

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.....	5
1. Préparation de l'extrait RDA07	5
2. Criblage phytochimique.....	6
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	7
1. Animaux d'expérimentation, répartition des animaux et voie d'administration des produits	7
2. Étude de l'effet de RDA07 sur la diarrhée provoquée par l'huile de ricin.....	7
3. Étude de l'effet de RDA07 sur le péristaltisme intestinal	8
4. Étude du mécanisme d'action de l'extrait RDA07	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.....	12
1. Effet de RDA07 sur la diarrhée provoquée par l'huile de ricin.....	12
2. Effet de RDA07 sur la motilité intestinale	13
3. Mécanisme d'action de l'extrait RDA07.....	13
IV. DISCUSSION.....	15
CONCLUSION.....	17
BIBLIOGRAPHIE.....	18

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les différentes étapes de préparation de l'extrait RDA07.....	5
Figure 2. Variation du volume du fluide intestinal ($\bar{m} \pm \bar{\sigma}$; n = 3 ; P < 0,05).....	12
Figure 3. Variation de relâchement de l'iléon isolé ($\bar{m} \pm \bar{\sigma}$; n = 3 ; P < 0,05).....	13
Figure 4. Variation de la contraction de l'iléon isolé du cobaye provoquée par l'acétylcholine en présence et en absence de l'extrait ($\bar{m} \pm \bar{\sigma}$; n = 3 ; P < 0,05).	14

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Tests utilisés pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait RDA07	6
Tableau II. Composition de la solution de Tyrode	8
Tableau III. Les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait RDA07.....	11

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

Ach	: Acétylcholine
<i>al.</i>	: Alii
°C	: Degré Celsius
cm	: Centimètre
G	: Gramme
H	: Heure
LPGPC	: Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
m	: Mètre
Mg	: Milligramme
Mg	: Magnésium
mg/kg	: Milligramme par kilogramme
ml/kg	: Millilitre par kilogramme
mm	: Millimètre
m/min	: Mètre par minute
min	: Minutes
N	: Nombre d'animaux utilisés
P	: Seuil de signification
R	: Rendement
S	: Seconde
$\bar{\sigma}$: Écart type réduit
\bar{m}	: Moyenne
±	: Plus ou moins
<	: Inférieur à
%	: Pourcentage

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La diarrhée est caractérisée par l'émission de selles molles ou liquides trop fréquentes. Elle est généralement accompagnée de douleur ou de crampes intestinales qui rendent le sujet mal à l'aise (OMS, 1989). C'est un problème de santé publique en particulier dans les pays en voie de développement (BALAJI *et al.*, 2012). Le taux de mortalité liée aux diarrhées chez l'enfant de moins de 5 ans est égal à 15,2 % dans le continent Africain et d'Asie du sud-est (RANDREMANANA., 2012). A Madagascar, la diarrhée fait partie des causes de la mortalité infantile, avec une prévalence de 17 %. Elle constitue la 3^{ème} cause de décès après la pneumonie (21 %) et le paludisme (20 %) (UNICEF, 2014). Chaque année, environ 44000 enfants en meurent. En général, elle est due à un problème d'hygiène, d'insalubrité des aliments ou de l'eau (LEFLAIVE, 2012).

Cette maladie est due au déséquilibre entre l'absorption et la sécrétion hydro électrolytique au niveau de la paroi intestinale (BOURILLON *et al.*, 2008) . Selon sa durée, la diarrhée peut être classée en deux catégories : la diarrhée aigüe et la diarrhée chronique. La diarrhée aigüe est caractérisée par un début brutal qui ne dure que quelques jours. Elle peut être d'origine bactérienne, parasitaire ou virale. Les bactéries responsables sont souvent *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Shigella dysenteriae*. Parmi les parasites qui provoquent cette maladie, citons *Balantidium coli* et *Giardia intestinalis* (SAURABH *et al.*, 2008). Enfin, les rotavirus, adénovirus, astrovirus et calicivirus provoquent aussi la diarrhée (OLIVIER *et al.*, 2008). Ces germes pathogènes pénètrent dans la paroi intestinale et libèrent des toxines qui l'endommagent. Cela affecte l'échange d'eau et des électrolytes à travers la paroi, il en résulte une augmentation de sécrétion de fluide dans la lumière intestinale (BELAICHE, 2000).

Tandis que la diarrhée chronique peut durer plus de 4 semaines. Elle résulte d'une inflammation de la paroi intestinale ou d'une irritation du côlon provoquée par une réaction immunitaire intestinale inadaptée à l'encontre les bactéries habituelles de la flore intestinale, d'une intolérance alimentaire suite au manque d'enzyme ou à la présence de certaines molécules osmotiquement actives dans la lumière intestinale (KERHARO, 1971).

Par ailleurs, selon le mécanisme mis en jeu, la diarrhée peut être classée en diarrhée motrice, sécrétoire ou osmotique. La diarrhée motrice est caractérisée par la présence de résidus non

digérés dans les selles molles. Elle est d'origine nerveuse, elle peut également être due aux stress ou à l'anxiété qui augmentent la libération d'acétylcholine. Ce neurotransmetteur accélère le transit intestinal (BOUHNIK., 2013).

Quant à la diarrhée sécrétoire, elle est caractérisée par l'émission de selles liquides. Elle peut être due à l'irritation de la muqueuse intestinale qui provoque un dysfonctionnement du transport des molécules du contenu intestinal à travers la membrane des cellules épithéliales de l'intestin (BELAICHE, 2000). Cette irritation peut être provoquée par les toxines sécrétées par des agents pathogènes d'origine bactérienne comme *Salmonella typhi* (DUPEYRON, 1997), parasitaire comme *Giardia intestinalis* (SAURABH et al., 2008) ou virale comme *enterovirus* (DJELLOULI, 2013). Ces toxines altèrent la structure de la paroi intestinale, à l'origine de la perturbation du mouvement d'eau et d'électrolytes au niveau de la paroi intestinale. Elle peut aussi être provoquée par des produits irritants comme l'huile de ricin qui entraînent des réactions inflammatoires diminuant l'absorption de l'eau et des électrolytes et qui accélèrent aussi la motilité intestinale (AMNON et al., 1974).

