

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	i
LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	v
I.INTRODUCTION.....	1
II.MATERIELS ET METHODES.....	04
A.PARTIE CHIMIQUE.....	04
1. Préparation de l'extrait l'extrait.....	04
2. Ciblage phytochimique.....	05
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	06
1. Les animaux utilisés	06
2. Etude de l'effet de RV33 sur la suffocation provoquée par l'histamine.....	06
3. Etude de l'activité de l'extrait sur le muscle lisse bronchique.....	07
a) Préparation de la trachée isolée.....	07
b) Montage de la trachée isolée et étude de l'activité de l'extrait.....	08
4. Mécanisme d'action de l'extrait.....	08
C. EXPRESSION ET ANALYSES DES DONNEES.....	10
III.RESULTATS.....	11
A.PARTIE CHIMIQUE.....	11
1. Rendement de l'extraction.....	11
2. Résultats du criblage phytochimique.....	11
B.PARTIE PHARMACOLOGIQUES.....	12
1. Activité de l'extrait RV33 sur la suffocation provoquée par l'histamine.....	12
2. Activité de l'extrait RV33 sur la trachée contractée par l'histamine.....	13
3. Effet de l'extrait sur l'activité contracturant de l'histamine.....	14

IV.DISCUSSION.....	15
V.CONCLUSION.....	17
BIBLIOGRAPHIE.....	18
WEBOGRAPHIE.....	23

LISTE DES FIGURES

-Figure1. Dispositif expérimental 26cm de diamètre et 24cm de hauteur utilisé pour les tests <i>in vivo</i>	07
-Figure2. Dispositif expérimental utilisé pour les tests <i>in</i>	10
-Figure 3. Variation du temps d'apparition de détresse respiratoire provoquée par l'histamine (5%) pulvérisée dans le dispositif expérimental 26cm de diamètre et 24cm de hauteur contenant les animaux témoins et traités avec l'extrait aux doses de 200 et 400 mg/kg administré par voie orale	12
-Figure 4. Pourcentage de relâchement de la trachée isolée de cobaye contractée avec l'histamine en fonction de la concentration de l'extrait RV33 injecté dans le bain de façons cumulative ($\bar{m} \pm e.s.m$; n=3 ; P<0,05).....	13
-Figure 5. Variation de la contraction de la trachée isolée de cobaye provoquée par l'histamine injectée dans le bain de façon cumulative en absence et en présence de l'extrait RV3 aux concentrations de 0,25 et de 0,5mg /ml dans le bain.....	14

LISTE DES TABLEAUX

-Tableau I. Tests effectués pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait RV33.....	05
-Tableau II. Composition de la solution de Tyrode en mM préparée dans 1 litre d'eau distillée.....	08
-Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait RV33.....	11

LISTE DES ABREVIATIONS

%	: Pourcent
<	: Inférieur à
°C	: Degré Celsius
CE₅₀	: Concentrations efficaces de l'extrait donnant 50% du relâchement maximal
CNAM	: Caisse Nationale d'Assurance Maladie
coll.	: Collaborateur
e.s.m.	: Ecart-type standard à la moyenne
Kg	: Kilogramme
LFL	: Référence de la provende
L.P.G.P.C	: Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
M	: Molaire
mg	: Milligramme
Min	: Minute
ml	: Millilitre
mM	: Millimolaire
\bar{m}	: Moyenne
Na Cl	: Chlorure de sodium
Na⁺	: Ion sodium
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
P	: Seuil de signification
R	: Rendement

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

L'asthme est une maladie respiratoire chronique multifactorielle et hétérogène touchant les voies aériennes inférieures et les bronchioles, il est dû à l'inflammation et à l'obstruction des bronches (TAYTARD A., 2013). La crise d'asthme est un événement brutal caractérisé par trois mécanismes différents : une contraction des muscles lisses autour des bronches, une bronchoconstriction, une inflammation de la paroi interne des bronches et une hypersécrétion des mucus qui bloque les bronches (POSTON R. N. et coll., 1992). Cette obstruction des bronches entraîne un essoufflement, une oppression thoracique, une respiration sifflante accompagnée d'une suffocation (MALE D. et BROSTOFF J., 2007). Il existe plusieurs facteurs déclenchant la crise d'asthme comme l'infection respiratoire provoquée par le rhume, la grippe, le stress émotionnel et agitation, l'exercice physique, les allergies provoquées par des allergènes tels que les moisissures, la poussière, les acariens, le pollen et la variation de la température de l'air (GILLES G., 2006).

L'asthme figure parmi les maladies chroniques les plus fréquentes dans le monde. D'après l'OMS en 2015, on estime que 235 millions de personnes sont asthmatiques dans le monde et près de 255000 en décèdent chaque année. En France, d'après les enquêtes réalisées par le CNAM (Caisse Nationale d'Assurance Maladie), il y a environ 4 millions de personnes asthmatiques dont 1/3 a moins de 15 ans sur 15000 cas d'hospitalisation et tous les ans 2000 meurent d'une crise d'asthme (MARTINE P., 2008).

A Madagascar, selon la dernière enquête du Ministère de Santé Publique, en 2012 cette maladie touche 8 à 12% de la population et 28% sont des enfants. L'asthme se déclare pendant l'enfance et touche presque toutes les tranches d'âge. On note une expansion rapide de cette maladie surtout dans les pays développés connaissant une forte industrialisation (SARAH B., 2005).

