



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

**DOMAINE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES**



**MENTION PHYSIOLOGIE ANIMALE, PHARMACOLOGIE,
COSMETOLOGIE**

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



Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études en MASTER

Option : PHARMACOLOGIE

**ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-DARRHEIQUE DE
L'EXTRAIT IS-015 CHEZ LE COBAYE**

Présenté par

RASAMISON Ihoby

Le 19 Avril 2016

Devant le Jury composé de :

Président	: Mr RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainy	Professeur Titulaire
Rapporteur	: Mme RANDRIANAVONY Patricia	Docteur HDR
Examineur	: Mr RAKOTOARISON Olivier	Docteur

RASAMISON Ihoby

Lot II F 34 L bis BQ Antsahanierana

iubyrasami@gmail.com

034 61 112 61



ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI DIARRHEIQUE DE L'EXTRAIT IS-015 CHEZ LE COBAYE

Promotion **FANAZAVA**



Option : Pharmacologie

Rapporteur : Madame RANDRIANAVONY Patricia, Docteur HDR
Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de
Cosmétologie

BP : 8357

E-mail : frandimbi@gmail.com

**DOMAINE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
UNIVERSITE D'ANTANANARIVO**

Remerciements

Au terme de la réalisation de ce mémoire, je tiens à exprimer mes reconnaissances :

- ❖ A Monsieur le Professeur Titulaire RANDIMBIVOLOLONA Fanantenirainy de m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury de ce travail. Pour vos conseils et vos contributions à la réalisation de ce travail, acceptez toute ma considération et ma profonde gratitude.
- ❖ Au Docteur-HDR RANDRIANAVONY Patricia, chef du Département de Pharmacologie et de Physiologie Animale pour votre aide, soutien et vos conseils, sans oublier votre grande disponibilité et le temps que vous m'avez accordé malgré vos lourdes responsabilités. Permettez-moi d'exprimer ma gratitude et mon profond respect.
- ❖ Au Docteur RAKOTOARISON Olivier d'avoir accepté de juger mon travail. Merci pour votre aide et pour les corrections que vous avez apportées pour la réalisation de ce travail. Je vous suis vraiment reconnaissante.
- ❖ A tous les enseignants du Département de Physiologie Animale et de Pharmacologie de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo qui ont déployé leurs efforts pour ma formation en Pharmacologie. Je tiens à vous adresser mes sincères remerciements.
- ❖ A ma famille qui m'a toujours soutenu et a tout fait pour que je réussisse à mes études. Je vous en remercie profondément.
- ❖ À la promotion FANAZAVA, merci pour notre solidarité, les moments passés, les coopérations et l'équipe qu'on a fait durant toutes ses années en Pharmacologie.

TABLE DES MATIERES

Remerciements .	
TABLE DES MATIERES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	II
LISTE DES ABREVIATIONS.....	III
INTRODUCTION.....	4
MATERIELS ET METHODES.....	4
I. PARTIE CHIMIQUE.....	4
1. Préparation de l'extrait.....	4
2. Criblage phytochimique.....	4
II. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	6
1. Étude de l'effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée sécrétoire.....	6
2. Étude de l'effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée motrice.....	6
a. Étude de l'effet relaxant de l'extrait IS-015.....	7
b. Étude de l'effet de l'extrait IS-015 vis-à-vis de l'acétylcholine.....	7
III. EXPRESSION ET ANALYSES DES RÉSULTATS.....	8
RESULTATS.....	9
I. PARTIE CHIMIQUE.....	9
II. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	9
1. Effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée sécrétoire.....	9
2. Effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée motrice.....	10
3. Effet de l'extrait IS-015 vis-à-vis de l'acétylcholine.....	11
DISCUSSION.....	13
CONCLUSION.....	15
BIBLIOGRAPHIES.....	16

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: tests effectués pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait IS-015 (FONG H.H.S et coll., en 1977).....	5
Tableau II: les familles chimiques présentes dans l'extrait IS-015.....	9

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Volume du fluide intestinal provoquée par le $MgSO_4$ administré par voie orale, chez les témoins et les cobayes traités avec l'extrait IS-015 à la dose de 200 et 400 mg/kg) par voie orale ($x \pm e.s.m$, $n=3$, $p < 0,05$).....	10
Figure 2: relâchement de la contraction maximale de l'iléon isolé de cobaye provoqué par l'acétylcholine 10^{-4} M en fonction de la concentration de l'extrait IS-015 d'une manière cumulative dans le bain ($x \pm e.s.m$, $n=3$, $p < 0,05$)	11
Figure 3: contraction de l'iléon isolé de cobaye, provoquée par l'acétylcholine administrée d'une manière cumulative dans le bain en absence et en présence de l'extrait IS-015 aux concentrations de 0,125 mg/ml et de 0,25 mg/ml dans le bain ($x \pm e.s.m$, $n=3$, $p < 0,05$). 12	

LISTE DES ABREVIATIONS

- ❖ % : pourcent
- ❖ < : inférieur
- ❖ μl : microlitre
- ❖ **ach** : acétylcholine
- ❖ **Cm** : centimètre
- ❖ **CE₅₀** : concentration efficace pour 50% d'effet
- ❖ **EtOH-H₂O** : mélange éthanol-eau
- ❖ **e.s.m.** : erreur standard moyenne
- ❖ **g** : gramme
- ❖ **g/kg** : gramme par kilogramme
- ❖ **L** : Litre
- ❖ **LPGPC** : Laboratoire de Pharmacologie Générale, Pharmacocinétique et Cosmétologie
- ❖ **M** : mole
- ❖ **mg** : milligramme
- ❖ **mg/kg** : milligramme par kilogramme
- ❖ **mg/ml** : milligramme par millilitre
- ❖ **ml/kg** : millilitre par kilogramme
- ❖ **ml** : millilitre
- ❖ **mM** : millimole
- ❖ **°C** : degré Celsius
- ❖ **p** : degré de signification
- ❖ **x** : moyenne

INTRODUCTION

A l'échelle mondiale, 400 millions de cas de diarrhée sont recensés par jour (DOSSO M. et coll., 1998). La diarrhée figure parmi les causes de mortalité les plus importantes chez les enfants (HUBER-GIESKE T. et BICHARD P., 2013), elle constitue la deuxième cause de décès des enfants de moins de 5 ans après la pneumonie (FARTHING M., 2012). Elle est liée aux mauvaises conditions d'hygiène locale, à la malnutrition et aux moyens sanitaires limités, et de ce fait elle touche en particulier les régions pauvres (MINSAN., 2012). Dans les pays industrialisés, la mortalité est faible en raison de meilleures conditions d'hygiène et de vie (EMILY W., 2012). A Madagascar, la diarrhée reste courante aussi bien dans les zones urbaines que rurales. Selon l'Annuaire du Ministère de la Santé et du Planning Familial en 2003, la diarrhée est la troisième cause de consultation au niveau des centres de santé, et la troisième cause principale de mortalité infantile après la pneumonie et le paludisme.

