

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES



DEPARTEMENT DE PHYSIOLOGIE ANIMALE ET DE PHARMACOLOGIE
LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE GENERALE ET DE PHARMACOCINETIQUE

LPGP

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DE
DIPLOME D'ETUDE APPROFONDIE (D.E.A)

Option : PHARMACOLOGIE

**ETUDE DE L'ACTIVITE CURARISANTE DE
L'EXTRAIT *DAL - F₃*
CHEZ LA SOURIS ET LA GRENOUILLE**

Présenté par :

RASOLOFONDRA TSIMBA Felana Nomena

Maître – ès – Sciences

Soutenu publiquement le 09 Avril 2011

Devant les membres de jury composés de :

Président : Mr. RANDRIANTSOA Adolphe

Professeur titulaire

Examineur : Mme. RANDRIANAVONY Patricia

Maître de conférences

Rapporteur : Mr. RANDIMBOVOLOLONA Fanantenainirany

Professeur titulaire

Nom : RASOLOFONDRATSIMBA
Prénoms : Felana Nomena
Adresse : lot V S 52 U Bis Avaratr' Ankatso
E-mail : rasolofondratsimb_felanoom@yahoo.fr
Tel : 034 40 787 60 – 033 07 380 94



**ETUDE DE L'ACTIVITE CURARISANTE DE
L'EXTRAIT *DAL - F₃*
CHEZ LA SOURIS ET LA GRENOUILLE**

Promotion : 2009 - 2010
Option : PHARMACOLOGIE

Rapporteur : Mr RANDIMBIVOLOLONA
Fanantenainrainy
Professeur titulaire en Pharmacologie

Laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie
Générale et de Pharmacocinétique

B.P. : 8357
E-mail : frandimby@gmail.com
Faculté des Sciences
Université d'Antananarivo

REMERCIEMENTS

Au terme de réalisation de ce mémoire, je tiens à exprimer mes vifs remerciements :

Au Professeur **RANDIMBIVOLOLONA Fanantenirainy** de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir guidé mes premiers pas dans la recherche scientifique. Sans vos conseils, ce mémoire n'aurait pu être réalisé.

Au Professeur **RANDRIANTSOA Adolphe** d'avoir consacré votre temps et accepté avec gentillesse de siéger comme Président du jury de ce mémoire. Qu'il trouve ici le témoignage de ma respectueuse considération.

Au Professeur **RAHARISOLOLALAO Amélie** de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la partie chimique de ce travail. Soyez en remerciée.

Au Docteur **RANDRIANAVONY Patricia** d'avoir accepté avec gentillesse pour être parmi les membres du jury. Je vous en suis très reconnaissante.

A l'équipe de **I.O.G.A** (Institut et Observatoire de Géophysique d'Antananarivo) pour la création et l'installation du logiciel « **PHYSIOLOG** ».

A mon défunt père, à ma mère, à mes grandes sœurs, à mon petit frère et à mon ami Jô pour leur soutien moral et financier durant mes études.

A tous mes amis et tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidés à la réalisation de ce travail. Je vous adresse mes sincères remerciements.

A Dieu : à lui la gloire éternelle.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
MATERIELS ET METHODES	3
PREMIERE PARTIE : CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE.....	4
DEUXIEME PARTIE :.....	7
I. TESTS IN VIVO ET IN VITRO: ETUDE DE L'EFFET DE DAL – F ₃ SUR L'ACTIVITE MOTRICE VOLONTAIRE.....	7
I.1) Préparation des produits à tester et voie d'administration.....	7
I.2) Animaux d'expérience et doses administrées.....	7
I.3) Méthodes d'étude de l'effet myorelaxant de l'extrait DAL – F ₃	7
<i>I.3.1) Etude de l'effet de l'extrait DAL – F₃ sur la performance musculaire des souris placées sur le plan incliné.....</i>	<i>8</i>
<i>I.3.2) Etude de l'effet de l'extrait DAL – F₃ sur la performance musculaire des souris placées sur le rotarod.....</i>	<i>10</i>
I.4) Variation de la performance musculaire des souris.....	12
II. TESTS IN VITRO : ETUDE DE L'EFFET DE DAL – F ₃ SUR LA CONTRACTION DES MUSCLES STRIES SQUELETTIQUES.....	13
II.1) Préparation des produits.....	13
II.2) Méthodes d'étude de l'effet de l'extrait DAL – F ₃	13
<i>II.2.1) Etude de l'effet de DAL – F₃ sur le rectus abdominis isolé précontracté par l'ACh.....</i>	<i>14</i>
<i>II.2.2) Etude de l'effet de DAL – F₃ sur le rectus abdominis vis-à-vis de l'effet contractile d'ACh.....</i>	<i>14</i>
III ANALYSE ET EXPRESSION DES RESULTATS.....	15
TROISIEME PARTIE : ETUDE DE LA TOXICITE AIGÛE.....	16
RESULTATS	17
I. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE.....	17
II. TESTS IN VIVO : Effet myorelaxant de l'extrait DAL – F ₃ sur l'activité motrice volontaire.....	18
<i>II.1) Effet myorelaxant de DAL – F₃ chez les souris placées sur le plan incliné.....</i>	<i>18</i>
<i>II.2) Effet myorelaxant de DAL – F₃ chez les souris placées sur le rotarod.....</i>	<i>20</i>
III. TESTS IN VITRO : EFFET MYORELAXANT DE DAL – F ₃ SUR LES CONTRACTIONS DES MUSCLES STRIES SQUELETTIQUES.....	22
III.1) Effet myorelaxant de DAL – F ₃ sur le rectus abdominis isolé précontracté par ACh.....	22
III.2) Effet antagoniste de DAL – F ₃ vis-à-vis de l'effet contractile de l'ACh.....	23
VI. TOXICITE AIGÛE.....	25
DISCUSSION	28
CONCLUSION	31
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	32
RESUME	