Enfin, la diarrhée osmotique est caractérisée par des selles très liquides. Elle est due à la présence de substances osmotiquement actives dans la lumière intestinale. Ces substances augmentent la pression osmotique dans la lumière intestinale attirant l'eau des cellules pariétales vers la lumière. C'est le cas des laxatifs et des molécules osmotiques comme le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) qui attirent l'eau dans la lumière intestinale (GREGORY et al., 2011).

Des antibiotiques comme les aminoglycosides peuvent aussi provoquer une diarrhée. Ils appauvrissement qualitativement et quantitativement la flore intestinale normale ce qui favorise la prolifération des souches pathogènes (SURAWICZ ET CHRISTINA, 2017).

Selon leur mécanisme d'action, les anti-diarrhéique peuvent être classés en antipéristaltiques, anti-sécrétoires, ou des adsorbants. Dans le cas où la diarrhée est d'origine bactérienne, les antibiotiques sont aussi prescrits contre la diarrhée (CARRE et al., 2001).

Les antipéristaltiques diminuent le péristaltisme intestinal, en inhibant l'action de l'acétylcholine, de l'histamine ou de la sérotonine, ce qui ralentit le transit intestinal. Cela permet à l'intestin de mieux absorber l'eau et les électrolytes, diminuant ainsi le volume du selles

émises, la fréquence des émissions et augmentant en même temps leur consistance (ALLAIN, 2000). Le lopéramide se fixe sur le récepteur opioïde μ de l'entérocyte et diminue le taux de l'AMPc dans la cellule épithéliale de l'intestin, diminuant ainsi l'hyperpéristaltisme intestinal et l'hypersécrétion d'électrolytes et d'eau (HUIJGHEBAERT *et al.*, 2003).

Tandis que les anti-sécrétoires comme le Racécadotril (Tiorphan®) inhibent l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale, en inhibant l'enképhalinase intestinale. Cette dernière est une enzyme responsable de la dégradation de l'enképhaline responsable de la réabsorption de l'eau et des électrolytes (CTZARD *et al.*, 2007).

Quant aux adsorbants, ce sont des molécules qui tapissent la muqueuse digestive pour la protéger contre les agents irritants. En même temps, ils adsorbent le gaz et les toxines pour les inactiver. Le diosmectite (Smecta®) et le charbon actif font partie de ce groupe de médicaments adsorbants (HEINZ *et KLAUS*, 2003).

Enfin, en cas de diarrhée d'origine microbienne, des antibiotiques comme les sulfamides (sulfaguanidine©) qui sont des bactériostatiques et les nifuroxazides (Ercéfuryl®) qui sont des bactéricides sont prescrits (DJELLOULI, 2013).

A Madagascar, la phytothérapie est aussi utilisée pour traiter la diarrhée. Des plantes comme *Psydiump guyava* (*goavy*) (MYRTACEAE), *Ocinium gratissum* (*romba*) (LAMIACEAE) (NICOLAS, 2012) et *Euphorbia hirta* L. (*jean robera*) EUPHORBIACEAE) (LANHERS *et al.*, 2005), dont le décoté des feuilles est utilisé pour traiter les diarrhées (RABESA *et al.*, 1986). Les fruits d'*Andansonia digitata* sont aussi utilisés pour ralentir le transit intestinal et pour inhiber la sécrétion hydro-électrolyte (KENNE, 1994).

En analysant les résultats des enquêtes ethnopharmacologiques que nous avions effectuées dans les régions d'Atsimondrano et d'Itasy, le décoté des feuilles de la plante à partir de laquelle a été préparé l'extrait codé RDA07 est utilisé pour la prise en charge de la diarrhée. Afin d'étudier l'action de ces feuilles sur la diarrhée, nous avons étudié son effet sur une diarrhée expérimentale *in vivo* chez le cochon d'Inde. Puis l'effet de cet extrait sur le péristaltisme intestinal a été testé sur la contraction de l'iléon isolé de cochon d'Inde provoquée par l'acétylcholine *in vitro*.

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. PARTIE PHYTOCHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait RDA07

Les feuilles de la plante utilisée dans ce travail ont été récoltées au mois d'Aout 2017 dans la région d'Atsimondrano. Elles ont été séchées à l'ombre, dans une salle aérée, à la température ambiante, pendant 3 semaines. Ensuite 200 g de matière végétale sèche ont été broyés à l'aide d'un broyeur à marteau (BROOK CROMRTON, SERIE 2000©) au Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC), de la Faculté de Sciences, de l'Université d'Antananarivo. Deux cent grammes de la poudre obtenue ont été macérés dans 1,5 litre d'un mélange éthanol-eau (60 : 40), à la température ambiante, pendant 3 jours. Le macérât a été agité une fois par jour, pendant 10 minutes. Ensuite, il a été filtré sur du coton hydrophile et le filtrat récupéré a été évaporé à l'aide d'un distillateur à la température de 80° C, puis dans un bain marie, à la température de 100° C jusqu'à l'évaporation totale du solvant (Figure 1). L'extrait sec obtenu a été codé RDA07, puis pesé pour calculer le rendement selon la formule :

