

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. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	5
A. PARTIE CHIMIQUE.....	5
1. Préparation de l'extrait	5
2. Criblage phytochimique.....	7
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	9
1. Préparation de la crème de base.....	9
2. Préparation de la crème contenant 10 % d'extrait AHD-23.....	10
3. Animaux d'expérimentation.....	10
4. Création des plaies	10
5. Étude de l'activité de l'extrait AHD - 23 sur les différentes phases de la cicatrisation	11
a. Étude l'effet de l'extrait AHD - 23 sur l'hémostase.....	11
b. Étude de l'effet de l'extrait AHD - 23 sur la phase inflammatoire.....	11
c. Étude de l'effet de l'extrait AHD - 23 sur la phase de bourgeonnement.....	11
d. Étude de l'effet de l'extrait AHD -23 sur la phase d'épithélialisation.....	11
e. Étude de l'effet de l'extrait AHD - 23 sur la fermeture des plaies.....	12
C. EXPRESSION ET ANALYSE DES RÉSULTATS.....	12
III. RÉSULTATS.....	13
A. Partie chimique.....	13
1. Rendement de l'extraction.....	13
2. Résultats du criblage phytochimique.....	13
B. Partie pharmacologique.....	14
1. Effet de l'extrait AHD-23 sur l'hémostase.....	14

2. Effet de l'extrait AHD-23 sur l'inflammation.....	14
3. Effet de l'extrait AHD-23 sur le bourgeonnement	15
4. Effet de l'extrait AHD-23 sur l'épithélialisation	16
5. Effet de l'extrait AHD-23 sur la fermeture des plaies	17
IV. DISCUSSION.....	20
CONCLUSION.....	22
BIBLIOGRAPHIE.....	23

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Photographie de distillateur utilisé pour évaporer le filtrat (Photo prise dans le laboratoire de chimie LPGPC).....	5
Figure 2. Préparation de l'extrait AHD-23.....	6
Figure 3. État des plaies, après 3 jours de traitement, présence de rougeur, d'œdème et d'exsudat chez le lot traité avec la crème contenant 10 % d'extrait AHD-23 (a) et plaies humides présentant des signes inflammatoires avec une quantité importante d'exsudat chez le lot témoin (b).....	15
Figure 4. État des plaies, après 4 jours d'application de la crème, avec apparition de bourgeons chez le lot traité avec la crème contenant 10 % d'extrait AHD-23 (a) et plaies en phase inflammatoire avec persistance de rougeur et d'exsudat chez le lot témoin ayant reçu la crème de base (b).....	16
Figure 5. État des plaies, après 11 jours d'application de la crème, plaies en phase d'épithélialisation avec apparition de tissu épithélial chez lot traité avec l'extrait AHD-23 (a) et plaies en phase de bourgeonnement chez le lot témoin (b).....	17
Figure 6. État des plaies, après 17 jours d'application de la crème, fermeture complète des plaies du lot traité avec l'extrait AHD-23 (a) et plaies du lot témoin en phase d'épithélialisation (b).....	18
Figure 7. Variation de surface des plaies du lot traité avec l'extrait AHD-23 et celle des plaies du lot témoin traités avec la crème de base appliquée par voie topique une fois par jour en fonction du temps ($\overline{m} \pm \overline{\sigma}$; n = 4 ; P < 0,05).....	19

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Tests utilisés pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait AHD-23.....	8
Tableau II. Liste des ingrédients pour préparer 100 g de crème de base avec leurs fonctions et quantités respectives.....	9
Tableau III. Les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait AHD-23.....	13

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

<i>al.</i>	: <i>alii</i>
%	: pourcent
°C	: degré Celsius
Cm	: centimètre
FeCl ₃	: chlorure ferrique
h	: heure
g	: gramme
HCl	: acide chlorhydrique
H ₂ O	: eau
H ₂ SO ₄	: acide sulfurique
IL- 1	: interleukine 1
IL- 2	: interleukine 2
L	: litre
LPGPC	: Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
Mg	: magnésium
mg	: milligramme
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mm ²	: millimètre carré
\bar{m}	: moyenne
mn	: minute

n	: nombre d'observation
NaCl	: chlorure de sodium
NaOH	: soude
P	: seuil de signification
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
s	: seconde
$\bar{\sigma}$: écart type réduit
t	: test de Student
Tc₅₀	: temps de cicatrisation à 50 %
TGF	: Transforming Growth Factor
TNF	: Tumor Necrosis Factor
U. V	: Ultra-Violet
V. E. G. F.	: Vascular Endothelial Growth Factor
<	: inférieur à
±	: plus ou moins

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Les plaies, les brûlures, les blessures, les coupures ou les traumatismes constituent les sources de pénétration des substances étrangères qui peuvent contaminer l'organisme (SFMU, 2005). Selon leur état et leur profondeur, on distingue trois types de plaies : les plaies de premier degré qui touchent la partie superficielle de la peau, ensuite les plaies du second degré qui atteignent à la fois l'épiderme et le derme, et enfin les plaies du troisième degré qui touchent l'hypoderme ou les tissus sous-cutanés. Et selon leur évolution dans le temps, leur surface et leur profondeur, les plaies sont classées en plaies aiguës et en plaies chroniques (DELEAGE, 2011). Les plaies touchant la tête, les membres supérieur et inférieur représentent 13 % des admissions aux services des urgences en France (SFMU, 2005).

La peau est un tissu de revêtement qui protège l'organisme contre l'agression de l'environnement et des agents pathogènes (BANGERT, 2011). Une destruction de sa structure modifie sa participation à la protection de l'organisme et à la régulation des échanges avec le milieu extérieur. La réparation des lésions au niveau de ce tissu se déroule spontanément par un phénomène de régénération et de réparation (TONNESEN *et al.*, 2000), qui comprend cinq phases successives et interdépendantes : l'hémostase, la phase inflammatoire, de bourgeonnement, d'épithélialisation et de remodelage (GUO et DIPIETRO, 2010). Ce processus biologique est complexe et dynamique, il fait intervenir de nombreux facteurs locaux et systémiques (ROY *et al.*, 2012).

L'hémostase est la première réaction dans le processus de cicatrisation. Il a lieu immédiatement après la blessure, il vise à arrêter le saignement au niveau de la brèche vasculaire (DELEAGE, 2011). Cette phase commence par une vasoconstriction locale déclenchée par la sérotonine et les thromboxanes libérées par les plaquettes activées par le contact avec l'endothélium vasculaire mis à nu (ORSTED *et al.*, 2011). Ce spasme vasculaire diminue le flux sanguin au site endommagé et favorise l'interaction entre les plaquettes sanguines et le sous-endothélium au niveau de la lésion. Cela entraîne la formation du clou plaquettaire ou thrombus blanc. Ensuite le processus de coagulation se met en place et des filaments de fibrine emprisonnent les globules rouges, les globules blancs et d'autres plaquettes et se polymérisent pour former le caillot sanguin. Ce caillot sanguin arrête définitivement le saignement, et constitue un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance nécessaires au processus de cicatrisation (ORSTED *et al.*, 2011).

La phase inflammatoire succède à l'hémostase. Elle consiste à nettoyer la plaie en phagocytant les corps étrangers et les tissus morts au niveau du site lésé (DAWSON *et al.*, 1991). La réaction inflammatoire est caractérisée par une vasodilatation locale déclenchée par l'histamine libérée par les mastocytes au niveau du site lésé et les prostaglandines synthétisées à partir de l'acide arachidonique, sous l'action du cyclo oxygénase (TELLECHEA *et al.*, 2010). Cette vasodilatation augmente la perméabilité vasculaire au niveau de la lésion. Elle favorise la sortie et la migration des polynucléaires neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes vers le site lésé pour participer à l'élimination des agents pathogènes et des cellules mortes (TELLECHEA *et al.*, 2010). Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules de défense à affluer sur le site inflammatoire (TELLECHEA *et al.*, 2010). Leur migration est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, TNF-alpha, PDGF, le TGF-beta, le leucotriène B4I et les produits de dégradation de la fibrine (DELEAGE, 2011). La vasodilatation locale est à l'origine de la rougeur et de l'œdème de la berge de la plaie et de l'exsudat au niveau de sa surface (NAGORI et SOLANKI, 2011).

