

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIERES	ii
LISTE DES TABLEAUX	iii
LISTE DES FIGURES	iv
SIGNES ET ABBREVIATIONS	v
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIELS ET METHODES	5
A. PARTIE CHIMIQUE	5
1. Préparation de l'extrait	5
2. Criblage phytochimique	5
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE	7
1. Animaux d'expérimentation	7
2. Sélection des animaux	7
3. Etude de l'effet de l'extrait sur la suffocation provoquée par l'histamine	7
4. Etude de l'effet de l'extrait <i>in vitro</i>	8
a .Préparation de la solution de Tyrode	8
b. Préparation de la trachée isolée	9
c .Montage de la trachée dans la cuve à organe isolé	9
d. Etude de l'activité bronchodilatatrice de l'extrait MF11	9
e. Etude du mécanisme d'action de l'extrait	10
EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS	10
III. RESULTATS	11
A. PARTIE CHIMIQUE	
1. Rendement de l'extraction	11
Les familles chimiques présentes dans l'extrait	
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE	
1. Effet de l'extrait sur la suffocation provoquée par l'histamine	12
2. Effet de MF11 sur la contraction de la trachée provoquée par l'Histamine	13
3. Mécanisme d'action de MF11	13
IV. DISCUSSION	15
CONCLUSION	17
BIBLIOGRAPHIE	
WEBOGRAPHIE	
RESUME	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tests effectués pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait MF11	6
Tableau 2 : Composition de la solution de Tyrode.....	8
Tableau 3 : Résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait MF11	11

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie montrant les animaux dans le dispositif experimental	8
Figure 2 : Temps d'apparition de la détresse respiratoire provoquée par l'histamine (5%) pulvérisée sous une cloche contenant des animaux du lot témoin (■) et traités avec l'extrait aux doses de 150 (■) et 300mg/kg (■) administré par voie orale .	12
Figure 3 : Variation du relâchement de la trachée précontractée par l'histamine en présence de l'extrait MF11 injecté de façon cumulative dans le bain.....	13
Figure 4 : Variation de la contraction provoquée par l'histamine sur la trachée isolée de cobaye en absence (—) et en présence de l'extrait aux concentrations de 0,25 mg/ml (—) et 0,5 mg/ml (—) dans le bain	14

SIGNES ET ABBREVIATIONS

<	: inférieur
±	: plus ou moins
%	: pourcentage
°C	: degré Celsius
b	: beta
DEP	: Débit Expiratoire de Pointe (Peak flow)
DE ₅₀	: Dose efficace provoquant 50% de l'effet maximal
CE ₅₀	: concentration efficace provoquant 50% de l'effet maximal
coll.	: Collaborateurs
e.s.m	: écart-type standard moyen
Emax	: effet maximal
g	: gramme
GINA	: The Global Initiative for Asthma
h	: heure
H ₁	: récepteur Histaminique type 1
IgE	: immunoglobuline de type E
LPGPC	: Laboratoire de Pharmacologie Générale de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
mg/kg	: milligramme par kilogramme
M	: concentration molaire
mg/ml	: milligramme par millilitre
n	: nombre d'animaux utilisés
p	: seuil de signification
sec	: seconde
t	: test de Student
r	: rendement



I. INTRODUCTION

L'asthme est une maladie multifactorielle avec des facteurs de risques endogènes et exogènes, c'est une maladie inflammatoire des voies respiratoires à caractère chronique, (GINA, 2009). Selon la description physiopathologie et clinique de GINA, 2009 : « l'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes ». Cette maladie est devenue un problème de santé publique sur le plan mondial, elle touche 300 millions des personnes, causant la mort de 250000 individus (CHAUCHAN N. et coll., 2012). Depuis 1960, la prévalence et la sévérité de cette maladie ne cessent d'augmenter. Le nombre augmente de 50% environ tous les 10 ans aux USA (DJEBBAR A., 2001). Les spécialistes suisses rapportent que 8% de la population suisse souffrent d'asthme contre 2% seulement il y avait 25 ou 30 ans (DJEBBAR A., 2001). Trois cent millions de personnes souffrent d'asthme actuellement et leur nombre ne cesse de croître, et en 2025, la prévision donne une estimation de 400 millions de personnes asthmatiques (CHOPINAUD P. A., 2014).

L'asthme touche toutes les tranches d'âge mais débute souvent pendant l'enfance. Selon les estimations, l'Inde compte 15 à 20 millions d'asthmatiques avec une prévalence comprise entre 10 et 15% chez les enfants de 5 à 11 ans (DJEBBAR A., 2001). Dans la région du Pacifique occidental, l'incidence va de plus de 50% chez les enfants des îles de Carolines à pratiquement zéro en Papouasie-Nouvelle-Guinée (DJEBBAR A., 2001). Au Brésil, au Costa Rica, au Panama, au Pérou et en Uruguay, la prévalence des symptômes asthmatiques chez les enfants varie de 20 à 30% (DJEBBAR A., 2001), au Kenya, elle avoisine les 20%. Au pays du Maghreb : au Maroc 3 millions, Tunisie 400.000 et en Algérie 2 millions (DJEBBAR A., 2001). A Madagascar, d'après les dernières enquêtes faites à l'Hôpital Joseph RASETA, CHU Befelatanana à Antananarivo, la prévalence de l'asthme se situe entre 8 et 12% (RAKOTOMIZAO J. R. et coll., 2009). Environ 3,5 millions de gens sont asthmatiques, dont 8 à 10% des enfants, 5 à 7% des adultes, 8% des garçons de moins de 10 ans et les filles de même âge ne représentent que 5%. Le ratio homme/femme s'inverse ensuite, les femmes étant plus souvent asthmatiques que les hommes (DJEBBAR A., 2001). Cependant, la mortalité liée à l'asthme a significativement baissé depuis 1986 et cette baisse peut être expliquée par l'efficacité des traitements antiasthmatiques. Le plus faible nombre de décès en France a été observé en 2008 où l'on a compté 909 décès par l'asthme (ANNESI-MAESANO I., 2011).