La crise d'asthme se manifeste par une association de plusieurs phénomènes : une bronchoconstriction, une inflammation de bronche et une hypersécrétion mucus (POSTON R. N. et coll., 1992). On distingue trois grands types d'asthme : l'asthme chronique, l'asthme allergique et l'asthme d'effort. L'asthme chronique est généralement présent depuis l'enfance, souvent inflammatoire et s'installe progressivement. Il se manifeste par une hyperactivité des bronches provoquée par des agents extérieurs. L'asthme allergique est provoqué par des allergènes comme les acariens (MICHEL F.B. et coll., 1992), les moisissures, les poils, les

levures atmosphériques, les pollens (PAUPE J. et SCHEINMANN P., 1990). Lorsque l'exposition à l'allergène est constante et de longue durée, l'asthme allergique peut évoluer en asthme chronique (BOSQUET J. et coll., 1993). Enfin, l'asthme d'effort est dû à l'obstruction bronchique survenant à l'arrêt de l'effort, les crises sont déclenchées essentiellement par des irritants comme les changements brusque de la température, la pollution atmosphérique, la fumée de tabac et les odeurs fortes (ISABELLE P., 2004). Il se présente sous deux formes : l'asthme à dyspnée continue et l'asthme aigu grave (CHAUHAN N. et coll., 2012). En générale ce type d'asthme est associé à l'asthme chronique (SANDBERG S. et coll., 2004).

Le traitement de l'asthme se divise en deux : le traitement de crise et le traitement de fond (ISABELLE P., 2004). Le traitement de crise consiste à éviter tout ce qui déclenche les crises, c'est-à-dire tous les facteurs déclenchant la contraction des muscles lisses bronchiques (JULET M. et coll., 2009). Les bronchodilatateurs comme le terbutaline (Bricanyl®) et le formotérol (Foradil®) améliorent la respiration en dilatant les bronches (MICHEL F.B. et coll., 1992). Il existe des bronchodilatateurs de courte et de longue durée d'action. Ceux de courte durée d'action agissent entre trois et quatre heures, le traitement de première intention comme le bêta-2 mimétique qui est utilisé en cas de crise comme le salbutamol (Ventoline®) (SOPHIE F. et DUBOIS J.P., 2010). Les agonistes adrénergiques, les xanthines (xanthium®) et les anticholinergiques (Atrovent®) sont des médicaments de courte durée, ils relâchent les bronches (BOUDIN A. et coll., 2006 ; TAYTARD A., 2013).

Tandis que ceux de longue durée d'action agissent pendant six à huit heures (LE QUELLEC A., 2007). Ainsi, les corticoïdes en inhalation (Fluticasone®) sont utilisés par intraveineuse ou *per os*. La corticothérapie peut être associée ou non à des anti-leucotriènes comme le Zafirlukast® ou au bêta-2 mimétique de longue durée d'action, ce sont des médicaments prescrit pour le traitement de fond de l'asthme (MATHIEU M. et MICHEL M., 2009). D'autres classes des médicaments sont disponibles sur le marché pour traiter les symptômes d'asthme selon leur mode d'action comme lathéophylline, les antileucotriènes, les corticoïdes oraux et les anti IgE

Il existe des médicaments qui peuvent traiter l'asthme allergique de persistance sévère. Les antihistaminiques seuls ne sont pas très efficaces contre l'asthme mais présentent un intérêt pour traiter les manifestations allergiques associées (ISABELLE P., 2004). En général, le traitement de fond de l'asthme est basé sur les corticoïdes (BAUDOIN J., 2011).

A Madagascar les plantes médicinales sont utilisées pour traiter les maladies qui touchent le système respiratoire comme l'asthme, la bronchite, la toux, la coqueluche et l'hémoptysie. L'utilisation de ces plantes s'appuie sur les connaissances empiriques des tradipraticiens. Par exemple : *Euphorbia stenoclada* Baill (Samanta) (PIPERACAEA) est une espèce endémique de Madagascar utilisée en infusion pour traiter l'asthme (LIN C.C. et coll., 2002), *Ligodium lanceolatum* (Karakaratoloha) (SHIZEACAEA) pour son activité bronchodilatatrice (RAMANITRASIMBOLA D. et coll., 2005), *Viola abyssinica* (Anapoza) (VIOLACAEA) est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les bronchites aiguës (CHAADI M. et coll., 2007), *Phymathode scolopendria* (Tsiampangapanga) (POLYPODIACEAE) pour ses activités antispasmodiques (RAMANITRASIMBOLA D. et coll., 2005). De même, en France *Zingiber officinale* (ZINGIBERACEAE) est utilisée pour traiter la crise d'asthme, vue ses propriétés antiallergique et anti-inflammatoire (MULLER J. N., 2009). En Côte d'Ivoire *Combretum molle* (COMBRETACEAE) est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter la toux et l'asthme (YOE D. et coll., 2008).

Selon l'OMS en 2015, 70% de la population Malgache ont recours à la médecine traditionnelle, en particulier les plantes médicinales. Malgré tout, l'utilisation des plantes reste dans le domaine de la médecine traditionnelle, un effort important de recherches ethnopharmacologiques doit être fourni pour valoriser cette médecine. C'est dans ce sens que nous avons choisi une plante dont le décocté de ses feuilles est utilisé pour soulager les crises de suffocation, considérées comme crises d'asthme. Nous pensons que cette plante pourrait avoir une activité bronchodilatatrice. Pour vérifier cette hypothèse, des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués chez le cobaye.

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

II. MATERIELS ET METHODES

Afin d'étudier l'activité de cette plante, une extraction hydroalcoolique a été effectuée et l'extrait ainsi obtenu a été testé *in vivo* chez le cobaye contre la suffocation provoquée par l'histamine et des tests *in vitro* ont été utilisés pour étudier son mécanisme d'action.