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

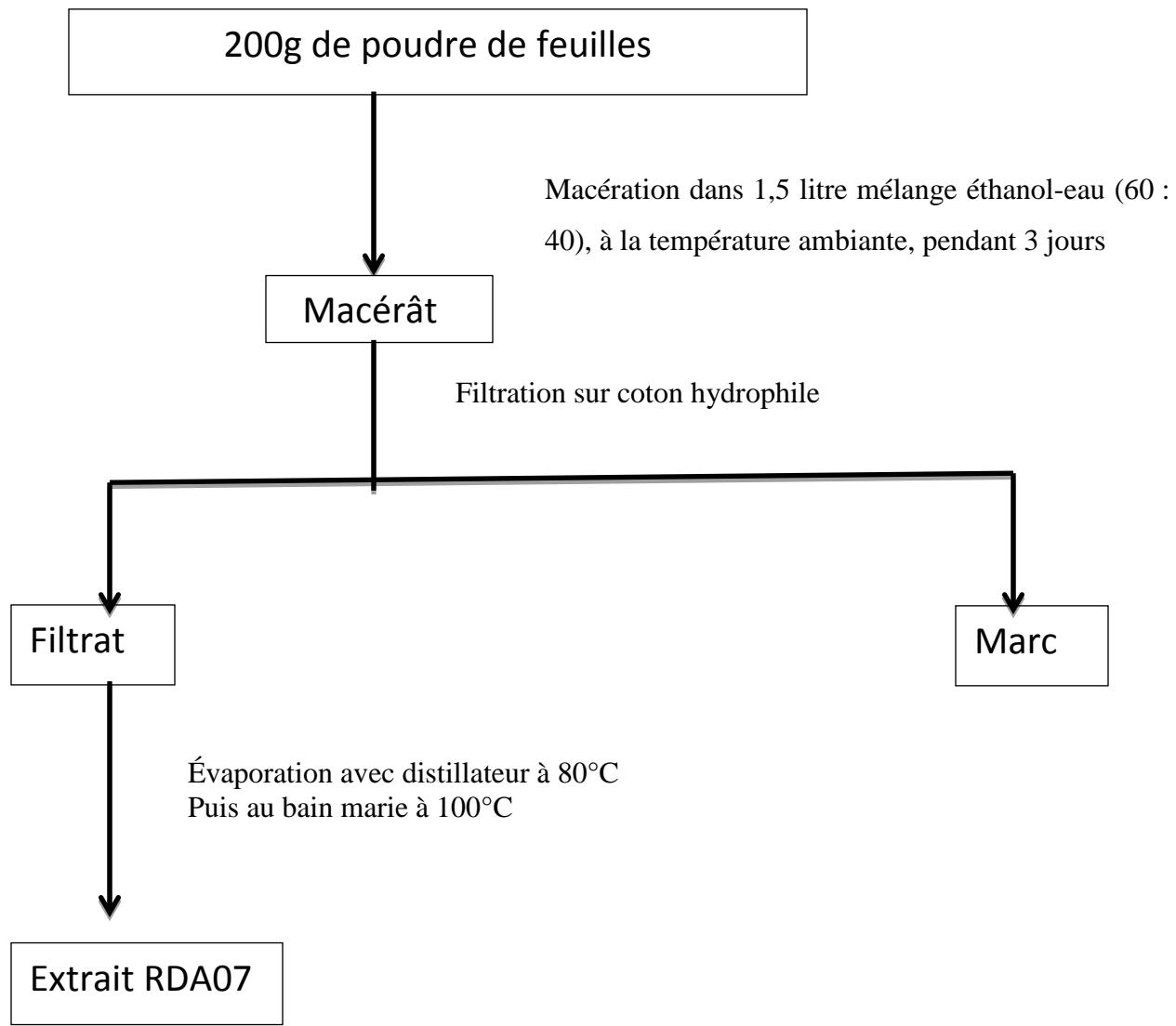


Figure 1. Les différentes étapes de préparation de l'extrait RDA07

2. Un criblage phytochimique

L'extrait RDA07 a fait l'objet d'un criblage phytochimique pour déterminer les familles chimiques qu'il contient. Ce test est basé sur la méthode 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 déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait RDA07 (FONG *et al.*, 1977).

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observations
ANTHOCYANES	BATH-SMITH	HCl à froid	Coloration rouge
LEUCOANTHOCYANES		HCl concentré chauffé au 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 absolu	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

Pour étudier l'action de l'extrait RDA07 contre la diarrhée, le cochon d'Inde tricolore a été utilisé comme modèle expérimental. Son effet a été testé *in vivo* sur une diarrhée provoquée avec de l'huile de ricin administrée par voie orale (AKUODORG *et al.*, 2011). Son effet sur le péristaltisme intestinal a été étudié *in vitro* en utilisant l'iléon de cochon d'inde contracté avec de l'acétylcholine (FERRON, 2008)

1. Les animaux utilisés pour l'expérimentation

Des cochons d'inde mâles et femelles âgés de 3 à 5 mois, pesant entre 200 et 300 grammes ont été utilisés pour toutes les expériences. Ils ont été élevés à l'animalerie du LPGPC à la température de 25°C, avec un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Ils ont été nourris avec des feuilles de graminées. Ils ont été mis à jeun pendant 18 heures avant les tests, mais ont eu un accès libre à de l'eau.

Pour les tests *in vivo*, les animaux ont été répartis en 4 lots : un lot témoin et trois lots traités avec RDA07. Les animaux du lot témoin ont reçu 10 ml/kg d'eau distillée par voie orale, tandis que les animaux des trois autres lots ont respectivement reçu de l'extrait RDA07 aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg administrés par voie orale dans 10 ml/kg d'eau distillée.

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

Quarante-cinq minutes après l'administration de l'eau distillée chez les animaux du lot témoin, et de l'extrait chez les animaux des autres 3 lots, 1 ml d'huile de ricin 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 animaux ont été anesthésiés par inhalation d'éther diéthylique, puis exsanguinés en coupant les deux carotides. Ensuite, une laparotomie a été effectuée, puis l'intestin grêle a été repéré. Une ligature a été effectuée au niveau du pylore et une autre au niveau de la jonction iléo-caecale. L'intestin entre ces deux nœuds a été prélevé, et son contenu a ensuite été recueilli dans un récipient. Ce fluide a été ensuite centrifugé à la vitesse de 3000 tours par minute, pendant 10 minutes, puis le surnageant a été récupéré dans un récipient gradué et son volume a été mesuré (MAMINILAINORO, 1996).

3. Étude de l'effet de l'extrait RDA07 sur le péristaltisme intestinal

L'effet de l'extrait RDA07 sur le péristaltisme intestinal a été étudié sur l'iléon isolé de cochon d'Inde contracté avec de l'acétylcholine (ATEUFACK et al., 2010).

a. Préparation et montage de l'organe

Des cochons d'Inde mis à jeun pendant 18 heures ont été utilisés. Ils ont été anesthésiés par inhalation d'éther diéthylique, puis exsanguinés en coupant leurs carotides. Après une laparotomie, l'iléon a été prélevé et placé dans une boîte de Pétri contenant une solution de Tyrode (Tableau II) aérée avec de l'air, avec un aérateur électrique (KOKO-108) à la température ambiante (MOHAMMED et al., 2009).

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

Ingrédients	Na Cl	K Cl	CaCl2	NaHCO3	MgCl2	NaHPO4	glucose
Concentration (mM)	136	3,4	3,4	17	1,7	0,8	17

L'organe a été nettoyé en enlevant les mésentères, puis découpé en morceaux de 1,5 cm de longueur. Ensuite, 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.