L'asthme est une maladie du système respiratoire touchant les voies aériennes inférieures précisément les bronchioles. La crise d'asthme est un évènement brutal associant un bronchospasme d'apparition rapide, une congestion de la muqueuse bronchique et une hypersécrétion bronchique. L'air passe avec difficulté, le patient s'étouffe, la respiration devient difficile et sifflante (HURTEL J. M., 2007). Il est dû soit à une inflammation avec une augmentation de production de mucus, soit à une hypersensibilité des bronchioles aboutissant à leur contraction (MULLER J. N., 2009). L'asthme peut être léger, modéré ou sévère, il peut être aigüe ou chronique, mais il existe aussi l'asthme intermittent qui se manifeste par deux brèves crises par semaine au maximum, et/ou deux épisodes nocturnes par mois. L'asthme est persistant lorsqu'il existe plus de deux épisodes hebdomadaires, et/ou plus de deux épisodes nocturnes mensuels avec retentissement sur les activités courantes. L'asthme aigu met en jeu le pronostic vital, il nécessite une prise en charge urgente en milieu hospitalier. Cliniquement, il y au moins un de ses signes suivantes : la sensation de crise inhabituelle ; la difficulté à parler ; le cyanose ; l'augmentation du rythme cardiaque ; les troubles de la conscience ; « silence auscultatoire », la diminution du débit expiratoire de pointe (DEP) qui est réduite de moitié par rapport au meilleur score du patient, ou de sa valeur théorique, le DEP est le seul moyen objectif d'évaluation de l'intensité de la crise d'asthme (MULLER J. N., 2009).

L'asthme peut être classé en asthme extrinsèque et asthme intrinsèque. L'asthme extrinsèque est d'origine allergique, la crise est déclenchée au départ par des allergènes ou des infections répétées (DJUKANOVIC A. L. et coll., 1990 ; NICHOLSON K. G. et coll., 1993 ; ISABELLE P., 2004). Tandis que l'asthme intrinsèque est d'origine non allergique (HUMBERT M., et coll., 1999).

L'histamine est le responsable de la réaction immédiate provoquant une bronchoconstriction. Elle se fixe sur les récepteurs histaminergiques H₁, et provoque la contraction des muscles lisses des bronches et des bronchioles (GILLES G., 2006 ; MARONE M. et coll., 2003). Tandis que les médiateurs inflammatoires sont responsables de l'hypersécrétion de mucus bronchique et de l'œdème inflammatoire (GILLES G., 2006 ; WHITE M. V., 1990 ; MARONE M. et coll., 2003 ; GILHODES O. et coll., 1994). L'œdème inflammatoire de la paroi de la bronche entraînent l'épaississement des bronches et le rétrécissement des voies aériennes à l'origine de la gêne respiratoire dans le cas d'asthme chronique, et l'hypersécrétion de mucus gêne la circulation de l'air dans les voies aériennes (DJUKANOVIC A. L. et coll., 1990 ; JAYDEOKAR A. V., 1990 ; SOYKA M. B. et coll., 2012).

Selon leur mode d'action, il existe deux types de médicaments antiasthmatiques : les bronchodilatateurs qui sont des agonistes des récepteurs beta2 adrénergiques agissant surtout en dilatant les bronches, et les anti-inflammatoires bronchiques comme les corticostéroïdes (cortisone en inhalation) et les antileucotriènes (PIERRICK H., 2009). Puisque l'asthme est une maladie allergique, les antihistaminiques trouvent leurs intérêts thérapeutiques dans le traitement d'urgence de la crise d'asthme (HOLGATE S. T., et coll., 2009 ; JUTEL M., et coll., 2009). Les bronchodilatateurs bêta-2 stimulants d'action brève (sulbutamol, terbutaline) associés à un anticholinergique (ipratropium) représentent le traitement de référence de la crise d'asthme. En se fixant sur les récepteurs bêta-2 du muscle lisse bronchique, les bêta-2 stimulants provoquent une bronchodilatation rapide. Tandis que l'asthme persistant implique l'administration quotidienne de corticoïdes inhalés, seuls ou en association avec des bêta-2stimulants d'action prolongée. D'autres classes médicamenteuses (théophylline, antileucotriènes, corticoïdes oraux, anti IgE) sont disponibles sur le marché, mais ne sont pas indiquées en première intention (PIERRICK H., 2009).

D'autre part, les plantes médicinales et les huiles essentielles sont d'une grande utilité pour contrôler l'évolution de la maladie. Parmi eux : les huiles essentielles à tropisme antibactériennes, antivirales et anti-inflammatoires limitent l'infection des muqueuses des voies respiratoires, diminuent l'inflammation et favorisent l'expectoration comme les huiles essentielles de thym, de sarriette, d'eucalyptus, de niaouli et de pin (MULLER J. N., 2009). Des plantes antiallergiques et anti-inflammatoires comme *Cassis* et *Zingiber officinale* sont employés en France (MULLER J. N., 2009), *Tylophora asthmatica* en Inde (HARANATH P. et SHYAMALAKUMARI S., 1975), *Boswellia serrata* au nord-Est de l'Afrique, *Combretum molle* (Velvet bushwillow) est utilisée à Côte d'ivoire pour ses activités antitussive, expectorante et antiasthmatique (YEO D. et coll., 2008), *Petasites hybridus* en Europe et en Asie, *Garcinia mangostana* dans la région indo-malaisie, *Rubus suavissimus* dans la partie nord du Chine (MULLER J. N., 2009). On peut citer aussi des plantes antispasmodiques comme l'aubépine, la lavande, la mélisse, le gingembre et *Ephedra sinica* utilisée en Chine comme bronchodilatatrice, enfin *Euphorbia hirta* employé en Afrique pour soulager la crise d'asthme (MULLER J. N., 2009). A Madagascar, de nombreuses plantes sont utilisées pour traiter l'asthme comme *Hypericum japonicum* (Anangoaika) (HECKEL E., 1910), *Phytodes scolopendria* (Tsiampangapanga) pour ses activités antispasmodiques (RAMANITRAHASIMBOLA D. et coll., 2005), *Euphorbia stenoclada* (Samanta) est

utilisée en médecine traditionnelle pour traiter l'asthme et les bronchites aigües (CHAADI M. et coll., 2007).

D'après les données ethnobotaniques que nous avions lues, à Madagascar et en Afrique tropicale, la population utilise les feuilles de la plante qui fait le sujet de notre mémoire en cas de difficultés respiratoires. Ce qui nous a incité à étudier son éventuelle activité antiasthmatique. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués chez le cobaye pour étudier cette activité.

II. MATERIELS ET METHODES

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Les feuilles de la plante utilisée dans cette étude, ont été récoltées au mois de Mars 2016 à Ankatso dans la région Analamanga. Les feuilles ont été séchées à l'ombre dans une salle bien aérée à la température ambiante pendant une semaine. Après séchage, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau au LPGPC, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Deux cent cinquante grammes de la poudre obtenue ont été macérés dans un mélange éthanol - eau (60 : 40), à la température ambiante pendant 72h en agitant le mélange 3 fois par jour. Le macérât a ensuite été filtré sur du coton hydrophile, puis le filtrat a été évaporé à sec à l'aide d'un distillateur à la température de 80°C. L'extrait obtenu a été codé MF11 puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction selon la formule :

$$r(\%) = \frac{\text{poids de l'extrait}}{\text{poids de la poudre macérés}} \times 100$$

2. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est un test qualitatif, il a pour objectif de détecter les différentes familles chimiques présentes dans un extrait et d'estimer leur teneur relative. Les tests utilisés sont basés sur l'utilisation de réactifs spécifiques et la présence de la famille correspondante est caractérisée par l'apparition de complexes insolubles se présentant sous forme de précipité et/ou d'un changement de coloration (FONG H. H. S. et coll., 1977) (Tableau I).