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** : Les différents types de tests utilisés pour détecter les grandes familles chimiques présentes dans l'extrait DAL – F3 (IGAN C., 1982).....**5**
- Tableau II** : Les signes utilisés et les critères observés lors du criblage phytochimique effectué sur l'extrait DAL – F3.....**6**
- Tableau III** : Résultats du criblage phytochimique effectués sur l'extrait DAL – F3.....**17**
- Tableau IV** : Les valeurs (en %) de la performance musculaire des souris placées sur le plan....**18**
- Tableau V** : Les valeurs (en %) de la performance musculaire des souris placée ssur le rotarod.....**20**
- Tableau VI** : Les valeurs de CE 50 (en M) d'ACh en absence et en présence des différentes concentrations de DAL – F3 sur le rectus abdominis isolé de grenouille.....**23**
- Tableau VII** : Les effets secondaires observés chez les souris après l'administration par voie orale de l'extrait DAL – F3 aux doses 1g/kg à 4g/kg.....**26**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Anatomie de la jonction neuromusculaire (MEISTELMAN C., 1998).....	2
Figure 2 :	Dispositif montrant une souris accrochée au sommet du plan incliné.....	9
Figure 3 :	Dispositif montrant 5 souris placées sur le rotarod.....	11
Figure 4 :	Variation du temps mis par les souris à rester accrochées au sommet du plan incliné.....	19
Figure 5 :	Variation du temps mis par les souris pour rester sur le rotarod.....	21
Figure 6 :	Effet myorelaxant de DAL – F ₃ sur le rectus abdominis précontracté par l’ACh.....	22
Figure 7 :	Courbes des contractions du rectus abdominis isolé provoquées par l’ACh en absence et en présence de DAL – F ₃ aux différentes concentrations.....	24
Figure 8 :	Dispositif montrant la diminution de l’activité motrice et somnolence après l’administration par voie orale de DAL - F ₃ aux doses 1g/kg, 2g/kg et 4g/kg chez les souris	27
Figure 9 :	Dispositif montrant la paralysie des pattes postérieures après l’administration par voie orale de l’extrait DAL - F ₃ aux doses 2g/kg et 4g/kg chez les souris	27
Figure 10 :	Dispositif montrant la ptose palpébrale et la respiration de CHEYNE STOKES après l’administration par voie orale de DAL - F ₃ à la dose 4g/kg chez les souris.....	27

LES SIGLES ET LES ABREVIATIONS

ACh : Acétylcholine

Ca⁺⁺ : calcium

Cl⁻ : Chlore

Coll. : collaborateurs

e.s.m : erreur standard à la moyenne

g/kg : gramme/kilogramme

H : heures

K⁺ : Potassium

LPGP : Laboratoire de Pharmacologie Générale et de Pharmacocinétique

M : Moles/litre

mM : Millimolaire

mg/kg : milligramme/kilogramme

mg/ml : milligramme/millilitre

n : nombre d'animaux utilisés

Na⁺ : Sodium

P : Phosphate

p : seuil de signification

sec : secondes

SNARE : Soluble N- etylmaleimide – Sensitive factor Attachment Receptor

SOTRAMEX : Société de Transformation Malgache et d'Exportation

% : pourcentage

X : valeur en moyenne

INTRODUCTION

Avant la découverte de la D – Tubocurarine, premier alcaloïde isolé à partir de *Chondodendron tomentosum* (MENISPERMACEES), les curares étaient connus comme poison de chasse des Indiens de la jungle amazonienne (KING H., 1935; WINTESTEINER O. et DUTCHER J.D., 1943; BISSET N.G., 1992 ; JAMES D. et DUTCHER J.D., 1946). En 1942, ils ont été introduits en anesthésiologie en tant que myorelaxants (GRIFFITH H.R. et JONHSON G.E., 1942). L'utilisation des curarisants comme adjuvants a pu limiter les intoxications dues aux premiers produits d'anesthésiques généraux (l'éther et le chloroforme) tout en améliorant la sécurité des patients lors des actes chirurgicaux (FOLDES F.F., 1993; BESSET M. et coll., 2003 ; ALBRECHT E. et coll., 2006).

La toxine botulique, sécrétée par la bactérie *Clostridium botulinum*, est la première toxine utilisée en application esthétique en tant qu'antiride (CARRUTHERS J.D et CARRUTHERS J.A., 1992 ; ERBGUTH F.J., 2004). En effet, l'utilisation de cette toxine en médecine cosmétique repose sur sa capacité de relâcher les muscles du visage en lui donnant une apparence plus détendue, sereine et rajeuni (CLARK R.P et BERRIS C.E., 1989).

Les curares et le BOTOX[®] sont des toxines qui provoquent le relâchement des muscles striés squelettiques sous forme d'une paralysie flasque en bloquant la transmission de l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire (CLAUDE B., 1981 ; JENNIFER M. et HUNTER M.B., 1995).

Les muscles striés squelettiques sont des tissus excitables (GUENARD H., 2001). En effet, ils se contractent quand le nerf moteur reçoit une excitation sous forme d'influx nerveux (GUENARD H., 2001). Ce mécanisme s'appelle la transmission neuromusculaire dont l'Acétylcholine (ACh) est le neurotransmetteur impliqué (GANONG., 1963 ; HOLLANDER A., 1987 ; GUENARD H., 2001). Elle est synthétisée dans les terminaisons nerveuses à partir de la Choline et de l'Acétyle Coenzyme A (acetyl-CoA) grâce à l'enzyme acétylcholine transférase et stockée dans des vésicules pré-synaptiques avant d'être libérée dans la fente synaptique par le phénomène d'exocytose (TASSONY E. et coll., 1975 ; HOLLANDER A., 1987).