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Les feuilles de la plante à étudier ont été récoltées à Tsiroanomandidy au mois de Novembre 2015. Deux cent cinquante grammes ont été séchées à l'abri de la lumière solaire et de l'humidité, dans une salle aérée à la température ambiante pendant 2 mois. Une fois séchées, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau au Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC) à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. La poudre obtenue a été macérée dans un mélange éthanol-eau (60 :40) pendant 72h à la température ambiante. Le macérât a ensuite été filtré sur du coton hydrophile, puis le filtrat a été évaporé à l'aide d'un distillateur à la température de 85°C. L'extrait ainsi obtenu a été codé RV33, puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction selon la formule :

$$R(\%) = \frac{\text{massedel'extrait}}{\text{massedelapoudremacérée}} \times 100$$

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).

Tableau 1 : Tests effectués pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait RV33 (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	Persistance d'une mousse (3cm d'épaisseur) après 30mn

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

L'activité de l'extrait RV33 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),

1. Les animaux utilisés

Des cobayes tricolores sans distinction de sexe pesant de 240g à 320g âgées de 3 mois ont été utilisés. Ils ont été acclimatés à l'animalerie du LPGPC pendant 1 semaine avant les manipulations. Ils ont été élevés dans les conditions de l'animalerie, avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12/12h et à la température de 25°C environ. Ils ont été nourris avec des feuilles fraîches de graminées, et ont été mis à jeun 12h avant chaque manipulation

2. Etude de l'effet de RV33 sur la suffocation provoquée par l'histamine

L'activité de l'extrait RV33 a été étudiée *in vivo* sur la détresse respiratoire provoquée par l'histamine (PERRY W.F. et BOYD E.M., 1941). Pour réaliser ce test, les animaux ont été préalablement sélectionnés et seuls les animaux sensibles à l'histamine ont été utilisés.

Les animaux sélectionnés ont été mis à jeun pendant 12h avant la manipulation puis répartis en 3 lots dont 1 lot témoin et 2 lots traités avec l'extrait à différentes doses (TROMBETTA D. et coll., 2005). Les animaux du lot témoin ont reçu 10 ml/kg d'eau distillée par voie orale. Tandis que les animaux des 2 lots ont reçu l'extrait RV33 aux doses respectives de 200 et 400mg/kg par voie orale dans un volume de 10 ml/kg (BRUNELLESCHI S. et coll., 2001).

Une heure après l'administration de l'eau distillée et de l'extrait, un représentant de chaque lot ont été placés dans un dispositif expérimental de 26cm de diamètre et de 24cm de hauteur muni d'un couvercle, puis une solution d'histamine à 5% a été pulvérisée dans l'enceinte. Les animaux qui ont présenté une détresse respiratoire en moins de 3 minutes ont été retenus et sélectionnés pour le test biologique (Figure 1) (KILADJIAN J.J., 2011). Le temps d'apparition de la détresse respiratoire ainsi que la durée de cette détresse respiratoire ont été chronométrés.



Figure 1. Dispositif expérimental de 26cm de diamètre et 24cm de hauteur utilisée pour les tests *in vivo*.

3. Etude de l'activité de l'extrait sur le muscle lisse bronchique

Pour étudier l'activité de l'extrait sur le muscle lisse bronchique, la trachée a été isolée et contractée avec de l'histamine. L'extrait a été injecté dans le bain contenant la trachée isolée (KO W.C. et coll., 2002).

a. Préparation de la trachée isolée

Le cobaye a été assommée avec un coup sec sur la nuque, puis exsanguiné en coupant les carotides, ensuite une thoracotomie a été effectuée, puis la trachée a été prélevée et placée dans une solution de Tyrode (Tableau II) aérée avec de l'air à l'aide d'un aérateur électrique.

Tableau II. Composition de la solution de Tyrode en mM préparée dans 1 litre d'eau distillée

Ingrédients	NaCl	MgCl ₂	KCl	CaCl ₂	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄	glucose
Concentration (mM)	136,7	1	2,7	1,8	11,9	0,4	5,6

b. Montage de la trachée isolée et étude de l'activité de l'extrait

L'organe a été ensuite nettoyé, puis découpé en spirale, et monté dans une cuve à organe isolé contenant 20ml de solution de Tyrode aérée à l'aide d'un aérateur et maintenue à la température de 37°C. Ensuite, une de ses extrémités a été fixée au fond de la cuve à l'aide d'un fil de coton, tandis que l'autre extrémité a été reliée à un stylet de l'enregistreur avec un contre poids de 1,5g. L'organe a été laissé s'équilibrer pendant 45 minutes pendant lesquelles le bain a été renouvelé toutes les 15 minutes. Puis la viabilité de l'organe a été testé et il a été sensibilisé en injectant l'Histamine 10^{-7} M dans le bain. Après la contraction, l'organe a été rincé puis laissé de nouveau se stabiliser pendant 45 minutes. Pendant cette période, l'organe a été rincé toutes les 15 minutes. Après cette phase de stabilisation, l'histamine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative pour obtenir des concentrations croissantes à partir de 10^{-10} M jusqu'à la contraction maximale. Puis, l'extrait a été injecté dans le bain d'une manière cumulative jusqu'au relâchement total de la trachée (VAN ROSSUN J.M., 1963 ; COLOT M., 1972). La contraction de la trachée a été enregistrée, son amplitude a été mesurée, puis exprimée en % par rapport à la contraction maximale provoquée par l'histamine seule qui a été considérée comme 100% de contraction.