Des facteurs pro inflammatoires principalement IL-1, IL-6 et TNF- alpha amplifient la réponse inflammatoire et des facteurs de croissance, provenant des plaquettes, stimulent la formation du tissu de granulation (REINKE et SORG, 2012). Ce tissu est riche en macrophages, en fibroblastes et en néo- vaisseaux (REINKE et SORG, 2012). Ces derniers proviennent des vaisseaux préexistants suite à la stimulation des facteurs de croissance comme la V. E. G. F (Vascular Endothelial Growth Factor). Cette angiogenèse assure l'apport en éléments nutritifs et en oxygène, indispensables aux cellules afin de réparer le tissu lésé (REINKE et SORG, 2012). Par ailleurs, les fibroblastes synthétisent et sécrètent des collagènes de type III (DIANE, 2012). Ces néo vaisseaux forment avec le collagène des granules visibles au niveau de la surface de la plaie, d'où le nom de cette phase : « phase de granulation ». Certains fibroblastes se transforment en myofibroblastes, cellules capables de se contracter. C'est grâce à leur contraction que la berge de la plaie se contracte pour assurer sa fermeture (LE TOUZE et ROBERT, 1993). La phase de bourgeonnement s'arrête lorsque la surface de la plaie est recouverte par un tissu épithélial, issu de la prolifération des kératinocytes.

Au cours de cette épithélialisation, les kératinocytes saines au niveau de la berge de la plaie ou au niveau des annexes de la peau s'étendent sur la plaie et la couvrent petit à petit. La peau est recouverte par un film fin de couleur rose pâle. Ensuite, les fibres de collagène mûrissent et le tissu cicatriciel se forme (TONNESEN, 2000).

Enfin, le remodelage constitue la dernière phase de la cicatrisation. Elle correspond à la phase de maturation de la cicatrice (GHOSH et GABA, 2013). C'est la phase la plus longue, elle peut se poursuivre pendant plus de quatre semaines à plusieurs mois. Pendant cette phase, le nombre de fibroblastes ainsi que celui des néo-vaisseaux diminue. La peau va rester plus ou moins blanche car le taux de mélanocytes se reconstitue (GHOSH et GABA, 2013).

Malgré le fait que la réparation des lésions au niveau de ce tissu se déroule spontanément, la prise en charge des plaies a pour but d'accélérer ce processus parce qu'une plaie ouverte est une porte ouverte à l'infection. Un cicatrisant agit sur l'une ou les différentes phases de la cicatrisation (NAYAK et MOHAN, 2007).

Plusieurs médicaments sont déjà disponibles sur le marché pour soigner les plaies comme l'alginate de calcium (algisite®), une pommade utilisée pour le traitement des plaies exsudatives et hémorragiques pour ses propriétés hémostatique et absorbante (LAUBSCHER et DAYER, 2013). L'association d'allantoïne et de guaïazulène (cycatril®), sous forme de pommade, est utilisée pour le traitement local des plaies et des brûlures superficielles peu étendues grâce à ses propriétés anti-inflammatoires (MONDHER, 2010). L'association de diacétate de chlorhexidine et de palmitate de vitamine A (néo-Cutigenol®), une pommade désinfectante ; l'huile de foie de morue et la vitamine A (fletagex®), sous forme de pommade, possédant une action durant la phase inflammatoire, sont utilisées pour traiter les plaies et les ulcères. Le bécaplermine (regranex®), un gel qui stimule le processus chimiotactique et la prolifération des cellules impliquées dans la cicatrisation des plaies et il favorise la formation de tissu de granulation (LAUBSCHER et DAYER, 2013). Enfin, l'association de l'allantoïne et de chlorhexidine (cicasedermyl®), est une crème qui est préconisée pour cicatriser et réparer la peau pour ses propriétés antibactérienne et anti-inflammatoire (MONDHER, 2010).

Par ailleurs de nombreuses plantes sont aussi utilisées pour traiter les plaies, les blessures et les brûlures. Par exemple, les feuilles broyées de *Centella asiatica* (talapetraka) (APIACEAE), sont appliquées directement comme cataplasme sur la plaie ou la brûlure pour accélérer la cicatrisation et stimuler la synthèse du collagène (BOITEAU, 1986). Le latex de

Carica papaya (papaye) (CARICACEAE) est utilisé pour soigner les plaies, les brûlures et les ulcères, en application sur la peau grâce à leurs activités anti-inflammatoires. Le gel d'*Aloe vera* (LILIACEAE) est employé aussi pour ses propriétés cicatrisantes et spécialement de son efficacité contre les brûlures, en l'appliquant directement sur ces brûlures, grâce à son action anti-inflammatoire. Le décocté des feuilles de *Ceiba pentandra* (kapoaka) (MALVACEAE) est utilisé pour soigner les plaies pour ses propriétés anti-inflammatoire et antibactérienne (NICOLAS, 2012).

D'après les enquêtes ethnobotaniques que nous avons menées à Andasibe, dans la région d'Alaotra Mangoro au mois d'octobre 2017, le décocté des feuilles de la plante appartenant à la famille des MELASTOMATACEAE est utilisé par la population de cette région pour laver les plaies et bu quotidiennement jusqu'à la fermeture des plaies. Le but de notre étude a été d'étudier l'effet de l'extrait hydroalcoolique de cette plante sur la cicatrisation des plaies ouvertes expérimentales chez le rat. Il a été appliqué sous forme crème E/H (Eau dans l'Huile), et son effet sur les différentes phases de la cicatrisation et sur la fermeture des plaies a été étudié.

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le but de ce travail a été d'étudier l'effet de l'extrait AHD-23 sur la cicatrisation des plaies ouvertes expérimentales chez le rat. Il a été appliqué par voie topique, sous forme de crème à 10 % sur une plaie fraîche, et son action sur les différentes phases de la cicatrisation a été observée (MARTINI, 2006).

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Les feuilles ont été séchées dans une salle aérée, à l'abri du soleil et à la température ambiante pendant 15 jours. Une fois sèches, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau (BROOK CROMPTON © série 2000). Puis, deux cent grammes ont été macérés dans 1,5 l de mélange d'éthanol-eau (60 : 40) dans un récipient en verre, à la température ambiante, pendant trois jours. Ce macérât a été agité une fois par jour pendant 10 minutes. Le macérât obtenu a été filtré sur du coton hydrophile, et le filtrat obtenu a été évaporé à l'aide d'un distillateur, à la température de 80 °C, (Figure1) puis au bain marie à la température de 100 °C (Figure 2).