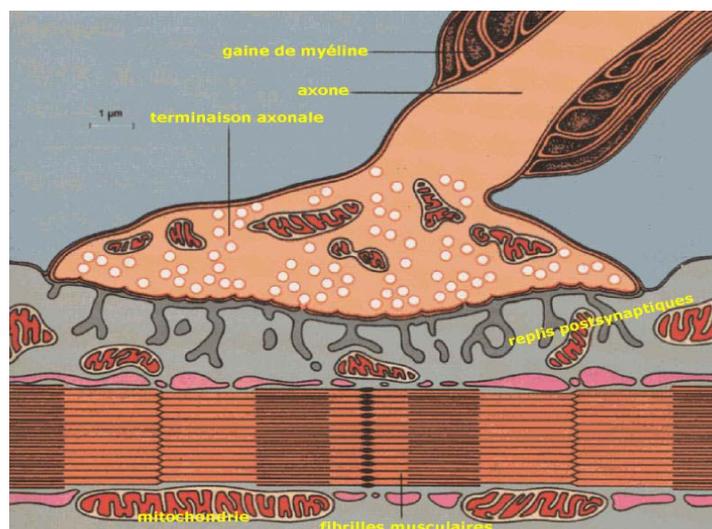


Figure 1 : Anatomie de la jonction neuromusculaire (MEISTELMAN C., 1998)

L'influx nerveux provenant du cerveau se propage vers l'extrémité de la cellule nerveuse et provoque la dépolarisation de la membrane du bouton terminal. Cette dépolarisation déclenche l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (canaux calciques type VOC) entraînant une entrée massive d'ions Ca^{++} dans le cytoplasme de la cellule nerveuse (RIGOARD S. et coll., 2009). Par conséquent, la concentration en ion Ca^{++} dans la terminaison nerveuse augmente entraînant la formation du complexe SNARE à l'origine du déplacement des vésicules de stockage d'ACh vers la zone de libération « zone active » pour fusionner avec la membrane pré-synaptique (GUENARD H., 2001). Ensuite, les molécules d'ACh sont libérées dans la fente synaptique par le phénomène d'exocytose (HALL L.W. et coll., 1991 ; GUENARD H., 2001).

La fixation des molécules d'ACh sur les récepteurs spécifiques de la plaque motrice entraîne une chaîne de processus électrique qui mène à la contraction des muscles striés squelettiques (GANONG., 1963 ; PAGE P.C. et coll., 1999). En effet, les molécules d'ACh libérées diffusent dans la fente synaptique pour se fixer sur les récepteurs cholinergiques localisés sur les crêtes de plissement de la membrane des fibres musculaires striées squelettiques (MOUSSARD C. et coll., 2005). Ces récepteurs sont de types nicotiques (N_M) et couplés avec des canaux sodiques (HOLLANDER A., 1987; MARTIN C. et coll., 2006). La fixation des molécules d'ACh sur ces récepteurs provoque l'ouverture de ces canaux laissant entrer les ions Na^+ et sortir les ions K^+ de façon concomitante. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ions Na^+ entraîne la dépolarisation de la membrane post-synaptique qui provoque l'ouverture d'un plus grand nombre de canaux Na^+ créant ainsi le potentiel de plaque motrice (HOLLANDER A., 1987 ; TASSONY E. et coll., 1975). Ensuite, ce potentiel se propage vers les extrémités de la membrane des fibres musculaires striées squelettiques. Ainsi, la dépolarisation est transmise au niveau des tubules transversaux du réticulum sarcoplasmique entraînant l'activation des récepteurs à la Ryanodine à l'origine du relargage des ions Ca^{++} dans

le sarcoplasme de la fibre musculaire (MOUSSARD C. et coll., 2005 ; MARTIN C. et coll., 2006). Par conséquent, la concentration intracellulaire en ions Ca^{++} augmente et créant ainsi le potentiel post-synaptique excitateur. Ce dernier provoque la fixation des ions Ca^{++} sur la Troponine (TN-C) conduisant à la formation du complexe actine-myosine à l'origine de la contraction musculaire (GUENARD H., 2001 ; RIGOARD S. et coll., 2009).

Pour induire une paralysie flasque, les curarisants et le BOTOX interrompent la transmission neuromusculaire au niveau de la jonction neuromusculaire (JENNIFER M. et HUNTER M.B., 1995 ; ROBERT R., 2002 ; BOWMAN W.C., 2006). En effet, les substances curarisantes peuvent agir aussi bien au niveau pré-synaptique qu'au niveau post-synaptique (BOWMAN W.C., 1986 ; COLQUHOUND D., 1986). Au niveau post-synaptique, les curarisants non dépolarisants provoquent la diminution progressive du seuil de dépolarisation de la membrane des fibres striées squelettiques en bloquant les récepteurs cholinergiques en compétition avec les molécules d'ACh (COLQUHOUND D., 1986). Par contre, les curarisants dépolarisants provoquent une dépolarisation persistante de la membrane des fibres striées squelettiques en agissant de la même manière que l'ACh sur ces mêmes types de récepteurs (TAYLOR P., 1998 ; BESSET M. et coll., 2003). Le second mécanisme possible pour interrompre la transmission neuromusculaire se situe au niveau pré-synaptique (BOWMAN W.C., 1996 ; BESSET M. et coll., 2003). En effet, les curarisants se fixent sur les récepteurs cholinergiques pré-synaptiques couplés avec des canaux calciques en compétition avec les molécules d'ACh alors que le BOTOX interrompe la formation du complexe SNARE (KUKREJA R. et SINGH B.R., 2009). Ceux-ci provoquent l'interruption du mécanisme de rétrocontrôle positif de la libération des molécules d'ACh dans la fente synaptique (BOWMAN W.C., 1986 ; JENNIFER M. et HUNTER M.B., 1995). La dernière possibilité par les curarisants d'interrompre la transmission neuromusculaire est d'imiter l'action enzymatique de l'Acétylcholinestérase, comme la Néostigmine (COLQUHOUND D., 1986 ; TAYLOR P., 1998 ; BOWMAN W.C., 2006).

