



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE PHYSIOLOGIE ANIMALE
ET DE PHARMACOLOGIE



MEMOIRE
Pour l'obtention du
Diplôme d'Etudes Approfondies

Option : PHARMACOLOGIE

**ETUDE *in vitro* SUR TRACHEE ISOLEE
DE COBAYE DE L'ACTIVITE
ANTIASTHMATIQUE DE
Tetracera madagascariensis
(DILLENACEES)**

Présenté par :

RASOLOFONDRAMANITRA Fara Rindra

Soutenu publiquement le 15 Avril 2010

Devant les membres de JURY composés de :

Président : Professeur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenanirainy

Examineur : Professeur RANDRIANTSOA Adolphe

Rapporteur : Docteur RAMANITRAHASIMBOLA David

Nom : RASOLOFONDRAMANITRA

Prénoms : Fara Rindra

Date et lieu de naissance : 16 Juillet 1984 à BRIEVILLE

Adresse : Lot II O 109 A Bis Anjanahary
ANTANANARIVO 101



**ETUDE *in vitro* SUR TRACHEE ISOLEE
DE COBAYE DE L'ACTIVITE
ANTIASTHMATIQUE DE
Tetracera madagascariensis
(DILLENIACEES)**

Année universitaire : 2008 – 2009

Option : PHARMACOLOGIE

Rapporteur : Docteur RAMANITRAHASIMBOLA David

Laboratoires : - Laboratoire de pharmacodynamie du Département de
Physiologie Animale et de Pharmacologie
- Laboratoire de chimie marine de l'IMRA

REMERCIEMENTS

Cette étude n'aurait pas pu être réalisée sans la collaboration étroite, l'aide précieuse, le soutien moral et pratique de nombreuses personnes.

Ainsi, nous adressons nos plus vifs remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Nous adressons notre reconnaissance et gratitude plus particulièrement :

▪ Aux membres de jury :

- Professeur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy, qui malgré ses nombreuses occupations, nous a fait un grand honneur de présider la soutenance de ce mémoire. Nous lui témoignons nos sincères remerciements.
- Professeur RANDRIANTSOA Adolphe, pour avoir bien voulu siéger parmi les membres de jury pour examiner le présent travail. Qu'il trouve ici le témoignage de notre respectueuse considération.
- Docteur RAMANITRAHASIMBOLA David a suivi ce travail avec beaucoup de patience, qui n'a pas ménagé ses efforts pour les conseils et le suivi de la rédaction et a accepté avec bienveillance d'être le Directeur de ce mémoire. Nous lui exprimons nos profondes gratitude ;

▪ A Madame le Professeur RAKOTO-RATSIMAMANGA Suzanne Urverg, Présidente de l'IMRA, de m'avoir accueillie dans son Institut. Qu'il nous soit permis de vous adresser notre profonde gratitude.

▪ Aux techniciens et chercheurs au sein du Laboratoire de Chimie Marine de l'IMRA. Soyez en remerciés.

▪ A tout le Personnel Chercheur et Technicien de l'IMRA qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre pour réaliser ce travail. Soyez assurés de ma profonde gratitude.

▪ A tous les enseignants de la Faculté des Sciences et plus particulièrement ceux du Département de Pharmacologie Générale et de Physiologie Animale pour la formation qu'ils nous ont offerte.

Pour terminer, une tendre pensée pleine de gratitude est adressée à l'égard de ma «famille» pour leur soutien moral et affectif immesurable tout au long de mes études.

Un grand merci à tous !

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES	I
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES FIGURES	IV
LES SIGLES ET ABREVIATIONS	V

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

MATERIELS ET METHODES

I. ETUDE PHYTOCHIMIQUE	3
I.1- Description botanique	3
I.2- Matériel végétal	5
I.3- Extraction et fractionnement de l'extrait brut	5
I.4- Fractionnement bioguidé de FAE'	8
I.5- Criblage phytochimique	12
II. ETUDE PHARMACOLOGIQUE	14
II.1- Animaux d'expériences	14
II.2- Prélèvement, préparation et montage de la trachée isolée de cobaye	14
II.3- Protocoles expérimentaux	15
A. Effet de l'extrait brut et des différentes fractions sur la trachée pré-contractée à l'histamine	15
B. Effet de la fraction FAE' sur la trachée pré-contractée aux différents agents contractuants :	
a- Acétylcholine	15
b- KCl	15
C. Effet de la fraction FAE' vis-à-vis de l'activité contractile de l'histamine	16
D. Effet de la fraction FAE' vis-à-vis de l'activité contractile de CaCl ₂	16
E. Effet du propranolol sur l'activité relaxante de la fraction FAE'	17
F. Effet du propranolol et du bleu de méthylène sur l'activité relaxante de EET.....	17
G. Effet de la combinaison FAE' - théophylline sur la trachée pré-contractée à l'histamine	18

II.4- Expression des résultats et analyses statistiques	18
II.5- Produits et substances utilisés pour les tests	18
III. ETUDE LA TOXICITE AIGUE	19
III.1- Voie orale	19
III.2- Injection intrapéritonéale	19
 RESULTATS	
 I. ETUDE PHYTOCHIMIQUE	20
I.1- Rendements de l'extraction et du fractionnement de l'extrait brut	20
I.2- Criblage phytochimique	21
I.3- Analyses par CCM comparatives de l'extrait brut ETF et des différentes fractions	22
II. ETUDE PHARMACOLOGIQUE	24
II.1- Effet relaxant des extraits bruts et des différentes fractions sur la trachée pré-contractée à l'histamine	24
II.2- Effet relaxant de la fraction FAE' sur la trachée pré-contractée à l'acétylcholine et au KCl	25
II.3- Effet inhibiteur de la fraction FAE' sur la réponse contractile de l'histamine	25
II.4- Effet inhibiteur de la fraction FAE' sur la réponse contractile de CaCl ₂	26
II.5- Effet du propranolol sur l'activité broncho-relaxante de la fraction FAE'	28
II.6- Effet du propranolol et du bleu de méthylène sur l'activité relaxante de EET	28
II.7- Effet de la combinaison FAE' - théophylline sur trachée précontractée à l'histamine	30
II.8- Effet relaxant des différentes fractions issues du fractionnement bioguidé de FAE'	32
III. TOXICITE AIGUE	34
III.1- Voie orale	34
III.2- Injection intra péritonéale	34
 DISCUSSION	35
 CONCLUSION	39
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	40
RESUME ET ABSTRACT.....	44

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Résumé des différents tests utilisés pour détecter les différentes familles chimiques présents dans l'extrait ETF	13
<u>Tableau II</u> : Rendements des extractions et des fractionnements	20
<u>Tableau III</u> : Résultats du criblage phytochimique effectué sur la tige feuillée de la plante	21
<u>Tableau IV</u> : Valeurs de CE_{50} de l'extrait ETF et des différentes fractions sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine	24
<u>Tableau V</u> : Valeurs de CE_{50} de FAE' sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'ACh et au KCl	25
<u>Tableau VI</u> : Effet de FAE' sur la réponse contractile de l'histamine	25
<u>Tableau VII</u> : Effet de FAE' sur la réponse contractile de $CaCl_2$	26
<u>Tableau VIII</u> : Valeurs de CE_{50} de FAE' en absence et en présence de propranolol	28
<u>Tableau IX</u> : Valeurs de CE_{50} de EET en absence et en présence du propranolol ou du bleu de méthylène	28
<u>Tableau X</u> : Valeurs de CE_{50} de Fae et F_{H_2O} sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine	32
<u>Tableau XI</u> : Effet relaxant des différentes fractions issues de F_{H_2O} sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine	32
<u>Tableau XII</u> : Effet relaxant des différentes fractions issues de F_8 sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine	33
<u>Tableau XIII</u> : Mortalité en fonction des doses et des voies d'administration	34

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Dessin des différentes parties aériennes de <i>Tetracera madagascariensis</i>	4
<u>Figure 2</u> : Extraction et fractionnement de l'extrait brut de l'écorce de tige	6
<u>Figure 3</u> : Extraction et fractionnement de l'extrait brut de la tige feuillée	9
<u>Figure 4</u> : Fractionnement bioguidé de FAE'	11
<u>Figure 5</u> : Analyses par CCM comparatives de l'extrait ETF et ses différentes fractions	23
<u>Figure 6</u> : Courbe effet-concentration de l'histamine en absence et en présence de FAE' sur trachée isolée de cobaye	27
<u>Figure 7</u> : Courbe effet-concentration de Ca Cl ₂ en absence et en présence de FAE' sur trachée isolée de cobaye	27
<u>Figure 8</u> : Courbe effet-concentration de FAE' en présence et en absence de propranolol sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine	29
<u>Figure 9</u> : Courbe effet-concentration de EET en présence et en absence de propranolol ou de bleu de méthylène sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine	29
<u>Figure 10</u> : Effet broncho-relaxant de 75 µg/ml de FAE', de 15 µg/ml de théophylline et de leur combinaison sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine	31

LISTES DES SIGLES ET ABREVIATIONS

Ca²⁺	: ion calcium
CE₅₀	: concentration efficace provoquant 50% de l'effet maximal
DL₅₀	: Dose létale provoquant 50 % de mortalité
DL₁₀₀	: Dose létale provoquant 100 % de mortalité
EA	: Extrait aqueux de l'écorce de tiges
ED	: Extrait dichlorométhane de l'écorce de tige
EET	: Extrait brut de l'écorce de tige
Em1	: Emulsion 1
Em2	: Emulsion 2
Em3	: Emulsion 3
Emax	: Effet maximal
ETF	: Extrait brut de tige feuillée
F A	: Fraction aqueuse
FAE	: Fraction acétate d'éthyle
FAE'	: Fraction acétate d'éthyle sans polyphénols
F I	: Regroupement des émulsions dans les phases hexanique et dichlorométhane
F II	: Regroupement des phases organiques dans les phases hexanique et dichlorométhane
F M	: Fraction méthanolique
Ph A1	: Phase aqueuse1
Ph A2	: Phase aqueuse 2
Ph AE	: Phase acétate d'éthyle
PIs1	: Phase insoluble
PS1	: Phase soluble 1
PS2	: Phase soluble 2
PS3	: Phase soluble 3
PS4	: Phase soluble 4

INTRODUCTION

Chaque année, les maladies respiratoires sont à l'origine de la mortalité des millions de personnes dans le monde. L'asthme est l'une de ces maladies ; on recense 225000 cas de décès par an dans le monde (1). Ces deux dernières décennies, elle fait partie des maladies à expansion rapide à cause de la pollution chimique de l'air et des modes de vie des humains. Elle touche les personnes de différents âges surtout les enfants mais aussi les adultes (2, 3).

L'asthme est un trouble inflammatoire des voies respiratoires. Elle est caractérisée par une inflammation et une hypersensibilité des voies respiratoires accompagnée d'une hypersécrétion et épaissement du mucus d'où le rétrécissement et l'obstruction des voies respiratoires (4, 5). Les principaux symptômes de la maladie sont la respiration sifflante, la toux, la difficulté à respirer (2).

Le traitement de cette maladie ne peut pas être standardisé (1). La conception courante de la thérapie d'asthme est basée sur l'approche par étape dépendant de la sévérité de la maladie. Les buts sont de réduire les symptômes qui résultent de l'obstruction et inflammation des voies respiratoires, éviter les exacerbations et maintenir une fonction normale de la voie respiratoire (5).

Le traitement établi de l'asthme comprend deux classes de médicaments. Dans la première classe, on trouve les bronchodilatateurs qui sont utilisés en traitement d'urgence pour soulager la difficulté de respirer. Les agonistes des récepteurs β_2 adrénergiques sont les plus utilisés comme le Salbutamol mais il y a aussi la Théophylline, inhibitrice de la Phosphodiesterase et à la limite les anticholinergiques en cas des asthmes nerveuses.

La seconde classe regroupe les médicaments pour le traitement de fond représentés par les anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs. Les anti-leucotriènes sont en vogue actuellement comme Montelukast® sans oublier les autres anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes (4).

En tant que maladie allergique, les anti-histaminiques trouvent aussi leurs intérêts thérapeutiques dans le traitement d'urgence de la crise d'asthme. (6, 7).

En plus du traitement médicamenteux, des mesures d'hygiène et de santé pour exclure les facteurs favorisant ou aggravant l'asthme sont strictement nécessaires pour les asthmatiques ou les gens prédisposés.

En outre, l'utilisation des plantes a toujours été d'une grande importance pour lutter contre les maladies car depuis les temps anciens, l'homme utilisait les plantes non seulement pour se nourrir mais aussi pour se soigner (2, 8).