3. Mécanisme d'action de l'extrait RV33

L'objectif de ce test a été d'étudier le mécanisme d'action de l'extrait RV33 sur la contraction de la trachée contractée par l'histamine. La trachée a été pré incubée dans un bain contenant l'extrait à différentes concentrations dans le bain avant de la contracter avec l'histamine.

Après avoir monté la trachée isolée de cobaye dans la cuve, elle a été laissée se stabiliser pendant 45 minutes, puis sensibilisée avec l'histamine à 10^{-7} M dans le bain. Elle a été laissée se stabiliser de nouveau pendant 45 minutes. Durant cette période, la solution de Tyrode a été renouvelée 3 fois. Puis, l'Histamine a été injectée dans le bain de manière cumulative pour

réaliser des concentrations croissantes à partir de la concentration 10^{-10} M dans le Tyrode jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de la trachée. Ensuite, la préparation a été rincée, puis l'organe a été laissé se stabiliser de nouveau pendant 45 minutes en renouvelant 3 fois la solution de survie.

Après, la trachée a été laissée en contact avec l'extrait pendant 15 minutes. Après ce temps d'incubation, l'histamine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de la trachée.

Au plateau de la contraction, la préparation a été rincée, puis laissée se stabiliser pendant 45 minutes. Pendant cette période, la solution de survie a été renouvelée 3 fois. L'extrait a ensuite été injecté dans la cuve à la concentration finale dans le bain de 0,25 et 0,5 mg/ml. Et après 15 minutes de contact avec l'extrait, l'Histamine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de la trachée.

L'amplitude des contractions a été mesurée en absence et en présence de l'extrait. La CE_{50} de l'histamine en absence et en présence de l'extrait RV33 a été déterminée graphiquement. Pour étudier le mécanisme d'action de l'extrait, l'amplitude des contractions maximales ainsi que les CE_{50} ont été comparées entre elles.

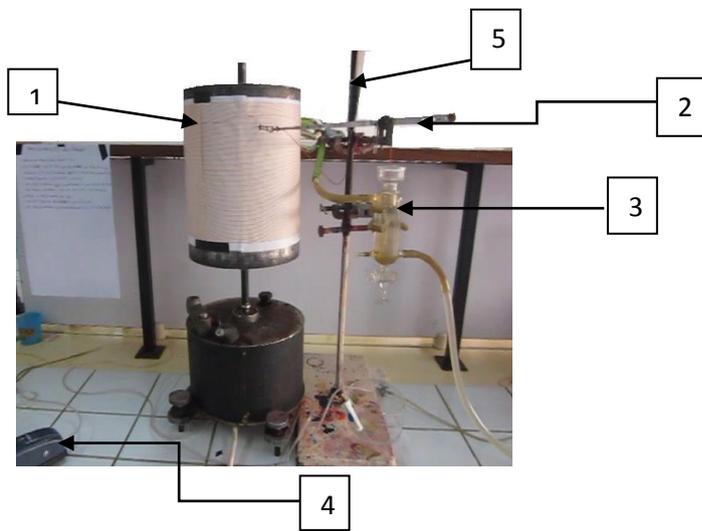


Figure 2. Dispositif expérimental utilisé pour les tests *in vitro*.

- 1 - Tambour avec du papier millimétré
- 2 - Stylet relié à l'organe isolé par un fil
- 3 - Cuve à organe isolé 200ml
- 4 - Aérateur
- 5 - Réservoir d'encre

RÉSULTATS

III. RESULTATS

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Rendement de l'extraction

La macération de 250g de poudre de feuilles donne 25,06g d'extrait sec, ce qui correspond à un rendement de 10,02 %

2. Résultats du criblage phytochimique

Les différents tests phytochimiques effectués sur l'extrait permettent d'identifier les familles chimiques comme : les alcaloïdes ; les tanins ; les stéroïdes et terpènes qui sont présentes en forte teneur. Ils révèlent aussi la présence de composés phénoliques, de flavonoïdes, de saponines et de sucres réducteurs en teneur moyenne, enfin les polysaccharides sont présents en faible teneur (Tableau III).

Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait RV33

FAMILLES CHIMIQUES	TENEUR
Alcaloïdes	+++
Tanins	+++
Stéroïdes et Terpènes	+++
Composés phénoliques	++
Flavonoïdes	++
Saponines	++
Sucres réducteurs	++
Polysaccharides	+

+++ : Présence à forte teneur

++ : Présence à moyenne teneur

+ : Présence à faible teneur

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

1. Activité de l'extrait RV33 sur la suffocation provoquée par l'histamine

L'inhalation de l'histamine provoque une détresse respiratoire caractérisée par une suffocation des animaux. Chez les cobayes traités avec l'extrait RV33, l'apparition de la détresse respiratoire est retardée en fonction de la dose administrée. Les animaux du lot présentent une détresse respiratoire à partir de $167 \pm 11,2$ secondes contre $256 \pm 9,6$ et $288 \pm 7,54$ secondes chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 200 et 400 mg/kg ($P < 0,05$) (Figure 3).