Les signes suivants ont été utilisés pour désigner la teneur de familles chimiques présentes dans l'extrait :

- ± : présence en très faible teneur
- + : présence en faible teneur
- ++ : Présence en teneur moyenne
- +++ : Présence en très forte teneur

Tableau 1 : Tests effectués pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait MF11 (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	LIERMAN BURCHARD	Anhydride acétique + H ₂ SO ₄	Coloration violette
	BADGET KEDDE	Acide picrique	Coloration rouge
	SALKOWSKI	H ₂ SO ₄	Anneau de séparation rouge
FLAVONOÏDES	WIL-STATER	Ruban de Mg + HCl concentré	Coloration rouge
LEUCOANTHOCYANE	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
COUMARINES		NaOH 10%	Fluorescence à l'UV
SAPONINES	MOUSSE	HCl + Agitation	Persistante d'une mousse (3cm d'épaisseur) après 30mn

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

L'activité de l'extrait MF11 a été étudiée chez le cobaye. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués. Son effet sur la gêne respiratoire provoquée par l'histamine a été étudiée *in vivo* (COLOT M., 1972), tandis que son mécanisme d'action a été étudié *in vitro* sur la trachée isolée de cobaye (SATAKE K. et coll., 1998).

1. Animaux d'expérimentation

Des cochons d'inde des deux sexes, âgés de 3 mois, pesant entre 280 g et 296 g ont été utilisés. Ils ont été nourris avec des feuilles de graminées fraîches et acclimatés aux conditions de l'animalerie du LPGPC à la température de 20°C et une alternance de lumière et d'obscurité de 12h/12h.

2. Sélection des animaux

Les animaux utilisés dans les tests ont été sélectionnés suivant leur sensibilité à l'histamine. Ils ont été placés dans un dispositif expérimental de 25 cm de diamètre et de 23 cm de hauteur muni d'un couvercle, puis une solution d'histamine à 5 % a été pulvérisée sous ce dispositif. Seuls les animaux qui ont présenté des signes de détresse respiratoire dans les 3 premières minutes ont été considérés comme sensibles et sélectionnés pour les tests biologiques (COLOT M., 1972).

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

Les animaux sélectionnés ont été mis à jeun pendant 12h avant la manipulation, puis répartis en 3 lots : 1 lot témoin et 2 lots traités avec l'extrait. Les animaux du lot témoin ont reçu de l'eau distillée ; ceux du deuxième lot ont reçu l'extrait à la dose de 150 mg/kg et ceux du troisième lot ont reçu l'extrait à la dose de 300 mg/kg. L'extrait et l'eau distillée ont été administrés par voie orale dans un volume de 10 ml/kg (HARRIS P. N. et coll., 1952).

Trente minutes après administration de l'eau distillée et de l'extrait, un animal par lot ont été placés dans le dispositif pendant 3minutes (Figure 1) (CHAUCHAN et coll., 2012). Ensuite, la solution de l'histamine à 5% a été pulvérisée dans ce dispositif et cette expérience a été répétée 3 fois. Le temps d'apparition des signes de suffocation chez les animaux a été noté (COLOT M., 1972).



Figure 1. Dispositif expérimental utilisé pour les tests *in vivo*

4. Etude de l'effet de l'extrait *in vitro*

Des tests *in vitro* sur la trachée isolée de cobaye ont été effectués pour étudier l'activité bronchodilatatrice de l'extrait (SATAKE K. et coll., 1998).

a. Préparation de la solution de Tyrode

La solution de Tyrode a été choisie comme solution de survie utilisée lors des tests *in vitro* (tableau II) (BRUNELLESCHI S. et coll., 1987 ; HAZEKAMP A. et coll., 2001).

Tableau II. Composition de la solution de Tyrode

Ingrédients	Concentration (mM)
NaCl	137
KCl	2,7
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	0,4
Glucose	11,1
CaCl ₂	2,5
Eau distillée	1 litre

b. Préparation de la trachée isolée

Des cobayes de 3 mois, sans distinction de sexe, pesant entre 280 g et 296 g ont été utilisés. L'animal a été sacrifié puis exsanguiné en coupant les carotides, ensuite une thoracotomie a été effectuée et la trachée été prélevée rapidement et placée dans une boîte de pétri contenant une solution de Tyrode aérée avec de l'air à l'aide d'un aérateur électrique. Un segment de 2cm de la trachée a été débarrassé des mésentères et des tissus adipeux, puis découpée en spirale (BRUNELLESCHI S. et coll., 1987 ; HAZEKAMP A. et coll., 2001).

c. Montage de la trachée dans la cuve à organe isolé

La trachée découpée en spirale été montée dans une cuve à organe isolé contenant 20 ml de solution de Tyrode aérée avec de l'air à l'aide d'un aérateur, et maintenue à la température de 37°C (SHETH U. K. et coll., 1972).

Une des 2 extrémités de l'organe a été fixée au fond de la cuve à l'aide d'un fil de coton inextensible, tandis que l'autre extrémité a été reliée à un stylet enregistreur avec un contre poids de 1g (ANITA A. M. et ARCHANA N. P., 2008). L'organe a été laissé s'équilibrer pendant 90 minutes. Pendant cette période, le milieu de survie a été renouvelé toutes les 15minutes (SHETH U. K. et coll., 1972).

Après les 90 minutes d'équilibration, la viabilité de l'organe a été testée en injectant l'Histamine dans le bain à la concentration de $10^{-7}M$. Puis, l'organe a été laissé se stabiliser pendant 30 minutes en changeant le milieu toutes les 15 minutes.

d. Etude de l'activité bronchodilatatrice de l'extrait MF11

L'histamine a été utilisée pour provoquer la bronchoconstriction (SATAKE K. et coll., 1998) afin d'étudier l'activité bronchodilatatrice de l'extrait. Elle a été injectée dans le bain d'une manière cumulative pour réaliser des concentrations croissantes à partir de la concentration de $10^{-10} M$ dans le bain, jusqu'à la contraction maximale de la trachée. Au plateau de la contraction, l'extrait a été injecté dans la cuve d'une manière cumulative à partir de la concentration de 0,25 mg/ml jusqu'au relâchement total de la trachée contractée par l'histamine. Le volume total des solutions injectées dans le bain n'a pas dépassé 10 % du volume total de la cuve (VAN ROSSUM J. M., 1963). L'amplitude des contractions a été mesurée et la CE₅₀ de l'histamine a été déterminée par régression dans la partie linéaire de la courbe cadrant 50 % de l'effet maximal.

e. Etude du mécanisme d'action de l'extrait

L'histamine a été utilisée dans le but d'étudier le mécanisme d'action de l'extrait, la trachée a été pré incubée dans un bain contenant l'extrait avant de la contracter avec l'histamine (TSUKIAMA H. et coll., 2007 ; KUMAR P. S. et coll., 2007). Après le test de viabilité de la trachée, l'Histamine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative à partir de $10^{-10}M$ dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de la trachée. La préparation a ensuite été rincée puis laissée se stabiliser. Après cette période, l'extrait a été injecté dans le bain à la concentration de 0,25 mg/ml, puis la trachée a été laissée en contact avec l'extrait pendant 10 minutes. Après ce temps d'incubation, l'histamine a été injectée dans le bain d'une façon cumulative jusqu'à la contraction maximale de l'organe. Cette manipulation a été reprise en pré incubant l'organe dans un bain contenant l'extrait à la concentration de 0,5mg/ml (LEE H. M. et coll., 1952).