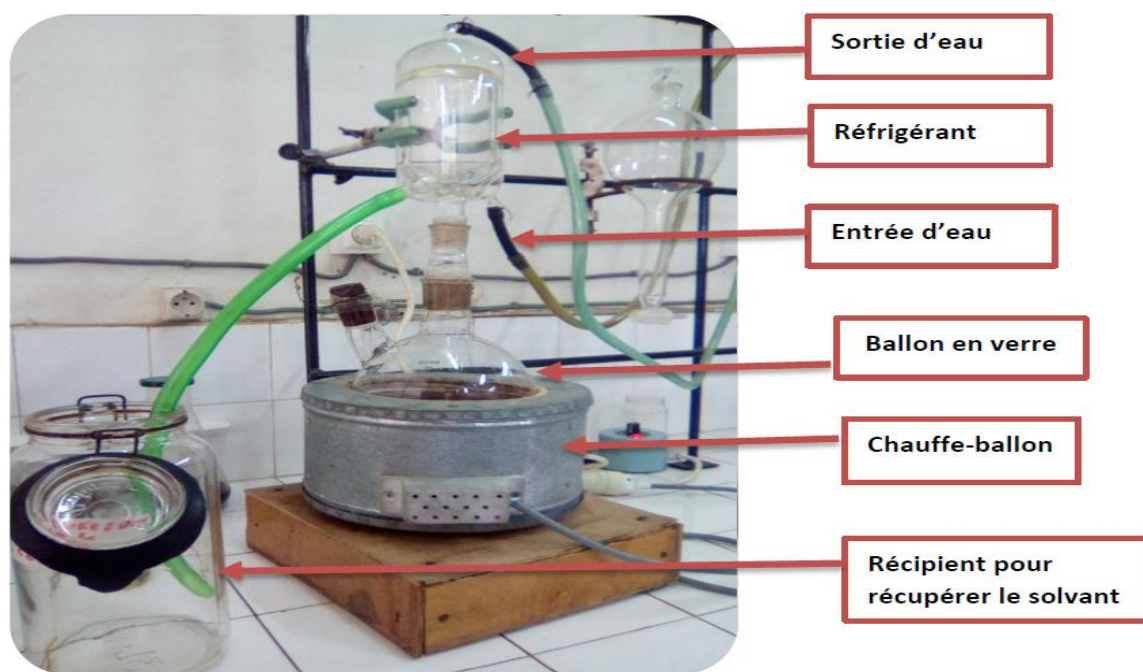


Figure 1. Photographie de distillateur utilisé pour évaporer le filtrat (Photo prise dans le laboratoire de chimie du LPGPC).

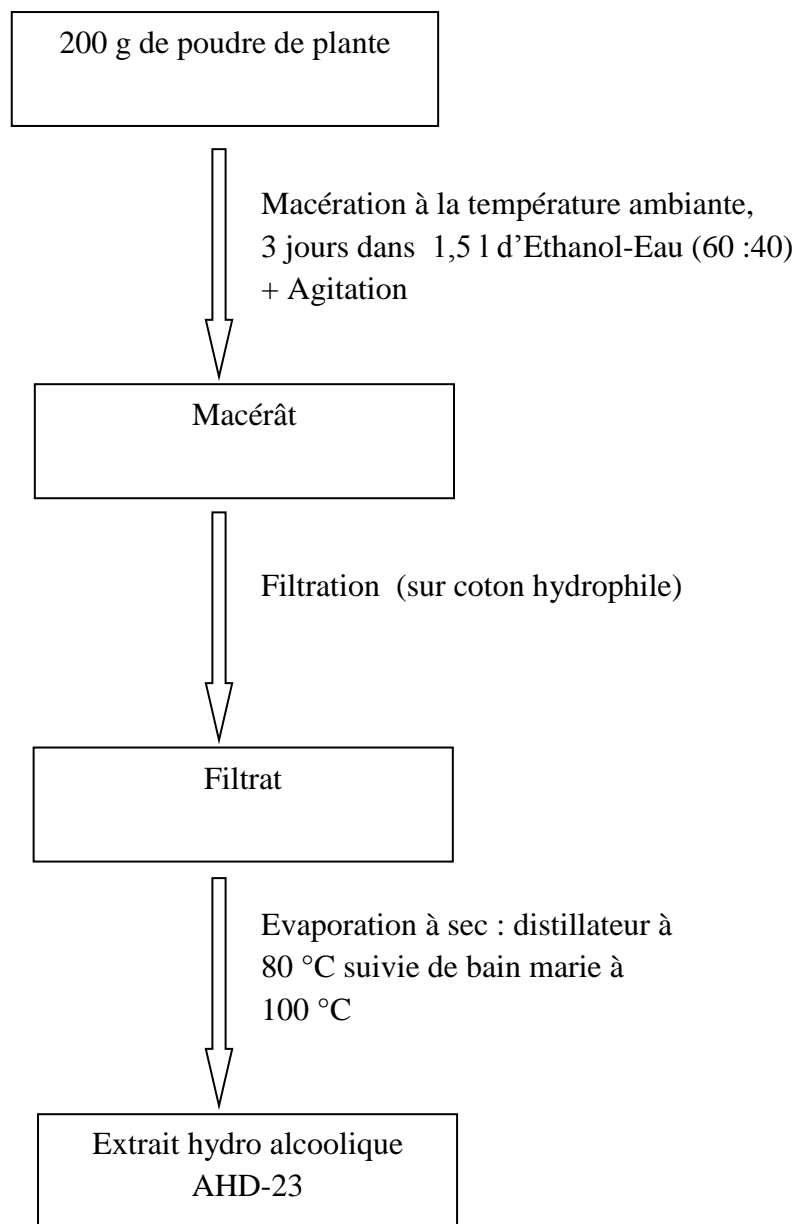


Figure 2. Préparation de l'extrait AHD-23.

L'extrait hydro alcoolique sec a été codé AHD-23, puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction. Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule:

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

2. Criblage phytochimique

Un criblage phytochimique a été effectué pour détecter les familles chimiques présentes dans l'extrait AHD-23. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (FONG *et al.*, 1997) (Tableau I). La présence de la famille chimique est caractérisée par la formation de précipité, ou d'un changement de coloration en utilisant des réactifs spécifiques pour chaque famille chimique.

Les signes suivants ont été utilisés pour quantifier la présence de la famille chimique recherchée dans l'extrait AHD-23 :

- +++ : Présence en forte teneur de la famille chimique recherchée
 - ++ : Présence en moyenne teneur de la famille chimique recherchée
 - +
 - ±
- : Présence en faible teneur de la famille chimique recherchée
- : Présence en très faible teneur de la famille chimique recherchée

Tableau 1. Tests utilisés pour déterminer les différentes chimiques présentes dans l'extrait AHD-23 (FONG *et al.* , 1977).

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observations
ANTHOCYANES	BATH-SMITH	HCl à froid	Coloration rouge
LEUCOANTHOCYANES		HCl concentré + bain marie	Coloration rouge violacée
SAPONINES	MOUSSE	HCl + Agitation	Persistance d'une mousse (3 cm d'épaisseur) après 30 mn
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

Le but de cette étude a été d'étudier l'effet de l'extrait AHD-23 sur la cicatrisation des plaies ouvertes expérimentales chez le rat. Il a été appliqué sous forme de crème sur la plaie, et son effet sur les différentes phases de la cicatrisation a été observé.

1. Préparation de la crème de base

Pour faciliter l'application de l'extrait sur la plaie, il a été incorporé dans une crème à base d'eau dans huile. Cette crème comprend de deux phases : une phase aqueuse dispersée et une phase grasse dispersante (MARTINI, 2011). La phase aqueuse est formée d'eau distillée et de bicarbonate de sodium, tandis que la phase grasse est formée d'huile de tournesol et de cire d'abeille (Tableau II).

Tableau II. Liste des ingrédients pour préparer 100 g de crème de base avec leurs fonctions et quantités respectives.

Ingrédients	Fonctions	Quantités
Eau distillée	Phase aqueuse	75 ml
Bicarbonate de sodium	Conservateur	25 g
Huile de tournesol	Phase grasse	150 ml
Cire d'abeille	Emulsionnant, épaississant	15 g

Pour préparer la crème de base, les deux phases ont été préparées séparément dans deux récipients différents placés dans un bain marie à la température de 80 °C. Dans le premier récipient, 25 g de bicarbonate de sodium ont été dissouts dans 75 ml d'eau distillée pour former la phase aqueuse, tandis que 15 g de cire d'abeille ont été découpées en petits morceaux et fondues dans le deuxième récipient. Lorsque la cire a été fondue, 150 ml d'huile de tournesol ont été ajoutées dans ce récipient. Le tout a été fouetté sans arrêt pour former la phase grasse.