La diarrhée est caractérisée par l'émission de selles molles, voire liquides, en quantité anormale avec une fréquence élevée (RANDREMANANA R., 2012). Elle est due au déséquilibre entre l'absorption et la sécrétion intestinale d'eau et d'électrolytes (CEZARD J.P. et coll., 2002). Environ 9 L de fluide par jour transitent dans l'intestin. Ce fluide est constitué des sucs digestifs et d'eau apportée par la nourriture. A l'état normal, la majorité de ce fluide est absorbée par l'organisme au niveau de l'intestin grêle, le colon en absorbe 1 à 1,5 L et les selles ne contiennent plus qu'environ 100 ml d'eau par jour (ENGRAND N., 2010). L'eau et les électrolytes sont absorbés au niveau de l'épithélium intestinal par le cycle entéro-systémique de l'eau. La réabsorption de l'eau est secondaire à la réabsorption du sodium, elle-même secondaire à la réabsorption de glucose dans la lumière intestinale (DESJEUX J.F., 1985).

Selon sa durée, la diarrhée peut être classée en diarrhée aiguë et diarrhée chronique. La diarrhée aiguë est caractérisée par un début brutal et une durée limitée, tandis que la diarrhée chronique s'étend sur une période excédant les trois semaines (KENNE FOPA O., 2005).

La cause la plus fréquente de la diarrhée aiguë est une infection intestinale. Des germes invasives comme *Shigella*, *Salmonella* pénètrent dans la paroi intestinale et provoquent la destruction des microvillosités. Ils modifient le processus de transport épithélial et perturbent l'absorption de l'eau et d'électrolyte (BELAICHE J., 2000). Les germes entérotoxigènes se fixent sur la paroi intestinale et produisent des toxines qui endommagent les cellules épithéliales et stimulent la sécrétion d'eau et d'électrolytes,

entraînant ainsi une accumulation d'eau dans la lumière intestinale. Les rotavirus, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* entérotoxigènes font partie de ce groupe. (AUBRY P. 2013 ; CATHERINE D., 1997).

L'anxiété, le stress, les émotions intenses peuvent aussi provoquer la diarrhée. Ils accélèrent le transit intestinal, diminuent ainsi l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau (DERVAUX J.L., 2008).

D'autre part, selon les mécanismes mis en jeu, la diarrhée peut être classée en diarrhée sécrétoire, osmotique et motrice. La diarrhée **sécrétoire** est due à une irritation des cellules épithéliales de l'intestin. Cette irritation perturbe les mouvements d'eau et d'électrolytes à travers la membrane intestinale et engendre une augmentation du fluide dans la lumière intestinale (BELAICHE J., 2000). L'irritation des cellules épithéliales peut être due à des toxines, à des infections parasitaires intestinales, à des agents irritants ou à certains médicaments. Les aliments non digérés peuvent aussi contenir d'acide gras ou d'autres produits qui irritent la paroi intestinale et provoquent une hypersécrétion intestinale (CAMILLERI M., 2008). Tandis que la diarrhée **osmotique** est due à la présence des molécules osmotiquement actives ingérées, ou des produits de l'indigestion qui sont peu ou pas absorbés par l'intestin grêle. Ces molécules attirent et retiennent l'eau dans la lumière intestinale (LUDWIG T.H. et URSULA F., 2003). Quant à la diarrhée **motrice**, elle est la conséquence de l'accélération de la vidange gastrique ou de la motricité intestinale. Elle entraîne l'arrivée d'une quantité excessive d'aliments non digérés dans le colon (DELVAUX M. et GAY G., 2006).

Selon les causes de la diarrhée, les médicaments anti-diarrhéiques sont classés en médicaments antisécrétoires, ralentisseurs de transit intestinal et adsorbants. Les anti-sécrétoires inhibent l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau de l'intestin en inhibant l'enképhalinase, une enzyme membranaire qui dégrade les enképhalines. En effet l'inhibition de la dégradation de l'enképhaline entraîne une augmentation du taux d'enképhalines dans la muqueuse intestinale, or en se fixant sur les récepteurs μ , l'enképhaline diminue la sécrétion intestinale et empêche la sortie d'eau et d'électrolyte ; le Racecadotril (Tiorfan®) est un exemple de médicaments anti sécrétoires (LAURANS M. et coll., 1999). Tandis que les ralentisseurs de transit, ralentissent le péristaltisme colique. En stimulant les récepteurs opioïdes, ils diminuent la motricité intestinale et favorisent ainsi la réabsorption du flux hydro-électrolytique depuis la lumière intestinale vers le pôle

plasmatique des entérocytes (AUDHOUI J.L. et coll., 2010). Les opiacés font partie de cette classe, par exemple le Lopéramide® agit sur les récepteurs μ et diminue le péristaltisme intestinal (CEZARD J.P. et coll., 2002). Enfin, les adsorbants tapissent la paroi intestinale et protègent ainsi la muqueuse intestinale. Ils augmentent la consistance de selles et adsorbent en même temps les gaz associés éventuels, sans diminuer les pertes hydro électrolytique comme les silicates (CEZARD J.P. et coll., 2002).

Bien que la médecine moderne propose une large diversité d'anti-diarrhéique, une proportion non négligeable de la population dans les pays en voie de développement compte encore sur les plantes médicinales pour leurs soins de base (ZHANG X. et coll., 1998). Les plantes médicinales prennent une place importante dans la vie quotidienne de la population Malagasy, aussi bien en milieu urbain qu'en milieu rural (RANARIJAONA H.L.T. et coll., 2009).

Beaucoup de plantes sont utilisées contre la diarrhée à Madagascar, citons par exemple l'*Andasonia digitata*, *Psidium guyava* ou *goavy*, *Spilanthus oleracea* L. ou *agnamafagna*, *Ageratum conyzoides* ou *bemaimbo*, *Heritiera littoralis* ou *voarongy* (NICOLAS J.P., 2012). La plante que nous avons sélectionné appartient à la famille des SOLANACEAE, un décocté préparé à partir de ses feuilles est utilisé empiriquement contre la diarrhée par les villageois d'Ambodiala, appartenant au district d'Andramasina dans la région d'Analamanga. Pour évaluer son activité anti diarrhéique, deux tests ont été effectués: un *test in vivo* pour étudier son activité anti-sécrétoire et un test *in vitro* pour étudier son activité sur la motilité intestinale.