L'amplitude des contractions a été mesurée puis exprimée en pourcentage de la contraction maximale et rapportée sur un papier semi logarithmique en fonction de la concentration de l'histamine dans le bain, en absence et en présence de l'extrait. La CE₅₀ de l'histamine en absence et en présence de MF11 a été déterminée graphiquement. Et pour étudier le mécanisme d'action de l'extrait, l'amplitude des contractions maximales ainsi que les CE₅₀ ont été comparées entre elles.

EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm e.s.m. les moyennes ont été comparées en utilisant le test 't' de Student avec le logiciel « Microsoft office Excel 2010 ». La différence a été considérée comme significative lorsque la valeur de p est inférieure à 0 ,05.

III. RESULTATS

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Rendement de l'extraction

La macération des 250 g de poudre dans un mélange éthanol : eau (60 - 40) pendant 3 jours donne 60 g d'extrait, ce qui correspond à un rendement de 24 %.

Les familles chimiques présentes dans l'extrait

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait révèle qu'il contient une forte teneur en terpenoïdes, une teneur moyenne en anthocyanes, alcaloïdes et sucres réducteurs. Puis, les polysaccharides, les flavonoïdes et les composés phénoliques sont présents en faible teneur dans l'extrait (Tableau III).

Tableau III. Résultats du criblage phytochimique effectué sur les feuilles de la plante

Familles chimiques	Teneur relative
Terpenoïdes	+++
Desoxy-2-sucres	++
Alcaloïdes	++
Anthocyanes	++
Composés phénoliques	+
Polysaccharides	+
Flavonoïdes	+

Légende :

+++ : Présence à forte teneur

++ : Présence à teneur moyenne

+ : Présence à faible teneur

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

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

L'administration de l'extrait par voie orale retarde l'apparition de la suffocation des animaux, et ce délai augmente en fonction de la dose de l'extrait administré (figure 2). Les animaux du lot témoin présentent une détresse respiratoire à partir de $123 \pm 12,18$ sec contre $311 \pm 11,41$ sec et $666,5 \pm 9,54$ sec respectivement chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 150 et 300 mg/kg ($p<0,05$).

D'après ces résultats, l'extrait MF11 protège les animaux contre la détresse respiratoire provoquée par l'histamine.

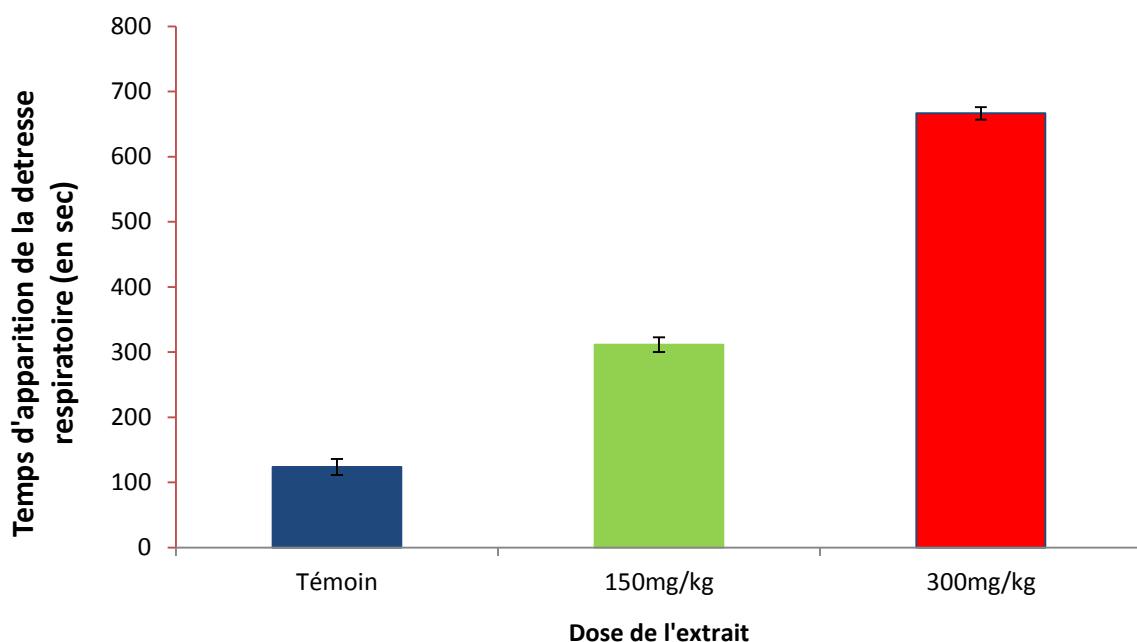


Figure2. Temps d'apparition de la détresse respiratoire provoquée par l'histamine (5 %) pulvérisée sous une cloche contenant des animaux du lot témoin (■) et traités avec l'extrait aux doses de 150 (■) et 300 mg/kg (■) administré par voie orale ($\bar{m} \pm e.s.m$; n=3 ; $p<0,05$).

2. Effet de MF11 sur la contraction de la trachée provoquée par l’Histamine

En présence de MF11 dans le bain, la trachée contractée par l’histamine se relâche en fonction de sa concentration dans le bain. Le relâchement à 100 % est obtenu à la concentration de 1 mg/ml de MF11. La détermination de la CE₅₀ donne 0,55 mg/ml ($p<0,05$) (Figure 3).