Lorsque ces deux phases ont été homogénéisées, la phase aqueuse a été versée petit à petit dans la phase grasse en fouettant à l'aide d'un fouet pour homogénéiser la crème, ensuite la crème a été laissée se refroidir à la température ambiante (DALLY *et al.*, 2007).

2. Préparation de la crème contenant 10 % d'extrait AHD -23

Pour obtenir une crème contenant 10 % d'extrait AHD-23, 10 g de l'extrait ADH-23 ont été incorporés dans 90 g de crème de base (MARTINI, 2006). Les crèmes obtenues ont été placées dans des récipients en verre bien fermés dans un endroit frais.

3. Animaux d'expérimentation

Des rats mâles de souche WISTAR, pesant entre 140 et 160 g, âgés de trois mois, ont été utilisés pour ce test. Ces animaux ont été élevés dans les mêmes conditions de vie à l'animalerie de Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC) de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo. Ils ont été nourris avec de la provende CPO AGRIVAL © et ont eu un accès libre à de l'eau. Ils ont été soumis à une alternance de 12 h d'éclairement et 12 h d'obscurité, et à la température ambiante.

Ces animaux ont été répartis en deux lots de deux rats : le premier lot a servi de témoin, et le deuxième lot a été traité avec l'extrait. Les plaies des animaux du premier lot ont été traitées avec la crème de base, tandis que celles des animaux du deuxième lot ont été traitées avec la crème contenant 10 % d'extrait AHD -23. Chaque rat a été placé dans une cage individuelle pendant le test.

4. Création des plaies

Les poils sur une surface de 8 cm² au niveau de la partie dorsale des rats ont été tondus. Puis la peau a été nettoyée avec de l'eau savonneuse. Après 24 heures, les rats ont été anesthésiés par inhalation d'éther diéthylique (CHITRA *et al.* , 2009), et deux plaies circulaires de 10 mm de diamètre ont été créées de part et d'autre de la colonne vertébrale de l'animal à l'aide d'un dispositif tranchant circulaire de 10 mm de diamètre (MANJUNATHA *et al.* , 2005).

5. Étude de l'activité de l'extrait AHD - 23 sur les différentes phases de la cicatrisation des plaies ouvertes expérimentales

L'état des plaies a été observé tous les jours jusqu'à leur fermeture complète. Celui des animaux du lot traité a ensuite été comparé à celui des animaux du lot témoin.

a. Étude l'effet de l'extrait AHD - 23 sur l'hémostase

Pour étudier l'effet de l'extrait AHD - 23 sur l'hémostase, 10 mg de la crème de base ont été appliqués sur chaque plaie des rats du lot témoin, et 10 mg de crème à 10 % contenant l'extrait AHD - 23 ont été appliqués sur chaque plaie des rats traités avec l'extrait tout de suite après la création des plaies. Puis, la durée du saignement des plaies a été chronométrée chez tous les animaux (OKOLI *et al.*, 2007).

b. Étude de l'effet de l'extrait AHD - 23 sur la phase inflammatoire

L'effet de l'extrait sur la phase inflammatoire a été étudié en observant les signes de l'inflammation au niveau de la berge des plaies et leur surface. Le début de l'apparition des signes de l'inflammation ainsi que la durée de cette phase ont été notés et comparés chez les animaux traités et chez les animaux du lot témoin (HUSEINI *et al.*., 2012).

c. Étude de l'effet de l'extrait AHD -23 sur la phase de bourgeonnement

L'effet de l'extrait AHD-23 sur la phase de bourgeonnement a été étudié en observant l'aspect de la surface des plaies tous les jours. Le temps d'apparition des bourgeons ainsi que leur nombre ont été notés, puis ceux des plaies traitées avec l'extrait ont été comparés avec ceux des animaux témoins (SONI et SINGHAI, 2012).

d. Étude de l'effet de l'extrait AHD - 23 sur la phase d'épithélialisation

L'effet de l'extrait AHD-23 sur la phase d'épithélialisation a été étudié en observant le temps d'apparition de l'épithélium qui couvre la plaie, en le comparant avec celui du lot témoin (SUBHASHINI et ARUNACHALAM, 2011).

e. Étude de l'effet de l'extrait AHD-23 sur la fermeture des plaies

Pour évaluer l'effet de l'extrait ADH-23 sur la variation de la surface des plaies, elle a été mesurée tout de suite après leur création et tous les jours, à la même heure, par planimétrie directe. Un papier millimétré transparent a été placé à la surface de la plaie, puis le contour de chaque plaie a été tracé sur le papier à l'aide d'un crayon à pointe fine, et le nombre de carreaux dans le tracé a été compté (SASIDHARAN *et al.* , 2012).

La variation de la surface des plaies a été rapportée en fonction du temps, sur un papier millimétré, et le temps de cicatrisation à 50 % (T_{c50}) qui est le temps mis pour que la surface des plaies diminue de moitié a été déterminé graphiquement.

C. EXPRESSION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne avec écart-type réduit ($\overline{m} \pm \overline{\sigma}$). Les moyennes ont ensuite été comparées entre-elles en utilisant le test « t » de Student. La différence a été considérée comme significative pour une valeur de $P < 0,05$ (DANDE et KHAN, 2012).

RÉSULTATS

III. RÉSULTATS

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Rendement de l'extraction

Après l'évaporation à sec du filtrat obtenu à partir de 200 g de poudre, 35 g d'extrait hydro alcoolique sec, codé AHD-23, sont obtenus, soit un rendement d'extraction de 17,5 %.

2. Résultats du criblage phytochimique

Le criblage phytochimique effectué sur AHD-23 révèle la présence de neuf familles chimiques. Les stéroïdes, les triterpènes, les tanins, les sucres réducteurs et les polysaccharides qui sont présents en forte teneur dans l'extrait, tandis que les alcaloïdes et les leuco anthocyanes y sont présents en teneur moyenne. Enfin, les anthocyanes et les saponines se trouvent en très faible teneur (Tableau III).

Tableau III. Les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait AHD-23.

FAMILLES CHIMIQUES	TENEUR
Stéroïdes	+++
Triterpènes	+++
Tanins	+++
Sucres réducteurs	+++
Polysaccharides	+++
Alcaloïdes	++
Leucoanthocyanes	++
Anthocyanes	±
Saponines	±

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

L'observation macroscopique de l'état et de l'évolution des plaies expérimentales créées chez les rats traités avec la crème contenant l'extrait AHD-23 à 10 % par rapport au témoin, montre l'effet de l'extrait AHD-23 sur les différentes phases de cicatrisation.

1. Effet de l'extrait AHD-23 sur l'hémostase

Appliqué par voie topique, juste après la création des plaies, l'extrait AHD-23 diminue la durée de saignement des plaies. Les plaies traitées avec l'extrait AHD-23 cessent de saigner au bout de $37,5 \pm 3,1$ secondes, contre $124 \pm 8,60$ secondes chez le lot témoin ayant reçu la crème de base ($P < 0,05$). Puis, après 3 jours d'application, la surface des plaies traitées avec l'extrait est recouverte par une croûte épaisse (Figure 3). Cela nous permet de dire que l'extrait ADH-23 accélère l'hémostase.

2. Effet de l'extrait AHD-23 sur l'inflammation

Vingt-quatre heures après la création des plaies, une rougeur et un œdème apparaissent au niveau de la berge de toutes les plaies et leur surface est recouverte d'exsudat. Après application de la crème contenant l'extrait AHD-23, ces signes inflammatoires disparaissent au bout de 3 jours, mais persistent pendant 8 jours chez le lot témoin (Figure 3). Cette différence traduit l'effet anti-inflammatoire de l'extrait ADH-23.

