

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	II
LISTE DES FIGURES.....	III
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	IV
I-INTRODUCTION.....	1
II-MATERIELS ET METHODES.....	4
A. PARTIE CHIMIQUE.....	4
1. Préparation de l'extrait.....	4
2. Criblage phytochimique.....	4
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	6
1. Animaux d'expérimentation.....	6
2. Préparation de la solution de Tyrode.....	6
3. Etude de l'effet de l'extrait HAN008 sur la sécrétion intestinale.....	6
4. Etude de l'effet de l'extrait HAN008 sur la motilité intestinale.....	7
5. Etude de l'effet de l'extrait HAN008 vis-à-vis de l'acétylcholine.....	8
C. EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS.....	8
III-RESULTATS.....	9
A. PARTIE CHIMIQUE.....	9
1. Rendement de l'extraction.....	9
2. Résultats du criblage phytochimique.....	9
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	10
1. Effet de l'extrait HAN008 sur la sécrétion intestinale.....	10
2. Effet de l'extrait HAN008 sur la motilité intestinale.....	11
3. Effet de l'extrait HAN008 vis-à-vis de l'acétylcholine.....	12
IV-DISCUSSION.....	13
V-CONCLUSION.....	15
VI-BIBLIOGRAPHIE.....	16

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Tests utilisés pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait HAN008	5
Tableau II. Composition de la solution de Tyrode.....	6
Tableau III. Familles chimiques présentes dans l'extrait HAN008.....	9

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Variation du volume de fluide intestinal provoqué par l'huile de ricin administrée par voie orale chez les témoins et les animaux traités avec l'extrait aux doses de 75 ; 150 et 300 mg/Kg ($\bar{x} \pm \text{e.s.m}$; n=5 ; $P < 0,05$).....	10
Figure 2. Variation du relâchement de l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'acétylcholine après injection de l'extrait HAN 008 de façon cumulative dans le bain ($\bar{x} \pm \text{e.s.m}$; n=5 ; $P < 0,05$).....	11
Figure 3. Variation de la contraction de l'iléon isolé de cobaye provoquée par l'acétylcholine injectée de manière cumulative dans le bain en absence et en présence de l'extrait HAN 008 à 0,125 ; 0,25 et 0,50 mg/ml ($\bar{x} \pm \text{e.s.m}$; n=5 ; $P < 0,05$).....	12

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

- % : Pourcentage
- < : Inférieur
- \pm : Plus ou moins
- °C : Degré Celcius
- ACh : Acétylcholine
- cm : Centimètre
- CE₅₀ : Concentration efficace donnant 50% de l'effet maximal
- e.s.m : Ecart type standart moyen
- EDSM : Enquêtes Démographique De Santé à Madagascar
- g : Gramme
- INSTAT : Institut National de la Statistique
- LPGPC : Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
- M : Concentration molaire
- mg/Kg : Milligramme par kilogramme
- mg/ ml : Milligramme par millilitre
- ml : Millilitre
- ml/Kg : Millilitre par kilogramme
- mM : Millimole
- n : Nombre d'animaux utilisés
- NaCl : Chlorure de sodium
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- P : Degré de signification
- \bar{x} : Moyenne

INTRODUCTION



I. INTRODUCTION

Selon l’OMS, la diarrhée figure parmi les 10 premières causes de mortalité dans le monde avec 1,5 millions de décès en 2012, soit 8 % du taux de mortalité (OMS, 2014). Ce sont les enfants de moins de 5 ans qui sont les plus touchés surtout dans les pays sous-développés, comme en Afrique, due à la contamination de l’eau et au manque d’hygiène et à l’insalubrité. Dans les régions africaines et dans le Sud Est Asiatique, 78 % de cause de la mortalité infantile est due à la diarrhée (PRUSS-USTUN A. et coll., 2006).

A Madagascar, 22 % de la mortalité infantile sont dus à la diarrhée, et les enquêtes démographiques et de santé réalisées à Madagascar en 2010 ont permis d’estimer la prévalence de la diarrhée chez l’enfant dans chaque région. Dans la région Boeny, par exemple les cas de diarrhée enregistrés chez les enfants de moins de 5 ans ont été les plus élevés par rapport aux autres régions de Madagascar avec une prévalence de 18 % (EDSM IV, 2010).

La manifestation de cette maladie est connue par l’émission de selles liquides et fréquentes. Elle est due à un déséquilibre entre la sécrétion intestinale et l’absorption de fluide dans la lumière intestinale, où la sécrétion hydroélectrolytique dépasse la capacité d’absorption. L’intestin grêle est le principal organe de digestion et d’absorption, à l’état normal, environ 10 litres de fluide y passent. Quatre-vingt-dix pourcent de ce fluide sont absorbés par l’intestin grêle et seule une faible quantité par le colon pour assurer un débit fécal de 100 ml par jour (BEHTASH G. et SHANTHI S., 2010 ; MOURI G. et GOUTAM P., 2013).

Selon la durée du symptôme, la diarrhée est classée en deux : la diarrhée aiguë et la diarrhée chronique. La diarrhée aiguë dure 2 à 3 jours, alors que la diarrhée chronique dure plusieurs semaines. En général, la diarrhée aiguë est due à la malabsorption ou à une infection avec ou sans lésion de la muqueuse intestinale. Les microorganismes présents dans la lumière intestinale affectent le système de défense de l’épithélium intestinal. D’une part, ils provoquent des lésions au niveau de la muqueuse, ce qui entraîne la perte de la capacité d’absorption de la cellule intestinale et la fuite excessive d’eau. D’autre part, ils produisent des toxines qui stimulent la sécrétion de fluide dans l’intestin, et inhibent l’absorption hydroélectrolytique (PIZZARO-CERDA J. et COSSART P., 2006 ; VISWANATHAN V. et coll., 2009). La diarrhée aiguë peut également être due à la faiblesse du système de défense suite à la malnutrition qui facilite l’infection de la muqueuse par les agents infectieux (FERRER S. et coll., 2008).

Quant à la diarrhée chronique, elle peut être motrice, sécrétoire ou osmotique. La diarrhée motrice est due à l'augmentation de la motilité intestinale qui entraîne l'évacuation rapide du contenu intestinal. En effet, l'augmentation du péristaltisme intestinal diminue le temps de contact du bol alimentaire avec la villosité intestinale qui est le site d'absorption d'eau et des électrolytes. Dans ce cas, la plupart de fluide intestinal n'est pas absorbée et la sécrétion de fluide intestinal excède l'absorption d'où l'émission de selles liquides en cas de diarrhée motrice (SHARKEY K. et WALLACE J., 2012).