Pour le fixer dans la cuve, un crochet a été fixé à chaque extrémité de l'organe, aux deux côtés opposés. Ensuite un des crochets a été attaché au fond de la cuve et l'autre accroché à un capteur isométrique (Statham Gould) sous une tension de 1,5 g (MOHAMMED et al., 2009). Ce capteur a été relié à un ordinateur et piloté avec le logiciel SIGNAL MONITOR développé par l'I.O.G.A de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo.

Puis, l'organe a été laissé se stabiliser pendant 45 minutes. Durant cette période, le bain a été renouvelé toutes les 15 minutes. À la fin de ce temps de stabilisation, l'acétylcholine a été injectée dans le bain afin d'obtenir une concentration finale de 10^{-4} M pour sensibiliser l'organe (BORGES et al., 2003). Ensuite, l'organe a été rincé, puis laissé se stabiliser pendant 45 minutes. Pendant cette période, le bain a été renouvelé toutes les 15 minutes.

b. Étude de l'effet de l'extrait RDA07 sur motilité intestinale

L'action de l'extrait RDA07 sur la motilité intestinale a été étudiée *in vitro* sur la contraction de l'iléon isolé de cochon d'inde provoquée par l'acétylcholine (FERRON, 2008)

Après la seconde période de stabilisation, l'acétylcholine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative, à partir de 10^{-9} M jusqu'à l'obtention de la contraction maximale, dont l'amplitude a été considérée comme 100 %. Ensuite, l'extrait RDA07 a été injecté dans le bain d'une manière cumulative jusqu'au relâchement total de l'organe. La somme du volume des solutions injectées dans le bain n'a pas excédé de 10 % du volume du bain (CAVALCANTE *et al.*, 2012). Les contractions ont été enregistrées avec un capteur isométrique (Statham Gould) et l'amplitude de chaque contraction a été mesurée, puis exprimée en fonction de l'amplitude maximale. Ensuite, une courbe montrant la relation entre l'amplitude et la concentration a été tracée sur une échelle semi logarithmique, puis la CE₅₀ de l'acétylcholine et celle de l'extrait ont été déterminées graphiquement.

4. Étude du mécanisme d'action de l'extrait RDA07

Le mécanisme d'action de l'extrait a été étudié *in vitro* sur l'iléon isolé de cochon d'Inde, en utilisant l'acétylcholine comme agent contracturant. L'organe a été pré incubé dans un bain contenant de l'extrait à différentes concentrations avant de le contracter avec l'acétylcholine (FERRON, 2008).

L'iléon isolé 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. L'organe a ensuite été laissé se stabiliser pendant 45 minutes, puis il a été sensibilisé avec d'acétylcholine à la concentration de 10^{-4} M dans le bain. Après la sensibilisation, il a été rincé et laissé se stabiliser de nouveau. Pendant les périodes de stabilisation, l'organe a été rincé toutes les 15 minutes (EZIKE *et al.*, 2014). Puis, l'extrait RDA07 a été injecté dans le bain afin de réaliser une concentration de 0,125 mg/ml dans le bain. L'organe a été laissé en contact avec l'extrait dans ce bain pendant 10 minutes. Ensuite, l'acétylcholine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative afin d'obtenir des concentrations croissantes jusqu'à la contraction maximale de l'organe. Ensuite, l'organe a été rincé, puis laissé se stabiliser de nouveau pendant 45 minutes en le rinçant toutes les 15 minutes. La même manipulation a été répétée en pré-incubant l'organe dans un bain

contenant l'extrait aux concentrations de 0,25 ; 0,5 puis 0,75 mg/ml. Les contractions en présence et en absence de l'extrait ont été enregistrées et leur amplitude a été mesurée et rapportée en fonction de la concentration de l'acétylcholine et de l'extrait dans le bain.

L'amplitude de la contraction en fonction de la contraction de l'acétylcholine dans le bain a été rapportée sur une échelle semi logarithmique, puis la CE₅₀ de l'acétylcholine en absence et en présence de l'extrait à différentes concentrations a été déterminée graphiquement.

C. ANALYSES ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne avec écart type réduit ($\bar{m} \pm \sigma$), puis elles ont été comparées entre elles avec un test « t » de Student. La différence a été considérée comme significative pour une valeur de P < 0,05.

RÉSULTATS

III. RÉSULTATS

A. PARTIE PHYTOCHIMIQUE

1. Rendement de l'extraction

Après l'évaporation du solvant du filtrat obtenu à partir de 200 g de poudre de feuilles macérés dans le mélange éthanol-eau (60 : 40), nous avons obtenu 40 g d'extrait sec, de couleur noir, avec un rendement de 20 %.

2. Résultats du criblage phytochimique

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait RDA07 révèle la présence de saponines, de sucres réducteurs, de tanins et de stéroïdes en forte teneur. Les anthocyanes, les alcaloïdes et les flavonoïdes sont présents en teneur moyenne. Enfin, les polysaccharides, les composés phénoliques y sont présents en faible teneur (Tableau III).

Tableau III. Les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait RDA07.

Familles chimiques	Teneur
Saponosides	+++
Sucres réducteurs	+++
Tanins	+++
Stéroïdes	+++
Anthocyanes	++
Alcaloïdes	++
Flavonoïdes	++
Polysaccharides	+
Composés phénoliques	+

+++ : Forte teneur

++ : Teneur moyenne

+ : faible teneur

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

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

L'administration l'huile de ricin par voie orale augmente le volume du fluide intestinal des animaux du lot témoin. L'extrait RDA07 diminue ce volume avec la dose administrée. Chez les cochons d'Inde du lot témoin, le volume du fluide est égal à 3 ml contre $2,1 \pm 0,2$, $1,3 \pm 0,6$ et $0,9 \pm 0,15$ ml chez les animaux traités avec l'extrait RDA07 aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg ($P<0,05$) (Figure 2). Ces résultats montrent que l'extrait RDA07 inhibe la diarrhée provoquée par l'huile de ricin (figure 2).