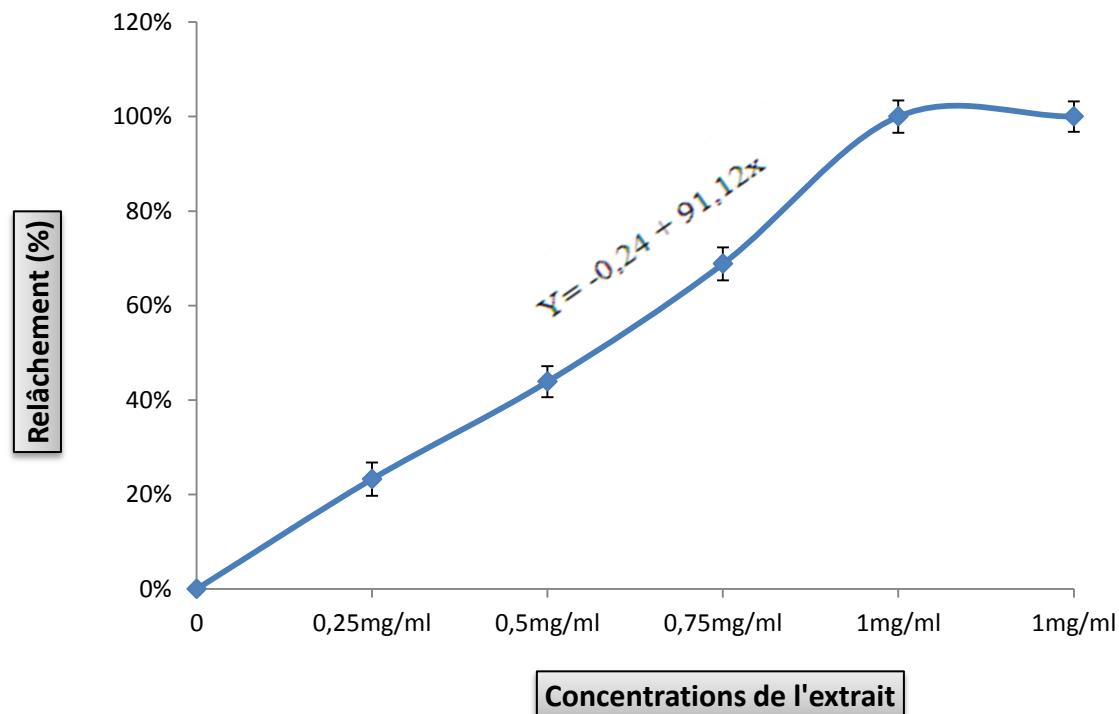


Figure 3. Variation du relâchement de la trachée précontractée par l’histamine en présence de l’extrait MF11 injecté de façon cumulative dans le bain ($\bar{m} \pm \text{e.s.m}$; $n = 5$; $p<0,05$).

3. Mécanisme d’action de MF11

En injectant l’histamine dans le bain, la trachée se contracte, et l’amplitude de la contraction augmente en fonction de sa concentration dans le bain. À la concentration de 10^{-7} M, la contraction est égale à 100 %. La détermination graphique du CE₅₀ en utilisant de papier semi-logarithme donne $3,5 \cdot 10^{-9}$ M. En pré incubant la trachée dans un bain contenant l’extrait MF11, l’effet maximal de l’histamine diminue et sa CE₅₀ augmente. En présence de 0,25 et 0,50 mg/ml d’extrait dans le bain, l’effet maximal diminue respectivement à 64 % et 34 % avec des CE₅₀ correspondant à $0,4 \cdot 10^{-8}$ M et $2,2 \cdot 10^{-8}$ M ($p<0,05$) (Figure 4).

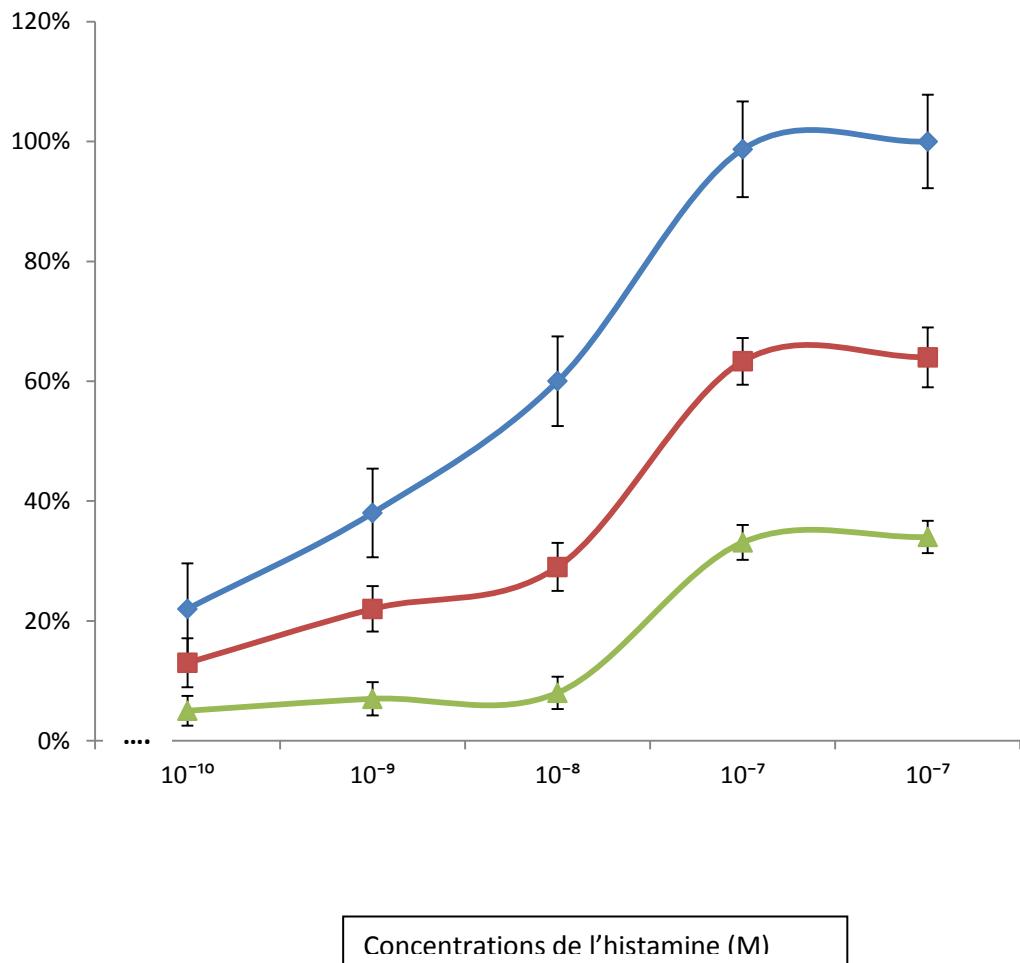


Figure 4. Variation de la contraction provoquée par l'histamine sur la trachée isolée de cobaye en absence (—) et en présence de l'extrait aux concentrations de 0,25 mg/ml (■) et 0,5 mg/ml (▲) dans le bain ($\bar{m} \pm \text{e.s.m}$; n = 5; p < 0,05).