Ce travail porte sur une plante malgache codée DAL. Les enquêtes ethnobotaniques effectuées sur cette plante ont rapporté que ses feuilles son utilisées en médecine traditionnelle pour décontracter les muscles en cas de fatigue et pour traiter les rides du visage. Pour vérifier les données empiriques sur le pouvoir décontractant de DAL, notre étude porte sur l'évaluation de l'activité myorelaxante de l'extrait DAL par des tests in vivo et in vitro chez la souris et la grenouille. Lors des études préliminaires, la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle (F3) a présenté la meilleure activité biologique par rapport aux autres fractions. Pour valider ces tests, le Pancuronium, un curarisant de synthèse, a été utilisé comme produit de référence.

Première partie : ETUDE PHYTOCHIMIQUE

CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Un criblage phytochimique a été effectué sur la fraction F₃ de l'extrait DAL afin d'identifier les grandes familles chimiques qui y sont présentes. Cette méthode est basée sur l'utilisation des réactifs spécifiques pour chaque famille. La présence d'une famille chimique est caractérisée par la formation de précipité, de mousse et/ou d'un changement de coloration (IGAN C., 1982).

Les différents types de tests utilisés pour détecter les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait DAL – F₃ sont résumés dans le **Tableau I**.

Pour quantifier la présence ou l'absence des grandes familles chimiques dans l'extrait DAL – F₃, des signes positifs ou négatifs ont été utilisés.

Les différents signes ainsi que les critères observés lors de ce criblage phytochimique sont résumés dans le **Tableau II**.

Tableau I : Les différents types de tests utilisés pour détecter les grandes familles chimiques présentes dans l'extrait DAL – F₃ (IGAN C., 1982).

FAMILLES CHIMIQUES	TESTS	SOLVANTS	REACTIFS	OBSERVATIONS	CONCLUSION
Alcaloïdes	-Dragendorff -Mayer -Wagner	Acide chlorhydrique	(NO ₂) ₂ BI/K HgCl/IK I ₂ /IK	-Précipitation jaune orangée -Précipitation Blanc-cassé -Précipitation jaune marron	ALCALOIDES
Tanins		Eau chaude	Gélatine- NaCl+FeCl ₃	-Précipitation verte -Précipitation bleue	TANINS catéchiques TANINS galliques
Saponines	Mousse Hémolytique	Eau distillée Eau distillée	-Agitation -Addition de quelques gouttes de sang dans l'extrait	-Persistance d'une mousse (3cm d'épaisseur) 30 minutes après agitation -Décoloration du sang	SAPONINES
Coumarines		Eau chaude	Ammoniaque	Fluorescence bleu à la lampe UV	COUMARINES
Flavonoïdes et Leucoanthocyanes	Wilstater BatSmith	Méthanol	-Ruban de magnésium +HCl concentré -HCl concentré+KOH	-Coloration rouge -Intensification de couleur	FLAVONOIDES COMPOSES PHENOLIQUES
Sucres réducteurs		Eau distillée	1 goutte de solution Ammoniacale Liqueur de Feling	Coloration rouge brique	SUCRES REDUCTEURS
Poly-saccharides		Alcool+eau (80/20)	Acétone (goutte à goutte)	Trouble	POLYSACCHARIDES
Stéroïdes et Terpenoïdes	-Badjet -Kedde -Libermann-Burchard	Méthanol Dichlorométhane	-KOH+acide picrique -KOH+réactif de Kedde -Anhydre acétique+H ₂ SO ₄	-coloration orange -coloration violette -Anneau rouge -coloration verdâtre	-STEROIDES LACTONIQUES -GLYCOSIDES CARDIOTONIQUES -STEROLS -TRITERPENOIDES

Tableau II : Les signes utilisés et les critères observés lors du criblage phytochimique.

SIGNES	PRECIPITATIONS	COLORATIONS	HAUTEUR DE MOUSSE (cm)
-	aucune	Pas de changement	0 à 2
+	Faible	Faible	2 à 4
++	Abondante	Nette	4 à 5
+++	Très abondante	foncée	Supérieure à 5

Deuxième partie : ETUDES BIOLOGIQUES

I. TESTS IN VIVO : Etude de l'effet de l'extrait DAL – F3 sur l'activité motrice volontaire.

I.1) Préparation des produits à tester et voie d'administration :

L'extrait DAL – F₃ se présente sous forme pâteuse hydrosoluble. Il a été dissout dans l'eau distillée avant d'être administré chez les souris.

Tous les produits (eau distillée, DAL – F₃ et Pancuronium) ont été administrés par voie orale au volume maximal égal à 0,3ml.