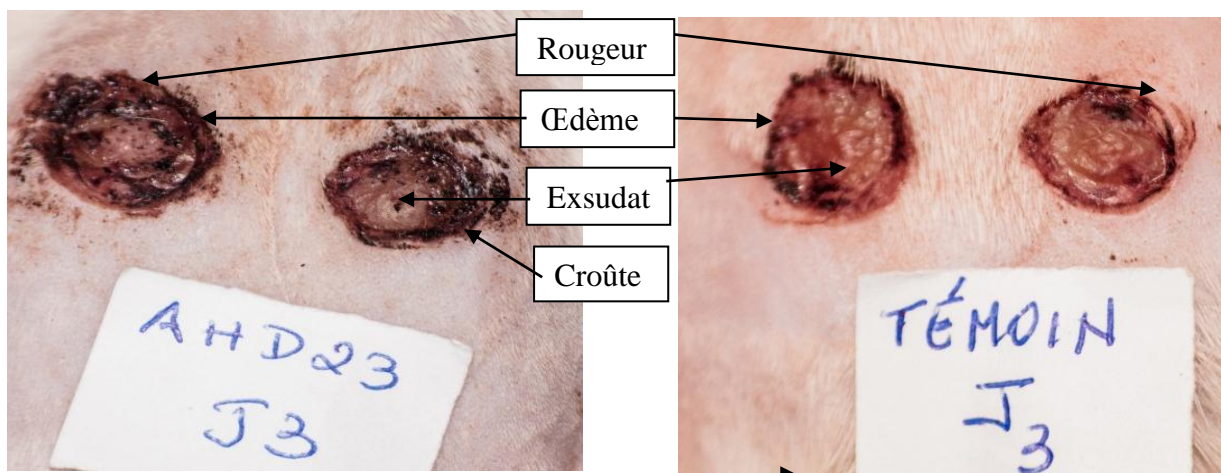


Figure 3. État des plaies, après 3 jours de traitement, présence de rougeur, d'œdème et d'exsudat chez le lot traité avec la crème contenant 10 % d'extrait AHD-23 (a) et plaies humides présentant des signes inflammatoires avec une quantité importante d'exsudat chez le lot témoin (b).

3. Effet de l'extrait AHD-23 sur le bourgeonnement

Le temps d'apparition et le nombre de bourgeons au niveau de la surface des plaies avec la crème contenant 10 % de l'extrait AHD-23 marquent l'effet de l'extrait sur la phase de bourgeonnement. Les bourgeons apparaissent à la surface des plaies traitées avec l'extrait AHD-23 après 4 jours de traitement, tandis que ceux du lot témoin apparaissent après 6 jours d'application de la crème de base. Par ailleurs, le nombre de bourgeons chez les plaies traitées avec l'extrait AHD-23 est supérieur à celui des plaies témoins. Après 4 jours de traitement, ils sont au nombre de $51 \pm 2,64$ chez les plaies traitées avec la crème à 10 % d'extrait AHD-23, tandis que les plaies du lot témoins présentent encore des signes inflammatoires (Figure 4). Après 6 jours d'application de la crème contenant l'extrait, ces bourgeons atteignent un nombre de $90 \pm 4,17$ chez le lot traité contre $47,5 \pm 4,78$ sur les plaies du lot témoin ($P < 0,05$). Ces résultats montrent que l'extrait ADH-23 stimule la formation de bourgeons.

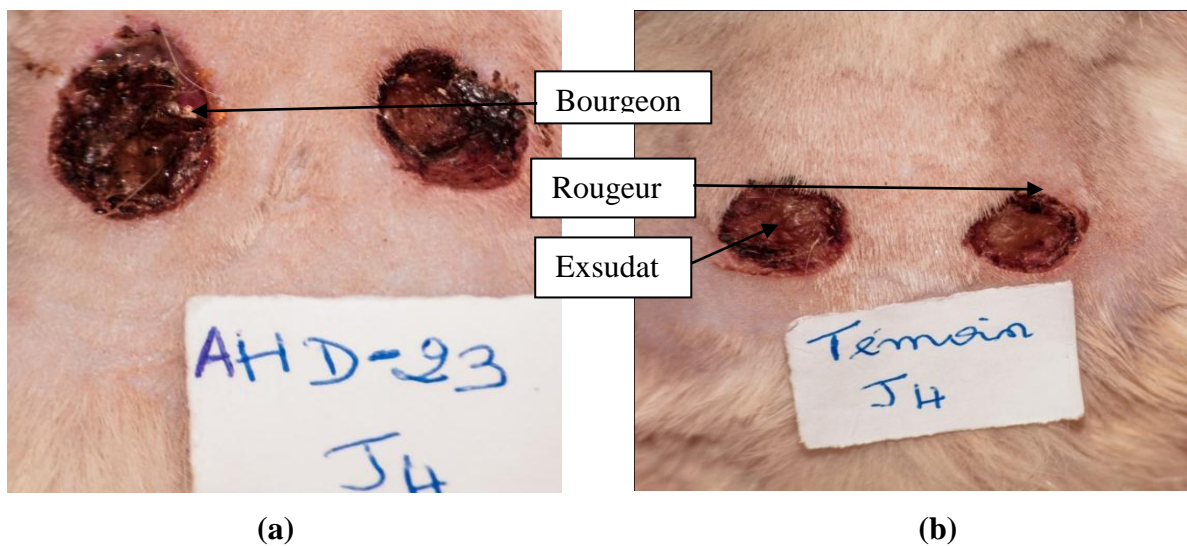


Figure 4. État des plaies, après 4 jours d'application de la crème, avec apparition de bourgeons chez le lot traité avec la crème contenant 10 % d'extrait AHD-23 (a) et plaies en phase inflammatoire avec persistance de rougeur et d'exsudat chez le lot témoin ayant reçu la crème de base (b).

4. Effet de l'extrait AHD-23 sur l'épithélialisation

L'apparition d'un épithélium de couleur rose sur la surface de la plaie marque le début de la phase d'épithélialisation. Ce tissu apparaît après 11 jours d'application de la crème chez le lot traité avec l'extrait AHD-23 contre 15 jours chez le lot témoin (Figure 5) ($P < 0,05$). Cela montre que l'extrait ADH-23 accélère la phase d'épithélialisation en activant la prolifération des cellules épithéliales.

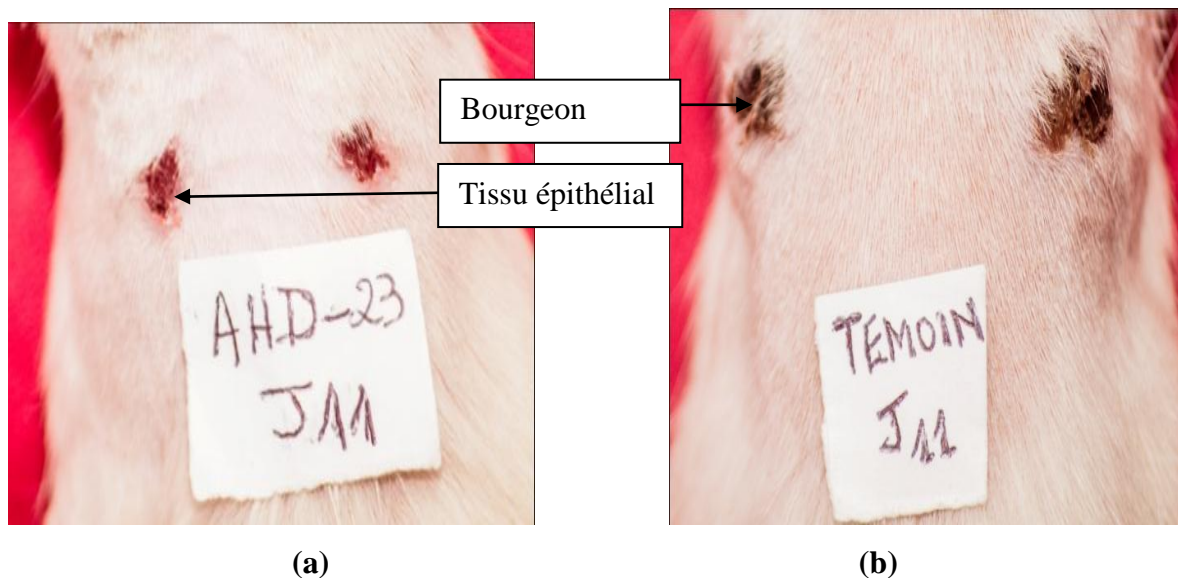


Figure 5. État des plaies, après 11 jours d'application de la crème, plaies en phase d'épithélialisation avec apparition du tissu épithélial chez lot traité avec l'extrait AHD-23 (a) et plaies en phase de bourgeonnement chez le lot témoin (b).

