HWF92 sur la diarrhée chez le cochon d'Inde. Son activité anti sécrétoire a été étudiée par la méthode *enteropooling* en administrant l'huile de ricin par voie orale, et son effet sur la motilité intestinale a été étudié sur la contraction de l'iléon isolé de cochon d'inde provoquée par l'acétylcholine. Nos résultats montrent que l'extrait HWF92 inhibe l'accumulation de fluide intestinal, de 3 ml chez le témoin, contre $2,36 \pm 0,05$, $1,96 \pm 0,064$ et $1,13 \pm 0,10$ ml chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg ($P < 0,05$). *In vitro*, il inhibe la contraction de l'iléon provoquée par l'acétylcholine, d'une manière non compétitive. En présence de l'extrait aux concentrations de 0,25, 0,50 et 0,75mg/ml dans le bain, l'effet maximal de l'acétylcholine est respectivement réduit à $69,73 \pm 1,05$, $44,73 \pm 1,14$ et $26,31 \pm 0,30$ % ($P < 0,05$) et sa CE₅₀ augmente de $5,45 \cdot 10^{-6}$ M à $7 \cdot 10^{-6}$, $1,52 \cdot 10^{-5}$ et $4,83 \cdot 10^{-5}$ M ($P < 0,05$). Les tanins pourraient être responsables de cette activité anti diarrhéique de l'extrait.

Mots clés : anti-diarrhéique, anti-sécrétoire, anti-motilité, huile de ricin, cochon d'Inde.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the anti-diarrheal potential of HWF92 on guinea pig. Its anti-secretory activity was studied on castor oil induced enteropooling, *in vivo*, 1 ml of castor oil was administered orally. And its effect on intestinal peristaltic was studied *in vitro* on guinea pig isolated ileum contracted with acetylcholine. *In vivo* tests results show reduction of enteropooling in guinea pig treated with the extract, from 3 ml in control group, versus 2.36 ± 0.05 , 1.96 ± 0.064 and 1.13 ± 0.10 ml respectively in animals treated with the extract at 100, 200 et 400 mg/kg ($p<0.05$). *In vitro*, HWF92 relaxes isolated ileum contracted with acetylcholine, with CE₅₀ of 0.75 mg/ml. It inhibits the effect of acetylcholine in a non-competitive manner. Acetylcholine CE₅₀ in the absence of the extract is equal to $5.45 \cdot 10^{-6}$ M, and $7 \cdot 10^{-6}$, $1.52 \cdot 10^{-5}$ and $4.83 \cdot 10^{-5}$ M, in the presence of the extract at the concentration of 0.25, 0.5 and 0.75 mg/ml in the bath. Whereas, the maximal effect of acetylcholine reduces from 100% in the absence of the extract to 69.73 ± 1.05 , 44.73 ± 1.14 and 26.31 ± 0.30 % in the presence of the extract at 0.25, 0.5 and 0.75 mg/ml in the bath ($P < 0.05$). Tannins present in the extract might be responsible for the anti diarrhoea activity of HWF92.

Key words: anti-diarrhoea, anti-secretory, antiperistaltic, castor oil, guinea pig