A Madagascar, on recense plusieurs plantes à vertu antiasthmatisque que les populations locales ont l'habitude d'utiliser en cas de problème de respiration. Parmi ces plantes, on peut citer : *Euphorbia hirta* (EUPHORBIACEES) connu sous le nom de «Jean Robert ou Aidinono», *Vetiveria zizanioides* (GRAMINEES) appelé «Vétiver» (9), *Phymatodes scolopendria* (POLYPODIACEES) appelé «Tsiampangampanga» (10).

D'après nos études bibliographiques et enquêtes ethnobotaniques, la tisane préparée par décoction des feuilles ou de l'écorce de tige de *Tetracera madagascariensis* (DILLENIACEES) connu sous le nom vernaculaire «Vahimaranga» est utilisée par la population du Nord, de l'Est et Sud Est de Madagascar à cette fin (11, 12).

Comme travail de recherche, l'étude de l'activité antiasthmatisque de *Tetracera madagascariensis* nous a été proposée par l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA).

Nos objectifs sont de :

- mettre en évidence l'activité pharmacologique de *Tetracera madagascariensis* sur trachée isolée de cobaye,
- émettre une hypothèse expliquant le mécanisme pharmacologique de cette activité et
- déterminer la fraction active de la plante.

Notre ouvrage présente trois parties : les matériels et méthodes sont décrits dans la première partie. La deuxième partie rapporte les résultats expérimentaux obtenus. Ces résultats sont interprétés et discutés dans la troisième partie. Une conclusion termine le travail.

MATERIELS ET METHODES

I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

I.1- Description botanique

Tetracera madagascariensis est une plante appartenant à la famille de DILLENIACEES.

C'est une grande liane connue sous le nom vernaculaire malgache Vahimaranga. Elle peut atteindre 8 à 15 cm de diamètre à la base.

Leurs feuilles sont alternées, dentées, de forme elliptique et de dimension variable de 4 à 20 cm de long avec 7 à 15 paires de nervures latérales très visibles sur les deux faces. Les jeunes tiges et la face inférieure de feuilles sont couvertes de poils.

Les fleurs sont petites, de couleur blanche et regroupées en cymes, donnant des carpelles avec des arilles enveloppant les graines (figure 1).

C'est une plante endémique de Madagascar qu'on rencontre le long de la cote orientale et la partie Nord Ouest de l'île.

Le genre *Tetracera* comprend 50 espèces dont 3 sont endémiques de Madagascar.

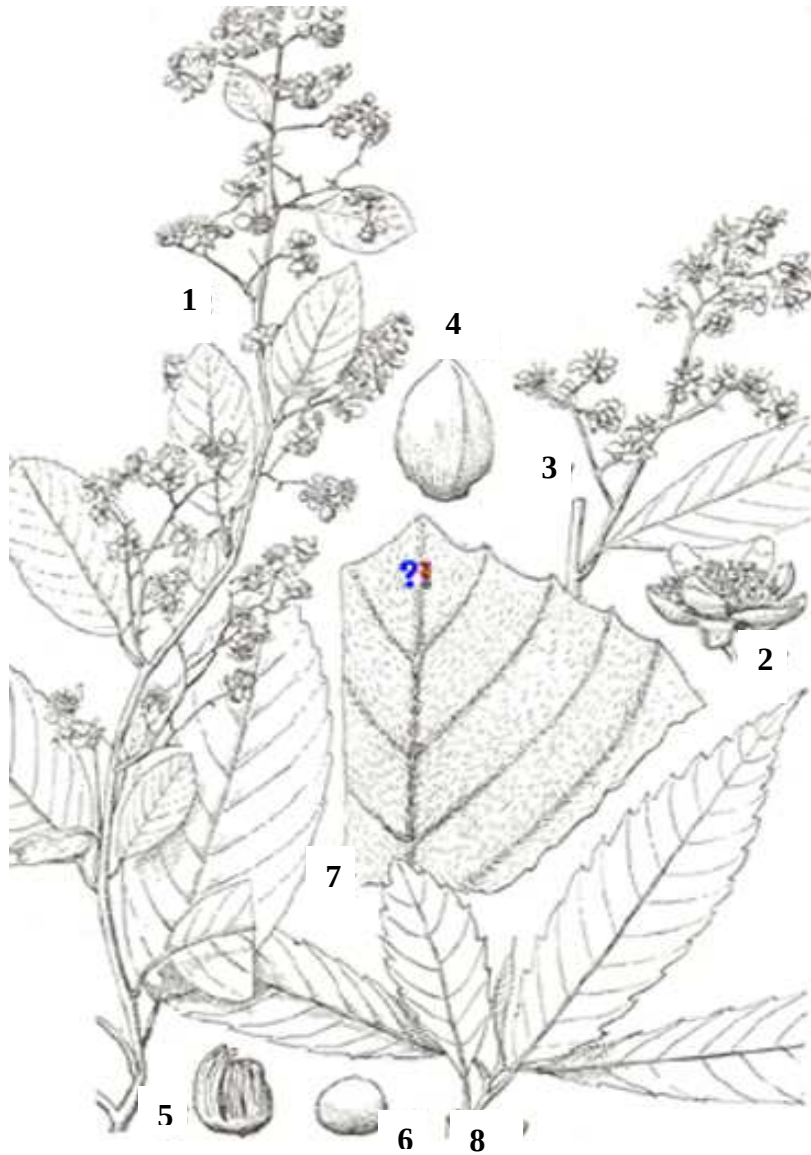


Figure 1 : Dessin des différentes parties aériennes de *Tetracera madagascariensis*

(Source : Flore de Madagascar et des Comores [11])

- 1 : rameau florifère
- 2 : fleur
- 3 : rameau fructifère
- 4 : carpelle
- 5 : graine avec son arille
- 6 : graine mature
- 7 : face inférieure du limbe
- 8 : feuille de rejet

I.2- Matériel végétal

Deux récoltes ont été effectuées, l'une en Janvier 2006 dans la région de Manakara pour l'écorce de tige et la deuxième en Février 2009 à Beforona (Moramanga) pour la tige feuillée. Les matériels végétaux ont été séchés à l'ombre à la température ambiante. Après une semaine de séchage, ils ont été broyés puis pesés.

I.3- Extraction et fractionnement de l'extrait brut

a) Ecorce de tige

Trois cent vingt grammes de poudre de l'écorce de tige ont été macérés à la température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (méthanol – eau : 80 / 20) et agités en continu pendant 24 heures. Cette macération a été répétée 3 fois pour avoir le maximum de rendement et suivie d'une filtration à chaque fois. Le filtrat obtenu a été regroupé puis évaporé sous vide à l'aide d'un ROTAVAPOR afin d'enlever le solvant et d'avoir un mélange concentré qui est l'extrait brut codé EET.

Pour déterminer la fraction active de l'extrait EET, ce dernier a été soumis à une séparation par partage liquide-liquide: eau – dichlorométhane. Deux phases ont été obtenues: phase dichlorométhane qui a donné l'extrait ED après évaporation et la phase aqueuse qui après évaporation a donné l'extrait EA.

La figure 2 récapitule ces étapes de l'extraction et du fractionnement de l'extrait EET.

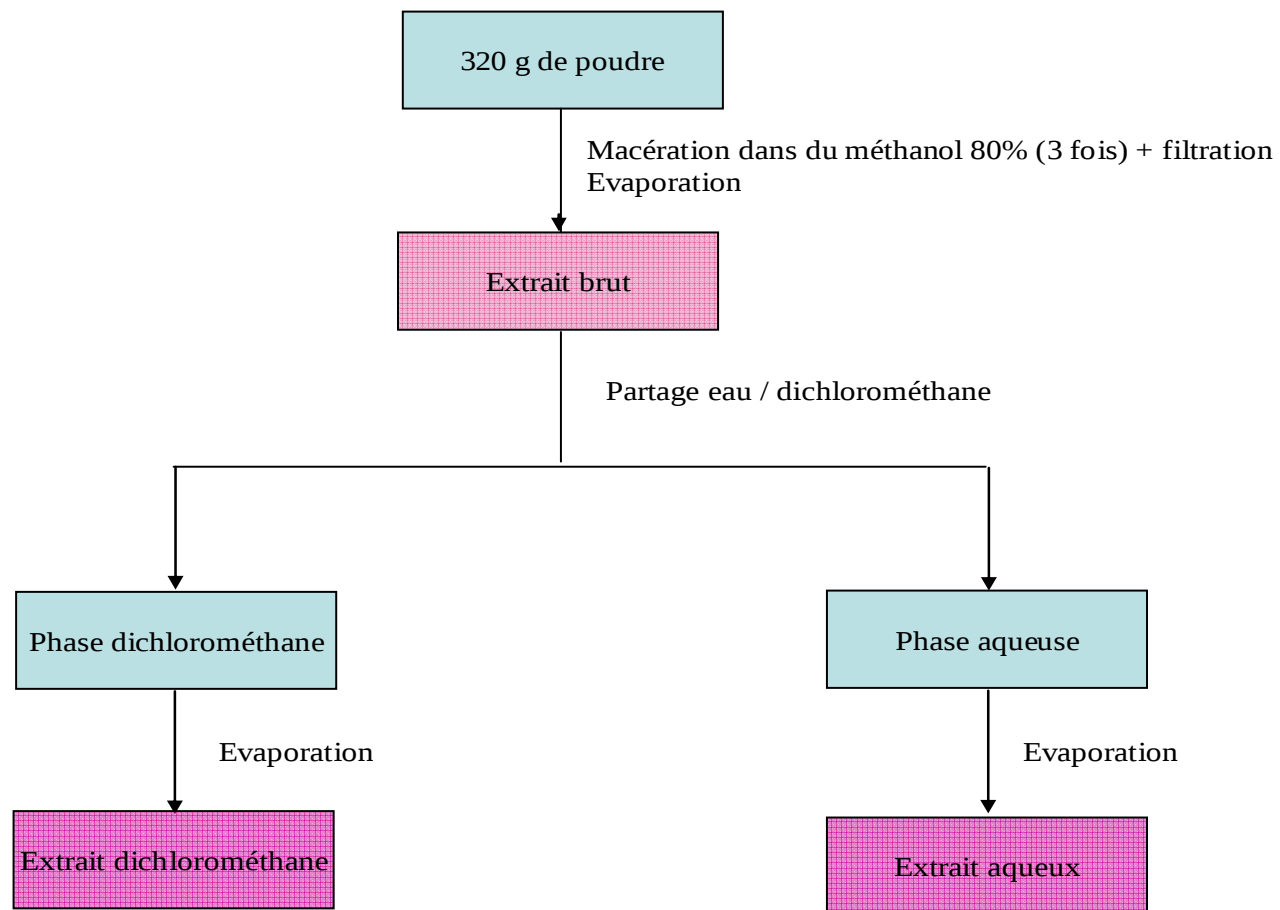


Figure 2: Extraction et fractionnement de l'extrait brut de l'écorce de tige

b) Tige feuillée

Les mêmes opérations ont été effectuées pour l'extraction de l'extrait brut à partir de 1200g de poudre de tige feuillée (ETF).

Pour déterminer la fraction active de l'extrait brut ETF, ce dernier a été soumis à des séparations par partage liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante: hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle.

L'extrait brut a été dilué dans de l'eau et après décantation, la partie insoluble (PIs1) a été reprise dans du méthanol qui a donné la fraction dénommée FM après évaporation. La partie soluble (PS1) a été partagée avec de l'hexane (volume à volume) dans une ampoule à décanter. Le mélange a été agité manuellement puis laissé se décanter pendant une heure. Ainsi, trois phases se sont distinguées : une phase aqueuse (Ph A1), une phase intermédiaire sous forme d'émulsion (Em1) et une phase organique (PS2). Elles ont été collectées séparément.

La phase aqueuse (Ph A1) a été reprise avec du dichlorométhane. Après agitation et décantation, le mélange a présenté trois phases comme précédemment : une phase aqueuse (Ph A2), une émulsion (Em2) et une phase organique (PS3).

La chromatographie est une méthode d'analyse immédiate et de séparation de différents constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire (13-16).

L'analyse sur CCM (Chromatographie sur Couche Mince) des deux phases intermédiaires Em1 et Em2 nous a permis de les regrouper en Em3. Elles ont présentées beaucoup de similarité en termes de nombre et migration des tâches chromatographiques. Ce mélange est dénommé FI après évaporation. Pour cette CCM, le système de solvants utilisé est un mélange acétate d'éthyle - acétone (6 / 4) et le révélateur a été une solution à vanilline. Cette solution à vanilline a été obtenue après dissolution de 1g de poudre de vanilline dans 100 ml de méthanol et 5 ml d'acide sulfurique.