MATERIELS ET METHODES

I. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Pour préparer l'extrait IS-015, des feuilles d'une plante utilisée par la communauté d'Ambodiala, dans la région d'Analamanga ont été récoltées dans les champs de culture d'Ambodiala, le mois de Novembre 2014. Elles ont été séchées à l'ombre à la température ambiante, dans une salle aérée pendant un mois. Après séchage, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau électrique, et 500 grammes de la poudre ainsi obtenue ont été macérés dans un mélange d'EtOH-H₂O dans une proportion (60:40) à la température ambiante. Le macérât a été filtré à l'aide d'un papier Whatman, et le filtrat a ensuite été évaporé à sec, sous vide à l'aide d'un Rotavapor (Büchi ®) à la température de 80°C. L'extrait hydro alcoolique obtenu après l'évaporation a été codé IS-015, puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction selon la formule:

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Poids de l'extrait}}{\text{poids de la poudre}} \times 100$$

2. Criblage phytochimique

Pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait IS-015, un criblage phytochimique a été effectué selon la méthode de FONG H.H.S et ses collaborateurs (1977). Des réactifs spécifiques pour chaque famille chimique ont été utilisés, la présence de la famille chimique correspondante provoque une réaction de précipitation ou de changement de couleur de l'extrait (Tableau I).

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

- (±) : présence en très faible quantité
- (+) : présence en faible quantité
- (++) : Présence en moyenne quantité
- (+++): Présence en forte quantité

Tableau I: tests effectués pour déterminer les familles chimiques présentes dans l'extrait IS-015 (FONG H.H.S et coll., en 1977).

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observation
ALCALOÏDES		DRAGENDORFF, MAYER, WAGNER	Précipitation
TANNINS		Gélatine + NaCl	Précipitation verte
		Gélatine + FeCl ₃ Méthanol	Précipitation bleue
COMPOSES PHENOLIQUES		Gélatine 1%	Précipitation
STEROIDES ET TRITERPENES	LIEBERMAN 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		+ 3Volumes 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

II. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

L'activité anti diarrhéique de l'extrait IS-015 a été étudiée *in vitro* sur sa capacité à réduire la motilité intestinale provoquée par l'acétylcholine, et l'accumulation de fluide intestinal provoquée par le sulfate de magnésium *in vivo* chez les cobayes.

1. Étude de l'effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée sécrétoire

L'effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée sécrétoire a été étudié sur son effet sur l'accumulation de fluide intestinal provoquée par le MgSO₄ administré par voie orale (ROBERT A. et coll., 1976).

Des cobayes des deux sexes, pesant entre 200 et 250 g ont été utilisés. Ils ont été élevés à l'animalerie de LPGPC, nourris avec des graminées fraîches. Ils ont été mis à jeun 18 heures avant la manipulation, mais ont eu accès libre à l'eau, puis répartis en trois lots: un lot témoin et deux lots traité avec deux doses de l'extrait IS-015.

Les animaux du lot témoin ont reçu de l'eau distillée, tandis que les animaux du deuxième lot ont reçu 200 mg/kg de l'extrait IS-015, et ceux du troisième lot ont reçu 400 mg/kg d'extrait par voie orale dans un volume de 10 ml/kg (SHAMKUWAR P.B et PAWAR D. P., 2013).

Trente minutes après l'administration de ces produits, le MgSO₄ a été administré par voie orale à la dose de 2 g/kg, dissous dans un volume de 10 ml/kg chez tous les animaux pour provoquer une accumulation d'eau dans la lumière intestinale (DOHERTY S.N., 1981).

Quarante-cinq minutes après l'administration du MgSO₄, les animaux ont été sacrifiées et une laparotomie a été effectuée. L'intestin a été ligaturé au niveau du pylore et de la jonction iléocæcale puis prélevé dans sa totalité. Le contenu intestinal a été recueilli dans un récipient gradué et son volume a été mesuré (ROBERT A. et coll., 1976).

2. Étude de l'effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée motrice

L'effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée motrice a été étudié *in vitro* par son action sur la contraction de l'iléon isolé provoquée par l'acétylcholine (FERRON F., 2008) en absence et en présence de l'extrait.

Des cobayes des deux sexes pesant entre 200 et 250 g ont été utilisés. Ils ont été élevés à l'animalerie de LPGPC, nourris avec des graminées fraîches et ont eu de l'eau à volonté. Ils ont été mis à jeun 18 heures avant la manipulation. Pour isoler l'iléon, l'animal a été sacrifié

puis une laparotomie a été effectuée, et une portion de 2 cm de l'iléon a été isolée. L'organe a été placé dans une boîte de Pétri contenant une solution de Tyrode aérée avec de l'air, et les méésentères ont été enlevés. La composition de la Tyrode est la suivante (mM/l): KCl 2,7; NaCl 136,9 ; MgCl₂ 1,1 ; NaHCO₃ 11,9 ; NaH₂PO₄ 0,4 ; glucose 5,6 ; CaCl₂ 1,8 (pH 7,4) (FISSEHA S. et WORKINEH S., 2013).

Les deux extrémités de l'iléon ont été attachées avec du fil à coudre non extensible, et l'une de ses extrémités a été fixée au fond de la cuve à organe isolé, tandis que l'autre extrémité a été reliée au stylet d'un tambour rotatif avec un contrepoids de 1 g. Vingt millilitres de solution de Tyrode maintenue à 37°C et aérée avec de l'air ont été mis dans la cuve à organe (SADRAEI H. et coll., 2011).

a. Étude de l'effet relaxant de l'extrait IS-015

L'organe a été laissé se stabiliser dans la cuve pendant quarante-cinq minutes, et la préparation a été rincée toutes les quinze minutes. Après le dernier rinçage, l'organe a été sensibilisé avec de l'acétylcholine à la concentration finale de 10⁻⁵ M dans le bain, la préparation a été ensuite de nouveau rincée et laissée s'équilibrer pendant quarante-cinq minutes en rinçant toutes les quinze minutes (NJINGA N.S. et coll., 2013).

Après cette période de stabilisation, l'organe a été contracté avec de l'acétylcholine injecté dans le bain d'une manière cumulative, pour obtenir des concentrations croissantes dans le bain, jusqu'à la contraction maximale.