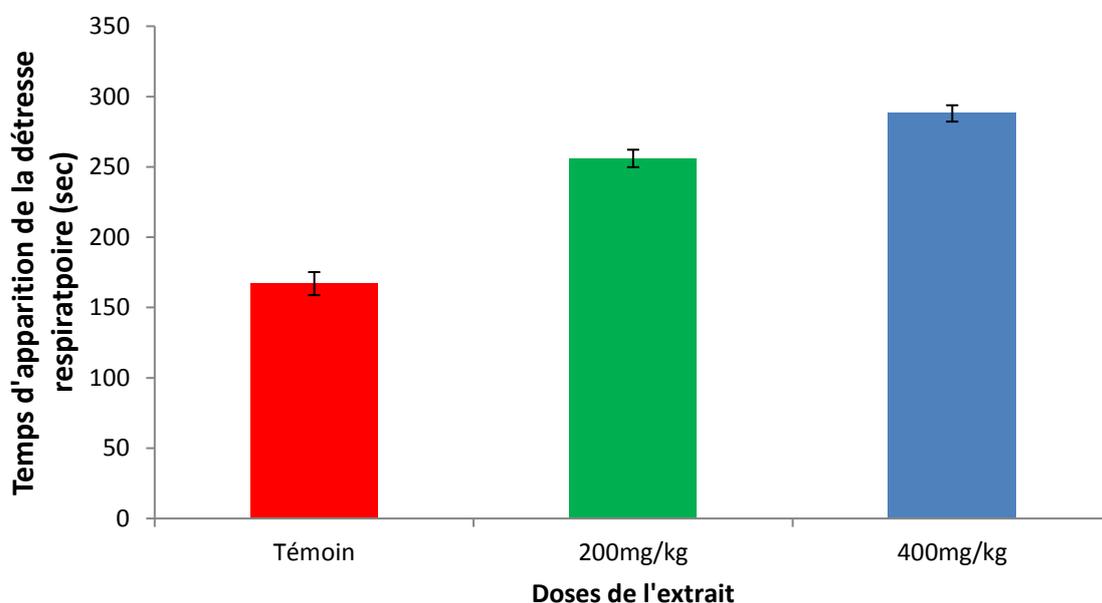


Figure 3. Variation du temps d'apparition de la détresse respiratoire provoquée par l'histamine (5%) pulvérisée dans la dispositif expérimental 26 cm de diamètre et 24 cm de hauteur contenant les animaux témoins (■) et traités avec l'extrait RV33 aux doses de 200 (■) et 400mg/kg (■) administré par voie orale ($\bar{m} \pm e.s.m$; $n = 3$; $P < 0,05$).

2. Activité de l'extrait RAV33 sur la trachée contractée par l'histamine

En présence de l'histamine à la concentration de $10^{-7}M$ dans le bain, la contraction de la trachée atteint sa valeur maximale 100 %. En présence de l'extrait RV33 dans le bain, la trachée se relâche avec une valeur de la CE_{50} égale à 0,35mg/ml (Figure 4).

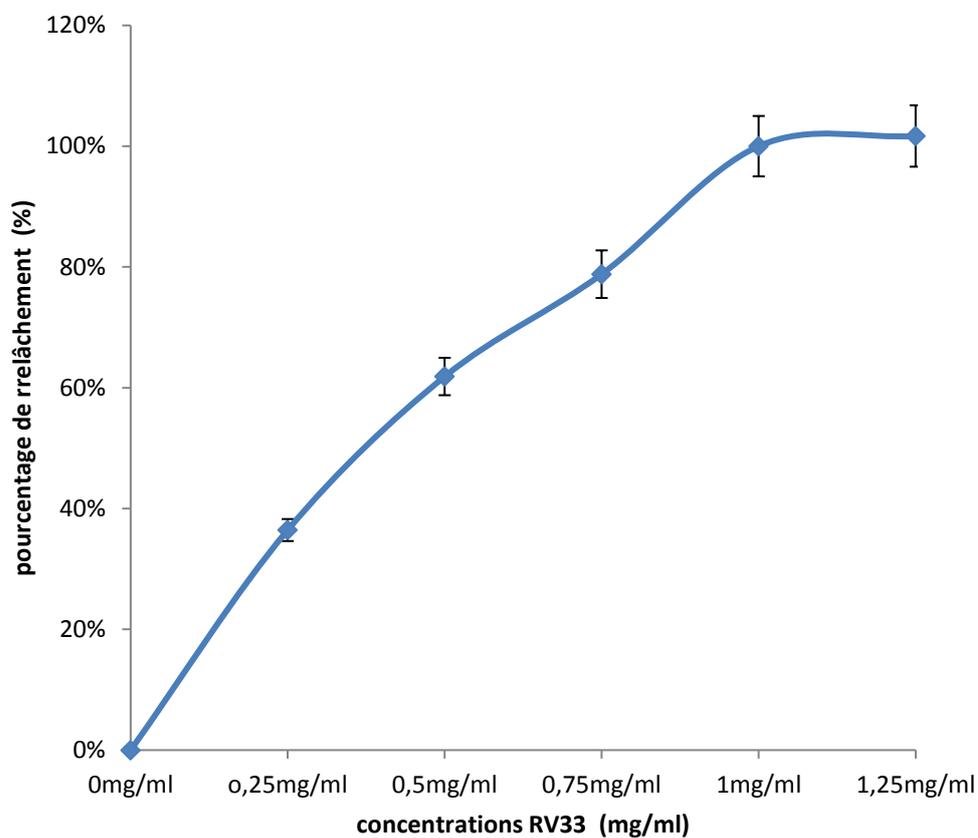


Figure 4. Pourcentage de relâchement de la trachée isolée de cobaye contractée avec l'histamine en fonction de la concentration de l'extrait RV33 injecté dans le bain de façon cumulative ($\bar{m} \pm e.s.m$; $n = 3$; $P < 0,05$).