La diarrhée sécrétoire est due à l'augmentation anormale de la sécrétion au niveau de l'intestin suite à l'irritation de la paroi intestinale par des agents infectieux ou de toxines qu'ils produisent, ou par de produits irritants, ou de médicaments, parce que l'inflammation qui se produit provoque une exsudation au niveau des entérocytes. L'infection peut être causée par des microorganismes (bactéries, virus, parasites ou champignons). Le plus souvent ce sont les bactéries comme *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella sp.*, *Campylo bacter*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia entérocolitica*, les virus comme rotavirus, les parvovirus et les réovirus, entérovirus et astrovirus, les champignons comme *Candida albicans* ou les parasites comme les protozoaires tels que *le Giardia lamblia* qui en sont les responsables (YIMER M. et coll., 2015). En outre, en cas d'irritation de la paroi intestinale, l'absorption hydroélectrolytique diminue et l'eau s'accumule dans la lumière intestinale (VELAZQUEZ et coll., 2006). Une atteinte de la paroi intestinale ou lors des troubles fonctionnels, entraîne aussi un déséquilibre entre l'absorption et la sécrétion (BROWN J. et TAYLOR P., 2000).

Par ailleurs, la présence de substances osmotiquement actives et non absorbables dans la lumière intestinale y attire l'eau par osmose et augmente aussi le volume du fluide intestinal, à l'origine de la diarrhée osmotique, comme c'est le cas de Maltitol, le sulfate de magnésium, ou les nutriments mal absorbés lors d'une indigestion (NAKAMURA S. et coll., 2007). Ceci est dû à l'augmentation de l'osmolarité au niveau de la lumière intestinale (GEOFFREY L., 2001).

Un anti-diarrhéique a pour but de restaurer l'équilibre hydroélectrolytique, en augmentant la réabsorption ou en diminuant la sécrétion. Parmi ces médicaments anti-diarrhéiques, on peut citer les ralentisseurs du transit comme les loperamides (Imodium®) qui sont des agonistes opioïdes. Ils diminuent la fréquence d'émission des selles en inhibant la motilité intestinale ainsi que la sécrétion de fluide à ce niveau.

Les anti-sécrétoires inhibent la sécrétion intestinale. C'est le cas des racécadotril (Tiorfan®) qui inhibent l'enképhalinase, une enzyme membranaire responsable de la dégradation de l'enképhaline intestinale et assure de ce fait la réabsorption d'eau et d'électrolytes au niveau de la paroi intestinale. Quant aux adsorbants (Smecta®), ils piègent l'eau en excès dans l'intestin et fixent les toxines. Ce qui diminue l'irritation provoquée par ces substances. Les anti-infectieux intestinaux, les antiseptiques (Ercéfuryl®) et les antibiotiques (Cotrimoxazole®) ainsi que les anti-bactériens (Sulfamide) quant à eux empêchent la prolifération des germes pathogènes (CEZARD J.P. et coll., 2002).

Malgré l'existence de ces différents médicaments, beaucoup de gens utilisent des plantes médicinales pour se soigner, y compris la diarrhée (DEBRAY M. et coll., 1971). Plusieurs plantes ont une vertu anti-diarrhéique. La décoction de la feuille de baobab ou «*Adansonia digitata*» de la famille de BOMBACEAE est utilisée en cas de diarrhée motrice. Les feuilles du « karasôly » ou *Annona muricata* de la famille des ANNONACEAE, la plante entière du « jean robert » ou *Euphorbia hirta* de la famille des EUPHORBIACEAE, et les feuilles de « Apongaben-danitra » ou *Punica granatum* de la famille des PUNICACEAE en décoction sont aussi utilisées comme anti-diarrhéique (NICOLAS J.P.). Fréquemment, la décoction des feuilles de « goavy » ou *Psidium guayava* de la famille de MYRTACEAE est utilisée en cas de diarrhée sanguinolente (RABESSA Z.A., 1986).

Beaucoup de chercheurs s'intéressent aux molécules d'origine naturelle (PETIT JEAN M. et coll., 1992) et nous en faisons partie. Nous avons effectué des enquêtes ethnopharmacologiques dans la région de Boeny, durant lesquelles nous avons trouvé une plante appartenant à la famille de FABACEAE, très utilisée dans cette région pour traiter la diarrhée. D'après les recherches bibliographiques que nous avons effectuées, aucune étude sur sa propriété anti-diarrhéique n'a été rapportée mais elle possède une activité antibactérienne (NICOLAS J.P., 2012) et en Inde, elle est utilisée comme anti-inflammatoire (MEHA N. et coll., 2015).

Ce travail a pour but de vérifier l'activité de cette plante sur l'accumulation de fluide intestinal et sur la motilité intestinale chez le cobaye.

MATERIELS

ET

METHODES



II. MATERIELS ET METHODES

A. PARTIE CHIMIE

1. Préparation de l'extrait

Les feuilles de cette plante ont été récoltées dans la région de Boeny, au mois de février 2016. Elles ont été séchées à l'ombre, dans une salle aérée et à la température ambiante pendant 3 mois. Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau électrique au LPGPC, puis 250 g de la poudre obtenue ont été macérés dans un mélange éthanol-eau (60 :40) pendant 72 heures à la température ambiante. Le macérât a ensuite été filtré avec du coton hydrophile, et le filtrat a été évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur à la température de 75°C. L'extrait obtenu a été codé HAN008, puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction, selon la formule :

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

2. Criblage phytochimique

Un criblage phytochimique a été effectué pour déterminer la teneur relative des familles chimiques présentes dans l'extrait HAN008. Le test effectué a été basé sur des réactions de coloration et de précipitation, en utilisant des réactifs spécifiques pour chaque famille chimique (FONG H.H.S. et coll., 1977).

Pour exprimer la teneur des familles chimiques présentes dans l'extrait, les signes suivants ont été utilisés :

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

Tableau I. Tests utilisés pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait HAN008 (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
STEROÏDES 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
LEUCOANTHOCYANES	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 PHARMACOLOGIE

L'activité de l'extrait HAN008 a été étudiée chez le cobaye. Son effet sur la sécrétion intestinale a été étudié *in vivo* tandis que son effet sur la motilité intestinale a été étudié *in vitro*.

1. Animaux d'expérimentation

Des cobayes mâles et femelles, âgés de 3 à 4 mois, pesant entre 180 et 220 g ont été utilisés. Ces animaux ont été élevés à l'animalerie du LPGPC. Ils ont été nourris avec des feuilles fraîches de graminées, et ont été mis à jeun pendant 18h avant les différents tests.

2. Préparation de la solution de Tyrode

La solution physiologique de Tyrode utilisée dans ce travail a été préparée selon la composition mentionnée dans le tableau II dans 1 litre d'eau distillée (KITCHEN I., 1984).