Au plateau de la contraction, l'extrait IS-015 a été injecté dans le bain d'une manière cumulative jusqu'au relâchement total de l'iléon contracté avec l'acétylcholine.

b. Étude de l'effet de l'extrait IS-015 vis-à-vis de l'acétylcholine

Pour étudier l'effet de l'extrait sur l'activité de l'acétylcholine, l'iléon a été contracté avec l'acétylcholine en absence et en présence de l'extrait (MEHMOOD H. et coll., 2011).

Après la période d'équilibration, l'iléon isolé a été contracté avec l'acétylcholine injectée dans le bain d'une manière cumulative jusqu'à l'obtention de la contraction maximale. Ensuite, la préparation a été rincée trois fois en quarante-cinq minutes et l'iléon a été mis en contact avec l'extrait IS-015 dont la concentration finale dans le bain a été de 0,125 mg/ml. Après dix minutes d'incubation dans le bain contenant de l'extrait, l'acétylcholine a été injecté dans le bain d'une manière cumulative afin de réaliser des concentrations croissantes

dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale. Ensuite, la préparation a été rincée puis laissée se stabiliser de nouveau pendant quarante-cinq minutes tout en la rinçant toutes les quinze minutes.

La même manipulation a été répétée en pré-incubant l'organe dans un bain contenant l'extrait IS-015 à la concentration de 0,25 mg/ml.

L'amplitude de la contraction provoquée par l'acétylcholine en absence et en présence de l'extrait a été mesurée puis exprimée en pourcentage par rapport à la contraction maximale provoquée par l'acétylcholine seule. Les valeurs des CE_{50} ont été ensuite déterminées graphiquement sur un papier semi log.

Le volume des produits injectés dans le bain a été fixé à 20 μ l pendant toutes les manipulations, pour ne pas modifier le volume du bain (CAVALCANTE A.F. et coll., 2012).

III. EXPRESSION ET ANALYSES DES RÉSULTATS

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne avec écart type standard moyen (e.s.m.), puis comparées entre elles en utilisant le test « t » de Student, une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

RESULTATS

I. PARTIE CHIMIQUE

Vingt-neuf grammes d'extrait sont obtenus avec les 500 g de poudre macérés dans le mélange EtOH-H₂O (60:40) ce qui correspond à un rendement de 5,8 %. Le criblage phytochimique révèle la présence en forte quantité de saponines, de sucres réducteurs, de stérols ainsi que de tannins dans l'extrait. Par contre, les alcaloïdes, les polyphénols et les terpénoïdes se trouvent en quantité moyenne. Enfin, les polysaccharides, anthocyanes et flavonoïdes sont présentes en faible quantité (tableau II).

Tableau II: les familles chimiques présentes dans l'extrait IS-015.

FAMILLES CHIMIQUES	TENEUR
Saponines	+++
Sucres réducteurs	+++
Stérols	+++
Tannins	+++
Terpénoïdes	++
Alcaloïdes	++
Polyphénols	++
Polysaccharides	+
Flavonoïdes	+
Anthocyanes	+

II. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

1. Effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée sécrétoire

L'administration de MgSO₄ par voie orale provoque une accumulation de fluide dans l'intestin des cobayes (enteropooling). L'administration de l'extrait IS-015 par voie orale diminue cet enteropooling en fonction de la dose administrée par rapport au témoin.

Le volume du fluide intestinal du lot témoin est de $3,23 \pm 0,06$ ml, contre $2,76 \pm 0,16$ et $1,6 \pm 0,34$ ml aux doses de 200 et 400 mg/kg ($p < 0,05$). Soit une diminution de $22,38 \pm 2,41$ %, et $55,98 \pm 4,81$ % aux doses respectives de 200 et 400 mg/kg ($p < 0,05$) (figure 1).

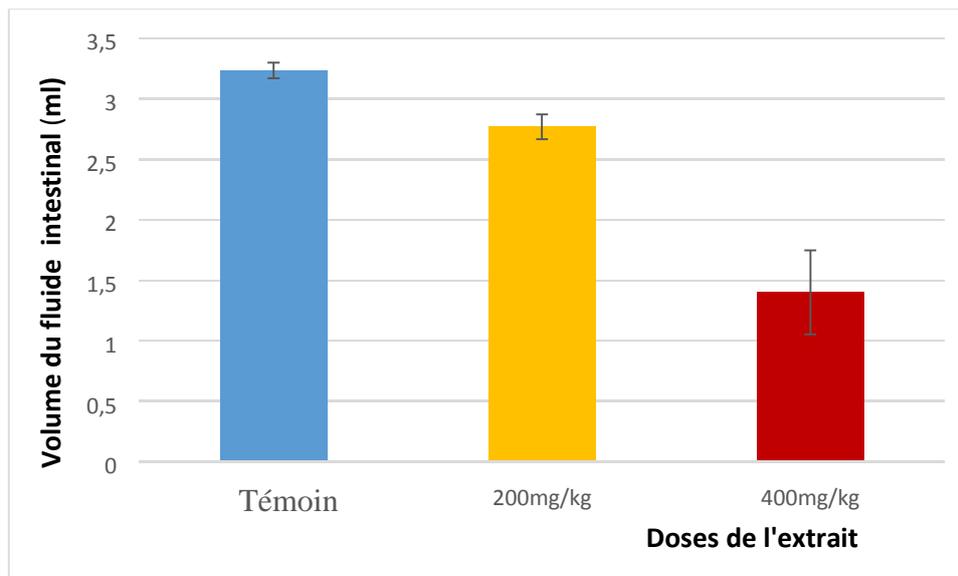


Figure 1: Volume du fluide intestinal provoquée par le $MgSO_4$ administré par voie orale, chez les témoins et les cobayes traités avec l'extrait IS-015 à la dose de 200 mg/kg (■) et 400 mg/kg (■) par voie orale ($x \pm e.s.m$, $n=3$, $p < 0,05$).

2. Effet de l'extrait IS-015 sur la diarrhée motrice

L'administration de l'acétylcholine dans le bain d'une manière cumulative contracte l'iléon isolé de cobaye. Cette contraction augmente en fonction de la concentration de l'acétylcholine dans le bain, et l'effet maximal est atteint à la concentration de 10^{-4} M d'acétylcholine dans le bain.

L'injection de l'extrait IS-015 dans le bain à des concentrations croissantes relâche l'iléon contracté par l'acétylcholine avec une CE_{50} de 0,19 mg/ml. À la concentration de 0,125 mg/ml, l'extrait relâche de 31,79 % la contraction maximale, et ce relâchement est égale 100 % à la concentration de 0,375 mg/ml de l'extrait IS-015 dans le bain (figure 2).