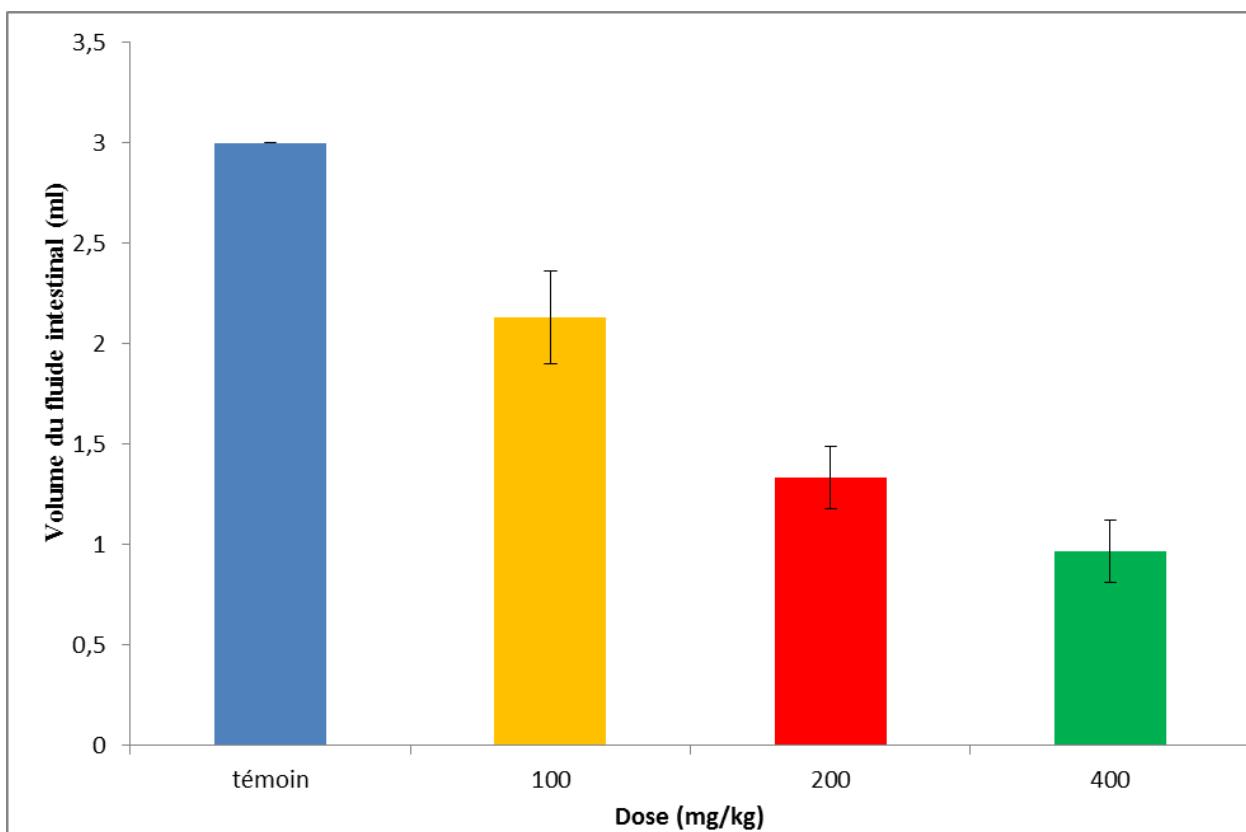


Figure 2. Variation du volume du fluide intestinal provoqué par l'huile de ricin, chez les animaux témoins (■) et traités avec l'extrait aux doses de (■) 100 ; (■) 200 et (■) 400 mg/kg, administré par voie orale ($\bar{m} \pm \sigma$; n = 3 ; P<0,05).

2. Effet de l'extrait RDA07 sur la motilité intestinale

L'injection d'Acétylcholine dans le bain contracte l'iléon isolé. L'amplitude de la contraction augmente en fonction de la concentration d'acétylcholine administrée dans le bain, et la contraction maximale est atteinte à la concentration de $10^{-3}M$. À la concentration de 0,25 mg/ml, l'extrait RDA07 relâche de 9 % la contraction provoquée par l'acétylcholine, et à 0,75 mg/ml il relâche à 100 % l'organe, avec une CE_{50} de 0,55 mg/ml (Figure 3). Ces résultats montrent que l'extrait RDA07 diminue le péristaltisme intestinal.

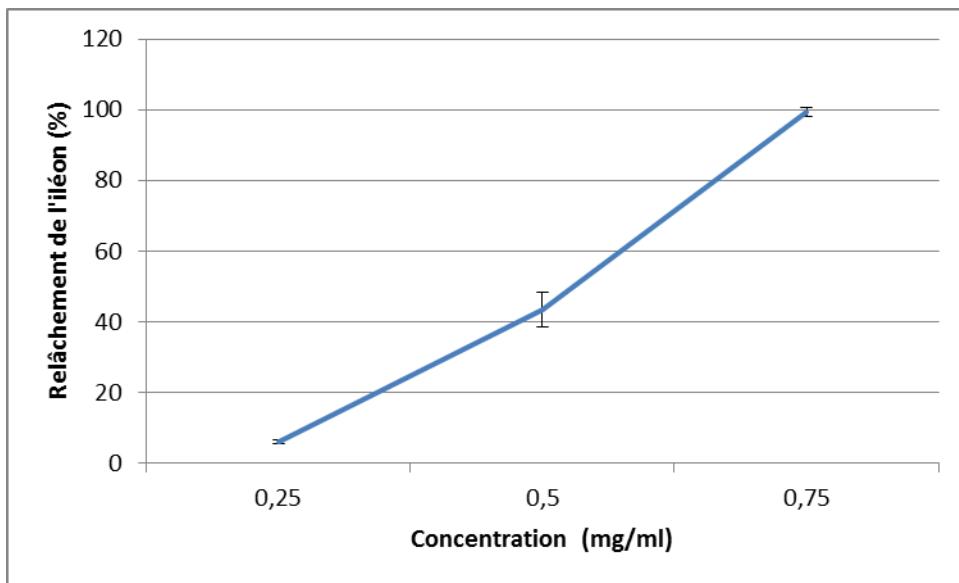


Figure 3. Variation du relâchement de l'iléon isolé, contracté avec l'Acétylcholine à $10^{-3}M$, en fonction de la concentration de l'extrait RDA07 dans le bain, injecté d'une manière cumulative ($\overline{m} \pm \sigma$; n = 3 ; P < 0,05).