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

Ingrédients	NaCl	KCl	MgCl ₂	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	CaCl ₂	Glucose
Concentration (mM)	136,9	2,7	1,1	0,42	11,9	1,80	5,6

3. Etude de l'effet de HAN008 sur la sécrétion intestinale

Pour étudier l'activité de l'extrait sur la sécrétion hydroélectrolytique au niveau de l'intestin, l'huile de ricin a été administrée par voie orale pour provoquer l'accumulation du fluide dans la lumière intestinale ou *enteropooling* (ROBERT A. et coll., 1976).

Les animaux ont été mis à jeun pendant 18h et ils ont été répartis en 4 lots: 1 lot témoin et 3 lots traités avec l'extrait. Au temps t_0 , 10ml d'eau distillée ont été administrés chez les animaux du lot témoin et l'extrait aux doses respectives de 75, 150 et 300 mg/kg a été administré par voie orale chez les cobayes des 3 lots. L'extrait a été administré par voie orale dans un volume de 10ml /kg (PRASHANT B. et coll., 2012).

Quarante-cinq minutes après l'administration de l'eau distillée et de l'extrait, 1ml d'huile de ricin a été administré par voie orale chez tous les animaux (YASMEEN M. et coll., 2010).

Trente minutes après l'administration de l'huile de ricin, les animaux ont été sacrifiés puis exsanguinés. Une laparotomie a ensuite été effectuée puis, l'intestin grêle a été repéré.

Deux ligatures ont été placées au niveau de l'intestin: l'une au niveau du pylore et l'autre au niveau de la jonction iléocoecale.

Ensuite, la portion entre les 2 nœuds a été prélevée et son contenu a été versé dans un récipient gradué puis son volume a été mesuré (MAMILAINORO L., 1996).

L'activité anti-sécrétoire de l'extrait a été exprimée en pourcentage d'inhibition de l'accumulation du fluide intestinal selon la formule :

$$\text{Inhibition (\%)} = (V_0 - V_t / V_0) \times 100$$

Avec :

V_0 : volume du liquide intestinal du lot témoin (ml)

V_t : volume du liquide intestinal du lot traité avec l'extrait (ml)

(MAMILAINORO L., 1996; OBEN J. et coll., 2006).

4. Etude de l'effet de HAN008 sur la motilité intestinale

L'effet de l'extrait HAN 008 sur la motilité intestinale a été étudié *in vitro* sur l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'acétylcholine (SHIFFERIE F. et coll., 2013).

L'animal a été mis à jeun pendant 18 h avant l'expérience, puis sacrifié et exsanguiné en coupant les 2 carotides. Ensuite, une laparotomie a été effectuée et l'iléon a été prélevé et plongé dans une boîte à pétri contenant de la solution de Tyrode aérée à l'aide d'un aérateur pour le maintenir en vie. L'iléon a été nettoyé en enlevant les mésentères qui l'entourent.

Après le nettoyage, un morceau de 3cm d'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 un aérateur. Pour monter l'organe dans la cuve, une des deux extrémités a été fixée au fond de la cuve à l'aide d'un fil de coton inextensible et l'autre a été fixée au stylet enregistreur avec un contre poids de 1g (MOHAMMED A. et coll., 2009).

L'organe a ensuite été laissé se stabiliser pendant 45 minutes; pendant ce temps il a été rincé toutes les 15 minutes. Après ce délai, l'acétylcholine a été injectée dans le bain pour réaliser une concentration de 10^{-4} M dans le bain, pour tester la viabilité de l'organe et pour le sensibiliser.

Puis, l'organe a été rincé et laissé se stabiliser pendant 30 minutes durant lesquels il a été rincé 3 fois. Après cette période, l'acétylcholine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative afin d'obtenir des concentrations croissantes à partir de 10^{-11} M jusqu' à l'obtention de la contraction maximale.

Au plateau de la contraction, l'extrait a été injecté dans le bain d'une manière cumulative jusqu' au relâchement total de l'organe. L'amplitude des contractions a été mesurée et portée sur un papier millimétré pour déterminer la concentration de l'extrait qui provoque 50% de relâchement de l'iléon contracté par l'acétylcholine (CE₅₀).

5. Etude de l'activité spasmolytique de HAN008

L'activité de l'extrait sur la contraction de l'iléon par l'acétylcholine a été étudiée en pré incubant l'iléon dans un bain contenant différentes concentrations de l'extrait avant de le contracter avec l'acétylcholine (MEHEMOOD H. et coll., 2011).

L'iléon isolé de cobaye a été monté dans une cuve à organe isolé contenant une solution de Tyrode maintenue à la température de 37°C et aérée à l'aide d'un aérateur. Il a été laissé se stabiliser pendant 45 minutes. Pendant ce temps de stabilisation, il a été rincé 3 fois. Après cela, il a été sensibilisé et sa viabilité a été testée en injectant dans le bain de l'acétylcholine à la concentration finale de 10⁻⁴M dans le bain. Après ce test il a été rincé et laissé de nouveau se stabiliser pendant 30 minutes, durant lesquelles, il a été rincé deux fois. Après le dernier rinçage, l'acétylcholine a été injectée dans le bain d'une manière cumulative jusqu'à la contraction maximale de l'iléon.

Puis, la préparation a été rincée et laissée se stabiliser pendant 30 minutes. Pendant cette période, la solution de Tyrode a été renouvelée 2 fois. Après la période de stabilisation, l'extrait a été injecté dans le bain afin de réaliser une concentration finale de 0,125 mg/ml dans le bain. L'iléon a été laissé en contact avec l'extrait pendant 10 minutes, puis sans rincer, l'acétylcholine a été injectée dans le bain d'une façon cumulative jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de l'organe.

Au plateau de contraction, la préparation a été rincée et laissée se stabiliser, et la même manipulation a été refaite en pré incubant l'iléon dans un bain contenant l'extrait à la concentration de 0,25 et 0,50 mg/ml.

L'amplitude des contractions a été mesurée puis rapportée sur un papier semi logarithmique pour déterminer la CE₅₀ de l'acétylcholine.

C. EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTAS

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type réduit ($\bar{x} \pm e. s. m$). Puis les moyennes ont été comparées entre elles en utilisant le test 't' de Student.

La différence entre les moyennes est considérée significative pour une valeur de $P < 0,05$.

RESULTATS



III. RESULTATS

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Rendement de l'extraction

Après évaporation à sec du filtrat hydro alcoolique préparé avec 250 g de poudre de feuilles, 35 g d'extrait pâteux sont récupérés, soit un rendement de 14 %.