5. Effet de l'extrait AHD-23 sur la fermeture des plaies

Après leur création, la surface initiale des plaies est égale à 113 mm². Les plaies traitées avec l'extrait AHD-23 sont fermées après 17 jours d'application de la crème, contre 22 jours chez les plaies témoins ($P < 0,05$) (Figure 6).

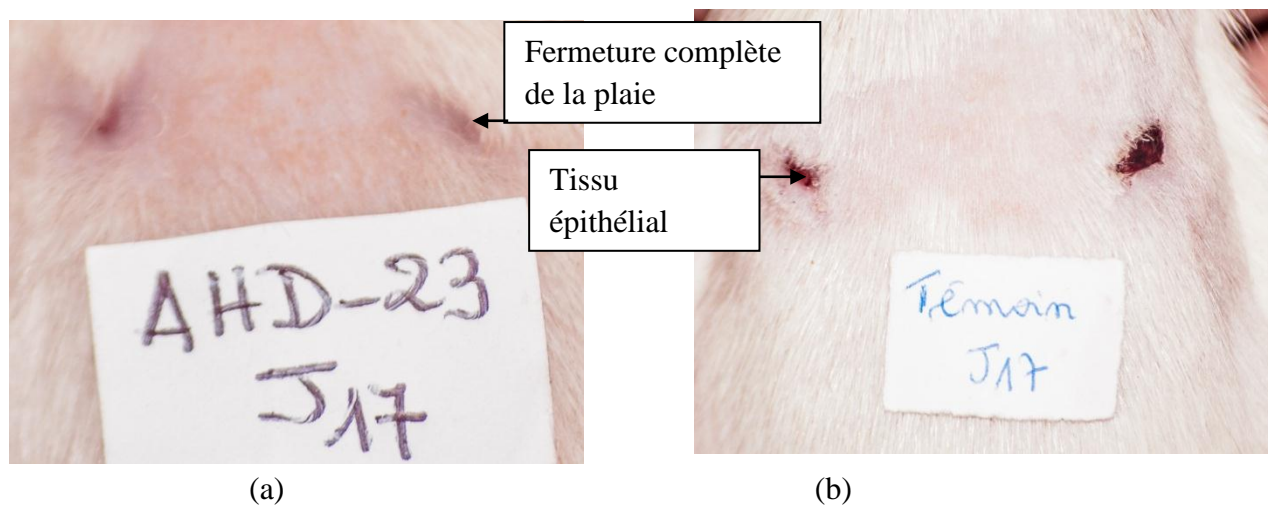


Figure 6. État des plaies, après 17 jours d'application de la crème, fermeture complète des plaies du lot traité avec l'extrait AHD-23 (a) et plaies du lot témoin en phase d'épithélialisation (b).

En présence de l'extrait AHD- 23, le T_{CS0} est égale à 7 jours contre 12 jours pour les animaux du lot témoin ($P < 0,05$) (Figure 7). L'extrait AHD-23 diminue le temps de cicatrisation des plaies.

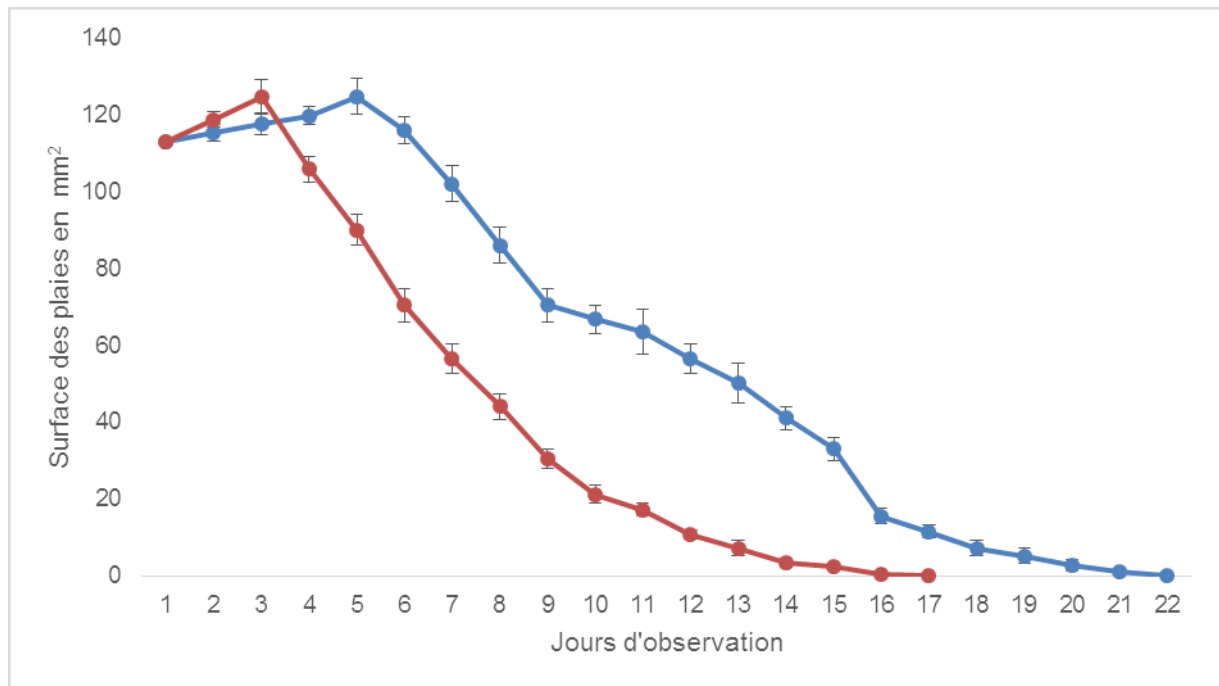




Figure 7. Variation de surface des plaies traitées avec l'extract AHD-23() et celle des plaies témoins () traitées avec la crème de base, appliquée par voie topique une fois par jour en fonction du temps ($\overline{m} \pm \overline{\sigma}$; n = 4 ; P < 0,05).

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'action de l'extrait AHD-23, appliqué par voie topique, sous forme de crème à 10 %, sur la cicatrisation des plaies ouvertes expérimentales chez le rat. Cette action a été évaluée en étudiant l'évolution de l'état des plaies.

D'après les résultats que nous avons obtenus, l'extrait AHD-23 réduit la durée d'hémostase, qui pourrait être due à une vasoconstriction locale (ADOLF *et al.*, 2006). En outre, une croûte épaisse se forme beaucoup plus rapidement à la surface des plaies traitées avec l'extrait, par rapport au témoin. Nous avançons une hypothèse que l'extrait AHD-23 raccourcit le processus de coagulation (ORSTED *et al.*, 2011). Dans le cas rapporté avec l'extrait de *Prosopis africana* (FABACEAE) (EZIKE *et al.*, 2010) et avec l'extrait de *Aspilia africana* (COMPOSITEAE) (OKOLI *et al.*, 2007), cette activité hémostatique est due aux tanins grâce à ses propriétés astringentes, les tanins arrêtent le saignement en précipitant les protéines plasmatiques qui sont le facteur Willebrand, le fibrinogène, la fibronectine, la protéase et la thrombine (OKOLI *et al.*, 2007).