3. Mécanisme d'action de l'extrait RDA07 vis-à-vis de l'acétylcholine

En absence de l'extrait, la contraction maximale provoquée par l'acétylcholine est égale à 100 % et sa CE_{50} est égale $10^{-6} M$. En incubant l'iléon avec l'extrait RDA07 à des concentrations croissantes, l'amplitude de la contraction maximale provoquée par l'acétylcholine diminue, et la CE_{50} de l'acétylcholine augmente. En présence de l'extrait aux concentrations de 0,25 ; 0,5 et 0,75 mg/ml, sa CE_{50} passe de 10^{-5} à $10^{-4} M$ (P < 0,05) (Figure 4). Cette augmentation de la valeur de la CE_{50} signifie que l'extrait RDA07 est un antagoniste non compétitif de l'acétylcholine.

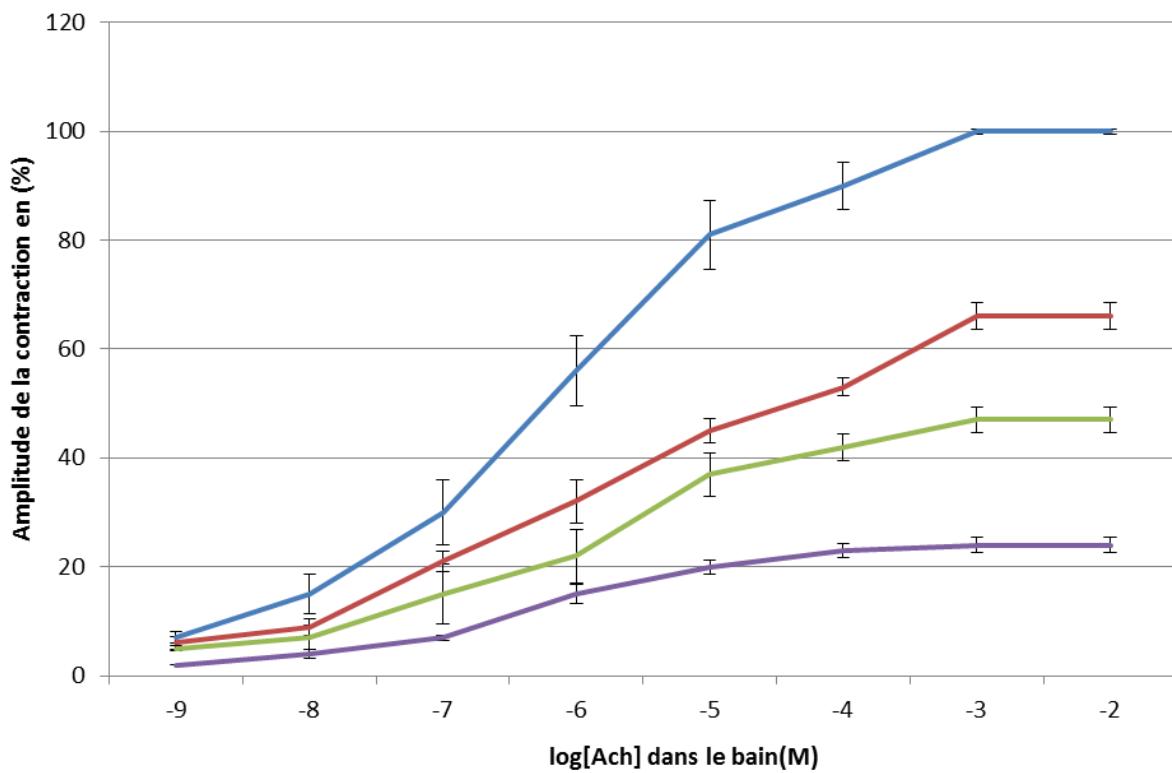


Figure 4. Variation de la contraction de l'iléon isolé du cobaye provoquée par l'acétylcholine en présence (■) et absence de l'extrait (■) 0,25; (■) 0,5 et (■) 0,75 mg /ml

($\bar{m} \pm \sigma$; n = 3 ; P<0,05).

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

L'administration de l'huile de ricin par voie orale, provoque augmentation de volume du fluide dans la lumière intestinale. La présence de l'acide ricinoléique dans cette huile irrite la muqueuse intestinale, et accélère le transit intestinal (GALVEZ *et al.*, 1993). Cette irritation de la muqueuse intestinale modifie le mécanisme de réabsorption hydro-électrolyte intestinale, en faveur de la sécrétion, à l'origine de la diarrhée sécrétoire (HELMUT *et al.*, 1972).

Les résultats de nos tests montrent que l'extrait RDA07 inhibe l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale. Pour l'expliquer, l'extrait augmenterait la réabsorption des électrolytes et de l'eau au niveau de la paroi intestinale ou diminuerait leur sécrétion. Avec sa propriété astringente, les tanins contenus dans l'extrait modifient la perméabilité de la muqueuse intestinale. Ils empêchent ainsi la sortie d'eau et d'électrolytes, ce qui réduit le volume du fluide dans la lumière intestinale des animaux traités avec l'extrait RDA07. Nos résultats sont à rapprocher avec les études effectuées sur l'extrait de *Morinda morindoides* (RUBIACEAE) dont son effet anti sécrétoire, est dû aux tanins qu'il contient (MEITE *et al.*, 2009).

Une autre famille chimique qui pourrait être à l'origine de cette activité anti diarrhéique de RDA07 est celle des flavonoïdes. En effet, les travaux de VENKATESAN et ses collaborateurs (2005) sur un extrait *Asparaguss racemosus* (ASPARAGACEAE) ont mentionné que les flavonoïdes empêchent la sécrétion intestinale provoquée par l'irritation induite par l'acide ricinoléique, en inhibant la synthèse des prostaglandines. Le criblage phytochimique effectué sur RDA07 révèle la présence de flavonoïdes. Il est envisageable que les flavonoïdes contenus dans l'extrait RDA07 inhiberaient aussi la synthèse des prostaglandines, ce qui diminue la réaction inflammatoire provoquée par l'acide ricinoléique de l'huile de ricin, l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau de la paroi intestinale.