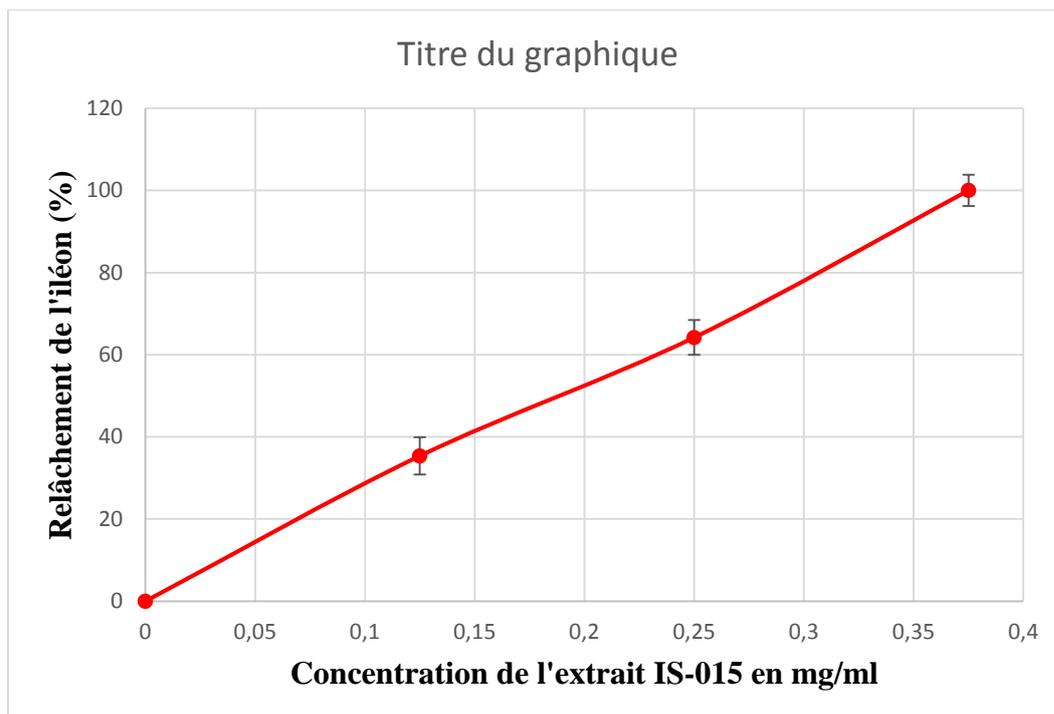


Figure 2: Relâchement de la contraction maximale de l'iléon isolé de cobaye provoqué par l'acétylcholine 10^{-4} M en fonction de la concentration de l'extrait IS-015 d'une manière cumulative dans le bain ($x \pm e.s.m$, $n=3$, $p < 0,05$)

3. Effet de l'extrait IS-015 vis-à-vis de l'acétylcholine

En pré-incubant l'iléon isolé de cobaye dans le bain avec l'extrait IS-015, l'effet maximal de l'acétylcholine diminue. En présence de l'extrait IS-015 à la concentration de 0,125 mg/ml l'effet maximal de l'acétylcholine est réduit à $63,64 \pm 4,84 \%$, et à $35,79 \pm 1,36 \%$ en présence de 0,25 mg/ml de l'extrait IS-015 ($p < 0,05$) (figure 3).

D'autre part, la CE_{50} de l'acétylcholine augmente en fonction de la concentration de l'extrait dans le bain. En absence de l'extrait IS-015, elle est égale à $1,2 \times 10^{-6}$ M. En présence de l'extrait IS-015 à la concentration de 0,125 et 0,25 mg/ml, cette CE_{50} est respectivement égale à 2×10^{-6} et $1,4 \times 10^{-5}$ M ($p < 0,05$).

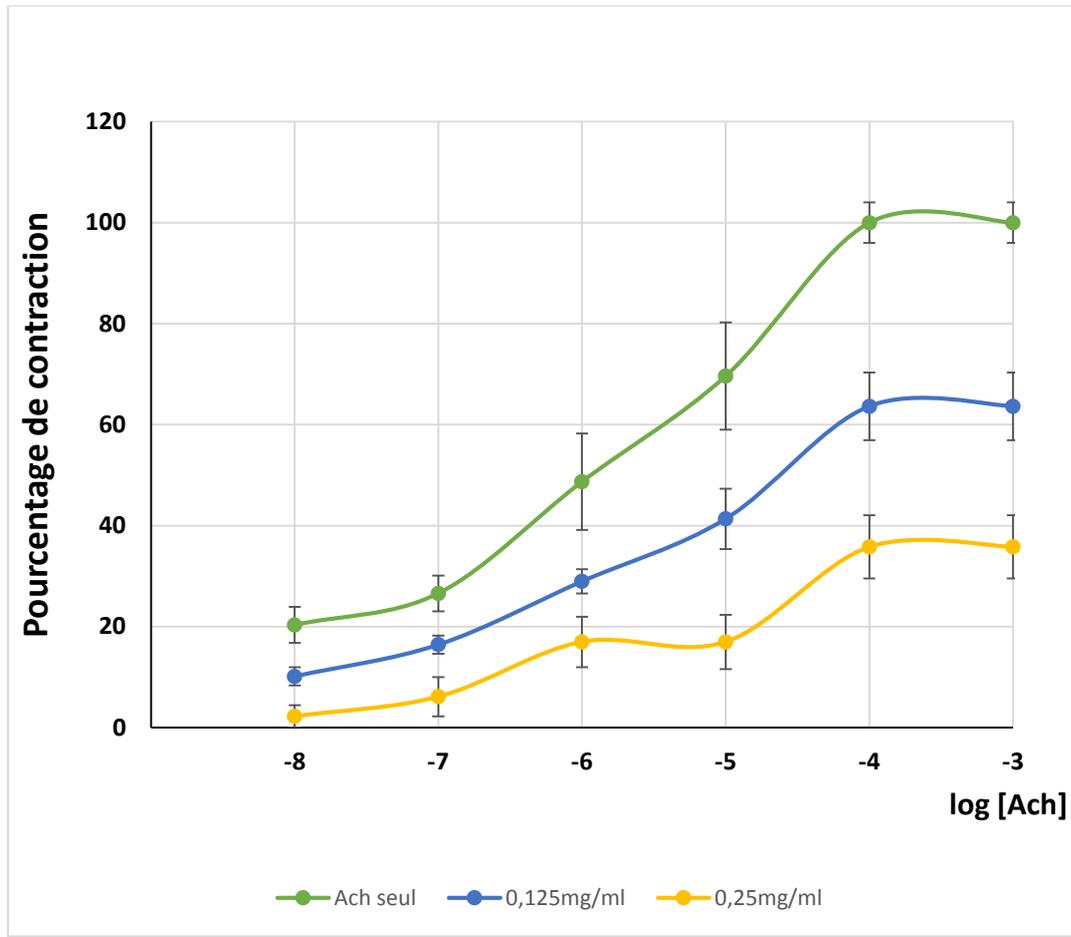


Figure 3: Contraction de l'iléon isolé de cobaye, provoquée par l'acétylcholine administrée d'une manière cumulative dans le bain en absence (■) et en présence de l'extrait IS-015 aux concentrations de (■) 0,125 mg/ml et de (■) 0,25 mg/ml dans le bain ($x \pm e.s.m$, $n=3$, $p < 0,05$).