3. Effet de l'extrait sur l'activité contracturante de l'histamine

Après avoir injecté l'histamine dans le bain, la trachée se contracte, et l'amplitude de la contraction augmente en fonction de la concentration. A la concentration 10^{-7} M, la contraction est maximale égale à 100%. En pré incubant la trachée dans le bain contenant l'extrait RV33, l'effet maximal de l'histamine diminue et sa CE_{50} augmente. La détermination graphique du CE_{50} donne $3,9 \cdot 10^{-10}$ M.

En présence de 0,25 et 0,50 mg/ml d'extrait dans le bain, l'effet maximal diminue respectivement à 73% et 47% avec des CE_{50} correspondant à $2,7 \cdot 10^{-10}$ M et $1,3 \cdot 10^{-8}$ M ($P < 0,05$) (Figure 5).

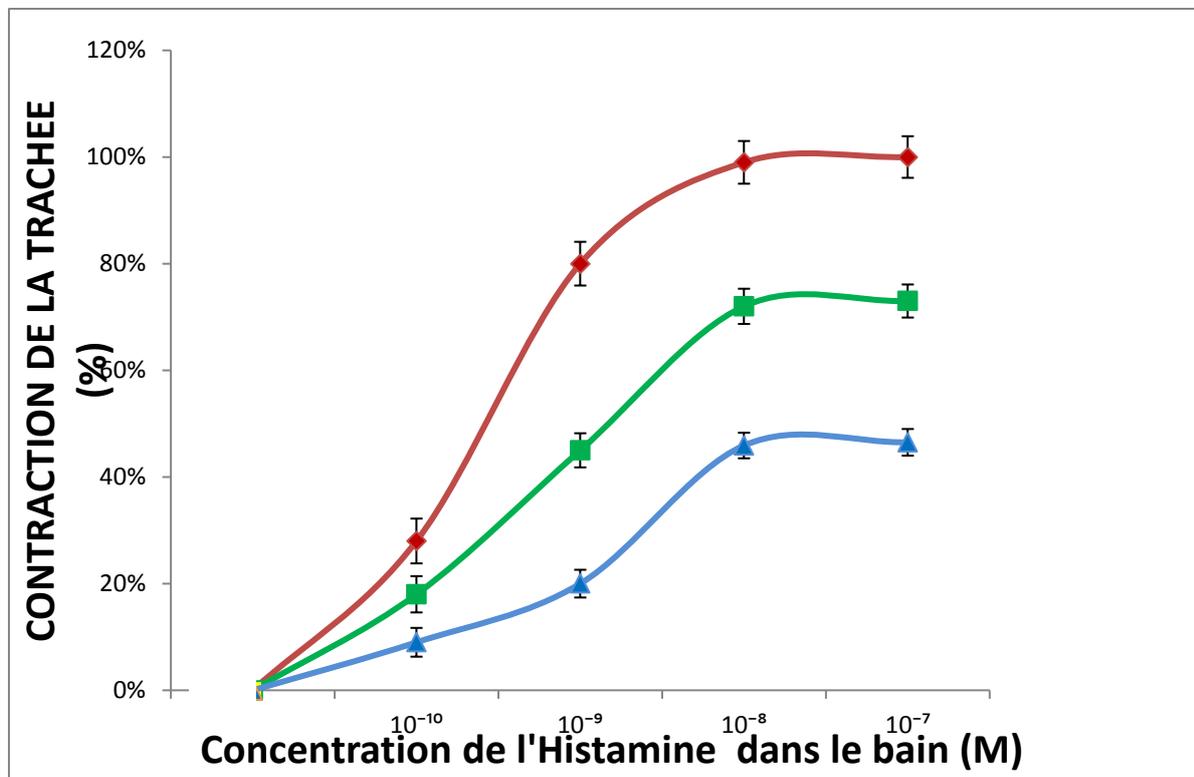


Figure 5. Variation de la contraction de la trachée isolée de cobaye provoquée par l'histamine injectée dans le bain de façon cumulative en absence (■) et en présence de l'extrait RV33 aux concentrations de 0,25 (■) et de (■) 0,5 mg /ml dans le bain ($\bar{m} \pm e.s.m$; $n = 3$; $P < 0,05$).

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

Lors de ce travail, l'activité de l'extrait RV33 a été étudiée 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, elle a été utilisée dans les tests de suffocation durant les tests *in vivo* (WHITE M. V., 1990). Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'extrait RV33 administré par voie orale retarde l'apparition de la détresse respiratoire. Les animaux ayant résisté à la suffocation après exposition à l'histamine sont considérés comme étant protégés (POSTON R. N. et coll., 1992). Cet effet dépend de la dose administrée. C'est comme le cas de l'extrait de *capparis spinosa* (TROMBOTTA D. et coll., 2005). Ceci nous permet de dire que les animaux traités avec l'extrait RV33 sont protégés contre la suffocation provoquée par l'histamine.