Par ailleurs, en analysant les résultats des tests *in vitro*, l'extrait RDA07 déprime l'effet maximal provoqué par l'acétylcholine, et augmente sa CE₅₀. Cela démontre que l'extrait inhibe l'action de l'acétylcholine d'une manière non compétitive. Ce qui signifie que la molécule active de l'extrait se fixe sur des récepteurs autres que ceux des récepteurs cholinergiques. Ceci pourrait changer la conformation spatiale du récepteur de l'acétylcholine, empêchant ainsi sa liaison à ses récepteurs (RAJAMANICKA *et al.*, 2010). Cette activité peut être attribuée aux tanins ou aux

flavonoïdes qu'il renferme. Pour les tanins, ils dénaturent les protéines, ce qui entraîne un changement de la conformation des récepteurs membranaires. Dans de cas, l'acétylcholine ne peut plus se fixer sur ses récepteurs, ce qui explique le relâchement de l'iléon isolé, et la diminution de l'amplitude maximale de la contraction provoquée par l'acétylcholine en présence de l'extrait. En outre, en dénaturant les protéines membranaires, les tanins diminuent aussi l'excitabilité des fibres musculaires intestinales (KUMAR *et al.*, 2010). Cela pourrait aussi dénaturer les canaux calciques membranaires, ce qui diminue l'entrée de calcium dans le cytoplasme, et la concentration du Ca^{2+} libre cytoplasmique. Cette activité pourrait être due aux flavonoïdes. Des résultats similaires ont été rapportés sur un extrait de *Salvadora persica* (SALVADORACEAE) dont les propriétés anti-diarrhéiques sont les conséquences de l'inhibition des canaux calciques par les flavonoïdes (GARBA *et al.*, 2017). Comme l'extrait RDA07 contient des flavonoïdes, il se pourrait qu'une molécule appartenant à cette famille chimique soit la responsable de l'activité anti péristaltique.

Les résultats des tests *in vivo* et *in vitro*, démontrent que l'extrait RDA07 possède une activité antidiarrhéique. Des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer les molécules actives responsables de cette activité ainsi que de déterminer leurs mécanismes d'action.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les résultats que nous avions obtenus montrent que l'extrait RDA07 diminue la sécrétion intestinale provoquée par l'huile de ricin et la contraction intestinale provoquée par l'acétylcholine. Il est efficace contre les diarrhées sécrétoire et motrice. Les tanins ou les flavonoïdes présents dans l'extrait pourraient être les responsables de cette activité. Des études approfondies donneraient plus de détails sur les molécules responsables de cette activité ainsi que sur leur 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): 1 - 7.

ALLAIN P. (2000).

Les médicaments.

Ed. CdM (France), 50 - 54.

AMNON H.V., THOMAS P.J., PHILLIPS S. (1974).

Effects of the oleic acid and ricinoleic acid on net jejuna water and electrolyte movement.

J. Clin. Invest., **53**: 374 – 379.

ATEUFACK G., NGEULEFACK T. B., TANE P., KAMANYI A. (2010).

Spasmogenic Activity of the Aqueous and Methanol Extracts of the Stem Bark of *Anthocleista vogelii* Planch. (LOGANIACEAE).

Pharmacologyonline., **1**: 86-101.

BALAJI G., CHALAMAIAH M., RAMESH B., AMARNATH R.Y. (2012).

Antidiarrhoeal activity of ethanol and aqueous extracts of *carum copticum* seeds in experimental rats.

Asian. Pac. J. Trop. Biomed., 1151 - 1155.

BELAICHE J. (2000).

Physiopathologie des diarrhées aigües infectieuses.

Acta Endoscopica, **30** (3): 177 - 184.

BORGES E. L., MACHADO A. D., HAIBARA A. S., PETROIANU A. S. (2003).

Effects of vasoactive intestinal polypeptide microinjected into the nucleus tractus solitaires on jejuna glucose absorption in rats.

Automic. Neurosci. Basic Clin., **107**: 111 - 113.

BOUHNIK (2013).

Appareil Digestif.

Sémiologie des diarrhées et de la malabsorption **19** : 1 – 14.

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^{ème} Ed. Elsevier Masson (Paris), chap. 5: 315 - 320.

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

Diarrhées aigües infectieuses : traitement actuel et perspectives.

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

CAVALCANTE A. F., VEIGA L. J., MEDEIROS A. F. D., CLAUDINO F., AGRA M. F.,

TANIA M., MARIO G. D., RAIMUNDO B., BAGNOLIA A. (2012).

Solanum jambrense (SOLONACEAE) exhibits spasmolytic activity on guinea pig ileum.

J. Med. Plant Res., 772 - 776.

CTZARD J. P., BELLAICHE M., VIALA J., HUGOT J. P. (2007).

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

Arch. Pediatr., **14**: 169 - 174.

DJELLOULI .S (2013).

Anti-diarrhéiques.

Cours de pharmacologie de 4^{ème} année, Département de pharmacie, Université Saad Dahlab de Blida, 10-78 .

DUPEYRON C. (1997).

Les diarrhées aiguës bactériennes : causes et mécanismes.

Bio., Hôpital Albert-Chenevier, Créteil., 1-10.

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.

FERRON F. (2008).

Trouble de la motilité gastro-intestinale.

Reanimation, **17**: 454 - 461.

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

Manual for phytochemical screening.

Rev. College of Pharmacy, University of Illinois (Chicago)., 275 - 277.

GARBA A. B. H., AGARYA M., TRAORE A., OUEDRAOGO S. (2017).

Etude des effets vermicide et anti-diarrhéique du macéré aqueux des feuilles de *Salvadora persica*, L. (SALVADORACEAE).

Int. J. Biol. Chem. Sci., **11** (1): 54 - 66.

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

Antidiarrhoeic activity of Euphorbia hirta extract and isolation of an active flavonoid constituent.

Planta Medica, **59**: 333 - 336.

GREGORY J., TRIVEDI R. (2011).

Evaluation of Chronic Diarrhea.

Am. Famil. Phy., **84** (10): 1120 - 1126.

HEINZ L., KLAUS M. (2003).
Atlas de poche de pharmacologie.
Ed. Flammarion S.A (France) chap. 3 :60-80.

HELMUT V. A., PAUL J. T., SIDNEY F. P. (1972).
Effect of oleic and ricinoleic acids on net jejuna water and electrolyte moment perfusion studies in man.
J. Clin .Invest ., 53: 374 - 379.