Par ailleurs, l'extrait AHD-23 diminue la durée de la phase inflammatoire. L'œdème, la rougeur de la berge des plaies, ainsi que l'exsudat au niveau de la surface des plaies traitées avec l'extrait disparaissent plus vite par rapport à ceux des plaies témoins. Nous émettons une hypothèse que la diminution de cette durée de la phase inflammatoire serait due à la présence de la croûte qui protège les plaies contre les infections provenant de l'extérieur. En outre, en comparant les familles chimiques contenues dans l'extrait de *Centella asiatica* (APIACEAE) avec AHD-23, ils ont en commun les triterpènes. Or, dans *Centella asiatica*, ces triterpènes comme l'asiaticoside et le madécassoside sont des anti-inflammatoires puissants (MEI *et al.*, 2008 ; MONDHER, 2010). Comme AHD-23 contient des triterpènes, nous avançons par parallélisme qu'ils pourraient être aussi à l'origine de son activité anti-inflammatoire. En plus d'autres littératures rapportent aussi que les triterpènes possèdent une activité anti-inflammatoire (SEREME *et al.*, 2008 ; CHITRA *et al.*, 2009). Leur participation à la détersion de plaie diminue la durée de la phase inflammatoire et accélère la guérison de la plaie car la phase de bourgeonnement ne peut avoir lieu que si la plaie soit nettoyée (NAYAK et MOHAN, 2007).

A la fin de la phase inflammatoire, la réparation de lésion débute et des bourgeons apparaissent à la surface des plaies (REINKE et SORG, 2012). De nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir des vaisseaux préexistants par bourgeonnement.

Cette angiogenèse assure l'apport en nutriments et en oxygène, indispensables à la prolifération des fibroblastes qui vont combler le vide lors de la création de la plaie ainsi qu'à celle des kératinocytes qui formeront le tissu épithélial (FLANAGAN, 2000 ; REINKE et SORG, 2012). En plus, certains fibroblastes dans les granulations se transforment en myofibroblastes contractiles, dont la contraction rapproche la berge des plaies à l'origine de leur fermeture (LE TOUZE et ROBERT, 1993 ; FLANAGAN, 2000). Or, d'après les résultats que nous avons obtenus, l'extrait AHD-23 accélère la formation des bourgeons, dont le nombre sur la surface des plaies traitées est supérieur à celui des plaies témoins. Cela signifie que les plaies traitées avec l'extrait sont bien irriguées, favorables à la prolifération cellulaire.

En ce qui concerne, l'effet de l'extrait sur la phase de bourgeonnement, l'extrait AHD- 23 accélère la formation de tissu de granulation. Nous avançons une hypothèse que les triterpènes seront responsables de l'action de l'extrait AHD-23 sur la phase de granulation. Comme c'est le cas produit par les triterpènes de *Laurus nobilis* (LAURACEAE) et de *Allamanda cathartica* L. (APOCYNACEAE) sur les plaies expérimentales, qui accélèrent l'apparition du tissu de granulation en promouvant l'angiogenèse (NAYAK *et al.*, 2006).

Enfin, l'extrait AHD-23 active la formation du tissu épithélial qui recouvre les plaies. Cette épithélialisation est due à la migration des kératinocytes à partir de la surface des berges de la plaie pour reconstituer la lésion épidermique (FLANAGAN, 2000). Nous avançons une hypothèse que l'extrait ADH-23 favorise la prolifération des kératinocytes. Ce cas a été observé avec les polysaccharides comme ceux de *Tremella fuciformis* (TREMELLACEAE) et d'*Auricularia auricula* (AURICULARIACEAE) (RATCHANEE *et al.*, 2012).

L'activité de l'extrait AHD-23 sur la cicatrisation pourrait au moins être due à l'effet des tanins et des triterpènes qu'il contient. Mais, il est nécessaire d'isoler chaque famille chimique et de les tester, afin de confirmer ces hypothèses. Il est aussi intéressant d'isoler les molécules responsables de l'activité cicatrisante de cette plante, afin d'étudier le mécanisme d'action mis en jeu dans les différentes phases de cicatrisation.

CONCLUSION

V. CONCLUSION

D'après les résultats de cette étude, l'extrait AHD-23 accélère l'hémostase, réduit la durée de la phase inflammatoire. Il accélère l'apparition de tissu de granulation et accélère l'épithélialisation et la fermeture des plaies. Cela nous permet de conclure que l'extrait AHD-23 accélère la cicatrisation des plaies ouvertes expérimentales chez le rat.

Il contient des tanins, des triterpènes ou des polysaccharides. Des études de fractionnement chimique bioguidé sont nécessaires pour trouver la molécule responsable de son activité cicatrisante.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ADOLF F., SPRUMONY P., MICHAEL S. (2006).

Le corps humain : anatomie- physiologie.

Ed. de Boeck supérieur, Amazone (France), 200-202.

BANGERT C., BRUNNER P.M., STINGL G. (2011).

The immune function of the skin.

Clin. Dermatol., **29**: 360-376.

BOITEAU. P (1986).

Précis de matière médicinale malgache. Plantes médicinales de Madagascar.

Ed. KARTHALA, Amazone, (France), 37-61.

CHITRA S., PATIL M. B., RAVI K. (2009).

Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (LAMIACEAE).

Int. J. Pharm. Tech. Res., **1** (3): 737 - 744.

DALLY L. I., COULIBRAY S., ANGNIMALL H., BAMABA M. (2007).

Formulation, contrôle galénique, toxicologique et essai bio galénique d'une crème à activité cicatrisante de base de feuilles fraîches de *Baphia nitida* (PAPILIONACEAE).

J. Sci. Pharm. Biol., **8** (1): 33-40.

DANDE P., KHAN A. (2012).

Evaluation of wound healing potential of *Cynodon dactylon*.

Asian. J. Pharm. Clin. Res., **5** (3): 161 - 164.

DAWSON J., SEDGWICK A., EDWARDS J., LEES P. (1991).

A comparative study of the cellular, exsudative and histological responses to carrageen dextran in the mouse.

Int. J. Tissue React., **13**: 171-178.

DELEAGE A (2011).

Mise en évidence de l'effet d'un peptide sur l'épithélialisation dans un modèle expérimental de cicatrisation épidermique chez le porc.

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire, Université Claude-Bernard, Lyon (France), 31 - 51.

DIANE S. C. (2012).

Soins des plaies, l'hyper granulation, un obstacle à la cicatrisation des plaies. Perspective infirmière.

CiSMeF, Montréal (Canada), **9** (6):51-53.

EZIKE A. C., AKAH P. A., OKOLI C. O., UDEGBUNAM S., OKWUME N., OKEKE C., ILOANI O. (2010).

Medicinal plants used in wound care: A study of *Prosopis africana* (FABACEAE) stems bark.

J. Pharm. Sci., **72**: 334-339.

FLANAGAN M. (2000).

The physiology of wound healing.

J. Wound Care, **9** (6): 299 – 300.

.

FONG H. H. S., TINWA M., FARNSWORTH N. R. (1977).

Manual for photochemical screening.

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

GHOSH P. K., GABA A. (2013).

Phyto-extracts in wound healing.

J. Pharm. Pharm. Sci., **16**: 760 - 779.

GUO S., DIPIETRO L. A. (2010).

Factors affecting wound healing.

J. Dent. Res., **89** (3): 219 - 229.

HUSEINI H. F., RAHIMZADEH G., MEMRAZMA M., SALEHI M. (2012).

Evaluation of wound healing activities of kefir products.

Burns, **38**: 719 - 723.

LAUBSHER A., DAYER P. (2013).