Des tests *in vitro* ont été effectués avec la trachée isolée de cobaye pour étudier le mécanisme d'action de l'extrait RV33. D'après nos résultats, la contraction maximale provoquée par l'histamine diminue et sa CE₅₀ augmente c'est-à-dire que l'extrait inhibe l'histamine comme étant un antagoniste non compétitif. Compte tenu de mécanisme d'action de l'extrait RV33, deux cas peuvent se présenter : soit le principe actif occupe un récepteur autre que celui de l'histamine, et diminue l'affinité de l'histamine avec son récepteur (BOUDIN A. et coll., 2006 ; TAYTARD A., 2013), soit il posséderait une activité bronchodilatatrice propre qui s'oppose à l'effet bronchoconstricteur de l'histamine (VALNET J., 1992). En se fixant au niveau des récepteurs β -adrénergiques par exemple, il relâcherait le muscle lisse bronchique (CORRIGAN C. J. et KAY B., 1990). Cette propriété se retrouve dans le cas d'*Ephedra sinica* qui possède un effet bronchodilatateur propre avec l'*Ephédrine* qui stimule le système nerveux sympathique (MULLER J. N., 2009). Il existe aussi des alcaloïdes comme la théophylline, qui agissent comme bronchodilatateurs en inhibant l'enzyme phosphodiesterase (MULLER J. N., 2009).

En plus, de la bronchoconstriction provoquée par l'histamine, le mucus rétrécit le diamètre des bronches et les bronchioles, aggrave la dyspnée respiratoire et provoque une obstruction des bronches qui est à l'origine de la mortalité au cours de la crise (COLOT M., 1972).

D'après la littérature, les flavonoïdes pourraient réduire la sécrétion de mucus bronchiques, comme c'est le cas de l'extrait de *Zingiber officinalis* qui inhibent la sécrétion de mucus (STEPHAN., 2002). Parmi les flavonoïdes, la Quercetine possède des activités anti-inflammatoires (MEUNIER L. et coll., 2005). La présence de ces familles chimiques peut 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

Il est nécessaire de déterminer la famille chimique et isoler les molécules responsables de la propriété antiasthmatique de l'extrait RV33 pour étudier son mécanisme d'action .

CONCLUSION

V. CONCLUSION

Cette étude nous a montré que l'extrait protège les animaux contre la détresse une activité bronchodilatatrice et antagonise l'histamine d'une manière non compétitive. L'extrait RV33 pourrait être utilisé en cas de crise d'asthme d'origine allergique. Ceci justifie que l'extrait RV33 possède une activité antiasthmatic. Pour continuer l'étude de son mécanisme d'action, d'autres expériences s'avèrent indispensables en isolant les principes actifs contenus dans la plante

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

BRUNELLESCHI S., HAZEKAMP A., BRINX C., BENVENISTE J. (2001).

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.

BOSQUET J., GODARD P., MICHEL F.B. (1993).

Antihistamine in the treatment of asthma.

J.Eur. Res., **5**: 42-137.

BAUDOIN Jocelyne. (2011).

Les remèdes naturels en complément d'ordonnances allopathiques dans les pathologies ORL et broncho-pulmonaires.

Ed. Ellipses, Collection internat, (Paris),**7** : 10-17.

BEKRO Y.A., N'GUESSAN K., ILBOUDO S.(2009).

Etude ethnobotaniqueet screening phitochimique de *Caesalpinibenthamiana*.

Art.Sci.Nat., **4**(2): 220-221.

BOUDIN A., CHANEZ P., GODARD P. (2006).

Asthme de l'enfant et de l'adulte.

DESC Allergologie., **7** : 10 – 17.

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.

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

Antiasthmatic effect of roots of *clitoreaaternatea*.

L.Int.J. Pharm. Sci.Res.,**3**(4):1076-1077.

COLOT M. (1972).

Notions techniques de pharmacologie générale.

Ed. Masson αCie, (Paris), 104-106.

CORRIGAN C.J., KAY B. (1990).

CD4 T-Lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status.

Rev.Res. Dis., 141: 970-7.

FONG H.H., TINWAN S., FARNSWORTH N.R. (1977).

Phytochemical screening.

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

GILLES G. (2006).

Hyperéosinophilies d'origine allergique.

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

GODARD P., DEMOLY P., BOSQUET T. (2000).

Asthmologie.

2^{ème} Ed. Masson, (Paris), 15-102.

ISABELLE P. (2004)., SOPHIE F., DUBOIS J.P. (2010)., SEYER J. (2012).

Asthme du nourrisson et de l'enfant.

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

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

Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology.

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

KILADJIAN J.J. (2011).

Pharmacologie de l'Histamine.

Ed. Scientifique et médicales, Elsevier, PCEM2, Saint-Louis, (Paris), 259-277.

KO W. C., LIN CH., TZENG SH., CHEN C.D. (2002).

Relaxant effects of Quercetine methyl ether derivatives in isolated guinea pig and their

Structure-activity relationships.

Planta Medica., **68**: 30-35.

LE QUELLEC A. (2007).

SEMEIOLOGIE RESPIRATOIRE ; Module intégré.

Cardiologie vasculaire et pneumologie - Séméiologie de l'appareil I.

1èreEd. Masson, (Paris), 126-134.

LIN C.C., YSOG H., CBESG C.C . (2002).

Antioxydant and Antiviral activity of *Ephorbiadentifolia*.

J. Biol. Med. Sci., (2): 656-664.

MARTINE Perez. (2008).

Asthme chronique mal soigné en France.

Ed. Ellipses, Collection internat, (Paris), 216-223.

MALE D., BROSTOFF J. (2007).

Les antihistaminiques H1.

Module de Pharmacologie clinique DCEM3 Collection campus Faculté de Médecine de Strasbourg, 7ème édition.

Allergies cutané-muqueuses chez l'enfant et l'adulte, 27-32.

MATHIEU M., MICHEL M. (2009).

Rôle du pharmacien dans la prise en charge du patient asthmatique.

Fiche technique : ces pharm+éducation et prévention pour la santé.

Ed. Masson,(Paris), 61-68.

MICHEL F.B., VERCAUTEREN J., VIGOR C. (1992).

Vivre avec son asthme.