HUIJGHEBAERT S., AWOUTERS F., TYTGAT G. N. J. (2003).
Racecadotril versus loperamide. Antidiarrheal research visited digestive deseases and sciences.
J. Pharm. Belg., 48 (2): 239 - 250.

KENNE FOPA O. (1994).
Contribution à l'étude de l'activité anti diarrhéique de la pulpe de fruit d '*Adansonia digitata* L. (BOMBACACEAE).
Thèse de doctorat en Pharmacie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop (Dakar),, 3 - 26.

KERHARO J. (1971).
Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales et toxiques de la pharmacopée sénégalaise traditionnelle.
Thèse Méd. Pharm., Dakar, 21.

KITCHEN I. (1984).
Textbook of *in vitro* Practical Pharmacology.
1st Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 5- 6.

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

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

Les conséquences de l'inaction.

Perspective de l'environnement de l'OCDE à l'horizon 2050 (Pays Bas)., **5**: 1 - 7.

MAMILAINORO L. (1996).

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

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

MEITE S., N'GUESSAN J. D., BAHI C., YAPI H. F., DJAMAN A. J., GUINA F. G. (2009).

Antidiarrheal Activity of Ethyl Acetate Extract of *Morinda morindoides* in Rat.

Trop. J. Pharm. Res., **8** (3): 201-207.

MOHAMMED A., AHMED H., GOJI A. D.T., OKPANACHI A. O., EZEKIEL I., TANKOY. (2009).

Preliminary Anti-diarrheal activity of ethanolic stem bark extract of *Indigofera pulchra* Linn. in rats.

Songklanakarin. J. Sci. Technol., **34** (3): 317 - 322.

NICOLAS J. P. (2012).

Plantes médicinales du nord de Madagascar. Ethnobotanique Antakarana et informations scientifiques.

Ed. Jardin du monde (France), Chap. 4: 13-278.

OLIVIER J.P., JACQUES, LOUIS (2008).

Pathologie de l'intestin grêle du colon.

Proctologie., *Chap.2* : 87 - 106.

OMS (1989). (2010).

Traitemet et prévention des diarrhées aiguës.

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

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

Pharmacopée de l'Alaotra.

Ed. CIDST (Antananarivo), 284 - 286.

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

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

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

RANDREMANANA R. V. (2012).

Impact de l'environnement sur les diarrhées infantiles à Madagascar: Analyse du risque *Campylobacter*.

Thèse de Doctorat, l'Université de Grenoble, 25 - 27.

SAURABH A., AMARENDRA P., PRASANTA K. (2008).

Evaluation of antimicrobial activity of some medicinal plants against enteric Bacteria with particular reference to multi-drug resistant vibrio cholera.

Trop. J. pharm. Res., 8 (3): 231 - 237.

SURAWICZ ,CHRISTINA M. (2017).

Probiotiques et diarrhée associée aux antibiotiques et infection à Clostridium difficile.

Prébio. et probio. sc., tech. 825 -843.

UNICEF (2014).

Les enfants en Afrique., 127 - 129.

VENKATESAN N., VADIVU T., SATHIYA N., AROKYA A., SUNDARAJAN R., SENGODAN G., VIJAYA K., THANDAVARAYAN R. (2005).

Antidiarrheal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals.

J. Pharm. Sci., 8: 39 - 45.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE L'EXTRAIT RDA07 SUR LA DIARRHÉE CHEZ LE COCHON D'INDE

Auteur : RAFANOMEZANTSOA Dauphin
Adresse : FVB 49 Ambaniavaratra Fenoarivo
Contact : 0325838459
E-mail : rafanomezantsoadauphin07@gmail.com
Année : 2016-2017
Rapporteur : Pr RANDRIANAVONY Patricia

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

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'activité de l'extrait RDA07 sur la diarrhée provoquée chez le cochon d'Inde. Son activité anti-sécrétoire a été étudiée *in vivo*, en utilisant la méthode d'enteropooling provoquée par l'huile de ricin et des tests *in vitro* sur l'iléon isolé de cochon d'inde contracté avec l'acétylcholine pour étudier son effet sur la motilité intestinale, ainsi que son mécanisme d'action.

Les résultats des tests *in vivo* montrent que l'extrait RDA07 diminue l'accumulation du fluide intestinal provoquée par l'huile de ricin. Le volume de fluide intestinal chez les témoins est égal à 3 ml, contre $2,1 \pm 0,2$, $1,3 \pm 0,6$ et $0,9 \pm 0,15$ ml chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg ($P < 0,05$). Les résultats des tests *in vitro* montrent que RDA07 relâche l'iléon isolé contracté avec l'acétylcholine. Il inhibe l'effet de l'acétylcholine d'une manière non compétitive. En présence de l'extrait aux concentrations de 0,25, 0,5 et 0,75 mg/ml dans le bain, l'effet maximal de l'acétylcholine diminue respectivement de 100 % à 66, 47 et 24 %, et sa CE₅₀ augmente à 10^{-6} à 10^{-5} , 2×10^{-5} et 10^{-4} M ($P < 0,05$). Ces résultats montrent que RDA07 possède une activité anti diarrhéique. Les tanins ou les flavonoïdes pourraient être responsables de cette activité.

Mots clés : anti-diarrhéique, anti-sécrétoire, motilité intestinale, huile de ricin, acétylcholine, enteropooling.

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate *in vivo* and *in vitro* antidiarrhoeal activity of RDA07 on guinea pig. *In vivo* activity was studied using castor oil induced enteropooling, and *in vitro* activity was studied on contraction induced by acetylcholine.

In vivo study shows reduction of fluid accumulation in treated animal. Fluid volume in control group is 3 ml, versus 2.1 ± 0.2 ; 1.3 ± 0.6 and 0.9 ± 0.15 ml in treated animals with RDA07 at doses 100, 200 et 400 mg/kg ($P < 0.05$). It relaxes isolated ileum contracted by acetylcholine in a non competitive manner. Maximal contraction reduces from 100% to 66 ; 47 and 24 % in the presence of the extract at 0.25 ; 0.5 and 0.75 mg/ml in the bath, and its CE₅₀ increases from 10^{-6} M to 10^{-5} ; 2×10^{-5} et 10^{-4} M ($P < 0.05$). These results show anti diarrhoeal activity of RDA07. Tannins and flavonoids might be responsible for this activity ;

Key words : anti diarrhoea, anti secretory, castor oil, enteropooling