2. Résultats du criblage phytochimique

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait HAN008 révèle la présence de stéroïdes et de tanins en forte teneur. Tandis que les alcaloïdes y sont présents en teneur moyenne. Les triterpènes, les anthocyanes et les sucres réducteurs sont présents en faible teneur (Tableau III).

Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait HAN008

FAMILLES CHIMIQUES	TENEUR
TANINS	+++
STEROÏDES	+++
ALCALOÏDES	++
TRITERPENES	+
ANTHOCYANES	+
SUCRES REDUCTEURS	+

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

1. Effet de HAN008 sur la sécrétion intestinale

Le test sur la sécrétion intestinale effectué chez le cobaye *in vivo* montre que l'administration de l'huile de ricin par voie orale provoque l'accumulation de fluide intestinal (*enteropooling*) ; l'extrait diminue cette accumulation. Le volume du fluide intestinal des animaux traités avec l'extrait aux différentes doses est inférieur à celui des témoins. Chez le lot témoin, le volume du liquide intestinal provoqué par l'huile de ricin est égal à $4,57 \pm 0,15$ ml. Par contre, chez les animaux traités avec l'extrait aux doses respectives de 75, 150 et 300 mg/kg, ce volume est égal à $3,77 \pm 0,25$, $1,13 \pm 0,15$ et $0,67 \pm 0,12$ ml (Figure 1). Ce qui correspond à une diminution respective de 17,54 %, 75,21 % et 85,30% ($P < 0,05$) chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 75, 150 et 300 mg/kg par rapport au lot témoin.

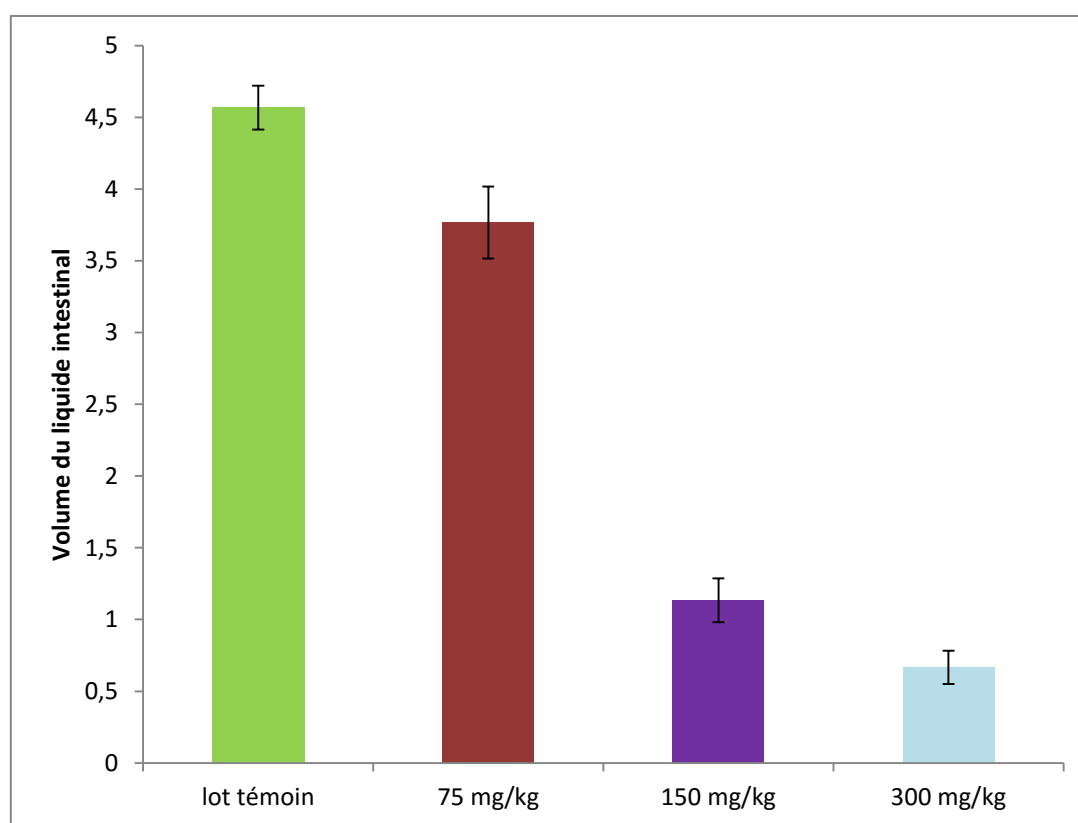






Figure 1. Variation de volume du fluide intestinal chez les témoins  et les animaux traités avec l'extrait HAN008 administré par voie orale chez le cobaye aux doses respectives de 75 , 150  et 300  mg/Kg ($\bar{x} \pm$ e.s.m; $n = 5$; $P < 0,05$).

2. Effet de HAN008 sur la motilité intestinale

L'acétylcholine a contracté l'iléon isolé de cobaye en fonction de la concentration dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale. Administré dans le bain au plateau de la contraction provoquée par l'acétylcholine, à partir de la concentration de 0,1mg/ml dans le bain, l'extrait relâche l'iléon. Ce relâchement de l'iléon augmente en fonction de la concentration de l'extrait HAN008 dans le bain et le relâchement total de l'organe est obtenu à la concentration de 3,2 mg/kg dans le bain, et la CE_{50} est égale à 1,2 mg/ml (Figure 2).