Après analyse sur CCM, le même constat a été observé avec les phases organiques issues du partage eau – hexane (PS2) et eau - dichlorométhane (PS3). PS2 et PS3 présentent le même profil chromatographique sur CCM réalisée sous les mêmes conditions que précédemment. Ainsi, elles ont été regroupées pour donner la fraction FII après évaporation.

La phase aqueuse Ph A2 a été partagée avec de l'acétate d'éthyle. Deux phases ont été obtenues, une phase aqueuse Ph A3 donnant la fraction FA après évaporation et une phase acétate éthylique Ph AE qui après évaporation a donné la fraction FAE.

Cette dernière a été ensuite dépolyphénolisée par filtration sur gel de polyamide pour donner la fraction FAE'.

Ces différentes étapes d'extraction et de fractionnement sont récapitulées dans la figure 3.

Les CCM comparatives de l'extrait brut et de ses différentes fractions ont été réalisées.

Le système de solvants formé par Hexane – dichlorométhane – acétate d'éthyle (6 / 3 / 1) a été utilisé pour cette analyse comparative. La révélation a été effectuée avec la ninhydrine sulfurique.

I.4- Fractionnement bioguidé de la fraction FAE'

Dans le but de déterminer les molécules responsables de l'activité biologique de la plante, des séries de fractionnement de FAE' ont été effectuées.

La fraction FAE' a été partagée entre l'eau et l'acétate d'éthyle. Après décantation, on a obtenu deux phases. Après séparation et évaporation, deux fractions ont été obtenues: la fraction Fae qui est la fraction obtenue après évaporation de la phase organique et la fraction F_{H_2O} obtenue après évaporation de la phase aqueuse.

Ces deux fractions et la fraction FAE' ont été analysées à l'aide d'une CCM. Le système de solvants utilisé a été : acétate d'éthyle – méthanol – hexane - ammoniacque (7 / 1 / 1,98 / 0,02). La révélation a été faite avec la vanilline.

La fraction F_{H_2O} a été fractionnée à son tour par chromatographie sur colonne (15) sur gel de silice RP-18 (SORBSILTM C60) 40-60 μ m de diamètre.

Une colonne de verre dont la hauteur est de 80 cm et le diamètre est de 2,5cm a été utilisée. Les solvants d'élution utilisés ont été le dichlorométhane - acétone (4/6 → 6/4) suivant un mode d'élution par gradient.

A la fin de la chromatographie, les différentes fractions collectées ont été analysées par CCM, les fractions qui renfermaient les mêmes produits ont été regroupées. Le système de solvants utilisés a été : acétate d'éthyle – méthanol – hexane (8 / 1 / 1). La révélation a été faite avec la vanilline. Après regroupement et évaporation, 10 fractions ont été récupérées (F_1 à F_{10}).

Une analyse comparative par CCM de la fraction F_{H_2O} et de la fraction active F_8 a été réalisée avec un système de solvants composé de acétate d'éthyle – méthanol – hexane (8 / 1 / 1) et une révélation faite avec la vanilline.

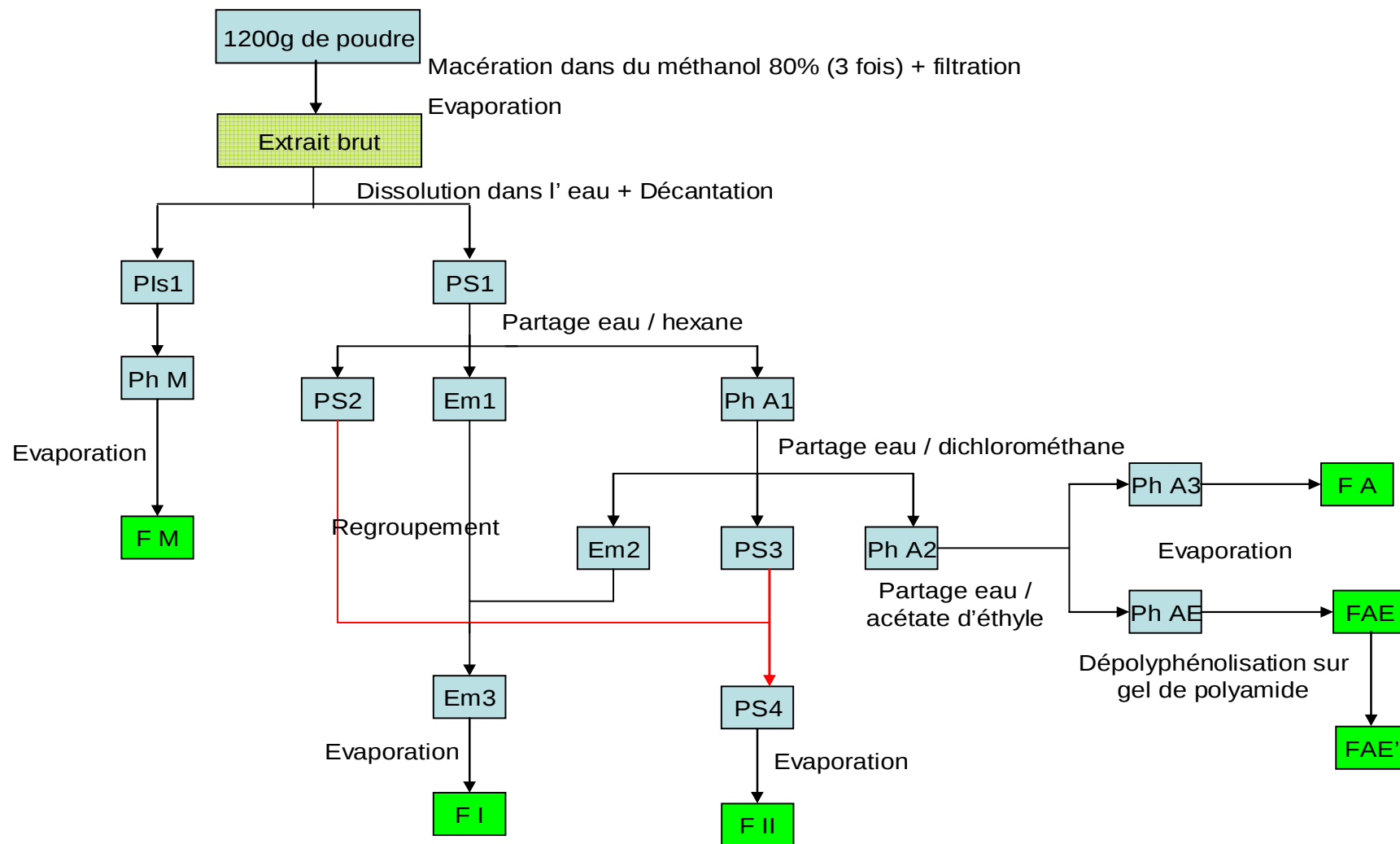


Figure 3: Extraction et fractionnement de l'extrait brut des tiges feuillées

La fraction F₈ a ensuite été fractionnée par chromatographie sur colonne sur gel de silice 60 de 40 à 60 µm de diamètre. Le mélange de solvants d'élution utilisés a été : l'acétate d'éthyle, méthanol, hexane et ammoniac dont les proportions respectives sont : 80 / 10 / 8,8 / 1,2. L'élution a suivi le mode isocratique. La colonne de verre utilisée a une hauteur de 45 cm et un diamètre de 1,5 cm. Six fractions ont été collectées à la fin (F₈₁ à F₈₆).

Après analyse sur CCM, les fractions F₈₁ et F₈₂ ont été regroupées à cause de leur similarité chimique.

L'isolement des molécules responsables de l'activité biologique est actuellement en cours.

Les différentes étapes du fractionnement bioguidé de la fraction FAE' sont récapitulées dans la figure ci-dessous.

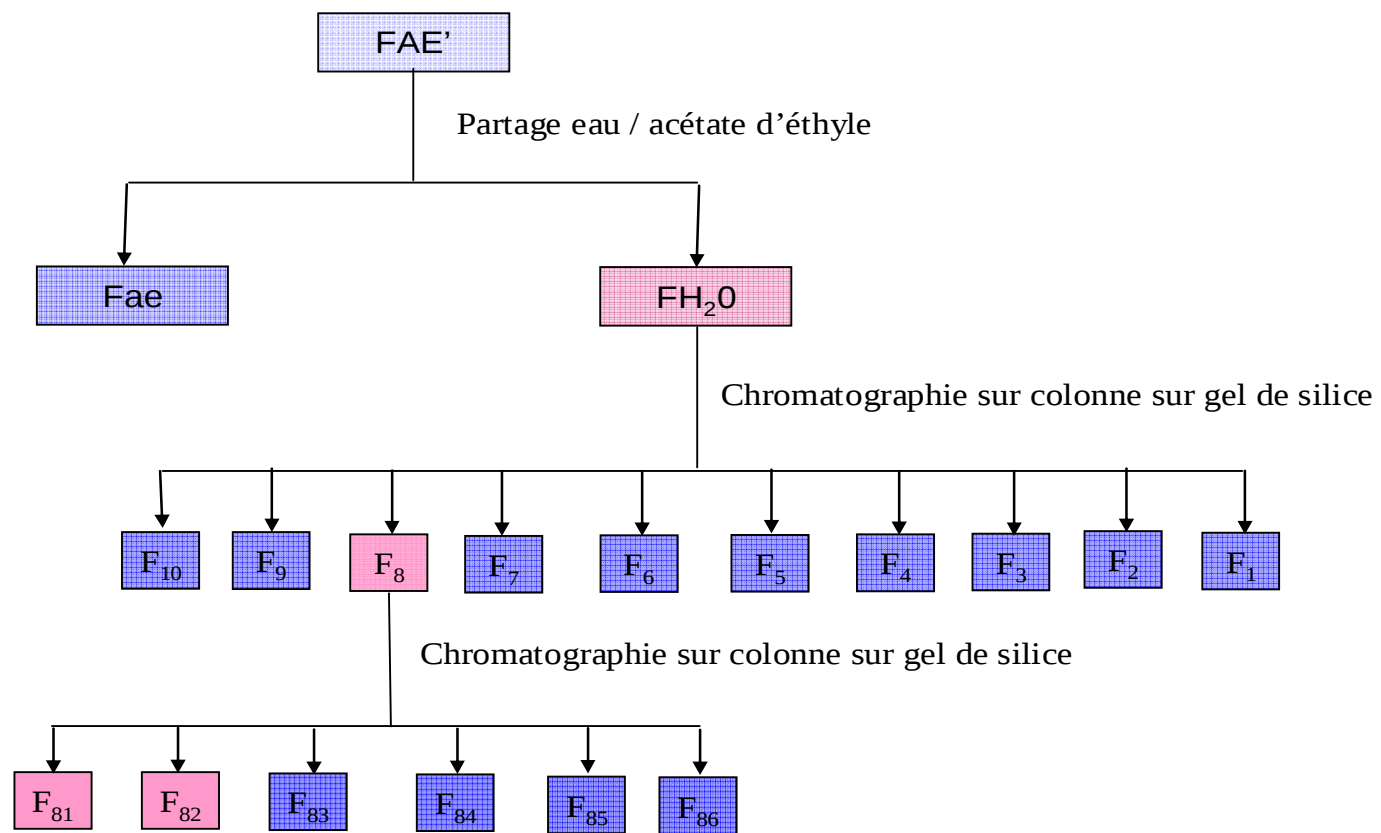


Figure 4: Fractionnement bioguidé de FAE'

I.5- Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique a pour objectif de caractériser les différentes familles chimiques présentes dans une plante.

Dans notre cas, différents tests basés sur l'utilisation des réactifs spécifiques ont été utilisés selon les méthodes décrites par FONG et ses collaborateurs en 1977 (17).