IV. DISCUSSION

Ce travail a pour objectif d'étudier l'activité de MF11 sur le bronchospasme en effectuant des tests *in vivo* chez le cobaye et des tests *in vitro* sur la trachée isolée.

Compte tenu du rôle joué par l'histamine lors de la bronchoconstriction au cours d'une crise d'asthme, l'histamine a été utilisée lors des tests de suffocation *in vivo* (SATAKE K. et coll., 1998). Les résultats que nous avions obtenus montrent que l'extrait MF11 augmente le temps d'apparition des signes de suffocation. Les animaux qui ne présentent aucun signe d'étouffement pendant les 3 premières minutes qui ont suivi la pulvérisation de l'histamine dans le dispositif expérimental ont été considérés comme protégés de son effet bronchoconstricteur (ZONGO R. F. E., 2014). Cette absence des signes de suffocation pourrait être due à l'effet bronchodilatateur de l'extrait. Comme c'est le cas de l'extrait CSK qui augmente également le temps d'apparition de la gêne respiratoire, en utilisant les mêmes procédés (LAHADSON S. F., 2013).

Pour expliquer les résultats obtenus *in vivo*, des tests sur organe isolé ont été effectués en contractant la trachée isolée de cobaye avec l'histamine. Lors de ces tests *in vitro*, l'extrait relâche la trachée contractée par l'histamine exogène. Cet effet bronchodilatateur de MF11 dépend de sa concentration dans le bain. Ceci explique pourquoi les animaux traités avec l'extrait sont protégés contre la suffocation provoquée par l'histamine. Cette activité bronchodilatatrice pourrait être due à l'inhibition de l'histamine. Deux cas peuvent se présenter : soit l'extrait inhibe l'histamine d'une façon non compétitive, soit cette inhibition est compétitive. D'après nos résultats, la contraction maximale provoquée par l'histamine diminue, et sa CE₅₀ augmente en présence de l'extrait, ce qui veut dire que l'extrait inhibe l'histamine d'une manière non compétitive. Deux cas encore peuvent se présenter : soit le principe actif occupe un récepteur autre que celui de l'histamine, dont l'occupation par l'extrait MF11 déformerait le récepteur histaminergique, ce qui empêche la liaison de l'histamine à son récepteur (BAROODY F. M. et coll., 2000). Soit il possèderait une activité bronchodilatatrice propre qui s'oppose à l'effet bronchoconstricteur de l'histamine (MEHDI C., 2008). Par exemple, il se fixe au niveau des récepteurs β-adrénergiques, et relâche le muscle lisse bronchique et soulage ainsi la gêne respiratoire provoquée par l'histamine (ZONGO R. F. E., 2014). Cette propriété se retrouve dans le cas de *Ephedra sinica* qui possède un effet bronchodilatateur propre avec l'Ephédrine qui stimule le système nerveux sympathique (BHOOMIKA R. G. et coll., 2007 ; MULLER J. N., 2009).

L'action des alcaloïdes sur le récepteur bêta a également été rapportée par BOUSTA D. et ses collaborateurs (2001) avec *Atropa belladonna* et par GUESSAN K. et ses collaborateurs (2009) sur *Ficus exaspeata*, dont l'activité bronchodilatatrice est attribuée aux alcaloïdes. Certains alcaloïdes du type méthylxanthine, comme la théophylline, substances actives des feuilles du thé, du café et du guarana, agissent comme bronchodilatateurs en inhibant l'enzyme phosphodiesterase (MULLER J. N., 2009 ; BELLIA V. et coll., 2006). Enfin, comme c'est le cas de l'extrait *Waltheria indica* L. (MALVACEAE) qui inhibe la bronchoconstriction (ZONGO R. F. E., 2014).

Une crise d'asthme est aussi aggravée par une hypersécrétion de mucus par les cellules calciformes produisant une quantité accrue des mucines (BURGEL P. R., 2001). En plus, de la bronchoconstriction provoquée par l'histamine (GILLES G., 2006), le mucus rétrécit le diamètre des bronches et les bronchioles en aggravant la dyspnée respiratoire (MULLER J. N., 2009). L'obstruction des voies respiratoires par des bouchons muqueux provoque une asphyxie, une des causes majeures de mortalité au cours d'une crise d'asthme (BURGEL P. R., 2001). D'après la littérature, les flavonoïdes pourraient réduire la sécrétion de mucus bronchiques (ZEGHAD N., 2009). Comme c'est le cas de l'extrait de plantes comme *Eucalyptus globulus*, *Malva sylvestris* et *Zingiber officinalis* qui inhibent la sécrétion de mucus (ROJAS U. R. E. et coll., 2010). Parmi les flavonoïdes, la Quercétine possède des activités anti-inflammatoires (TEIXERIE S., 2002) et réduit le risque de l'asthme (KNEKT P. et coll., 2002).

La présence de ces familles chimiques pourrait être le responsable de la protection des animaux contre la détresse respiratoire provoquée par l'histamine, ce qui justifie l'utilisation empirique de la plante dans la prise en charge de la crise d'asthme.

Des études plus approfondies seraient nécessaires pour élucider le mécanisme d'action de l'extrait ainsi que les familles chimiques responsables de son activité bronchodilatatrice en effectuant des tests *in vitro* avec d'autres agonistes contracturant.

CONCLUSION

Les tests *in vivo* et *in vitro* effectués avec l'extrait MF11 montrent que MF11 protège les animaux contre la gêne respiratoire provoquée par l'histamine exogène, et relâche la trachée contractée par l'histamine. Ces résultats montrent que l'extrait MF11 possède une activité bronchodilatatrice, et pourrait être utilisée en cas de crise d'asthme d'origine allergique. Ceci justifie l'utilisation empirique de la plante à partir de laquelle, MF11 a été extrait. Les alcaloïdes et/ou flavonoïdes pourraient être responsables de cette activité.

BIBLIOGRAPHIE

ANITA A. M., ARCHANA N. P. (2008).

“Investigation into the Mechanism of Action of *Abutilon indicum* in the treatment of Bronchial Asthma”.

Global. J. Pharmacol., **2** (2): 23-30.

ANNESI-MAESANO I. (2011).

Epidémiologie de l’asthme dans le monde et en France : la mortalité par asthme en France.

Données CEPIDISC Inserm

Revue du praticien, **61**: 334-343.

BAIRD J. G., CHILVERS E. R., KENNEDY E. D., NAHORKI S. R. (1989).

Changes in intercellular calcium within the physiological range influence receptor-mediated inositol phosphate responses in brain and tracheal smooth muscles slices.

Arch. Pharmacol., **339**: 247-251.

BAROODY F. M., NACLERIO R. M. (2000).

Antiallergic effects of H1-receptor antagonists.

Rev. Allergy, **64** (55): 17-27.

BELLIA V., BATTAGLIA S., MATERA M. G., CAZZOLA M. (2006).