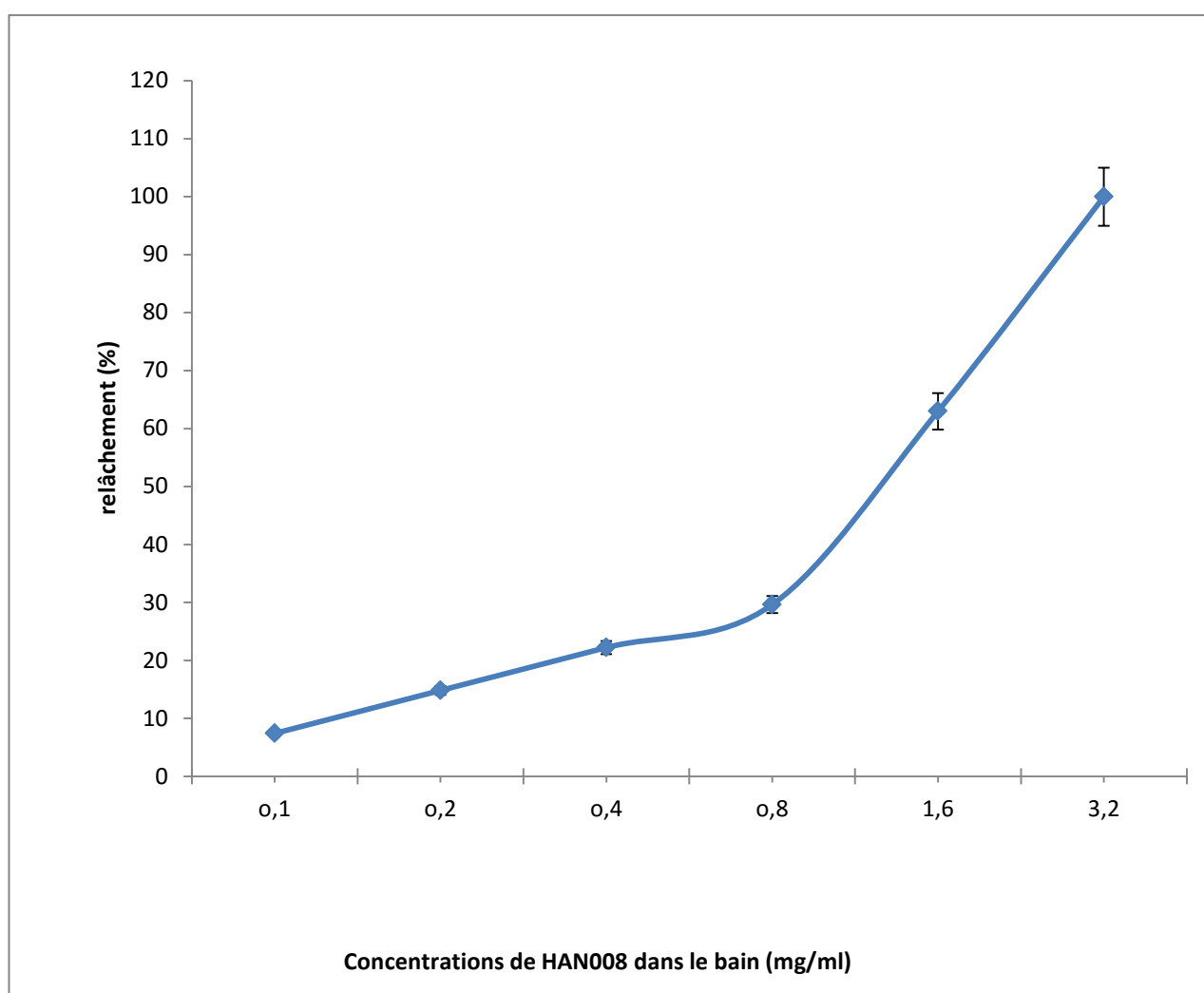


Figure 2. Variation du relâchement de l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'acétylcholine après injection de l'extrait HAN008 de façons cumulative dans le bain ($\bar{x} \pm e.s.m$; $n = 5$; $P < 0,05$).

3. Effet de l'extrait HAN008 vis-à-vis de l'acétylcholine

En pré incubant l'iléon avec l'extrait, l'effet maximal de l'acétylcholine diminue et sa CE_{50} augmente. En absence de l'extrait, la contraction de l'iléon est considérée comme 100 % avec une CE_{50} égale à $1,4 \cdot 10^{-11} M$. Par contre, en présence de l'extrait dans le bain, l'effet maximal de l'acétylcholine est réduit à $62,65 \pm 0,3$, $46,15 \pm 1,88$ et $40,67 \pm 1,97\%$ ($P < 0,05$) aux concentrations respectives de 0,125, 0,25 et 0,5 mg/ml (Figure 3).

D'autre part, la CE_{50} de l'acétylcholine augmente à $4,1 \cdot 10^{-11}$, $2,5 \cdot 10^{-9}$ et $4 \cdot 10^{-9} M$ en présence de l'extrait aux concentrations de 0,125, 0,25 et 0,5 mg/ml ($P < 0,05$) (Figure 3)

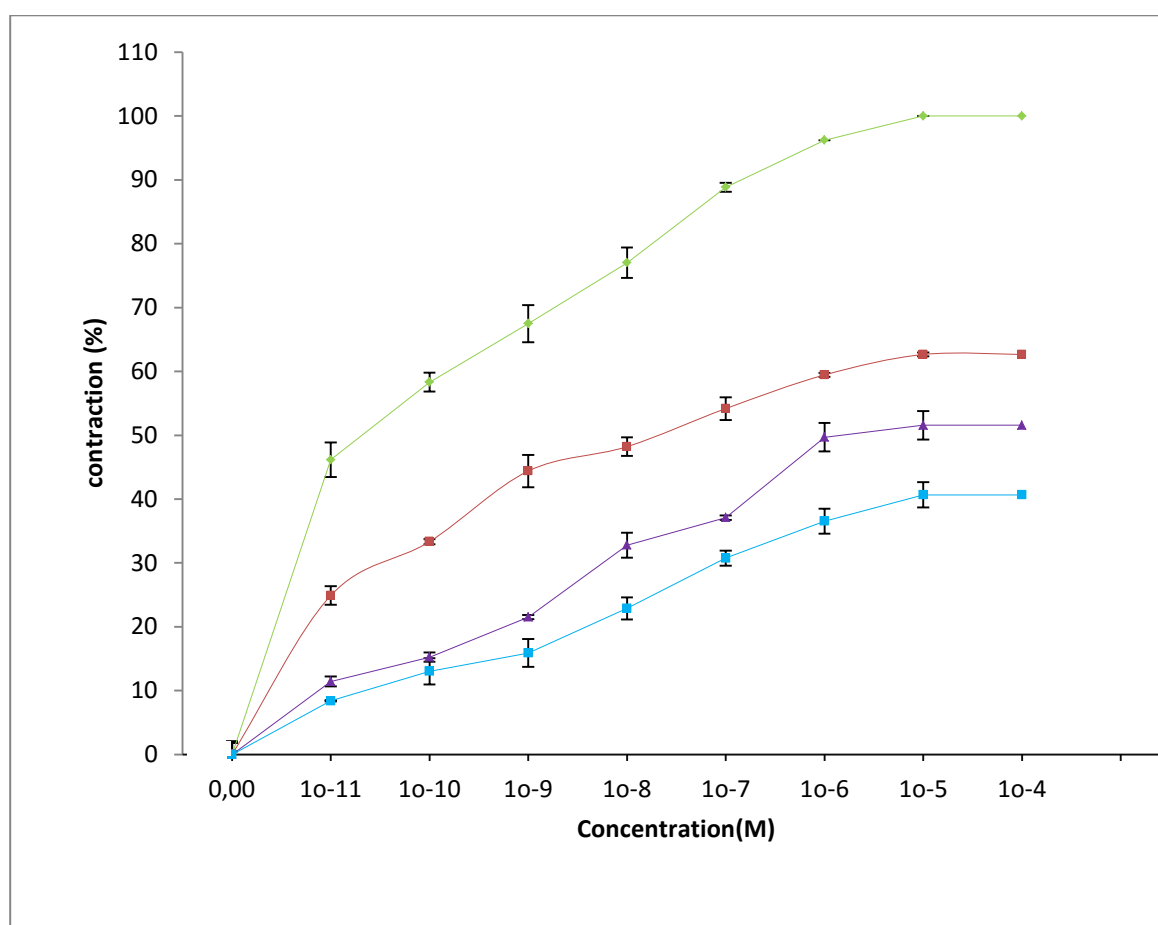


Figure 3. Variation de la contraction de l'iléon isolé de cobaye provoquée par l'acétylcholine injectée de manière cumulative dans le bain en absence ■ et en présence de l'extrait HAN 008 à 0,125 ■ ; 0,25 ■ et 0,50 ■ mg/ml ($\bar{x} \pm e.s.m$; $n=5$; $P < 0,05$)