I.2) Animaux d'expérience et doses administrées :

Des souris de race SWISS, de deux sexes, âgées de 6 à 8 semaines, pesant entre 20 à 25 grammes ont été utilisées pour effectuer tous les tests in vivo. Elles ont été élevées dans l'animalerie du LPGP à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo. Elles ont été nourries avec de la provende « **LFL de Madagascar 1430 X**, de composition : protéine 15%, graisse 12,5%, fibre 8%, Calcium 1% et phosphore 0,6% » et ont reçu de l'eau à volonté. Pour chaque série d'expérience, les animaux ont été mis à jeun 8 heures avant l'expérience. Puis ils ont été répartis en cinq lots de cinq souris pour recevoir les produits par voie orale aux différentes doses. Un lot témoin a reçu de l'eau distillée à raison de 10ml/kg. Un lot référence a reçu le Pancuronium à 10mg/kg (BUCKETT W.R. et coll., 1969). Trois lots traités ont reçu l'extrait DAL – F₃ aux doses de 100mg/kg, 200mg/kg et 400 mg/kg.

I.3) Méthodes d'étude de l'effet myorelaxant de l'extrait DAL – F3 :

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ sur l'activité motrice volontaire des souris en utilisant les méthodes sur « plan incliné » et sur « rotarod ». Ces méthodes ont été choisies pour les tests in vivo car elles sont couramment utilisées pour évaluer l'effet myorelaxant d'un médicament chez les rongeurs (VOGEL H.G., 1927). Elles consistent à soumettre les souris à effectuer des activités musculaires durant lesquelles leurs performances musculaires ont été notées.

I.3.1) Etude de l'effet de l'extrait DAL – F₃ sur la performance musculaire des souris placées sur le plan incliné :

Pour évaluer l'effet de l'extrait DAL – F₃ sur l'activité motrice volontaire des souris, elles ont été placées sur un plan incliné.

Ce dispositif est constitué de deux planches rectangulaires lisses, de 60 cm de longueur, reliées à leur extrémité par une charnière. L'une des planches sert de base et l'autre de plan incliné à 65° par rapport à la base (ALLMARK M.G et BACHINSKI W.M., 1949 ; RIVLIN A. et TATOR C., 1977 ; RANDALL L.O. et coll., 1961 ; SIMIAND J. et coll., 1989). Ce dispositif expérimental est montré sur la **Figure 2**.

Selon la méthode décrite par RANDALL et ses collaborateurs, en 1965, ainsi que SIMIAND et ses collaborateurs, en 1989, ce test consiste à placer une souris au sommet du plan incliné afin de noter sa performance musculaire avant de glisser. Pour sélectionner les animaux, un test préliminaire a été effectué : les souris ont été placées une à une au sommet du plan incliné et seuls les animaux capables de s'accrocher pendant 30 secondes sur l'appareil ont été retenus pour l'expérience. Ensuite, les animaux sélectionnés ont été répartis en 5 lots de 5 souris pour recevoir les produits par voie orale aux doses respectives. Trente minutes après l'administration des produits, les animaux ont été placés un à un au sommet du plan incliné. Le temps pendant lequel chaque souris reste accrochée au sommet du dispositif expérimental a été noté (RANDALL L.O. et coll., 1961 ; SIMIAND J. et coll., 1989).



Figure 2 : Dispositif montrant une souris accrochée au sommet du plan incliné.

I.3.2) Etude de l'effet de l'extrait DAL – F₃ sur la performance musculaire des souris placées sur le rotarod :

Pour évaluer l'effet de l'extrait DAL – F₃ sur l'activité motrice volontaire chez les souris, elles ont été placées sur un ROTAROD.

Ce dispositif est constitué d'une tige de bois de 3,5 cm de diamètre, 30 cm de longueur, attachée à un moteur qui tourne autour de son axe à la vitesse constante de 20 tours par minute. La tige se situe à une hauteur de 50 cm au-dessus du sol. Des disques métalliques solidaires de la tige divisent celle-ci en 5 sections égales permettant de tester simultanément 5 souris (DUNHAM N.W. et MIYA., 1957; DELPHAUT J. et coll., 1957). Ce dispositif expérimental est montré sur la **Figure 3**.

Selon la méthode décrite par DUNHAM N.W. et MIYA, en 1957, ainsi que JONES B.J. et ROBERTS D.J., en 1968, ce test consiste à placer simultanément 5 souris d'un même lot entre les 5 sections égales de la tige afin de noter leur performance musculaire avant de tomber de l'appareil. Pour sélectionner les animaux, un test préliminaire a été effectué. Seuls les animaux capables de rester sur le ROTAROD pendant 5 minutes ont été retenus pour l'expérience (JONES B.J. et ROBERTS D.J., 1968). Les animaux sélectionnés ont été répartis en 5 lots de 5 souris pour recevoir les produits par voie orale aux doses respectives. Trente minutes après l'administration des produits, les animaux ont été placés sur le ROTAROD. Le temps pendant lequel les souris courent sur le ROTAROD a été noté (DUNHAM N.W. and MIYA., 1957 ; JONES B.J. et ROBERT D.J., 1968 ; ABID M. et coll., 2006).