La présence de chaque famille est caractérisée par l'apparition d'un précipité ou d'un changement de couleur

Tableau I: Résumé des différents tests utilisés pour détecter les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait ETF (17)

FAMILLES CHIMIQUES A DETERMINER	TESTS	SOLVANTS	REACTIFS	REACTION POSITIVE
ALCALOÏDES	-macération chlorhydrique -test préliminaire	HCl 12% HCl 2N	Réactif de : -Wagner -Mayer -Dragendorff	Apparition de précipité
FLAVONOÏDES ET LEUCOANTHOCYANES	Wil stater	Ethanol	HCl concentré + tournures de magnésium	-Coloration rouge (Flavones) -Coloration rouge à pourpre (Flavonols) -Coloration rouge violacée (Flavanones et Flavanols)
	Bath Smith	Ethanol	HCl concentré : -A chaud -A froid	Coloration rouge violacée (Leucoanthocyanes) Coloration rouge (Anthocyanes)
TANINS ET POLYPHENOLS		Eau distillée	-Gélatine à 1% -Gélatine salée -FeCl ₃ 10% dans du méthanol	Apparition de précipité (Polyphénols) Apparition de précipité (Tanins) -Coloration bleu vert (tanins condensés) -Coloration noire bleuâtre (tanins hydrolysables) -Incolore (absence de tanins)
QUINONES		Benzène	NH ₄ OH	Coloration de la phase alcaline rouge violacée (quinones)
STEROÏDES ET TERPENOÏDES	Liebermann Burchard	Chloroforme	Anhydre acétique + H ₂ SO ₄ concentré	-Coloration rouge pourpre (triterpénoides) - Coloration violette ou bleu vert (Stéroïdes)
	Salkowski	Chloroforme	H ₂ SO ₄ concentré	Anneau de séparation rouge (Stéroïls insaturés)
	Badjet-Kedde	Chloroforme	Acide picrique	Coloration rouge (Stéroïdes lactoniques)
	Keller-Killiani	Chloroforme	FeCl ₃ 10% + acide acétique glacial	Anneau de séparation rouge pourpre (Désoxy-2-sucres)
SAPONINES	Test de mousse	Eau distillée		Mousse persistante (Saponines)
POLYSACCHARIDES		Méthanol		Apparition de précipité

II-ETUDES PHARMACOLOGIQUES

II.1- Animaux d'expérience

Deux genres d'animaux ont été utilisés :

- Des cobayes albinos ou tricolores pesant entre 300 et 400g ont été utilisés pour la caractérisation et la détermination de l'activité broncho-dilatatrice.
- Des souris de race SWISS de 25 à 30g ont été utilisés pour les tests de toxicité

II.2- Prélèvement, préparation et montage de la trachée isolée de cobaye

L'animal a été assommé par un coup sec sur la nuque. Après ouverture de la gorge, 1,5 à 2 cm de la trachée a été prélevée, puis placée dans une boîte de contention contenant de la solution de Krebs-Henseleit préchauffée à 37°C et dont la composition en mM est la suivante (18) :

- NaCl : 120
- NaHCO₃ : 25
- KCl : 4,72
- CaCl₂ : 2,5
- MgSO₄ : 0,5
- KH₂PO₄ : 1,2
- D-glucose : 11

L'organe a été ensuite nettoyé en enlevant les tissus conjonctifs puis découpés en hélice. Le strip a été suspendu dans une cuve à organe de 20ml de capacité contenant de la solution de survie et soumis à une tension de base isotonique de 2g. La température de la solution dans la cuve est maintenue à 37°C et aérée avec du carbogène composé de 95% de O₂ et 5% de CO₂ pour maintenir son pH à 7,4.

Ensuite, l'organe a subi une équilibration de 1 heure intercalée d'un rinçage toutes les 15 minutes qui correspond à une période d'adaptation aux conditions de l'expérience.

Après équilibration, l'organe a été sensibilisé avec l'histamine à concentration de 10⁻⁵ M dans le bain. Puis après 3 rinçages successifs, l'organe a été laissé au repos pendant 15 minutes pour retrouver sa tension de base.

II.3- Protocoles expérimentaux

A- Effet des extraits bruts et des différentes fractions sur la trachée pré-contractée à l'histamine

L'extrait brut de l'écorce de tige (EET) et de tige feuillée (ETF), l'extrait EA et ED ainsi que les différentes fractions (FI, FII, FAE, FAE', FA, FM) ont été dissous dans du DMSO puis dilués avec de l'eau distillée pour que la teneur maximale en DMSO dans la cuve ne dépasse pas 1%.

Après la sensibilisation, l'organe a été pré-contracté à l'histamine à raison de 5×10^{-6} M dans le bain. Au plateau de contraction, l'extrait EET a été injecté dans le bain de façon cumulative pour avoir dans le bain une concentration allant de 50 à 800 µg/ml. L'effet relaxant de l'extrait a été exprimé en pourcentage de relaxation et la valeur de CE_{50} a été calculée.

En adoptant le même protocole, les valeurs de CE_{50} de ETF et des différentes fractions ont été calculées mais avec des concentrations croissantes et cumulatives différentes :

- 50 à 1000 µg/ml pour EA, ETF et FI
- 50 à 800 µg/mL pour ED et FM
- 50 à 400 µg/ml pour FA, FII et FAE
- 20 à 400 µg/ml pour FAE'

B- Effet de la fraction FAE' sur la trachée pré-contractée aux différents agents contractuants

a- Acétylcholine

Après équilibration, l'organe a été sensibilisé avec 10^{-5} M d'acétylcholine, puis rincé 3 fois suivi d'un repos de 15 minutes. Après ce temps, l'organe a été pré-contracté avec 5×10^{-6} M du même agoniste. Au plateau de contraction, des concentrations croissantes et cumulatives allant de 20 à 400 µg/ml de FAE' ont été testées.

La valeur de CE_{50} a été calculée.

b- KCl

Après sensibilisation à l'histamine (10^{-5} M), l'organe a été rincé trois fois avec de la solution de Krebs - Henseleit dépourvue de KCl. Après un repos de 15 minutes, l'organe a été pré-contracté avec 40mM de KCl. Au plateau de contraction, des concentrations croissantes et cumulatives allant de 50 à 1200 µg/ml de FAE' ont été testées.

La valeur de CE_{50} a été calculée.

C- Effet de la fraction FAE' vis-à-vis de l'activité contractile de l'histamine sur la trachée isolée de cobaye

Afin d'étudier l'éventuelle activité inhibitrice de la fraction FAE' vis-à-vis de l'histamine, la relation effet-concentration de l'histamine en présence et en absence de la fraction FAE' a été étudiée.

Après sensibilisation, l'histamine a été injecté dans le bain de façon cumulative jusqu'à l'obtention de l'effet maximal en testant des concentrations croissantes de 10^{-8} à 3×10^{-4} M.

L'amplitude de contraction provoquée par chaque concentration a été enregistrée et la courbe effet-concentration a été construite.

L'organe a été ensuite rincé 3 fois puis toutes les 15 minutes jusqu'à ce qu'il retrouve sa tension initiale. Puis, ces mêmes opérations ont été répétées mais en présence de la fraction FAE'. Elle a été incubée 10 minutes dans le bain avant l'injection de l'histamine à concentrations croissantes et cumulatives.

Les concentrations de FAE' testées ont été de 100 et 200 µg/ml.

D- Effet de la fraction FAE' vis à vis de l'activité contractile de CaCl_2 sur trachée isolée de cobaye

Afin d'étudier l'activité anticalcique de la fraction FAE', la relation effet-concentration du CaCl_2 en présence et en absence de la fraction FAE' a été étudiée.

La solution de Krebs - Henseleit sans CaCl_2 a été utilisée après la sensibilisation.

De la solution de CaCl_2 a été injectée petit à petit dans le bain de façon cumulative pour avoir des concentrations de 0,25 à 32mM. Les amplitudes de contraction après chaque injection ont été enregistrées et la courbe effet-concentration a été construite.

L'organe a été ensuite rincé 3 fois puis toute les 15 minutes jusqu'à ce qu'il retrouve sa tension initiale. La fraction FAE' a été incubée 10 minutes dans le bain et les mêmes opérations que les précédentes ont été effectuées.

Les concentrations de la fraction FAE' testées ont été de 100 et 200 µg/ml.

E- Effet du propranolol sur l'activité broncho-relaxante de la fraction FAE'

Le propranolol est un antagoniste des récepteurs β adrénergiques (18). Son effet sur l'activité broncho-relaxante de FAE' a été étudié.

Après la sensibilisation à l'histamine, l'organe a été pré-contractionné à l'histamine à la concentration de 5×10^{-6} M. Au plateau de contraction, la fraction FAE' a été injectée cumulativement dans le bain pour avoir des concentrations allant de 20 à 400 μ g/ml.

L'amplitude de relaxation provoquée par chaque concentration a été enregistrée et la courbe effet-concentration a été construite.

L'organe a été ensuite rincé 3 fois puis toutes les 15 minutes durant 30 minutes pour retrouver sa tension initiale. Ensuite, les mêmes opérations ont été répétées en présence de propranolol. Ce dernier a été incubé dans le bain 10 minutes avant d'injecter la fraction FAE' à concentrations croissantes et cumulatives.

Les concentrations du propranolol utilisées ont été de 10^{-6} M et 10^{-8} M.

L'effet relaxant de l'extrait a été exprimé par les valeurs de CE_{50} en présence et en absence du propranolol.

F- Effet du propranolol et du bleu de méthylène sur l'activité broncho-relaxante de EET

Le bleu de méthylène est un inhibiteur de la guanylate cyclase.

Après la sensibilisation, l'organe a été pré-contractionné à l'histamine à la concentration de 5×10^{-6} M. Au plateau de contraction, EET a été injecté de façon cumulative pour avoir dans le bain des concentrations variant de 50 à 1000 μ g/ml.

L'amplitude de relaxation provoquée par chaque concentration a été enregistrée et la courbe effet-concentration a été construite.

L'organe a été ensuite rincé 3 fois puis toutes les 15 minutes durant 30 minutes pour retrouver sa tension initiale. Ensuite, les mêmes opérations ont été répétées en présence de propranolol à 10^{-5} M ou de bleu de méthylène à 10^{-6} M. Ce dernier a été incubé dans le bain 10 minutes avant d'injecter EET de façon cumulative pour avoir dans le bain des concentrations variant de 50 à 1000 μ g/ml.

G- Effet de la combinaison fraction FAE'- théophylline sur la trachée pré-contractée à l'histamine

L'effet de la combinaison fraction FAE'- théophylline a été comparé à la somme des effets relaxants de la fraction FAE' et de la théophylline étudiés séparément.

Après pré-contraction à l'histamine $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $15 \mu\text{g/ml}$ de théophylline a été testé au plateau de contraction. Le pourcentage de relaxation correspondant a été calculé. Après lavage, l'organe a été de nouveau pré-contracté à la même concentration de l'histamine puis l'effet broncho-relaxant de la fraction FAE' a été évalué avec une concentration de $75 \mu\text{g/ml}$ dans le bain. Le pourcentage de relaxation correspondant a été calculé.

Concernant l'étude de l'effet de la combinaison de la théophylline et de la fraction, après pré-contraction de l'organe, les 2 produits ont été injectés simultanément dans le bain au plateau de contraction pour avoir dans le bain $15 \mu\text{g/ml}$ de théophylline et de $75 \mu\text{g/ml}$ de FAE'.

La relaxation correspondante a été calculée.

II.4- Analyse statistique et expression des résultats

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne des valeurs obtenues $\pm$ écart-type ($\bar{X} \pm \text{e.s.m}$)

Le test «t» de Student a été utilisé pour comparer et analyser les résultats (19).

La différence a été considérée comme statistiquement significative pour $p < 0,05$.

La CE_{50} exprime la concentration de l'agoniste, de l'extrait ou de la fraction testée relâchant ou contractant l'organe de 50% de l'effet maximal. Elle a été calculée par régression linéaire.

L' Emax exprime l'effet maximal correspondant à 100 % de contraction ou de relaxation.

II.5- Produits et substances utilisés

- Différents sels (NaCl , NaHCO_3 , KCl , CaCl_2 , MgSO_4 , KH_2PO_4), ainsi que du D-glucose de marque Prolabo ont été utilisés pour la préparation de la solution de Krebs-Henseleit légèrement modifiée.

- Les agonistes de références (Histamine, Théophylline, Acétylcholine,) et antagonistes (Propranolol, Bleu de méthylène) utilisés sont de marque Sigma.

- Le diméthylsulfoxyde (DMSO-ACE ou Associated Chemical Enterprises) a été utilisé pour la dissolution des divers extraits et fractions.

III- ETUDE DE TOXICITE AIGUE

Des souris de race SWISS à jeun depuis 12 heures, mâles ou femelles pesant entre 22 et 25g ont été utilisées.

III.1- Voie orale

Les animaux ont été repartis en 5 lots de 6 souris.

Les souris du premier lot ou lot témoin ont reçu de l'eau distillée tandis que les souris des autres lots ont été traitées avec de l'extrait brut aux doses respectives de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/kg.

L'eau distillée du premier lot et l'extrait ETF pour les autres lots ont été administrés par gavage. La quantité administrée a été de 0,5 ml.

Les changements de comportements des animaux des lots traités par rapport au lot témoin et l'éventuelle mortalité ont été observés après administration des produits, après 30 minutes, toutes les heures durant les 6 premières heures et une fois par jour durant 3 jours (20).

III.2- Injection intra péritonéale

Les souris ont été réparties en 7 lots de 6 souris. Par injection intra péritonéale, les animaux du lot témoin ont reçu de l'eau distillée et les souris des autres lots ont été traitées avec l'extrait ETF aux concentrations de 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/kg.