DISCUSSION

Le présent travail a pour but d'étudier l'activité anti diarrhéique de l'extrait IS-015 chez les cobayes. Un test *in vivo* a été effectué pour étudier son effet sur la diarrhée sécrétoire, et des tests *in vitro* sur l'iléon isolé pour étudier son effet sur la diarrhée motrice.

Le sulfate de magnésium est une substance osmotiquement active qui n'est pas absorbée au niveau de l'intestin, et attire l'eau dans la lumière intestinale, ce qui entraîne une accumulation d'eau dans la lumière intestinale ou 'enterpooling' qui représente la diarrhée sécrétoire (ROBERT A. et coll., 1976). Son administration chez les cobayes qui ont reçu l'extrait IS-015 montre que l'extrait d'IS-015 diminue l'accumulation du fluide intestinal provoquée par le MgSO₄.

L'augmentation du volume du fluide intestinal provoquée par le MgSO₄ est due à sa propriété osmotique qui attire l'eau et à la libération de cholécystokinine au niveau de la muqueuse duodénale. La cholécystokinine empêche la réabsorption de chlorure de sodium et de l'eau et augmente la sécrétion et la motilité de l'intestin grêle, ce qui provoque une diarrhée à la fois sécrétoire et osmotique (ZAVALA M.A. et coll. 1998). La diminution de l'accumulation du fluide intestinale chez les animaux traités avec l'extrait montre qu'il inhiberait la sécrétion hydro-électrolytique intestinale provoquée par le MgSO₄, soit en inhibant la libération de cholécystokinine, soit en stimulant la réabsorption de Chlorure de sodium, et augmente ainsi la réabsorption d'eau. Cette activité anti sécrétoire serait due soit aux tannins, soit aux flavonoïdes ou aux saponines contenus dans l'extrait. Les tannins diminueraient la perméabilité de la muqueuse intestinale (TRIPATHI K.D., 1994) et les flavonoïdes augmenteraient l'absorption des électrolytes et de l'eau à travers la muqueuse intestinale (GALVEZ et coll., 1993 a, GALVEZ et coll., 1993 b). Quant aux saponines, ils inhiberaient le transport actif au niveau de la muqueuse intestinale et faciliteraient ainsi l'absorption de substances qui ne sont normalement pas absorbées (GEORGES F. et coll., 2002). Des résultats similaires rapportés sur l'extrait de *Malvastrum tricuspidatum* ont conclu que cette plante possède une activité anti sécrétoire (BALEKAR N. et coll. 2014).

La diarrhée peut aussi être due à une accélération du péristaltisme intestinal (DELVAUX M. et GAY G., 2006). Or le péristaltisme intestinal est sous le contrôle du système parasympathique dont le médiateur est l'acétylcholine (FERRON F., 2008). C'est pour cela que nous avons effectué des tests *in vitro* en contractant l'iléon isolé de cobaye avec l'acétylcholine pour étudier l'activité anti diarrhéique de l'extrait IS-015. D'après les résultats de ces tests *in vitro*, l'extrait IS-015 relâche la contraction provoquée par l'acétylcholine et inhibe son effet d'une manière non compétitive. Cette inhibition est à l'origine de la diminution de la motilité intestinale. Le relâchement de la contraction

provoquée par l'acétylcholine signifie une baisse du péristaltisme intestinal (LUTTEROD G.D., 1989), et cette baisse du péristaltisme intestinal est le responsable de son activité contre la diarrhée motrice (AUDHOUI J.L. et coll., 2010). Mais puisque l'inhibition est non compétitive, cela veut dire que l'extrait n'occupe pas les récepteurs de l'acétylcholine (GACEM H. et coll., 2014). Il aurait occupé un autre récepteur que l'acétylcholine qui pourrait être le récepteur α adrénergique, car l'activation des récepteurs sympathiques de l'intestin inhibe le tonus et le péristaltisme intestinal (ANUPAMA S. et coll., 2013).

D'autre part, la contraction musculaire est due à une augmentation de taux de calcium intracellulaire (GANITKEVICH V. et coll., 2002). Il se pourrait que l'extrait diminue la motilité intestinale en inhibant l'influx de Ca^{2+} ou la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires, ou les deux (QNAIS E.Y. et coll., 2007). Cette activité antispasmodique peut être due aux flavonoïdes et aux tannins, car les tanins agissent localement sur la paroi intestinale, inhibent la motilité intestinale par leur propriété astringente, précipitent les protéines et diminuent l'excitabilité des fibres musculaires intestinales (KUMAR R. et coll., 2010), tandis que les flavonoïdes diminuent la motilité intestinale en inhibant la libération d'acétylcholine (VITALI F. et coll., 2005 ; EGLÉN R.M., 1996). EZENWALI M.O. et ses collaborateurs (2009) ont également conclu que les flavonoïdes sont responsables de l'effet antispasmodique de l'extrait de *Monodora tenuifolia*, et LAKSHMINARAYANA M. et ses collaborateurs (2011) ont rapportés dans leurs travaux que l'effet anti diarrhéique de *Moringa oleifera* est dû à la présence des tannins et des flavonoïdes que l'extrait contient. Le mécanisme de l'extrait semble être associé à deux effets sur la motilité intestinale, ainsi que sur la sécrétion d'eau et d'électrolyte.

CONCLUSION

Compte tenu des résultats des tests effectués sur l'extrait, on peut conclure qu'il possède une activité anti diarrhéique. En effet il diminue l'accumulation du fluide intestinal provoquée par le sulfate de magnésium et diminue la contraction provoquée par l'acétylcholine. Ce qui nous permet de dire qu'il peut être efficace contre les diarrhées sécrétoire et motrice. Ces activités pourraient être dues soit aux tanins, aux flavonoïdes ou aux saponines contenus dans l'extrait.