Ed. Rocher, (Paris), 346-352.

MONASSIER L. (2001).

Thérapeutique Dermatologique : Antihistaminiques.

Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie clinique DCEM3 2005/2006.

Chapitre 10, Item 114 : Allergies chez l'enfant et l'adulte, 78-112.

PAUPE J., SCHEINMANN P. (1990).

Prise en charge de l'asthme de l'enfant.

Le point d'un consensus.

Rev. Franc. Allergol., 2:113-128.

PERRY W. F., BOYD E.M.(1941).

The histamine-cytokine network in allergic.

J. Pharmacol. Exp. Ther.,**1**(2): 65-73.

POSTON R.N., CHANEZ P., LACOSTE J.Y., LITCHFIELD T., LEE T.H. (1992).

Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi.*Am.*

Rev.Res. Dis., **145**: 20-24

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

Bronchodilatator activity of *Phymatodescolependria*(brun) Ching and its bioactive
constituent.

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

SANDBERG S., JARVENPAA S., PATON Y.J., McCANN D.C. (2004).

Asthma exacerbations in children immediately following stressful life events.

Thorax, **59**: 1046-1051.

SARAH B. (2005).

The Asthma Plague.

Ed. Guardian,(Strasbourg), 10-15.

SOPHIE F., DUBOIS J.P. (2010).

L'asthme.

Ed. Université Claude Bernard, (Lyon), 1-6.

STEPHAN. (2002).

Les antimuscariniques.

Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale.

Les Antagonistes Muscariniques: L'atropine., 125-216.

TROMBETTA D., OCCHIUT F.PERRI D. (2005).

Anti-allergic and antihistaminique.

Phytother. Res., **19**(1): 29-33.

TAYTARD A. (2013).

Asthme, Allergie et sport.

Rev. Res. Dis., **24**: 206-208.

VALNET J. (1992).

PreethiKC, KuttanR. Wound healing activity of flower extract of *Calendula officinalis*.

J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol., **2**(1):73-9.

VAN ROSSUN 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).

Histamine in allergic diseases.

J. Allergy Clin. Immunol., **86**: 599-605.

YOE D., ESSAN 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** : 384-351.

WEBOGRAPHIE

PIERRICK H., (2009).

Traitement des allergies.

Santé-médecine commentcamarche.net.

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=OahUKEwiMnGS8tDQAhWRyRoKHaXNBsoQFggdMAA&url=http%3A%2Fwww.hippocratus.com%2Fmetasite%2Fweb%2Fsite%2F1%2Fcontenu%2Fpublic%2Fpdf%2Fmemoires%2Foctobre2011%2Fmemoire2mullerasthme.pdf&usg=AFQjCNHJ6KKdWZRYumja-c9KIILmz6rqg&bvm=bv.139782543,d.d2s&cad=rja> consulté le 02 /02 /17

« ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-ASTHMATIQUE DE L'EXTRAIT RV33 CHEZ LE COBAYE »

Auteur : RAMBOLAMANANA
Ravoniaina Malala Justine
Adresse : Lot II H 2BVRS Nanisana
Contact : 0347030596 / 0328790202
E-mail : ravo.rambolamanana@yahoo.com
Année : 2015-2016
Rapporteur : Pr. RANDIMBIVOLOLONA
Fanantenanirainy

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 RV33 sur la détresse respiratoire provoquée par l'histamine a été étudié chez le cobaye, tandis que son effet sur la trachée isolée de cobaye a été étudié *in vitro*.

L'extrait RV33 retarde l'apparition de la détresse respiratoire provoquée par l'histamine chez le cobaye. Les animaux du lot témoins présentent une difficulté respiratoire durant $167 \pm 3,9$ secondes contre $256 \pm 2,7$ et $288 \pm 1,3$ secondes respectivement chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 200 et 400mg/Kg ($P < 0,05$). Il relâche la trachée isolée de cobaye contractée par l'Histamine avec une CE_{50} égale à 0,35mg/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 73% et 47%, avec une CE_{50} qui augmente. En absence de l'extrait RV33 la CE_{50} de l'histamine est égal à $1,3 \cdot 10^{-10}M$, et passe à $2,7 \cdot 10^{-10}M$ et $3,9 \cdot 10^{-9}M$ 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 antiasthmatique en agissant contre l'histamine. Cette activité pourrait être due aux alcaloïdes ou aux flavonoïdes.

Mots clés : Asthme- histamine - alcaloïdes - flavonoïdes - Cobaye.

ABSTRACT

The objective of the work was to study the extract 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. Results of the *in vivo* tests show a delay in the time of the appearance of respiratory distress in animals treated with extract RV33 at doses 200 and 400 mg/kg to $167 \pm 3,9$ sec and $256 \pm 2;7$ sec, respectively, versus $288 \pm 1,3$ sec observed in the control animals ($P < 0,05$). The *in vitro* tests results indicate the extract RV33 relaxes completely the isolated trachea constricted by histamine with an EC_{50} equal 0,35 mg/ml. Pre-incubating the isolated trachea in a bath containing the extract RV33 at concentrations 0.25 and 0.5mg/ml ($P < 0,05$). Reduces the maximal effect of histamine from 100% with $EC_{50} = 1,3 \cdot 10^{-10}M$ in the absence of the extract, to 73 % with $2,7 \cdot 10^{-10}M$ and 47 % with $3,9 \cdot 10^{-9}M$ respectively ($P < 0,05$). These results show that the extract has an anti-asthmatic activity. The presence of alkaloids in the extract could be responsible for this activity

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