Le volume d'administration a été de 0,25 ml.

Les changements de comportements et l'éventuelle mortalité ont aussi été observés comme précédemment.

RESULTATS

I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

I.1- Rendements des extractions et des fractionnements

Les poids et rendements des extraits et des différentes fractions sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Rendements des extractions et des fractionnements

Extrait et fractions	Poids obtenu (g)	Rendements (%)
ECORCE DE TIGE		
EET	20,52	6,41
EA	10,4	3,25
ED	3,86	1,21
TIGE FEUILLEE		
ETF	144,96	12,08
FI	2,5	0,2
FII	10,48	0,87
FM	26,98	2,25
FA	72,53	6,04
FAE	12,98	1,07

EA : Extrait aqueux de l'écorce de tiges

ED : Extrait dichlorométhane de l'écorce de tige

EET : Extrait brut de l'écorce de tige

ETF : Extrait brut de tige feuillée

F A : Fraction aqueuse

FAE : Fraction acétate d'éthyle

F I : Regroupement des émulsions dans les phases hexanique et dichlorométhane

F II : Regroupement des phases organiques dans les phases hexanique et dichlorométhane

F M : Fraction méthanolique

I.2- Criblage phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique de ETF sont montrés dans le tableau III.

On note :

- L'absence des Alcaloïdes, Terpénoides et Stéroïdes lactoniques
- Une faible concentration de Saponines, Tanins et Polysaccharides
- Une présence moyenne de Quinones et Flavonols
- Une forte concentration de Polyphénols, Stéroïdes, Stérols insaturés et Désoxy-2-sucres

Tableau III : Résultats du criblage phytochimique effectué sur la tige feuillée de la plante

FAMILLES CHIMIQUES	PRESENCE RELATIVE
Alcaloïdes	-
Terpénoides	-
Stéroïdes lactoniques	-
Saponines	+
Tanins	+
Polysaccharides	+
Flavonols	++
Quinones	++
Polyphénols	+++
Stéroïdes	+++
Stérols insaturés	+++
Désoxy-2-sucres	+++

Légende :

- : absence
- + : présence à faible concentration
- ++ : présence à moyenne concentration
- +++ : présence à forte concentration

I.3- Analyses par CCM comparatives de l'extrait brut ETF et des différentes fractions issues après fractionnement bioguidé

Les profils chromatographiques sur CCM de ETF et des fractions issues de son fractionnement bioguidé sont montrés sur la figure 5.

L'extrait brut ETF présente plusieurs taches. Après fractionnement de ETF, la fraction FAE' possède des taches que les autres fractions (FI, FII, FM, FA) ne possèdent pas.

Suite au partage dans eau – acétate d'éthyle de FAE', une partie des produits de FAE' se rencontrent seulement dans F_{H_2O} .

Après fractionnement de F_{H_2O} , une tache révélée à la vanilline est observable uniquement avec F_8 .

AcEt / MeOH / Hex / Amm
(7 / 1 / 1.98 / 0.02)



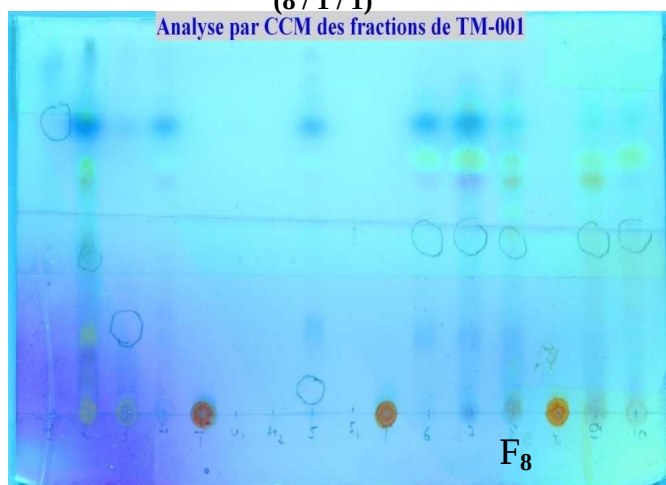
A

AcEt / MeOH / Hex / Amm
(7 / 1 / 1.98 / 0.02)



B

AcEt / MeOH / Hex
(8 / 1 / 1)
Analyse par CCM des fractions de TM-001



C

AcEt / MeOH / Hex
(8 / 1 / 1)



D

Figure 5 : Analyses par CCM comparatives des l'extract brut ETF et des différentes fractions

- A : fractions FAE', Fae et F_{H_2O} (Révélation : vanilline)
- B : fractions FAE', Fae et F_{H_2O} (Vue sous UV à 365 nm)
- C : F_{H_2O} et ses différentes fractions (Révélation à la vanilline)
- D : F_{H_2O} et F_8 (Vue sous UV à 365 nm)

II. ETUDES PHARMACOLOGIQUES

II.1- Effet relaxant de l'extrait brut et des différentes fractions sur trachée pré-contractée à l'histamine

a) Ecorce de tige

L'extrait EET ainsi que les deux fractions issues de son partage ont provoqué un effet broncho-relaxant concentration-dépendant.

Pour l'extrait EET, la valeur de CE_{50} est de $372,21 \pm 53,0 \mu\text{g/ml}$ ($n=10$). Avec l'extrait aqueux (EA), la CE_{50} a fortement augmenté ($> 1000 \mu\text{g/ml}$). L'extrait dichlorométhane (ED) a présenté une CE_{50} égale à $247,21 \pm 26,1 \mu\text{g/ml}$ ($n=4$).

La quantité de l'extrait issu de l'écorce de tige a été insuffisante pour pouvoir continuer le fractionnement bioguidé. C'est pour cette raison que nous avons continué notre étude sur la tige feuillée.

b) Tige feuillée

Le tableau IV montre les valeurs de CE_{50} de l'extrait ETF et des différentes fractions issues de cet extrait ETF.

Sur la trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine, ETF et ses différentes fractions ont provoqué un effet relaxant concentration-dépendant.

Parmi les différentes fractions testées, c'est la fraction FAE qui est la plus active ($CE_{50} = 136,92 \pm 12,2 \mu\text{g/ml}$).

La valeur de CE_{50} de FAE et de la fraction sans polyphénols (FAE') ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). C'est pour cette raison que la suite de nos études a été conduites sur FAE'.

Tableau IV : Valeurs de CE_{50} de l'extrait ETF et ses différentes fractions sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine ($X \pm \text{e.s.m}$)

Extrait et fractions testés	Valeurs de CE_{50} ($\mu\text{g /ml}$)
ETF	$562,85 \pm 38,0$ ($n=6$)
F I	$690,90 \pm 33,7$ ($n=2$) ($p < 0,05$)
F M	$344,60 \pm 38,7$ ($n=2$) ($p < 0,02$)
F A	$186,81 \pm 9,2$ ($n=2$) ($p < 0,01$)
F II	$170,25 \pm 6,8$ ($n=2$) ($p < 0,001$)
FAE	$136,92 \pm 12,2$ ($n=4$) ($p < 0,001$)
FAE'	$128,88 \pm 27,9$ ($n=10$) ($p < 0,001$)

II.2- Effet relaxant de la fraction FAE' sur trachée pré-contractée à l'acétylcholine et au KCl

En utilisant différents agents contractuants (ACh et KCl), l'effet de la fraction FAE' a été étudié. Cet effet est concentration-dépendant. Les valeurs de CE_{50} ont été calculées et sont regroupées au tableau V.

Quand l'organe a été pré-contracté à l'ACh, la valeur de CE_{50} a été de 164,28 $\mu\text{g/ml}$. En utilisant le KCl, cette valeur a augmenté à 515,67 $\mu\text{g/ml}$. FAE' est moins active sur un broncho-constriction provoquée au KCl qu'à l'ACh. La différence est hautement significative ($p < 0,001$).

Tableau V : Valeurs de CE_{50} de FAE' sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'ACh et au KCl ($X \pm \text{e.s.m}$; $n=3$)

Agents contractuants	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
ACh	164,28 $\pm$ 3,7
KCl	515,67 $\pm$ 20,6 ($p < 0,001$)

II.3- Effet inhibiteur de la fraction FAE' sur la réponse contractile de l'histamine

Les courbes effet-concentrations de l'histamine en absence et en présence de 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de FAE' sont présentées dans la figure 6.

L'histamine agit avec une CE_{50} de $1,53 \pm 0,36 \times 10^{-6}$ M sur la trachée de cobaye préparée en hélice.

La fraction FAE' déplace la courbe effet-concentration de l'histamine vers la droite. En présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ ou 200 $\mu\text{g/ml}$ de FAE', la CE_{50} de l'histamine a augmenté mais la différence n'est pas statistiquement significative mais on a noté une réduction de l' E_{max} ($p < 0,02$). (Tableau VI)

Tableau VI : Effet de FAE' sur la réponse contractile de l'histamine ($X \pm \text{e.s.m}$; $n=3$; NS:Non Significatif)

FAE'	CE_{50} de l'histamine (M)	Réduction de l' E_{max} (%)
Histamine seule	$1,53 \pm 0,4 \times 10^{-6}$ M	
Avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de FAE'	$2,14 \pm 0,1 \times 10^{-6}$ M (NS)	22,82 $\pm$ 2,5 ($p < 0,02$)
Avec 200 $\mu\text{g/ml}$ de FAE'	$2,26 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M (NS)	34,56 $\pm$ 3,5 ($p < 0,02$)

II.4- Effet inhibiteur de la fraction FAE' sur la réponse contractile de Ca Cl₂

Les courbes effet-concentrations de Ca Cl₂ en absence et en présence de 100 et 200µg/ml de FAE' sont présentées dans la figure 7.

CaCl₂ agit avec une CE₅₀ égale à 1,82 ± 0,3 mM sur la trachée isolée de cobaye découpée en hélice.

En présence de FAE' d'une part, la valeur de CE₅₀ de Ca Cl₂ a augmenté et d'autre part, la valeur de son Emax a diminué. Un déplacement de la courbe effet - concentration de Ca Cl₂ vers la droite a aussi été constaté. Ces modifications sont proportionnelles à la concentration de FAE'.

Tableau VII : Effet de FAE' sur la réponse contractile de CaCl₂ (X± e.s.m ; n=3)

Produits testés	CE ₅₀ de Ca Cl ₂ (µg/ml)	Réduction de l'Emax (%)
Ca Cl ₂ seul	1,82 ± 0,3	
En présence de 100 µg/ml de FAE'	3,52 ± 0,3 (p<0,02)	26,91± 2,6 (p<0,02)
En présence de 200µg/ml de FAE'	5,93 ± 0,6 (p<0,01)	43,37± 2,8 (p<0,01)

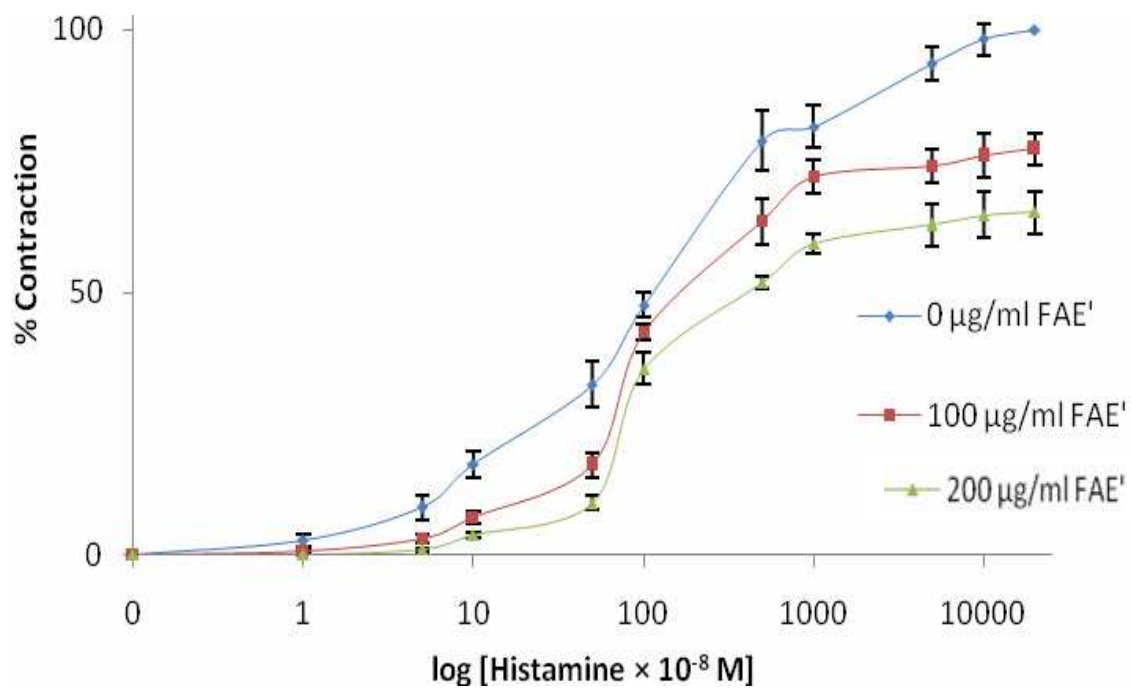


Figure 6 : Courbe effet-concentration de l’histamine en absence et en présence de FAE' sur trachée isolée de cobaye ($\bar{X} \pm \text{e.s.m}$; n=3)