Tableau matériel de pansement.

H.U.G., 1-16.

LAWRENCE W.T. (1998).

Physiology of the acute wound.

Clin. Plast. Surg., **25** (3): 21-40.

LE TOUZE A., ROBERT M. (1993).

La cicatrisation et la cicatrice.

Ed. Chirurgicales Pédiatriques, (Strasbourg), 2-8.

MANJUNATHA B. K., VIDYA S. M., RASHMI K. V., MANKANI K. L., SHILPA H. J., SINGH J. S. (2005).

Evaluation of wound healing potency of *Vernonia arborea* Hk.

Ind. J. Pharmacol., **37** (4): 223 - 226.

MARTINI M.C. (2006).

Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie.

Ed. Tec. Doc. Lavoisier, (Paris), 20-38.

MARTINI M. C. (2011).

Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie.

Ed. Tec. Doc. Lavoisier, (Paris), 247 - 250.

MEI L., YUE D., YING L., YUBIN L., FANG H., ZHUNAN G., QINGYU M. (2008).

Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice.

Planta Medica, **74** (8): 809 – 815.

MONDHER E. J. (2010).

Conservation et valorisation de la biodiversité de Madagascar.

Bull. Séanc. Acad. R. Sci. Outre-Mer, **56** (3): 279 - 291.

MOULIN Y. (2001).

Comprendre le processus de cicatrisation.

Inf. M. Sci. Inf., **9** (1) : 37-40.

NAGORI B. P., SOLANKI R. (2011).

Role of medicinal plants in wound healing.

Res. J. Med. Plants, **5**: 392 - 405.

NAYAK B. S., NALABOTHU P., SANDIFORD S., BHOGADI V., ADOGWA A. (2006).

Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica* L. and *Laurus nobilis* L. extracts on rats.

BMC Med., **6**: 12-.15.

NAYAK B. S., MOHAN K. (2007).

Influence of ethanolic extract of *Jasminum grandiflorum* Linn flower on wound healing activity in rats.

Ind. J. Physiol. Pharmacol., **51** (2): 189 - 194.

NICOLAS J. P. (2012).

Plantes médicinales du Nord de Madagascar, Ethnobotanique Antakarana et informations scientifiques.

Ed. Jardins du monde, (France), 69 - 137.

OKOLI C. O., AKAH P. A., OKOLI A. S. (2007).

Potentials of leaves of *Aspilia africana* (COMPOSITEAE) in wound care: an experimental evaluation.

BM C Med., **7**: 24.

ORSTED H. L., FOREST-LALANDE L., MEGIE M. F. (2011).

Basic principles of wound healing.

Wound Care Can., **9** (2): 1 - 12.

RATCHANEE K., NIKHOM N., ANAN O., NUTTAWUT S. (2012).

Skin wound healing promoting effect of polysaccharides extracts from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricular* on the ex – vivo Porcin Skin Wound Healing Model.

I. A. C. S. I. T. Press, (Singapore), **43** (20): 93 – 98.

REINKE J. M., SORG H. (2012).

Wound Repair and Regeneration.

Eur. Surg. Res., **49** (1): 35 – 43.

ROY S. K., MISHRA P. K., NANDY S., DATTA R., CHAKRABORTY B. (2012).

Potential wound healing activity of the different extract of *Typhonium trilobatum* in albino rats.

Asian Pac. J. Trop. Biomed., 1477 - 1486.

SASIDHARAN S., LOGESWARAN S., LATHA L. Y. (2012).

Wound healing activity of *Elaeis guineensis* in leaf extract ointment.

Int. J. Mol. Sci., **13**: 336 - 347.

SEREME A., MILLOGO R. J., GUINKO S., NACRO M. (2008).

Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso.

Pharm. Med. Trad. Afr., **15**: 41 - 49.

SFMU (2005).

Conférence de consensus : Prise en charge des plaies aux urgences.

Ed. Société francophone de médecine d'urgence, Clermont- Ferrand, 1-4.

SONI H., SINGHAI A. K. (2012).

A recent update botanicals for wound healing activity.

Int. Res. J. Pharm., **3** (7): 1 - 6.

SUBHASHINI S., ARUNACHALAM K. D. (2011).

Investigations on the photochemical activities and wound healing properties of *Adhatoda vasica* leave in Swiss albino mice.

Afr. J. Plant Sci., **5** (2): 133 - 145.

TELLECHEA A., LEAL E., VEVES A., CARVALHO E. (2010).

Inflammatory and angiogenic abnormalities in diabetic wound healing: role of neuropeptides and therapeutic perspectives.

Open Circ. Vasc. J., **3**: 43 - 46.

TONNESEN M. G., FENG X., CLARK R. A. E. (2000).

Angiogenesis in wound healing.

J. Invest. Dermatol. Symp. Proc., **5** (1): 40 - 46.

ÉTUDE DE L'EFFET DE L'EXTRAIT AHD-23 SUR LA CICATRISATION CHEZ LE RAT

Auteur : ANDRIANALIFIDY Henintsoa Diavolana

Adresse : Logt II N 134 bis Anjanahary – 101

Contact : 0 32 72 721 92 / 0 34 65 283 52

E-mail : diavolanaandrianaly@gmail.com

Année : 2016-2017

Université d'Antananarivo

Laboratoire de Pharmacologie Générale, de
Pharmacocinétique et de Cosmétologie

Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo

E-mail : frandimbi@gmail.com

Rapporteur : Pr RANDRIANAVONY Patricia

RÉSUMÉ

Le but de ce travail a été d'étudier l'activité de l'extrait AHD-23, sous forme de crème à 10 %, appliquée par voie topique sur les plaies ouvertes expérimentales chez le rat de souche WISTAR. Cette activité a été étudiée en observant l'effet de l'extrait AHD-23 sur les différentes phases de la cicatrisation et sur la vitesse de cicatrisation des plaies par rapport au lot témoin. Nos résultats montrent que l'extrait AHD-23 diminue la durée de saignement. Les plaies traitées saignent pendant $37,5 \pm 3,1$ secondes, contre $124 \pm 8,60$ secondes chez les plaies témoins ($P < 0,05$). Il diminue la durée de la phase inflammatoire, 8 jours chez le témoin, contre 3 jours chez le lot traité ($P < 0,05$). L'extrait AHD-23 accélère l'apparition des granulations, celles-ci apparaissent après 4 jours chez le lot traité contre 6 jours chez les plaies témoins. Il accélère également la fermeture des plaies, celles du lot traité avec AHD-23 se ferment après 17 jours contre 22 jours, chez le lot témoin ($P < 0,05$). Le T_{c50} est égale à 7 jours chez le lot traité avec la crème contenant l'extrait AHD-23 contre 12 jours chez les animaux témoins ($P < 0,05$). Ces résultats montrent que l'extrait AHD-23 possède une activité cicatrisante. Des tanins, des triterpènes et/ou des polysaccharides en sont responsables.

Mots-clés : cicatrisation, plaies ouvertes, rat.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the efficacies of 10 % ointment of AHD-23, applied topically on rat's experimental wound. Its effect on different phasis of wound healing was observed.

AHD-23 reduces the hemostasis duration, from 37.5 ± 3.1 s in control group, versus 124 ± 8.60 s in the animals treated with the extract ($P < 0.05$). It also reduces the inflammatory duration from 8 days in control group, versus 3 days in the treated group ($P < 0.05$). AHD-23 accelerates granulation within 4 days in treated group, versus 6 days in control group ($P < 0.05$). Closure of treated wound is 17 days, versus 22 days for control group ($P < 0.05$), with T_{c50} equal to 7 days for the treated group, versus 12 days in control group ($P < 0.05$). The results show the effectiveness of AHD-23 for wound healing, and tannins, triterpenes and polysaccharides might be responsible for its activity.

Keys words: wound healing, opened wound, rat