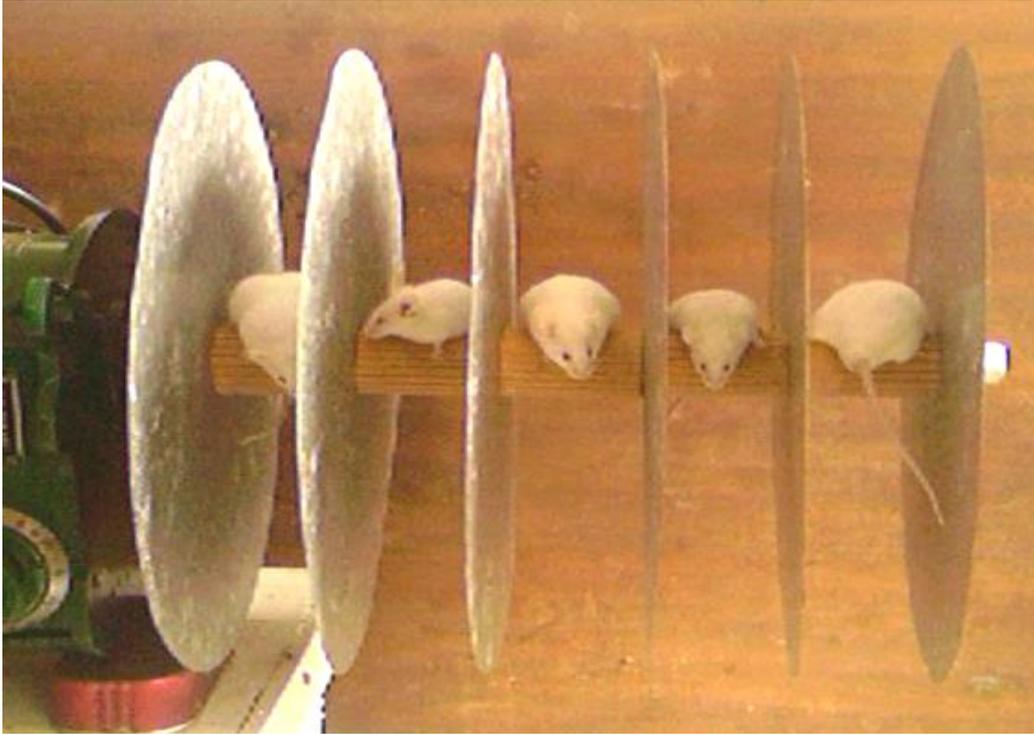


Figure 3: Dispositif expérimental montrant 5 souris placées sur le ROTAROD.

I.4) Variation de la performance musculaire :

L'agrippement est le premier reflexe que montrent les souris dès qu'elles se trouvent sur un support glissant et pour ne pas perdre l'équilibre, les animaux placés sur un appareil tournant à une vitesse constante ont tendance à courir dans le sens contraire de la rotation et à suivre le rythme de l'appareil (VOGEL H.G., 1927).

Si, par rapport au lot témoin, le temps mis par les animaux des lots traités avec l'extrait DAL – F₃ aux différentes doses diminue, cela veut dire que la performance musculaire des souris diminue.

La diminution de la performance musculaire des animaux a été calculée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de diminution de la performance musculaire} = \frac{\mathbf{T}_{\text{témoin}} - \mathbf{T}_{\text{traité}}}{\mathbf{T}_{\text{témoin}}} \times 100$$

- **T**_{témoin} : Temps mis par les souris du lot témoin à rester sur le dispositif expérimental.
- **T**_{traités} : Temps mis par les souris du lot traité ou lot référence à rester sur le dispositif.

II. TESTS IN VITRO : Etude de l'effet de l'extrait DAL – F₃ sur la contraction des muscles striés squelettiques.

II.1) Préparation des produits :

Dans toutes les expériences, l'eau distillée a été utilisée comme solvant. L'extrait DAL – F₃ a été dissout dans de l'eau distillée ; une solution mère d'ACh à la concentration 10⁻²M a été préparée et utilisée comme agent contracturant.

Pour que la variation des concentrations des produits dans le bain soit négligeable, le volume du produit injecté dans le bain 20 ml a été limité à 200µl, ce qui représente 0,01% d'erreur.

II.2) Méthodes d'étude de l'effet curarisant de l'extrait DAL – F₃ :

Pour évaluer l'activité curarisante de l'extrait DAL – F₃, le rectus abdominis de grenouille a été utilisé. Cet organe a été choisi pour cette étude car c'est un muscle strié squelettique riche en récepteurs cholinergiques de type nicotinique, très approprié pour tester les produits à activité curarisante (ELIZABETH M.W. et coll., 1996 ; YVES C., 2008).

Les méthodes utilisées lors de cette étude ont été décrites par KITCHEN et IAN en 1984 ; KARATAS Y. et ses collaborateurs, en 2000 ; DONDAS N. et ses collaborateurs, en 2004 ; ainsi que RAY R.K. et ses collaborateurs, en 2005.

La grenouille a été décapitée puis placée sur sa partie dorsale dans un bac à dissection. La partie ventrale a été mise à nue en coupant la peau couvrant son abdomen. Ensuite, le rectus abdominis de la grenouille a été prélevé soigneusement puis placé dans une boîte de Pétri remplie d'une solution de Ringer maintenue à la température ambiante. La veine abdominale a été enlevée et le muscle a été divisé en deux parties en coupant le long de la ligne médiane.

La composition (en mM) de la solution de Ringer utilisée a été la suivante:

- NaCl : 111,1
- KCl : 1,87
- CaCl₂ : 1,08
- NaH₂PO₄ : 0,083
- Glucose : 11,1.

L'une des extrémités du muscle a été fixée à un crochet qui se situe à la base de la cuve à organe isolé et l'autre bout a été relié à un capteur isotonique (HARVARD BIOSCIENCE). Les contractions basales du muscle ont été captées par un transducteur isotonique et ont été enregistrées sur l'ordinateur en utilisant le logiciel « PHYSIOLOG ». La préparation a été

équilibrée pendant 1 heure sous une tension de 1,5 gramme durant laquelle elle a été rincée toutes les 15 minutes.

Après cette période d'équilibration, la préparation a été sensibilisée par l'ACh à la concentration finale égale à 10^{-5} M dans le bain. Lorsque le plateau de contraction a été atteint, l'organe a été rincé et mis au repos jusqu'à ce que ses contractions retournent à la normale.