DISCUSSION



IV. DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'activité d'une plante utilisée dans la région Boeny contre la diarrhée. Pour cela, des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués chez le cobaye. Son effet sur l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale a été étudié *in vivo* en provoquant la sécrétion intestinale avec l'huile de ricin. Tandis que son activité sur la motilité intestinale a été étudiée *in vitro* sur son effet contre la contraction provoquée par l'acétylcholine.

Après son administration par voie orale, l'huile de ricin est métabolisée et produit l'acide ricinoléique un métabolite qui irrite la paroi intestinale. Cette irritation change la perméabilité de la muqueuse intestinale vis-à-vis de l'eau et des électrolytes. Elle augmente la sécrétion et diminue la réabsorption par les cellules intestinales (PATIL V.V. et coll., 2012). Ce déséquilibre entraîne l'accumulation de liquide au niveau de l'intestin.

En outre, l'acide ricinoléique stimule la sécrétion de prostaglandines qui va inhiber l'absorption de NaCl accompagnée de l'eau. Il forme aussi avec le sodium ou le potassium des sels ricinoleates qui exercent une pression osmotique dans la lumière intestinale et inhibent l'absorption de l'eau et de sodium dans la lumière intestinale (WILLIAM S. et coll., 1976).

Les résultats montrent que le volume du liquide intestinal provoqué par l'huile de ricin chez les lots traités avec l'extrait HAN008 est inférieur à celui du lot témoin. Cette diminution de l'accumulation de fluide intestinal signifie qu'il inhibe la sécrétion ou augmente la réabsorption de liquide au niveau de la muqueuse intestinale. La présence de tanins ou d'alcaloïdes dans l'extrait HAN008 aurait pu provoquer cet effet anti-sécrétoire. En effet, QNAIS E. et ses collaborateurs (2012) ont rapporté que les tanins inhibent la sécrétion d'eau dans la lumière intestinale. Ce sont des composés astringents. Ils dénaturent les protéines responsables de la sécrétion intestinale en formant des tanates qui diminuent la sécrétion intestinale (TRIPATHI K., 1997). D'autre part, ils resserrent les pores intestinaux et empêchent la fuite d'eau vers la lumière intestinale. Les mêmes résultats ont été rapportés chez les *Moringa oleifera* (ANKITA M. et coll., 2014).

Par ailleurs, l'extrait HAN008 pourrait aussi agir en augmentant la réabsorption d'eau et d'électrolytes par les cellules intestinales. Les terpenoïdes pourraient être responsables de cet effet (EZEKWESILI J. et coll., 2010). Ils peuvent inhiber la sécrétion intestinale (VILLASSENOR et coll., 2004; PALOMBO E.A., 2005) ainsi que les prostaglandines (EZEKWESILI J. et coll., 2010).

Or, au niveau de l'intestin, les prostaglandines inhibent la réabsorption d'eau et électrolytes et en l'inhibant, les terpénoides diminuent l'accumulation de fluide intestinal.

L'accélération du transit intestinal est aussi à l'origine de la diarrhée. Les résultats obtenus lors du test *in vitro* montrent que l'extrait HAN008 relâche l'iléon contracté par l'acétylcholine, cela veut dire qu'il possède une activité antispasmodique (NIAZ A. et coll., 2014) et diminue la vitesse du transit intestinal. Il en résulte l'augmentation du temps de contact du contenu intestinal avec la paroi de l'intestin. Cette augmentation assure la meilleure réabsorption d'eau et d'électrolytes au niveau intestinal et le volume de fluide dans la lumière intestinale diminue (SHARKEY K. et WALLACE J., 2012).

En ce qui concerne l'action de l'extrait sur la contraction intestinale, il inhibe l'effet de l'acétylcholine de manière non compétitive. En effet, en présence de l'extrait, l'effet maximal de l'acétylcholine est déprimé et sa CE_{50} augmente. Des résultats qui signifient que la molécule active responsable de son activité sur l'iléon n'occupe pas les mêmes récepteurs que l'acétylcholine. L'hypothèse serait qu'elle agisse soit en modifiant la conformation du récepteur M3 cholinergique, soit elle se fixe sur les récepteurs alpha adrénergiques et provoque un effet propre antipéristaltique (ANAPUMA S. et coll., 2013). L'effet antispasmodique pourrait être attribué aux tanins ou aux alcaloïdes.

D'une part, les alcaloïdes ralentissent le péristaltisme intestinal en diminuant la contraction de muscle lisse intestinal (SCHORDERET M. et coll., 1992). Quant aux tanins, ils précipitent les protéines de la paroi intestinale et de cette manière, ils rendent les fibres musculaires intestinales moins excitables et diminuent la contraction intestinale, comme ce qui a été rapporté chez *Adansonia digitata* (KUMAR R. et coll., 2010).

Enfin, il se pourrait aussi que l'activité spasmolytique de l'extrait HAN008 serait due à l'inhibition de l'influx calcique ou bien de sa libération (QNAIS E.Y. et coll., 2007).

Comme l'extrait HAN008 contient plusieurs molécules qui ne sont pas encore purifiées, il est difficile de préciser la famille chimique active responsable de son mécanisme d'action.

CONCLUSION



V-CONCLUSION

Les études que nous avons menées sur l'extrait HAN008 montrent qu'il diminue l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale et relâche l'iléon isolé de cobaye contracté par l'acétylcholine. Ces deux activités sont à l'origine de la diminution d'une émission de selles liquides et fréquentes, traduisant une activité anti diarrhéique. Cette activité serait attribuée à l'une des familles chimiques présentes dans l'extrait telles les alcaloïdes, tanins ou terpenoïdes, sans négliger les autres familles chimiques qui pourraient être actives. En plus pour les tests *in vitro*, mener des recherches jusqu' au niveau cellulaire sera mieux au lieu de se limiter au niveau membranaire. Ceci permettra d'expliquer le mécanisme action de l'extrait.