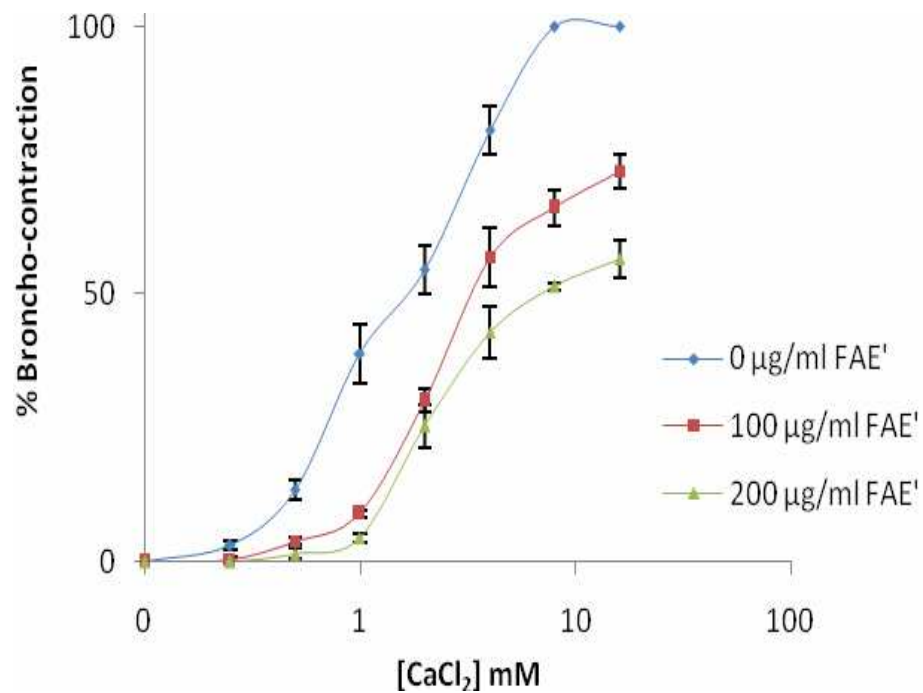


Figure 7 : Courbe effet-concentration de CaCl₂ en absence et en présence de FAE' sur trachée isolée de cobaye ($\bar{X} \pm \text{e.s.m}$; n=3)

II.5- Effet du propranolol sur l'activité broncho-relaxante de FAE'

Le tableau VIII montre les valeurs de CE_{50} de FAE' en présence et en absence de 10^{-8} M et 10^{-6} M de propranolol.

La figure 8 présente les courbes effet-concentrations de FAE' en présence et en absence de propranolol.

La fraction FAE' agit avec une CE_{50} de 128,88 μ g/ml.

La CE_{50} de FAE' a augmenté en présence de 10^{-8} M ($p < 0,05$). ou 10^{-6} M ($p < 0,02$) de propranolol.

Tableau VIII : Valeurs de CE_{50} de FAE' en absence et en présence de propranolol ($X \pm e.s.m$; $n=3$)

FAE'	Absence de propranolol	En présence de 10^{-8} M de propranolol	En présence de 10^{-6} M de propranolol
CE_{50} (μ g/ml)	128,88 $\pm$ 27,9	166,22 $\pm$ 2,2 ($p < 0,05$)	183,40 $\pm$ 7,9 ($p < 0,02$)

II .6- Effet du propranolol et du bleu de méthylène sur l'activité broncho-relaxante de EET

La figure 9 présente les courbes effet-concentrations de EET en présence et en absence du propranolol ou du bleu de méthylène.

En présence de 10^{-5} M de propranolol, la CE_{50} est de 594 $\pm$ 15,62 μ g/ml et elle est de 616,13 $\pm$ 39,58 μ g/ml avec 10^{-6} M de bleu de méthylène.

Tableau IX : Valeurs de CE_{50} de EET en absence et en présence de propranolol ou de bleu de méthylène ($X \pm e.s.m$; $n=3$)

EET	Absence d'inhibiteur	En présence de 10^{-5} M de propranolol	En présence de 10^{-6} M de bleu de méthylène
CE_{50} (μ g/ml)	372,21 $\pm$ 53	594 $\pm$ 15,62 ($p < 0,05$)	616,13 $\pm$ 7,9 ($p < 0,02$)

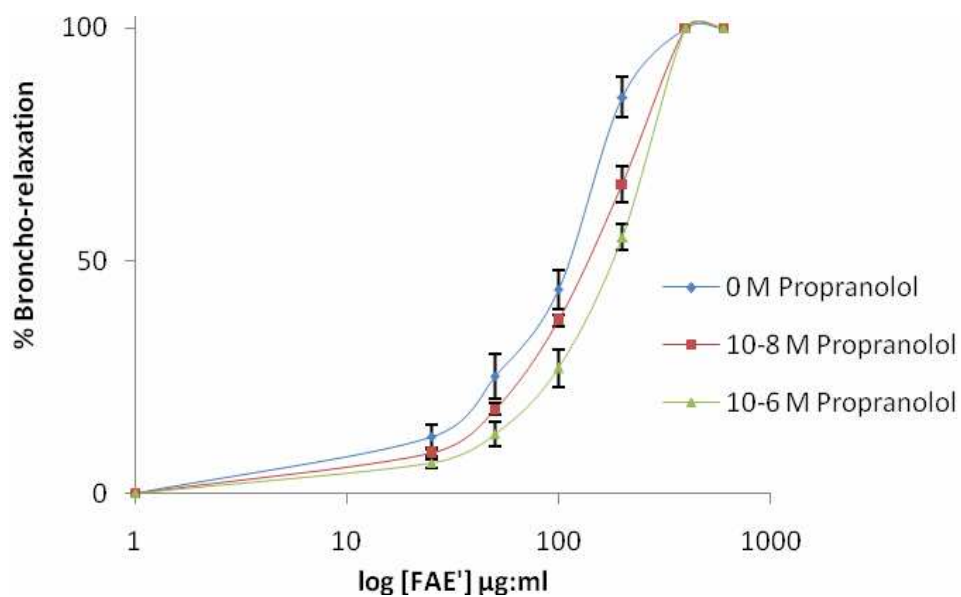


Figure 8 : Courbe effet-concentration de FAE' en absence et en présence de propranolol sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine ($X \pm e.s.m$; $n=3$)

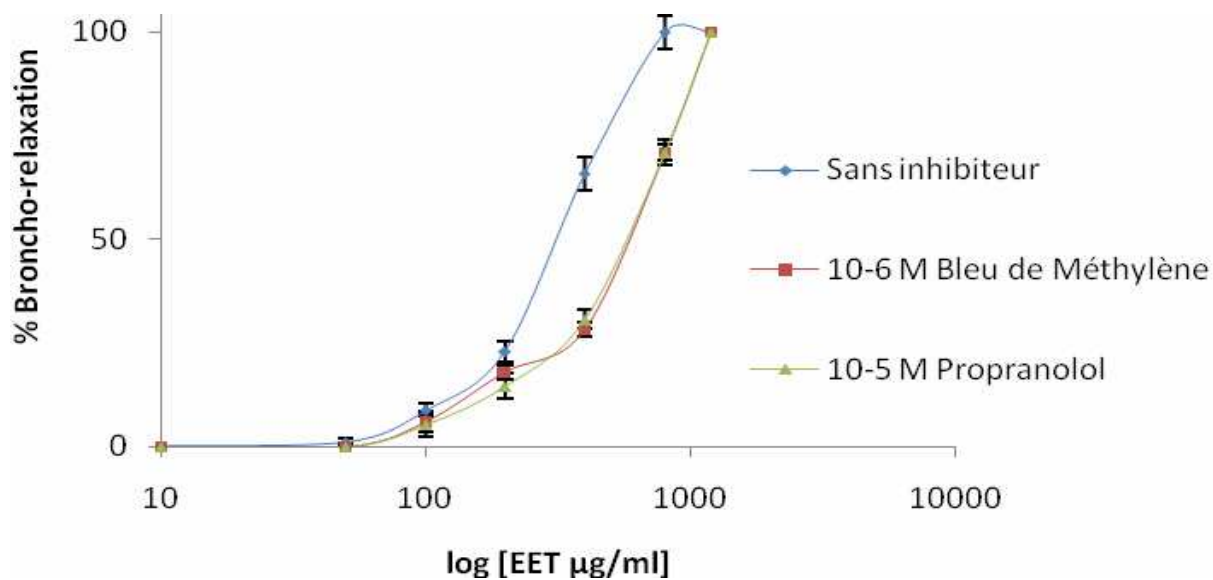


Figure 9 : Courbe effet-concentration de EET en absence et en présence de propranolol ou de bleu de méthylène sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine ($X \pm e.s.m$; $n=3$)

II .7-Effet de la combinaison de FAE' - théophylline sur la trachée pré-contractée à l'histamine

La figure 10 montre les effets relaxants de 75 µg/ml de FAE', de 15 µg/ml de théophylline, de la somme de ces deux effets et de leur combinaison.

75µg/ml de FAE' a provoqué $26,06 \pm 1,3$ % (n=3) de relaxation sur la trachée pré-contractée à l'histamine, tandis que 15µg/ml de théophylline a produit $34,22 \pm 4,0$ % (n=3).

La somme de ces deux effets relaxants a été calculée et a donné $60,04 \pm 2,6$ %.

Quand les deux produits ont été simultanément injectés (15µg /ml de théophylline et 75 µg/ml de FAE'), la relaxation mesurée a été de $77,71 \pm 2,1$ % (n= 3).

Comparée à l'activité des deux produits combinés (77,71%), la somme des effets des deux produits (60,04) est inférieure ($p < 0,01$). La combinaison de ces deux produits produit un effet synergique.

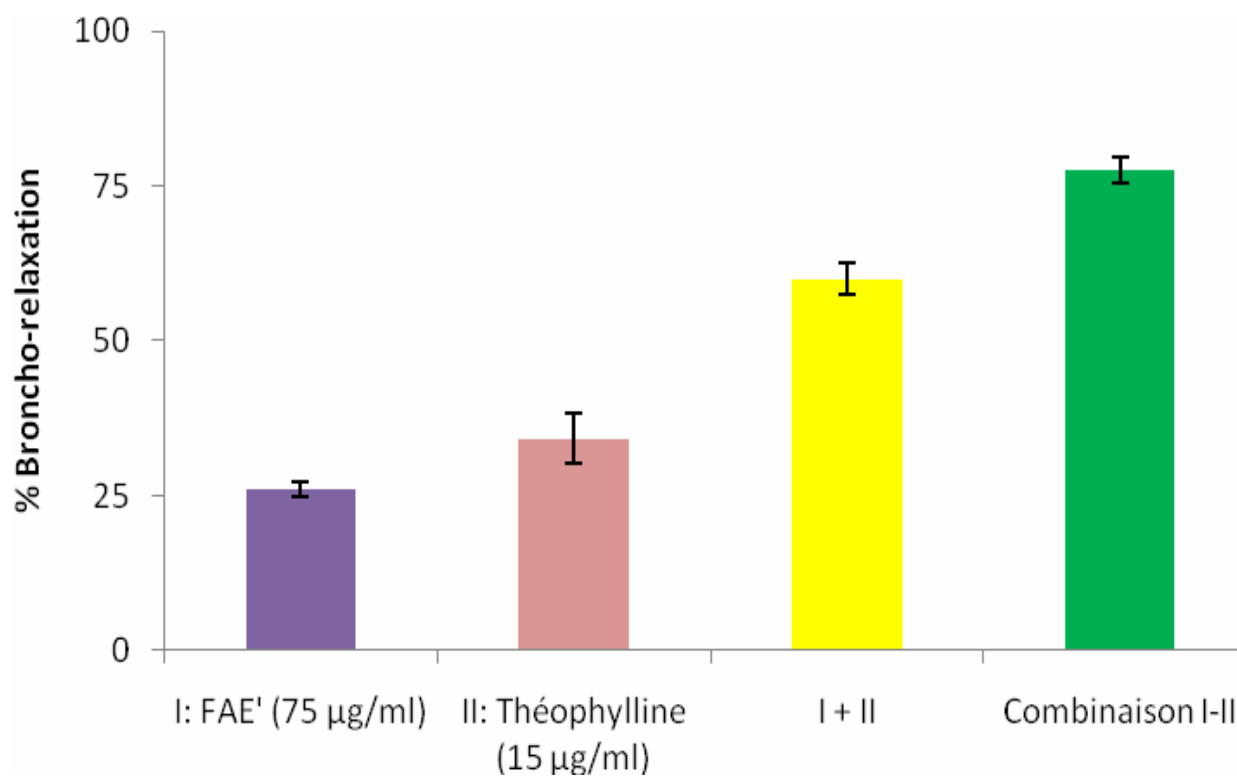


Figure 10 : Effet broncho-relaxant de 75 µg/ml de FAE', de 15 µg/ml de théophylline et de leur combinaison sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine ($\bar{X} \pm \text{e.s.m}$; n=3)

II.8- Effet relaxant des différentes fractions issues du fractionnement bioguidé de FAE' sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine

L'effet broncho-relaxant des fractions issues du partage eau – acétate d'éthyle de FAE' est présenté dans le tableau X. La fraction F_{H_2O} est plus active que Fae avec un E_{max} obtenu à $320\mu\text{g/ml}$ alors qu'avec la fraction Fae, l' E_{max} a été obtenu à $1000\mu\text{g/ml}$.