II.2.1) Etude de l'effet de DAL – F₃ sur le rectus abdominis isolé précontracté par l'ACh :

Pour mettre en évidence l'effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃, il a été injecté d'une manière cumulative aux concentrations croissantes égales à 0,1mg/ml, 0,5mg/ml, 1mg/ml, 1,5mg/ml et 2mg/ml dans le bain contenant le rectus abdominis précontracté par l'ACh à 10^{-6} M.

Après la période de sensibilisation de l'organe, les contractions maximales du muscle ont été provoquées par l'ACh à la concentration 10^{-6} M dans le bain. Au plateau de contraction, l'extrait DAL – F₃ a été injecté de manière cumulative aux concentrations croissantes dans le bain jusqu'à l'obtention de relaxation musculaire maximale.

La courbe montrant la relation entre effet et concentrations de l'extrait DAL – F₃ a été établie et la concentration efficace de l'extrait DAL – F₃ pour obtenir 50% de relaxation musculaire maximale a été calculée par régression linéaire.

II.2.2) Etude de l'effet de DAL – F₃ vis-à-vis de l'effet contractile de l'ACh :

Pour étudier l'effet de DAL – F₃ vis-à-vis de l'effet contractile de l'ACh, cet agent contracturant a été injecté de manière cumulative aux concentrations croissantes allant de 5.10^{-9} M à 10^{-5} M dans le bain contenant le rectus abdominis prétraité par DAL- F₃ aux concentrations 1mg/ml, 1,5mg/ml et 2mg/ml dans le bain.

Après la période de sensibilisation de l'organe, l'ACh a été injectée de manière cumulative aux concentrations croissantes dans le bain jusqu'à l'obtention de contractions maximales. Ensuite, au plateau de contraction, l'organe a été rincé toutes les 15 minutes jusqu'à ce qu'il retrouve sa tension de base. Lorsque les contractions du muscle ont été revenues à la normale, l'extrait DAL – F₃ a été mis en contact avec l'organe pendant 10 minutes à la concentration 1mg/ml dans le bain avant d'y injecter l'ACh de manière cumulative jusqu'à l'obtention des contractions musculaires maximales. Un nouveau rectus abdominis a été utilisé pour tester chaque concentration de l'extrait DAL – F₃.

Les courbes montrant la relation entre effet et concentrations de l'ACh en absence et en présence de l'extrait DAL – F₃ ont été établies et les variations des concentrations efficaces d'ACh pour obtenir 50% de contraction maximale en absence et en présence de DAL – F₃ ont été calculées par régression linéaire.

III. ANALYSE ET EXPRESSION DES RESULTATS

Tous les résultats des tests in vivo et in vitro ont été exprimés sous forme de moyenne des valeurs obtenues avec l'écart – type réduit (moyenne \pm e.s.m).

L'analyse et la comparaison des résultats obtenus ont été faites en utilisant le test « t » de Student avec un degré de signification $p < 0,05$.

En effet, ce test est utilisé pour garantir la validité des résultats quantitatifs expérimentaux. Le degré de signification permet de juger la signification ou non des résultats expérimentaux (SCHWARTZ D., 1963).

L'effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ a été évalué à l'aide des valeurs de CE₅₀ calculées par la méthode de régression linéaire. Ce paramètre exprime d'une part la concentration efficace d'ACh pour obtenir 50% de contraction musculaire maximale en absence ou en présence de l'extrait DAL - F₃ ; d'autre part, la concentration efficace de DAL – F₃ pour provoquer 50 % de relaxation musculaire maximale.

L'E_{max} représente d'une part les contractions musculaires maximales provoquées par l'ACh en absence et en présence de l'extrait DAL – F₃ ; d'autre part le relâchement maximal du muscle provoqué par l'extrait DAL – F₃.

Troisième partie : ETUDES DE LA TOXICITE AIGUE

Pour étudier les effets secondaires de l'extrait DAL – F₃, il a été administré par voie orale aux fortes doses chez la souris de race SWISS, mâles et femelles pesant entre 25 à 30 grammes, âgées de 6 à 8 semaines.

Les animaux ont été mis à jeun 8 heures avant l'expérience puis répartis en 4 lots de 5 souris. Un lot témoin a reçu par voie orale de l'eau distillée à 10ml/kg et les trois lots restants ont été traités avec l'extrait DAL – F₃ aux doses de 1g/kg, 2g/kg et 4g/kg.

Tous les changements de comportement des animaux ont été observés à 5, 10, 15, 30 minutes puis à 1, 2, 4, 6 et 24 heures et à 2, 4 et 7 jours après l'administration des produits (MALONE M.H et coll., 1991).

Durant ces périodes d'observation, les animaux ont eu accès à la provende « **LFL de Madagascar 1430 X**, de composition : protéine 15%, graisse 12,5%, fibre 8%, Calcium 1% et phosphore 0,6% » et de l'eau à volonté.

RESULTATS

I. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Les résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait DAL – F₃ sont résumés dans le **Tableau III**. Ce tableau montre que plusieurs familles chimiques se trouvent dans l'extrait DAL – F₃ en différentes concentrations. Les alcaloïdes et les coumarines sont présents en fortes concentrations. Les stéroïdes, les flavonoïdes sont présents en moyennes concentrations. Les tanins et les sucres réducteurs sont détectés en faible teneur. Par contre l'extrait DAL – F₃ ne contient ni de saponines ni de polysaccharides.

Tableau III : Résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait DAL - F₃.