BIBLIOGRAPHIE



VI-BIBLIOGRAPHIE

ANAPUMA S., VIKAS A., VEERMA R., ANIL B. (2013).

Evaluation of antidiarrheal activity of *Elytraria acaulis* extract on magnesium sulfate and castor oil diarrhea in wistar.

Malays. J. Pharma. Sci., **11**(2): 1-9.

ANKITA M., SHARAD S., MANJOOSHA S. (2014).

Evaluation of antidiarrheal potential of *Moringa oleifera* (Lam) leaves.

J. Pharmacogn. Phytochem., **2** (5): 43-46.

BEHSTASH G., SHANTI S. (2010).

Enteric Nervous System in the small intestine.

Pathophysiol. And Clin. Implication, **12**(5): 358-365.

BROWN J., TAYLOR P. (2000).

Muscarinic Receptor Agonist and Antagonist.

Ed. The pharmacological Basis of Therap., (NEW YORK), 115-158.

CESARD J.P., CHOURAQUI J.P., GIGARDET J.P., GOTTRAND F., BENHAMOU P.H.,
BOIGE N., FAURE C., GINIE S., LENAERTS C., MAHERZI A., MORALI A.,
MOUJENOT J.F., MOUTERDE O., OLIVES J.P., SARLES J., SCAILLON M., TURCK D.
(2002).

Traitements medicamenteux des diarrhées aiguës et infectieuses du nourrisson et de l'enfant.

Ed. Elsevier, (PARIS), Arch Pediatr. **9**: 620-628.

DEBRAY M., JACQUEMIN H., RAZAFINDRABAO R. (1971).

Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar.

Travaux et Documents ORSTOM N°8, **1** :150 – 151.

Enquêtes démographiques et de santé à Madagascar (2010).

INSTAT et ICF Macro., 1- 30.

ANTANANARIVO.

EZEKWESILI J., NKEMDILIM U., OKEKE C. (2010).

Mechanism of antidiarrhoeal effect of ethanolic extract of *Psidium guyava* leaves.

Biochem., **22** (2): 85-90.

- FERRER S., STRIRIA A., JESUS S., RIBEIRO H. (2008).
A hierarchical model for studying risk factors for childhood diarrhea: a case-control study in a middle-income country.
Int. J. Epidemiol., **37**(4): 805-815.
- FONG H.H.S., TIN W., FARNSWORTH N. (1977).
Screening plants.
Rev. Pharmacol. University of Illinois, (CHICAGO), **275**: 6-7.
- GEOFFREY L. (2001).
Tolerance of Low-digestible Carbohydrates.
Br. J. Nutr., **85**: 7-16.
- KITCHEN I. (1984).
Text book of in vitro Practical Pharmacology.
Ed. Blackwell. Chicago, 33-118.
- KUMAR R., SHARMA R., BAIRW A., ROY R. (2010).
Pharmacological review on natural antidiarrhoeal agents.
Der. Pharma. Chem., **2** : 66-93.
- MAMILAINORO L. (1996).
Etude de l'activité anti-diarrhéique des extraits bruts de plante D2.
Mémoire de DEA de Pharmacologie.
Faculté des Sciences Université d'Antananarivo, 14-21.
- MEHA N., GUPTA R., DUMORE N., DANAOK K. (2015).
In vivo wound healing activity of *Cajanus cajan* on burn wound model in mice regulating antioxidant and inflammatory mediators.
J. Pharma. care health syst.
- MEHEMOOD H., SALMAN H., GILANI A. (2011).
The antidiarrheal and spasmolytic activities of *Phyllanthus emblica* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca²⁺ channels.
J. Pharmacol., **133**: 856-865.

MOHAMMED A., AHMED H., GOJI A., OKPANACHI A., EZEKIEL I., TANKO Y. (2009).

Preliminary Anti-diarrheal activity of ethanolic stem bark extract of *Indigo pulchra* Linn. In rats.

Songklanakarim J. Sci. Tecnol., **34** (3): 317-322.

MOURI G., GOUTAM P. (2013).

Intestinal dysfunction and alteration of various systemic and morphometric characters in albinos rats under stress of inorganic arsenic compounds.

Int. J. Pharm. Bio. Sci., **4** (2): (B) 1008-1016.

NAKARUMA S., HONGO R., MOJI K., OKU T. (2007).

Suppressive effect of partial hydrolysed guar gum on transitory diarrhea induced by ingestion of mannitol and lactitol in healthy humans,

Eur. J. Clin. Nutr., **61**: 1086-1093.

NIAZ A., HIN A., ASLAM K. (2014).

Antispasmodic and antidiarrhoeal activity of fruit of *Rosa moschata*.

BMC Complementary and Alternative Medicine, **14**: 485- 487.

NICOLAS J.P. (2012).

Plantes médicinales du Nord de Madagascar. Ethnobotanique Antakarana et Informations Scientifiques.

Ed. Jardin du Monde, (France), 41-100.

OBEN J., ASSI S., ABGOR G., MUSARO D. (2006).

Effect of *Eremomastax speciosa* on experimental diarrhea.

Afr. J. Trad. Complement. Altern. Med., **3** (1): 95-100.

OMS (2014).

Les maladies antidiarrhéiques.

Prévalence de la diarrhée.

Rev. WHO/ CDD/ SER/ 80.2.

PALOMBO E. (2005).

Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhea: mode of action and effects intestinal function.

Phytother. Res., **20**: 717-724.

PATIL V., BANGHALE S., CHAUDHARE K. (2012).

Evaluation of antidiarrheal activity of plants extracts of *Ficus species*.

J. Chin. Integr. Med., **10** (3): 347-352.

PETIT JEAN M., RAKOTOVAO L., RASOANAIVO M. (1992).

Les plantes utiles de Madagascar- Inventaires genres, espèces et variétés.

Académie de Madagascar, Tome II, 336-339.

PIZZARO-CERDA J., COSSART P. (2006).

Bacterial adhesion and entry into host cells.

Cell., **124**: 715-727.

PRASHANT B., SADHANA R., SUVARNA T. (2012).

Evaluation of antidiarrhoeal effect of *Pipper nigrum L.*

As. J. Plant Sci.Res., **2**(1): 48-53.

PRUSS-USTUN A., CORVALAN C. (2006).

Preventing diseases through healthy environments.

Towards an estimate of the environment burden of disease. (FRANCE), 34-42.

World Health Organisation.

QNAIS E., ABU Y., ABDULLA F. (2007).

Antidiarrheal activity of the aqueous extract of *Punica granatum* Peels.

Pharm. Biol., **45**(9): 715-720.