The use of bronchodilatators in the treatment of airway obstruction in elderly patients.

Pulm. Pharmacol. Ther., **19**: 311-319.

BHOOMIKA R. G., BABITA B. A., RAMESH K. G., ANITA A. M. (2007).

Pharmacological classification of herbal anti-asthmatics.

Orient. Pharm. Exp. Med., **7** (1): 16-19.

BOUSTA D., SOULIMANI R., JARMOUNI I. (2001).

Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and Poumon histamine in stressed mice.

J. Ethnopharmacol., **74** (3): 205-215.

BRUNELLESHI S., HAYE-LE GRAND L., NOREL X., BENVENISTE J., BRINX C. (1987).

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

J. Pharmacol. Exp. Ther., **243**: 356-362.

BURGEL P. R. (2001).

Epidermal Growth Factor : regulation de l'hypersécretion bronchique de mucus; mécanismes et perspectives thérapeutiques.

La lettre du pneumologue, **4** (6): 249-251.

CHAADI M., FREUND-MICHEL V., FROSSARD N., RANDRIANTSOA A., ANDRIANTSITOHAINA R., LOBSTEIN A. (2007).

Antiproliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells".

J. Ethnopharmacol., **109** (1): 134-139.

CHAUCHAN N., SAAURABH R., DUBEY B. K. (2012).

Antiasthmatic effect of roots of *Clitorea ternatea*.

L. Int. J. Pharm. Sci. Res., **3** (4): 1076-1080.

CHOPINAUD P. A. (2014).

Consultations pour asthme en médecine générale. Une étude descriptive.

Thèse de doctorat en médecine à la faculté mixte de médecine et de pharmacie de Rouen, 1-54.

COLOT M. (1972).

Notions techniques de pharmacologie générale ».

Ed. Masson & Cie (Paris), 104-106.

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

Phytochemical screening.

Rev. University of Illinois, (Chicago), **275**: 6-7.

GILLES G. (2006).

Hyperéosinophilie d'origine allergique.

Ed Masson, Presse Med., (Paris), **35**: 135-143.

GILHODES O., IGUAL J. (1994).

Pneumologie.

Ed. Ellipses, Collection internat, Paris, 160-176.

GUESSAN K., KADJA B., ZIRIHI G. N., TRAORÉ D., AKÉ-ASSI L. (2009).

Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubou (Agboville, Côte-d'Ivoire).

Sci. Nat., **6** (1): 1-15.

HARANATH P., SHYAMALAKUMARI S. (1975).

Experimental study on the mode of action of *Tylophora asthmatica* in bronchial asthma.

Ind. J. Med. Res., **63**: 661-670.

HARRIS P. N., LEE H. M., ANDERSON R. C. (1952).

Antihistaminic action of pyronil.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **80**: 458-462.

HAZEKAMP A., VERPOORT R., PANTHONG A. (2001).

Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*".

J. Ethnopharmacol., **78**: 45-49.

HECKEL E. (1910).

Les plantes utiles de Madagascar.

Ann. Inst. Bot. Géol. Colon. Marseille, **28**: 147-154.

HOLGATE S. T., DAVIES D. E. (2009).

Rethinking the pathogenesis of asthma.

Immunity. **31** (3): 362-367.

HUMBERT M., MENZ G., YING S., CORRIGAN C. J., ROBINSON D. S., DURHAM S. R. (1990).

The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non atopic) asthma: more similarities than differences.

Immunol. Today., **20**: 528-533.

ISABELLE P. (2004).

Asthme du nourrisson et de l'enfant.

Suppl. Arch. Pediatr., **9** (3): 337-421.

JAYDEOKAR A. V., SHENOYA P. A., BANDAWANE D. D., NIPATE S. S, CHAUDHARI P. D. (2011).

Preclinical evaluation methods for screening of bronchodilators and antitussives.

Int. J. Universal Pharm. and Life Sci., **1** (2): 149-157.

JUTEL M., AKDIS M., AKDIS C. A., (2009).

Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology.

Clin. Exp. Allergy, **39** (12): 1786-1800.

KNEKT P., KUMPKUNS J., JARVINEN R., RESSANEN H., HELIOVAARA M., REUNANE A., AROMAA A., (2002).

Flavonoid intake and risk of chronic diseases.

Am. J. Clin. Nutr., **76** (3): 560-568.

KUMAR P. S., SONI K., JADHAV S. R., DOSHINS, SARAF M. N. (2007).

Mecanism of spasmolytic activity of a fraction of *Sarcotemma brevistigma* wight.

Ind. J. Exp. Biol., **45** (J): 419-424.

LAHADSON S. F. (2013).

Contribution à l'évaluation de l'activité antiasthmatique de l'extrait de la plante CSK.

Mémoire de DEA en pharmacologie, Université d'Antananarivo, 26-28.

LEE H. M., ANDERSON R. C., HARRIS P. N. (1952).

Antihistaminic action of pyronil.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **80**: 458-462.

MARONE M., GENOVESE A., TRIGGIANI M. (2003).

The histamine-cytokine network in allergic inflammation.

J. Allergy Clin. Immunol., **112** (4): 83-88.

NICHOLSON K. G., KENT J., IRELAND D. C. (1993).

Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults.

Br. Med. J., **307**: 962-986.

RAMANITRAHASIMBOLA D., RAKOTONDRAMANANA D.A., RASOANAIVO P., RANDRIANTSOA A., RATSIMAMANGA S., PALAZZINO G., GALEFFI C., NICOLETTI M. (2005).

Bronchodilatator activity of *Phymatodes scolependria* (Burn) Ching and its bioactive constituent.

J. Ethnopharmacol., **102**: 400-407.

RAKOTOMIZAO J. R., RAKOTOSON J. S., SICARD H. (2009).

Profil allergologique des patients vus à Antananarivo.

Revue des maladies respiratoires, **26** : 39-40.

ROJAS U. R. E., MARTINEZ S. (2010).

Evaluation of the mucolytic effect of a mixture of natural extracts of *Eucalyptus globulus*, *Glycyrrhiza glabra*, *Malva sylvestris*, *Sambucus nigra*, *Zingiber officinalis*.

J. In. Med., **12** (6): 327-334.

SATAKE K., TAKAGI K., KODAMA I., HONJO, TOYAMA J., SHIBATA S. (1998).

Relaxant effects of NKH77, a new water soluble forskolin derivative, on guinea pig Tracheal smooth muscle: the role of Ca^{2+} - activated K^+ channels.

Br. J. Pharmacol., **123** (4): 753-61.

SETH U. K., DADKAR N. K., KAMAT U. G. (1972).
Selected topics in Experimental Pharmacology.
1^{ère} Ed. Kothari Book Depot, Bombay, 126-130.