Tableau X: Valeurs de CE_{50} de F_{H_2O} et Fae sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine ($X \pm \text{e.s.m}$; $n=3$; $p<0,01$)

Fractions testées	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Fae	$473,62 \pm 6,9$
F_{H_2O}	$101,86 \pm 4,3$ ($p<0,01$)

Après fractionnement par chromatographie sur colonne de F_{H_2O} , différentes fractions ont été testées sur la trachée pré-contractée à l'histamine.

D'après les résultats regroupés dans le tableau XI, la fraction F_8 est la plus active avec une valeur de CE_{50} égale à $88,13 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$. ($p<0,001$)

Tableau XI: Valeurs de CE_{50} des différentes fractions issues de F_{H_2O} sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine ($X \pm \text{e.s.m}$; $n=3$)

Fractions testées	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrations pour avoir E_{max} ($\mu\text{g/ml}$)
F_2	$498,53 \pm 7,3$	1000
F_5	$256,1 \pm 5,3$ ($p<0,02$)	600
F_8	$88,13 \pm 3,4$ ($p<0,001$)	240

La fraction F_8 a été fractionnée à son tour. Différentes fractions issues de ce fractionnement ont été testées sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine. Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous

Tableau XII : Effet relaxant des différentes fractions issues du fractionnement de F₈ (X± e.s.m ; n=3 ;NS :Non Significatif)

Fractions testées	CE ₅₀ (µg/ml)	Concentrations pour avoir Emax (µg/ml)
F ₈₁	64,68 ± 3,7	120
F ₈₂	66,63 ± 1.1 (NS)	120
F ₈₃	132,58 ± 8,2 (p<0,05)	240
F ₈₆	310 ± 5,4 (p<0,01)	800

Ce sont les deux fractions de tête F₈₁et F₈₂ qui sont les plus actives. Elles ont ensuite été regroupées car elles sont chimiquement identiques.

III. TOXICITE AIGUE

III.1- Voie orale

Des signes de toxicité caractérisés par la diminution de l'activité motrice et la somnolence commencent à apparaître à partir de la dose de 0,5g/kg.

A la dose de 0,5g/kg, ces signes apparaissent à partir de la 20^e minute de l'administration et disparaissent après 6 heures.

A partir de 1,5g/kg, les signes apparaissent dès la 10^e minute et persistent pendant 20heures. Les animaux qui ont survécu retrouvent leur physiologie normale tandis que d'autres sont décédés.

50 % des animaux traités avec la dose de 2g/kg ont été décédés ($DL_{50}=2g/kg$). La mortalité apparaît entre la 6^e et la 22^e h.

III-2. Injection intrapéritonéale

Des signes toxiques apparaissent cinq minutes après l'administration de l'extrait. Ces signes sont caractérisés par une diminution de l'activité motrice, somnolence et ataxie. L'apparition de ces signes a duré 26 heures.

La mortalité apparaît dès la dose de 0,5g/kg.

100 % des animaux traités avec la dose de 1g/kg ont été décédés ($DL_{100}=1g/kg$). La mortalité apparaît entre la 2^e et la 20^e h après administration du produit.

La mortalité en fonction de la dose et de la voie d'administration est montrée dans le tableau XIII suivant.

Tableau XIII : Mortalité en fonction des doses et des voies d'administration

Doses (g/Kg)	MORTALITE (%)	
	Voie orale	Voie intrapéritonéale
0,125	Non déterminée	0
0,25	0	0
0,5	0	33,3
1	0	100
1,5	33,3	100
2	50	100

DISCUSSION

Tetracera madagascariensis (DILLENIACEES) est une liane de la région Est et Nord de Madagascar. Plusieurs utilisateurs affirment l'efficacité de cette plante pour traiter l'asthme. L'asthme est un trouble inflammatoire de la voie respiratoire à l'origine du rétrécissement des voies respiratoires. De ce fait, tous les médicaments capables d'agir contre cette obstruction sont utilisés pour traiter l'asthme.

Testés sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine, les deux extraits bruts de la plante EET et ETF provoquent un effet broncho-relaxant concentration dépendant. L'extrait EET est plus actif que ETF. Cette différence est probablement due à une teneur en principe(s) actif(s) broncho-dilatateur(s) beaucoup plus importante au niveau de l'écorce de tige que dans les feuilles. L'écorce est généralement considérée comme organe de stockage des métabolites secondaires alors que la feuille est plutôt un organe de synthèse. D'autre part leur profil chromatographique sur CCM n'est pas identique. L'existence d'autres composés qui pourraient avoir un effet myo-relaxant est une hypothèse à ne pas écarter totalement. La vérification de cette première hypothèse constitue une des nos prochaines étapes sur l'étude de cette plante.

Le problème d'approvisionnement en matière première nous a obligé d'abandonner l'écorce de tige malgré son activité beaucoup plus intéressante et de continuer nos études sur la tige feuillée.

L'extrait brut renferme tous les composés apolaires à polaires contenus dans la plante. Les différentes techniques de séparation par partage liquide-liquide utilisées lors du fractionnement de cet extrait ETF ont permis de séparer les différents composés en fonction de leur polarité relative dans les solvants utilisés. L'hexane et le dichlorométhane ont permis d'extraire les pigments et les composés apolaires. La phase aqueuse (Ph A2) contenant les molécules moyennement polaires et polaires, obtenue à la suite de ces deux premiers partages a été partagé de nouveau avec l'acétate d'éthyle. Seules les substances moyennement polaires sont présentes dans la fraction acétate d'éthyle (FAE) tandis que les molécules polaires vont dans la phase aqueuse (FA). Parmi les différentes fractions, FAE est la plus active.

Le passage à travers un gel de polyamide permet d'enlever les polyphénols qui sont retenus par le gel. FAE a subi cette filtration à travers le gel de polyamide et a donné la fraction FAE'. Cette dernière contiendrait donc des composés moyennement polaires sans polyphénols.

Après fractionnement de l'extrait ETF, la fraction acétate éthylique sans polyphénols FAE' qui est la plus active agit avec une CE_{50} quatre fois moins grande que celle de l'extrait brut ETF (Tableau IV). Elle a fait l'objet d'une analyse de mécanisme pharmacodynamique de son activité broncho-dilatatrice.

L'histamine est un médiateur capable de provoquer la contraction des fibres musculaires lisses au niveau des bronches par stimulation des récepteurs spécifiques de l'histamine type 1 (21).

L'acétylcholine est aussi un médiateur qui provoque la contraction des cellules musculaires lisses bronchiques en stimulant les récepteurs spécifiques de l'acétylcholine muscariniques type 3 (22, 23).

Effectivement, l'histamine et l'acétylcholine sont les médiateurs les plus impliqués dans les broncho-contractions à l'origine de la crise d'asthme (24, 25).

Dans les deux cas, la contraction est due à l'activation de la phospholipase C par l'intermédiaire des protéines Gq. Cette activation conduit à la production de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) qui à son tour va stimuler ses récepteurs au niveau de réticulum sarcoplasmiques (RS) (26, 27) qui sont des sites de stockage du calcium. L' IP_3 provoque la libération du calcium dans ces réservoirs par ouverture des canaux calciques (28, 29).

Cette libération du calcium stimule un mécanisme d'entrée du calcium extracellulaire induit par le calcium : Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} release pathway (30). Il y a donc augmentation de la concentration en calcium dans le milieu intracellulaire.

Le calcium dans le milieu intracellulaire va se complexer avec la calmoduline pour donner le complexe Ca^{2+} -calmoduline. Ce dernier va activer la MLCK qui est une kinase de la chaîne légère de myosine. Cette enzyme va phosphoryler l'ATP ase de la chaîne légère de myosine d'où les interactions des fibres actine – myosines c'est-à-dire la contraction du muscle lisse bronchique. (31)

En utilisant KCl pour la pré-contraction, la fraction FAE' est devenue moins active comparée à son activité avec les 2 précédents agonistes. En effet, KCl provoque une hyperpolarisation de cellules musculaires lisses trachéales. Cette modification du potentiel membranaire active les canaux calciques type voltage-dépendant (VOC) d'où l'entrée de Ca^{2+} à l'origine de l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium suivie de la contraction musculaire (32, 33).

Si une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium entraîne la contraction du muscle lisse bronchique (34, 35), une diminution de cette concentration conduira alors à la relaxation du muscle, soit par le restockage du calcium dans les RS, soit par la sortie du calcium dans le milieu extracellulaire.

La fraction FAE' est plus active lorsque les ions Ca^{2+} libérés par le RS sont impliqués. On peut en déduire que la fraction FAE' pourrait stimuler le restockage des ions Ca^{2+} dans les RS et provoque ainsi une broncho-relaxation.

L'extrait brut ETF et la fraction FAE' possèdent une activité broncho-dilatatrice d'où l'intérêt de déterminer leur probable mécanisme d'action.

Un déplacement des courbes effet-concentrations de l'histamine (figure 6) et de CaCl_2 (figure 7) vers la droite ainsi que la dépression de leur E_{max} sont caractéristiques d'un antagonisme non compétitif.

Alors la broncho-dilatation produite par FAE' ne passe ni par blocage des récepteurs spécifiques de l'histamine type 1 ni par blocage des canaux calciques.

Testée sur trachée isolée de cobaye, le propranolol inhibe de façon concentration dépendante et compétitive l'effet relaxant de FAE'. Le propranolol est un antagoniste des récepteurs β (18, 36) or au niveau de cellules musculaires lisses bronchiques, ce sont les récepteurs β_2 qui existent (34).

Ces résultats indiquent que la fraction FAE' agirait par stimulation des récepteurs β_2 . Les résultats obtenus avec l'extrait brut de l'écorce de tige confirment cette hypothèse.

Effectivement, la stimulation des récepteurs β_2 conduit à la relaxation musculaire par l'intermédiaire des protéines Gs qui à leur tour activent l'adénylate cyclase. Cette activation provoque la dégradation de l'ATP en AMP cyclique.

La formation de l'AMP cyclique provoque l'activation des PKA qui sont des protéines kinases (4, 37).

Des auteurs affirment que ces protéines kinases vont activer les pompes calciques membranaires d'où le recaptage des ions Ca^{2+} dans les RS et aussi la sortie de ces ions dans le milieu extra cellulaire (33).

D'autres auteurs ont rapporté (4) qu'en stimulant les récepteurs β_2 , il y a augmentation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique et ouverture des canaux potassiques à l'origine de la relaxation musculaire.

Certains auteurs notent que les protéines kinases PKA vont agir sur la MLCK pour inhiber l'interaction actines myosines (37).

En effet, tous ces auteurs affirment que la stimulation des récepteurs β_2 provoque une relaxation musculaire au niveau des bronches.

La théophylline est un inhibiteur non spécifique des phosphodiesterases. La phosphodiesterase est une enzyme capable de dégrader l'AMPc en métabolites inactifs (36, 38). Quand la fraction FAE' a été combinée avec la théophylline, leur association a provoqué un effet synergique (Fig.11).

Cet effet synergique confirme la probable activité broncho-relaxante de la fraction FAE' par stimulation des récepteurs β_2 adrénergiques.