QNAIS E., ABU Y., ABDULLA F., (2012).

Antidiarrheal activity of *Laurus nobilis* leaf extract in rats.

J. Med. Food, **15**(1): 51-57.

RABESSA Z.A., RANDRIANASOLO S., RASOLOMANANA J.C.,

RANDRIAMIZANA J.P. (1986).

Pharmacopée de l'Alaotra.

Ed., ANTANANARIVO, 90-91.

ROBERT A., NEZAMIS J., LANCASTER C., HANCHAR A., KLEPPER M. (1976).

Enteropooling Assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins.

Prostaglandins, **11**: 809-828.

SCHORDERET M., ALBIN H., BOURIN M., ESCOUSSE A., JAILLO P., LAROUSSE C.,

LAXARENNE J. (1992).

Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.

2^{ème} Ed. frisson Roche Paris : 296-297.

SHARKEY K., WALLACE J. (2012).

Treatment of disorders of bowel motility and water flux; antiemetics; agents used in biliary and pancreatic diseases.

Eds. Las Bases Farmacologicas de la Terapeutica, (MEXICO), 1323-1950.

SHIFFERIE F., SHIBESHI W. (2013).

In vivo antidiarrheal and *ex-vivo* spasmolytic activities of the aqueous extract of roots of *Fechinops kebericho* (ASTERACEAE) in rodents and isolated guinea-pig ileum.

Int. J. Pharmacol., **2** (7): 110-116.

TRIPATHI K. (1997).

Essentials of Medical Pharmacology.

Ed. Jaypee Brother Medical Publishers, (NEW DEHLI), 610-620.

VELAZQUEZ C., CALZADA F., TORRES J., GONZALEZ F., CEBALLOS G. (2006).

Antisecretory of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico.

J. Ethnopharmacol., **103**: 66-70.

VILLASENOR, CANLAS A., FAUSTINO K., PLANA K. (2004).

Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusamasam* leaves.

J. Pharmacol., **92**(1): 53-56.

VISWANATHAN V., HODGES K., HECHT G. (2009).

Enteric Infection meets intestinal function: How bacterial pathogens causes diarrhoea.

Nat. Rev. Microbiol., **7**(2): 110-119.

WILLIAM S., VILZA L., LYND A. B., PAUL B., WARD A. (1976).

The effects of Sodium Ricinoleate on small intestine function and structure.

J. Clin. Invest., **58**: 380-390.

YASMEEN M., PRABHU B., AGASHIKAR (2010).

Evaluation of the antidiarrhoeal activity of the leaves of *Ixora coccinea* in rats.

J. Clin. Diagn. Res. **4** : 3298-3308.

YIMER M., GEZHAGNE M., BIRUK T., DINAOL B. (2015).

Rev. Major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method.

J. Veterinary Med. And an Health, **7** (5): 173-185.

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-DIARRHEIQUE DE L'EXTRAIT HAN008 CHEZ LE COBAYE

NOM : RASOAMIHAMINA Flavienne Albertine

Tel : 034 92 748 74

Année : 2015-2016

Adresse : Lot IIF3JP Andraisoro

Encadreur : Pr RANDIMBIVOLOLONA

Fanantenanirainy

Laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie

BP : 8357

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 HAN008. Son effet anti-sécrétoire a été étudié *in vivo* contre la diarrhée sécrétoire provoquée par l'huile de ricin administrée par voie orale. Son effet sur la motilité intestinale a été étudié *in vitro* sur l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'acétylcholine. L'extrait HAN008 diminue le volume de fluide intestinal provoqué par l'huile de ricin qui est égal à $4,57 \pm 0,15$ ml chez le témoin, contre $3,77 \pm 0,25$ et $0,67 \pm 0,12$ ml respectivement chez les animaux traités avec l'extrait aux doses de 75 et 300 mg/Kg ($P < 0,05$). *In vitro*, l'extrait inhibe la contraction de l'iléon isolé provoquée par l'acétylcholine avec une CE_{50} de 1,2 mg/ml. Cette inhibition est non compétitive, en absence de l'extrait, l'effet maximal de l'acétylcholine est de 100% avec une CE_{50} de $1,4 \cdot 10^{-11}$ M, contre $62,65 \pm 0,3$, $46,15 \pm 1,88$ et $40,67 \pm 1,97$ % d'effet maximal en présence de l'extrait HAN008 aux concentrations de 0,125, 0,250 et 0,50 mg/ml ($P < 0,05$), et la CE_{50} augmente à $4,1 \cdot 10^{-11}$, $2,5 \cdot 10^{-9}$ et $4 \cdot 10^{-9}$ M en présence de l'extrait aux concentrations de 0,125, 0,25 et 0,5 mg/ml ($P < 0,05$). L'extrait possède une activité anti-diarrhéique.

L'extrait contient des stéroïdes, des tanins, des alcaloïdes, des triterpènes, des anthocyanes et des sucres réducteurs. L'activité anti-diarrhéique de cet extrait pourrait être due à la présence de tanins, d'alcaloïdes ou de terpénoïdes.

Mots clés: anti-diarrhéique, antispasmodique, anti-sécrétoire, huile de ricin.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the activity of extract HAN008. Its anti-secretory effect was studied *in vivo* by inducing secretory-diarrhea by the oral administration of castor oil to guinea pigs whereas *in vitro* tests were carried out on isolated guinea pig ileum contracted with acetylcholine to study its intestinal motility effect. The extract HAN008 reduces the volume of castor oil induced intestinal fluid from 4.57 ± 0.15 ml of the control animals to 3.77 ± 0.25 and 0.67 ± 0.12 ml of the animals treated with the extract at the doses 75 and 300 mg/kg respectively ($P < 0.05$). *In vitro*, extract HAN008 inhibits in a non-competitive manner the acetylcholine induced contraction of isolated ileum with an EC_{50} equal to 1.2mg/ml. The maximal effect of acetylcholine, in the absence of the extract is 100 % with an EC_{50} of 1.4×10^{-11} M. In the presence of the extract at concentrations of 0.125, 0.250 and 0.50 mg/ml, this effect is reduced to 62.65 ± 0.3 , 46.15 ± 1.88 and 40.67 ± 1.97 % respectively while the EC_{50} increases 4.1×10^{-11} , 2.5×10^{-9} and 4×10^{-9} M respectively ($P < 0.05$). These results show that the extract possesses an anti-diarrheal activity.

The extract HAN008 contains steroids, tannins, alkaloids, triterpenes, anthocyanins, and reducing sugars. This anti-diarrheal activity could be attributed to the presence of the tannins, alkaloids and terpenoids in the extract.

Key words: antidiarrheal, antispasmodic, anti-secretory, castor oil