BIBLIOGRAPHIES

BIBLIOGRAPHIES

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

Evaluation of antidiarrheal activity of *Elytraria acaulis* extarcts on magnesium sulfate and castoir oil induced diarrhoe in wistar.

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

AUBRY P. (2013).

Diarrhées infectieuses.

*Med. Trop.*1-6.

AUDHOUI J.L., CATALA O., CHAMBA G., DAVOUST N., ELIE J., GAZENGE J.M., LECERF A., PUJOL R., RICHARD R., SEVIN C., VEYRAT V., WICKAERT H., WIERRE P. (2010).

Anti diarrhéiques et laxatifs.

Le Moniteur des Pharmacies, **2820**: 3-8.

BALEKAR N., PARIHAR G., KUMAR J.D., GUPTA S. (2014).

Antidiarrheal potential of ethanolic leaf extract of *Malvastrum tricuspidatum* in albino rats.

J. Adv. Pharm. Educ. Res., **4**: 233-237.

BELAICHE J. (2000).

Physiopathologie des diarrhées aiguës infectieuses.

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

CAVALCANTE A.F., VEIGA L.J., MEDEIROS A.F.D., CLAUDINO F., AGRA M.F., TANIA MARIA SARMENTO DA SILVA⁶, MÁRIO G.D., RAIMUNDO B., BAGNOLIA A. (2012).

Solanum jabrense Agra & M. Nee (Solanaceae) exhibits spasmolytic activity on guinea-pig ileum.

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

CATHERINE D. (1997).

Les diarrhées aiguës bactériennes : causes et mécanismes.

Développement et Santé, n° 128 : 2-8.

CAMILLERI M. (2008).

Cause or Indicator of Intestinal or Colonic Irritation.

Am. J. Gastroenterol. **107** (3): 448-450.

CEZARD J. P., CHOURAQUI J. P., GIRARDET J. P., GOTTRAND F., BENHAMOU P. H., BOIGE N., FAURE C., GINIES J. L., LENAERTS C., MAHERZI A., MORALI A., MOUGENOT J. F., MOUTERDE O., OLIVES J. P., SARLES J., SCAILLON M., TURCK D. (2002).

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

Ed. Sci. et Med. Elsevier SAS, France, **9** : 620-628.

DELVAUX M., GAY G. (2006).

Approche du malade avec une diarrhée fonctionnelle.

Gastroentérol. Clin. Biol., **30**(3): 415-420.

DERVAUX J.L. (2008)

Les troubles digestifs liés aux stress

Ed. Dauphin, Paris (France) : 192-194

DESJEUX J.F. (1985).

Traitement de la diarrhée aiguë et malnutrition de l'enfant.

Med. Sci., **7**:376-383.

DOHERTY S.N. (1981).

Inhibition of arachidonic acid release, mechanism by which glucocorticoids inhibit endotoxininduced diarrhea.

Br. J. Pharmacol., **73**:549-554.

DOSSO M., COULIBALY M., KADIO A. (1998).

Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement.

Service des maladies infectieuses CHU de Treichville, 1-4.

EGLÉN R.M., HEDDGDE S.S., WATSON N. (1996).

Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function.

Pharmacol. Rev. **49**:531-565.

EMILY W., JOHANSSON, LILIANA C., HOLLY N., MARK Y. (2012).

Pneumonie et diarrhée : Lutter contre les maladies les plus mortelles pour les enfants les plus pauvres du monde.

Ed. UNICEF, New York, 1-6.

ENGRAND N. (2010).

Ralentissement du transit digestif en réanimation.

Ed. MAPAR, Paris, 400-403.

EZENWALI M.O., OKOLI C.O., NJOKU O.U. (2009).

Studies on the anti-diarrheal properties of seed extract of *Monodora tenuifolia*.

Int. J. Appl. Res. in Nat. Prod. **2**(4): 20-26.

FARTHING M., SALAM M., LINDBERG G., DITE P., KHALIF I., SALAZAR-LINDO E., RAMAKRISHNA B.S., GOH K., THOMSON A., KHAN A.G., KRABSHUIS J., LEMAIR A., GONVERS J.J. (2012).

La diarrhée aigüe chez les adultes et les enfants: une approche globale.

World Gastroenterology Organization (WGO): 3-21.

FERRON F. (2008).

Trouble de la motilité gastro-intestinale.

Réanimation. **17**:454-461.

FISSEHA S., WORKINEH S. (2013).

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

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

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

“Phytochemical screening plants”.

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

GACEM H., AHMANE A. (2014).

Les interactions médicamenteuses d’ordre pharmacodynamique.

*Batna. J. Med. Sci. 1:*96-99.

GALVEZ J., CRESPO J., JIMENEZ J., SUAREZ A., ZARZUELO A. (1993a).

Antidiarrhoeic activity of quercetin in mice and rats.

J. Pharmacol., 45: 157-159.

GALVEZ J., ZARZUELO A., CRESPO J., LORENTE M.D., ACETE M.A., JIMENEZ J. (1993b).

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

Planta. Med., 59: 333-336.

GANITKEVICH V., HASSE V., PFITZER G. (2002).

Ca²⁺ dependent and Ca²⁺ independent regulation of smooth muscle contraction.

J. Muscle Res. Cell. Motil., 23: 47–52.

GEORGES F., ZOHAR K., HARINDER P. S. M., KLAUS B. (2002).

The biological action of saponins in animal systems: a review.

Br. J. Nutr., 88, 587–605.

HUBER-GIESKE T., BICHARD P. (2013).

Diarrhées aiguës.

Service de médecine de premier recours HUG, Genève (Suisse): 2-8.

KENNE FOPA O. (1994).

Contribution à l'étude de l'activité antidiarrhéique de la pulpe de fruit d'*Adansonia digitata* L (BOMBACACEAE).

Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie.

Université CHEIKH ANTA DIOP (DAKAR): 48-72.

KUMAR R., SHARMA R., BAIRWA K., ROY R. (2010).

Pharmacological review on natural antidiarrhoeal agents.

Der. Pharma. Chem., 2: 66–93.

LAKSHMINARAYANA M., SHIVKUMAR H., RIMABEN P., BHARGAVA V. (2011).

Antidiarrhoeal activity of leaf extract of *Moringa Oleifera* in experimentally induced diarrhoea in rats.

Int. J. Phytomed., 3: 68-74.

LAURANS M., DAUGER S., DE SCHREVEL G., ARION A., DUHAMEL J. (1999).

Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës de l'enfant.

Néonatalogie, 1-4.

LUDWIG T. H., URSULA F. (2003).

Diarrhée aiguë–diagnostic différentiel et traitement.

Forum. Med. Suisse., 41, 983-988.

LUTTEROD G.D. (1989).

Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by *quercetin* as possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease.

J. Ethnopharmacol, 25: 235-249.

MEHMOOD H., SALMAN H.S., GILANI A. (2011).

The antidiarrheal and spasmolytic activities of *Phyllanthus emblica* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca (2+) channels.

J. Ethnopharmacol. 133 : 856–865.

Ministère de la Santé Publique (MINSAN) (2012).

La diarrhée : Risque de négligence.

Direction de la Veille Sanitaire et de la Surveillance Epidémiologique (DVSSE), Madagascar : 2-4.

ICOLAS J.P. (2012).

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

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

NJINGA N.S., SULE M.I., PATEH, U.U., HASSAN H.S., USMAN M.A., HARUNA M.S (2013).

Phytochemical and Antidiarrhea Activity of the Methanolic Extract of the Stem Bark of *Lannea kerstingii* Engl. and K. Krause (Anacardiaceae).

J. Nat. Prod. Plant. Resour., **3** (3) : 43-47.

QNAIS E.Y., ELOKDA A.S., ABU Y.Y., ABDULLA F.A. (2007).

Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of *Punica granatum* (Pomegranate) Peels.

Pharm. Biol. **45** (9): 715–720.

RANARIJAONA H.L.T., TSITOMOTRA A., RAVONIARISOA J.B., ANDRIANASETRA G.S. (2009).

Les plantes magiques traditionnelles les plus réputées des femmes de la ville de Mahajanga.

Université de Mahajanga, Madagascar : 1-20.

RANDREMANANA R., (2012).

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

Thèse de Doctorat de l'Université de Grenoble : 21-23.

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

Enteropooling assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins.

Prostaglandins **11**:809–828.

SADRAEI H., ASGHARI G., BEHZAD S. (2011).

Bioactivity-guided isolation of spasmolytic components of *Pycnocycla spinosa* Decne ex Boiss.

Res. Pharm. Sci., **6**(2): 81-86.

SHAMKUWAR P.B., PAWAR D.P. (2013).

Antidiarrhoeal and Antispasmodic Effect of *Berberis aristata*.

Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res., **5** (1): 24-26.

TRIPATHI K.D. (1994).

Essentials of Medical Pharmacology.

Jay. Br. Med. Pub. New Delhi, 775.

VITALI F., BOINA F.P., SAIJA, ANTONELLA S., ANTONIO T., FONTE G., CLAUDIA P., BEATRICE T. (2005).

Studies on antidiarrhoeal activity of an extract of Wine from *Jacquez grapes* in mice.

Phytother. Res., **19**: 924-927.

ZAVALA M.A., PEREZ S., PEREZ C., VARGAS R., PEREZ R.M. (1998).

L'activité antidiarrhéique de *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* et *Alternanthera*.

J. Ethnopharmacol., **61** (1): 41-47.

ZHANG X., STEINHOFF B., STOTT G., ZHANG G. (1998).

Réglementation des médicaments à base de plantes, la situation dans le monde.

Ed. OMS, Genève, 1-23.

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI DIARRHEIQUE DE L'EXTRAIT IS-015 CHEZ LE COBAYE

Auteur : RASAMISON Ihoby

Laboratoire de Pharmacologie Générale, de

Adresse : II F 34 L bis BQ Antsahanierana

Pharmacocinétique et de cosmétologie

Année : 2014-2015

BP : 8357

Tel : 034 61 112 61

E-mail : frandimbi@gmail.com

E-mail : iubyrasami@gmail.com

Rapporteur : M^{me} RANDRIANAVONY

Patricia, Maître de Conférences

RESUME

Le but de cette étude a été d'évaluer l'activité anti diarrhéique de l'extrait IS-015 chez les cobayes. Pour étudier son activité anti sécrétoire, des tests *in vivo* avec l'accumulation du fluide intestinal provoquée par le MgSO₄ ont été effectués; et son activité sur la motilité intestinale a été étudiée avec des tests *in vitro* sur iléon isolé contracté avec l'acétylcholine.

L'administration de l'extrait d'IS-015 par voie orale aux doses de 200 et 400 mg/kg provoque une diminution de $22,38 \pm 2,41$ %, et $55,98 \pm 4,81$ % respectivement de l'accumulation du fluide intestinal ($p < 0,05$). *In vitro*, l'extrait d'IS-015 relâche la contraction provoquée par l'acétylcholine avec une CE₅₀ égale à 0,19 mg/ml, il inhibe l'acétylcholine d'une manière non compétitive; il augmente la CE₅₀ de l'acétylcholine de $1,2 \times 10^{-6}$ M en absence de l'extrait, à 2×10^{-6} et $1,4 \times 10^{-5}$ M en présence de l'extrait aux concentrations de 0,125 et 0,25 mg/ml, et il déprime l'effet maximal de l'acétylcholine à $63,64 \pm 4,84$ et $35,79 \pm 1,36$ % respectivement aux concentrations de 0,125 et 0,25 mg/ml dans le bain ($p < 0,05$). Ces résultats montrent que l'extrait IS-015 possède une activité anti diarrhéique.

Mots clés : anti diarrhéique, anti sécrétoire, anti péristaltique

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antidiarrheal activity of the extract IS-015 on guinea pigs. *In vivo* tests were carried out to study its antisecretory activity using MgSO₄ induced enterpooling. *In vitro* test on isolated ileum contracted by acetylcholine was conducted to study its antiperistaltic activity.

Oral administration of the extract at 200 and 400 mg/kg decreased the volume of intestinal fluid by 22.38 ± 2.41 %, and 55.98 ± 4.81 % ($p < 0, 05$). *In vitro*, the extract released the contraction induced by acetylcholine with a EC₅₀ equal to 0.19 mg/l, and inhibits in a non-competitive manner the contracting effect of acetylcholine with an EC₅₀ of 1.2×10^{-6} M in the absence of the extract, and 2×10^{-6} and 1.4×10^{-5} M in the presence of 0.125 and 0.25 mg / ml of the extract, and decreased the maximal effect of acetylcholine to 63.64 ± 4.84 and 35.79 ± 1.36 % with 0.125 and 0.25 mg / ml of the extract ($p < 0.05$). These results show the antidiarrheal activity of the extract.

Keywords: antidiarrheal, antisecretory, antiperistaltic