SOYKA M. B., HOLZMANN D., CEZMI A. (2012).
Regulatory Cells in Allergen-specific Immunotherapy.
Immunotherap., **4** (4): 389-396.

TEIXERIE S. (2002).
Bioflavonoid: Proanthocyanide and Quercetine and their potential roles in treating muscles.
Phys. Ther., **32** (7): 357-363.

TSUKIAMA H., AKASHI T., UEKI T., OKUMURA H., ABE K., (2007).
The extract from *Nandina domestica* THUNBERG inhibits Histamine and serotonin contraction isolated guinea pig trachea.
Biol. Pharm. Bull., **30** (11): 2063-2068.

VAN ROSSUM J. M. (1963).
Cumulative dose-response curves. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluations of drug parameters.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., **143**: 299-330.

WHITE M. V. (1990).
The role of histamine in allergic diseases.
J. Allergy Clin. Immunol., **86**: 599-605.

YEO D., N'QUESSAN J., SEA T., COULIBALY Y., DIAMAN A., TAKON N., YAVO J., GUEDI-GUINA F. (2008).
Evaluation de l'activité antiasthmatique et antitussive de *Combretum molle* plante médicinale de la pharmacopée ivoirienne.
Phytothérapie, **6**: 348-351.

ZEGHAD N. (2009).

Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur propriété antimicrobienne.

Thèse de doctorat en science de la vie à l'Université de Mentouri (Constantine), 1-96.

ZONGO R. F. E. (2014).

Caractérisation chimique et biologique de *Waltheria indica* L. (MALVACEAE), herbacée utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour la prise en charge de l'asthme.

Thèse de doctorat en Chimie et Sciences du Vivant, Université de Grenoble, 1-18.

WEBOGRAPHIE

DJEBBAR A. (2001).

Epidémiologie de l'asthme.

http://www.aurespneumo.com/doc/comm/pdf/31%20Epid_asthme%20novartis%20setif.pdf

consulté le 12/11/ 16.

GINA. The Global Initiative for Asthma (2009).

Global strategy for asthma management and prevention. Classification of asthma. Asthma control.

<http://www.ginasthma.com> consulté le 12/11/16

HURTEL J. M. (2007).

L'asthme et son traitement par les médicaments de synthèse, les plantes médicinales et les huiles essentielles.

<http://pitti.over-blog.com/article-l-asthme-et-son-traitement-par-les-medicaments-de-synthese-les-plantes-medicinales-et-les-huiles-es-113986756.html> consulté le 12/11/16

MULLER J. N. (2009).

Les plantes de l'asthme.

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwiMnGS8tDQAhWRyRoKHaXNBsoQFggdMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.hippocratus.com%2Fmetasite%2Fweb_site%2F1%2Fcontenu%2Fpublic%2Fpdf%2Fmemoires%2Foctobre2011%2Fmemoire2_muler_asthme.pdf&usg=AFQjCNHNJ6KkdWZRyumjac9klJLmz6rqg&bvm=bv.139782543,d.d2s&cad=rja consulté le 12/11/16

PIERRICK H. (2009).

Traitements des allergies.

<http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/contents/35-traitement-des-allergies> consulté le 12/11/16

« ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIASTHMATIQUE DE L'EXTRAIT MF11 CHEZ LE COBAYE »

Auteur : RASAMOELINA Tokiniaina
Irinamalala Miorasoa
Adresse : Lot II E 9N Ter SA AMBOHIMIRARY
Contact : 0342002208 / 0322702208
E-mail : mimierasam@gmail.com
Année : 2015-2016
Rapporteur : Pr. RANDIMBIVOLOLOLONA
Fanantenainrainy

Laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
B.P. : 8351
E-mail : frandimbi@gmail.com
Domaine des Sciences et technologies
UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

RESUME

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'activité de l'extrait MF11 sur l'asthme expérimental chez le cochon d'inde. Des tests *in vivo* ont été effectués pour étudier son activité sur la gêne respiratoire provoquée par l'histamine et des tests *in vitro* ont été effectués pour déterminer son mécanisme d'action. Les résultats des tests *in vivo* montrent que l'extrait aqueux MF11 retarde l'apparition de la gêne respiratoire de $123,66 \pm 12,18$ sec chez le lot témoin à $311,33 \pm 11,41$ sec et $666,5 \pm 9,54$ sec chez les lots traités avec l'extrait aux doses respectives de 150 et 300 mg/kg ($p<0,05$). Il relâche la trachée isolée de cobaye contractée par l'Histamine avec une $CE_{50} = 0,55$ mg/ml. En pré incubant la trachée dans un bain contenant 0,25 et 0,5 mg/ml d'extrait, la contraction maximale de l'Histamine passe de 100 % à 64 % et 34 % respectivement, avec une CE_{50} qui augmente de $3,5 \pm 0,08 \cdot 10^{-9}$ M en absence de l'extrait à $0,4 \pm 0,04 \cdot 10^{-8}$ M et $2,2 \pm 0,03 \cdot 10^{-8}$ M en présence de l'extrait aux concentrations respectives de 0,25 et 0,5 mg/ml ($p<0,05$). Ces résultats montrent que l'extrait a une activité antiasthmatische en agissant contre l'histamine. Cette activité pourrait être due aux alcaloïdes ou aux flavonoïdes.

Mots clés : histamine - alcaloïdes - flavonoïdes – asthme – cochon d'inde.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the activity of the extract MF11 on experimental asthma in guinea pig. *In vivo* test was carried out to evaluate the effect of the extract on experimental asthma crisis induced by spraying histamine while *in vitro* test was done to investigate the effect of extract on histamine-induced trachea constriction and to determine the mechanism of action. Results of the *in vivo* tests show a delay in the time of the appearance of respiratory distress in animals treated with extract MF11 at doses 150 and 300 mg/kg to 311.33 ± 11.41 sec and 666.5 ± 9.54 sec, respectively, versus 123.66 ± 12.18 sec observed in the control animals ($p<0.05$). The *in vitro* tests results indicate the extract MF11 relaxes completely the isolated trachea constricted by histamine with an EC_{50} equal to $= 0.55$ mg/ml. Pre-incubating the isolated trachea in a bath containing the extract MF11 at concentrations 0.25 and 0.5mg/ml reduces the maximal effect of histamine from 100% with $EC_{50} = 3.5 \pm 0.08 \times 10^{-9}$ M in the absence of the extract, to 64 % with $EC_{50} = 0.4 \pm 0.04 \times 10^{-8}$ M and 34 % with $EC_{50} = 2.2 \pm 0.03 \times 10^{-8}$ M respectively ($p<0.05$). The inhibitory effect of extract MF11 on histamine is of a non-competitive nature. These results show that the extract MF11 has an anti-asthmatic activity. The presence of alkaloids or flavonoids in the extract could be responsible for this activity.

Keywords: histamine - alkaloids - flavonoids – asthma - guinea pig.