Si on se réfère aux résultats du criblage phytochimique, l'extrait ETF a montré une forte concentration en polyphénols, désoxy-2-sucres, stéroïdes et en stérols insaturés (tableau III). Malgré les propriétés antioxydantes et le potentiel antiasthmatic des polyphénols (39), la fraction FAE' sans polyphénols possède encore l'activité broncho-relaxante, cette activité n'est donc pas due aux polyphénols.

Les désoxy-2-sucres sont des composés très polaires, de ce fait la fraction FAE' n'en possèdent pas. Donc l'activité biologique de la plante pourrait être attribuée à des composés de nature stéroïdienne dont les stérols insaturés.

La comparaison des résultats après administration par deux voies différentes (voie orale et injection intrapéritonéale) montre que la plante pourrait subir des transformations le long du tube digestif ou que l'absorption intestinale est faible.

L'étude de la toxicité aiguë indique que l'utilisation de cette plante à des doses élevées est toxique voire mortelle chez les souris (tableau XIII).

CONCLUSION

L'extrait hydroalcoolique de l'écorce de tige et de la tige feuillée de *Tetracera madagascariensis* possèdent une activité broncho-relaxante sur trachée isolée de cobaye.

Après fractionnement et analyse du mécanisme d'action, il a été mis en évidence que cette activité pourrait être due à la stimulation des récepteurs β_2 au niveau des cellules musculaires lisses des bronches.

Les molécules responsables de cette activité broncho-relaxante sont probablement de nature stéroïdienne.

Les résultats obtenus au cours de ce travail confirment l'utilisation traditionnelle de la décoction de l'écorce de tige et de la tige feuillée de la plante pour lutter contre l'asthme.

L'isolement du principe actif est actuellement en cours et les travaux ultérieurs consisteront à déterminer sa structure chimique et son mécanisme d'action moléculaire qui entreront dans le cadre de notre prochaine étude académique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MASOLI M., FABIAN D., HOLTS S., BEASLEY R., FONTAINE C.H., GORARD PH.(2004)
Le poids global de l'asthme
La lettre du pneumologue, Ed. EDIMAK, Puteaux France : 227-234
2. JEAN-MICHEL HURTEL (2007)
L'asthme et son traitement par les médicaments de synthèse, les plantes médicinales et les huiles essentielles
www.phytomania.com (22 Jan 2010)
3. PENARD-MORGAN C., RAHERISON C., CHARPIN D., KOPFERSCHMITT L., LAVAUD F., CAILLAUD D., ANNESI-MAESANO I. (2010)
Long term exposure to proximity air pollution and asthma and allergies in urban children
Eur. Resp. J., 21(40): 36-45
4. RABE K.F., SCHMIDT D.T. (2001)
Pharmacological treatment of asthma today
Eur. Resp. J., 18(34): 34s-39s.
5. SAETTA M., TURATO G. (2001)
Airway pathology in asthma
Eur. Resp. J., 18(34): 18s-23s
6. HOLGATE S.T., DAVIES D.E. (2009)
Rethinking the pathogenesis of asthma
Immunity. 18; 31(3):362-367
7. JUTEL M., AKDIS M., AKDIS C.A. (2009)
Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology
Clin. Exp. Allergy., 39(12): 1786-1800
8. CLARCK A.M. (1996)
Natural product as a resource for new drugs
Pharmacy. Resp., 13:1113-1141.
9. RAKOTO-RATSIMAMANGA A., BOITEAU P., MOUTON M. (1969)
Eléments de pharmacopée malagasy
Tome I, p.52-56,72-78
10. RAMANITRAHASIMBOLA D., RAKOTONDRAMANANA D.A., RASOANAIVO P., RANDRIANTSOA A., RATSIMAMANGA S., PALAZZINO G., GALEFFI C., NICOLETTI M. (2005)
Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent
J. Ethnopharmacol., 102: 400-40

11. PERRIER DE LA BATHIE H. (1950)
Flore de Madagascar et des Comores
Typographie Didot et compagnie, p.15-16

12. HECKEL E. (1910)
Plantes utiles de Madagascar
Ed. Simson, p.129

13. KAMOUN P. (1997)
Appareils et méthodes en biochimie
Médecine-Sciences, Ed. Flammarion, 3^è édition , p.25-36

14. AUDIGIE C., DUPONT G., ZONZAIN F. (1989)
Principes des méthodes d'analyse biochimique
Ed. Doin, Paris, tome1, p.190

15. DETERMANN H. (1968)
Gel chromatography
Ed. Verlay NY, p.1-195

16. MARINI G.S., BETTOLO (1964)
Thin-layer chromatography
Ed. MASSON, Paris, 2^è edition, p12-14

17. FONG H., TINMAN, FARNSWORTH N.R. (1977)
Phytochemical screening
Rev. University of Illinois (Chicago)

18. BOSKABADY M.H., TEYMOORY S. (2003)
The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig trachea to β -adrenergic agonist and its antagonist
Med. Sci. Monit., 9(9): 336-342

19. SCHWARTZ D. (1969)
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes
Médecine-Sciences, Ed. Flammarion, 3^è édition, 41-56

20. MALONE M.R., ROBICHAUD R.V. (1962)
A hypocratic screening for pure or crude drug material
Loydia, 25: 320-332

21. BOUSQUET J., GODARD P., MICHEL F.B. (1992)
Antihistamine in the treatment of asthma
Eur. Resp. J., 5: 1137-1142

22. EGLIN R.M., REDDY H., WATSON N., CHALLIS R.A.J. (1999)
Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle
Trend Pharmacol. Sci., 15:114-119

23. KITAZAWA T., HIRAMA R., MASUNAGA K., NAKAMURA T., ASAKAWA K., CAO J., TERAOKA H., UNNO T., KOMORI S., YAMADA M., WESS J., TANEIKE T. (2008)
Muscarinic receptors subtypes involved in carbachol-induced contraction of mouse uterine smooth muscle.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.; 377(3-6): 2040-2050
24. AKDIS C.A., BLASER K. (2003)
Histamine in the regulation of allergic inflammation
J. Aller. and clin. Immunol., 112:15-22
25. HABRE W., ADAMICZA A., LELE A., NOVAK T., SLY P.D., PETAK F. (2008)
The involvement of histaminic and muscarinic receptors in the bronchoconstriction induced by myorelaxant administration in sensitized rabbits
Anesth. Analg.; 107(6): 1899-1906
26. MICHEL M.H. (1975)
Inositols phospholipids and cell surface receptor function
Biochim. Biophys. Acta., 41:81-147
27. CLAPHAM D.E. (1995)
Calcium signal cell
Cell calcium, 80:259-268
28. TAYLOR C.W., PROLE D.L., RAHMAN T. (2009)
Ca(2+) channels on the move
Biochemistry. 29; 48(51):12062-12080
29. OLSON M.L., CHALMRES S., Mc CARRON J.G. (2010)
Mitochondrial Ca²⁺ uptake increases Ca²⁺ release from inositol-1,4,5-triphosphate receptor clusters in smooth muscle cells
Eur. Resp. J., 20(39): 14-30
30. BERRIDGE M.J. (1991)
Cytoplasmic calcium oscillation: a two pool model
Cell calcium, 12: 63-72
31. EXTON J.H. (1994)
Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone actions
Ann. Rev. Physiol., 56: 349-369
32. NASA Y., ICHIARA K., YOSHIDA R., ABIKO Y. (1992)
Positif inotropic and negative chronotropic effect of Cis-Diltiazem in rat isolated atria.
Brit. J. Pharmacol., 105: 696-702
33. ALLAIN P. (2008)
Les médicaments (3è édition)
Rev. Pharmacorama, cdM Ed., p.39-45

34. VAALI K. (1999)
Relaxation mechanisms of nitric oxide donors, β_2 adrenoceptor agonist and their synergistic effect in vitro in airway smooth muscle: Role of potassium channels
Academic dissertation; Institute of Biomedicine; University of Helsinki , p.17-19
35. BAIRD J.G., CHILVERS E.R., KENNEDY E.D., NAHORSKI S.R. (1989)
Changes in extracellular calcium within the physiological range influence receptor-mediated inositol phosphate responses in brain and tracheal smooth muscles slices
Arch. Pharmacol., 339: 247-251
36. SANTINI R. (1979)
Dictionnaire pharmaco-toxicologique pour l'expérimentation animale
Ed. du Couloir du Gaube, France, p.1-109
37. BARNES P.J. (1995)
Beta-adrenergic receptor and their regulation
Am. J. Respir. Critic. Care. Med., 152: 838-860
38. PIAZ D.V., GIOVANNONI M.P. (2010)
Phosphodiesterase-4-inhibitors, structurally unrelated to rolipram as promising agents for treatment of asthma and other pathologies
Eur. J. Medical Chemistry; 35:463-480
39. CHAABI, MEHDI (2008)
Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines
Thèse de doctorat, Université Louis PASTEUR

Title: *In vitro* STUDY ON ISOLATED GUINEA PIG TRACHEA OF ANTHIASTHMATIC
ACTIVITY OF *Tetracera madagascariensis* (DILLENACEES)

ABSTRACT:

Tetracera madagascariensis is empirically used in the Eastern coast and North of Madagascar to treat asthma.

The crude extract of its aerial part induced a concentration dependant relaxation of the histamine pre-contracted isolated guinea pig trachea.

Fractionnations using chromatographic method by liquid-liquid partition of this crude extract allowed us to show that the acetate ethylic fraction FAE is the most active ($EC_{50} = 136,92 \pm 12,2 \mu\text{g/ml}$). When the polyphenols were taken off by polyamide gel filtration (FAE'), the activity has not been significantly changed ($EC_{50} = 128,88 \pm 27,9 \mu\text{g/ml}$).

This fraction FAE' produced relaxing activity on isolated guinea pig trachea pre-contracted by histamine, acetylcholine or KCl.

It inhibited in a non competitive manner the histamine and CaCl_2 spasm effect on the trachea. Nevertheless, the propranolol blocked in a competitive manner its broncho-relaxing activity. When combined with theophylline, FAE' provoked a synergistic relaxing effect on histamine pre-contracted trachea. These results would indicate the implication of β_2 adrenoceptors in the broncho-dilatator effect of FAE'.

The bioassay-guided fractionnation of FAE' led to the isolation of the active fraction.

All these results confirmed the traditional using of *Tetracera madagascariensis* to treat asthma.

Key words: *Tetracera madagascariensis*, asthma, β_2 -adrenergic

Titre : ETUDE *in vitro* SUR TRACHEE ISOLEE DE COBAYE DE L'ACTIVITE
ANTIASTHMATIQUE DE *Tetracera madagascariensis* (DILLENACEES)

RESUME :

Tetracera madagascariensis (DILLENACEES) est une plante utilisée dans la partie Est et Nord de Madagascar contre les crises d'asthme. Des tests effectués sur trachée isolée de cobaye pré-contractée à l'histamine ont démontré que l'extrait brut de l'écorce de tige ($CE_{50} = 372,21 \pm 53,0 \mu\text{g/ml}$) et de tige feuillée ($CE_{50} = 562,85 \pm 38,0 \mu\text{g/ml}$) exercent une activité broncho-relaxante.

Après fractionnement de l'extrait brut de tige feuillée par la méthode chromatographique de partage liquide-liquide, la fraction acétate éthylique (FAE) a présenté la meilleure activité avec une CE_{50} égale à $136,92 \pm 12,2 \mu\text{g/ml}$. L'absence de polyphénols dans cet extrait (FAE') par filtration sur gel de polyamide ne modifie pas cette activité ($CE_{50} = 128,88 \pm 27,9 \mu\text{g/ml}$).

Cette fraction FAE' provoque un effet relaxant concentration dépendant sur trachée isolée de cobaye pré-contractée aux divers agents contracturant : histamine, acétylcholine, KCl.

De plus FAE' inhibe de façon non compétitive la réponse contractile de l'histamine et de CaCl_2 au niveau du muscle lisse trachéal, tandis que le propranolol inhibe de façon compétitive l'activité relaxante de FAE'. En combinaison avec la théophylline, FAE' produit un effet synergique. Ces résultats indiqueraient l'implication de récepteurs β_2 adrénergiques dans cette activité broncho-dilatatrice.

Dans le but d'isoler la ou les molécule(s) responsable(s) de l'activité, le fractionnement bioguidé de FAE' a été effectué.

Tous ces résultats confirment le bien fondé de l'utilisation traditionnelle de *Tetracera madagascariensis* pour traiter l'asthme.

Mots clés : *Tetracera madagascariensis*, asthme, β_2 -adrénergique

Encadreur :

Docteur RAMANITRAHASIMBOLA David

Impétrante :

RASOLOFONDRAMANITRA Fara Rindra

Lot II O 109 A Bis Anjanahary

0340165303

rfrindra@yahoo.fr