FAMILLES CHIMIQUES	OBSERVATION
<i>ALCALOIDES</i>	+++
<i>COUMARINES</i>	+++
<i>FLAVONOIDES</i>	++
<i>STEROIDES :</i>	++
<i>TANINS catéchiques</i>	+
<i>SUCRES REDUCTEURS</i>	+
<i>SAPONINES</i>	-
<i>POLYSACCHARIDES</i>	-

II. TESTS IN VIVO : Effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ sur l'activité motrice volontaire.

II.1) Effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ chez les souris placées sur le plan incliné :

La figure 4 montre que les souris du lot témoin traitées avec l'eau distillée à 10ml/kg sont capables de rester accrochées au sommet du plan incliné pendant $59,79 \pm 0,78$ secondes. Par contre, les souris traitées avec l'extrait DAL – F₃ aux doses de 100mg/kg, 200mg/kg et 400mg/kg mettent moins de temps à rester sur le dispositif expérimental. Ce qui signifie que, l'extrait DAL – F₃ diminue la performance musculaire des souris. Les valeurs du pourcentage de diminution de la performance musculaire des souris sont résumées dans le **Tableau IV**. Ce tableau nous montre que ces valeurs augmentent significativement avec les doses de DAL – F₃ testées. Ce qui indique que l'extrait DAL – F₃ possède un effet myorelaxant dose dépendant.

Tableau IV : Valeurs du pourcentage de diminution de la performance musculaire des souris placées sur le plan incliné (moyenne \pm e.s.m; n=5; p<0,001** ; p<0,0001***).

Produits testés	Pourcentage de diminution
Eau distillée	0
DAL – F3 100 mg/kg	$30,42 \pm 1,6^{**}$
DAL – F3 200 mg/kg	$55,3 \pm 1,05^{***}$
DAL – F3 400 mg/kg	$74,08 \pm 1,15^{***}$
Pancuronium 10mg/kg	$81,29 \pm 0,63^{***}$

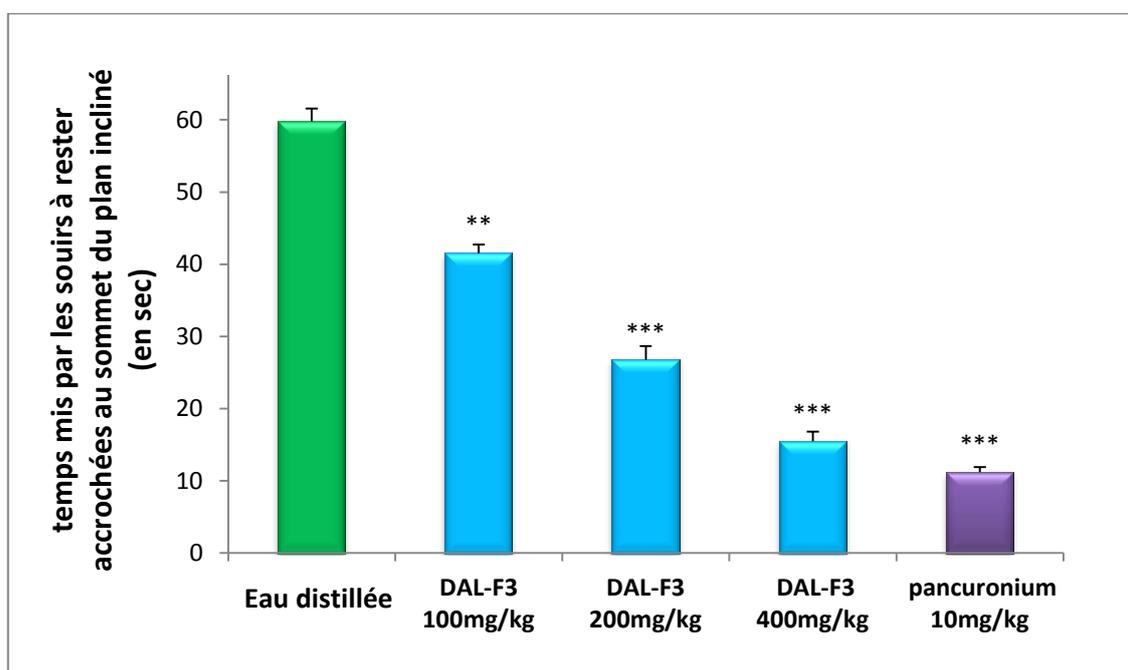


Figure 4: Variation du temps mis par les souris à rester accrochées au sommet du plan incliné (moyenne \pm e.s.m.; n=5; $p < 0,001^{**}$; $p < 0,0001^{***}$).

II.2) Effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ chez les souris placées sur le rotarod :

La figure 5 montre que, les souris du lot témoin traitées avec de l'eau distillée à 10ml/kg sont capables de courir sur le rotarod pendant $7,39 \pm 0,10$ heures avant de tomber. Par contre, celles qui sont traitées avec l'extrait DAL – F₃ aux doses de 100mg/kg, 200mg/kg et 400mg/kg mettent moins de temps à rester sur le rotarod. Ce qui signifie que l'extrait DAL – F₃ diminue la performance musculaire des souris. Les valeurs du pourcentage de diminution de la performance musculaire des souris sont résumées dans le **Tableau V**. Ce tableau nous montre que ces valeurs augment significativement avec les doses DAL – F₃ testées. Ce qui indique que l'extrait DAL – F₃ possède par voie orale un effet myorelaxant dose dépendant.

Tableau V : Valeurs du pourcentage de diminution de la performance musculaire des souris placées sur le rotarod (moyenne \pm e.s.m; n=5; p<0,001** ; p<0,0001***).

Produits testés	Pourcentage de diminution
Eau distillée	0
DAL – F ₃ 100 mg/kg	24,92 \pm 1,18**
DAL – F ₃ 200 mg/kg	48,31 \pm 2,21***
DAL – F ₃ 400 mg/kg	72,98 \pm 1,67***
Pancuronium 10mg/kg	84,73 \pm 1***

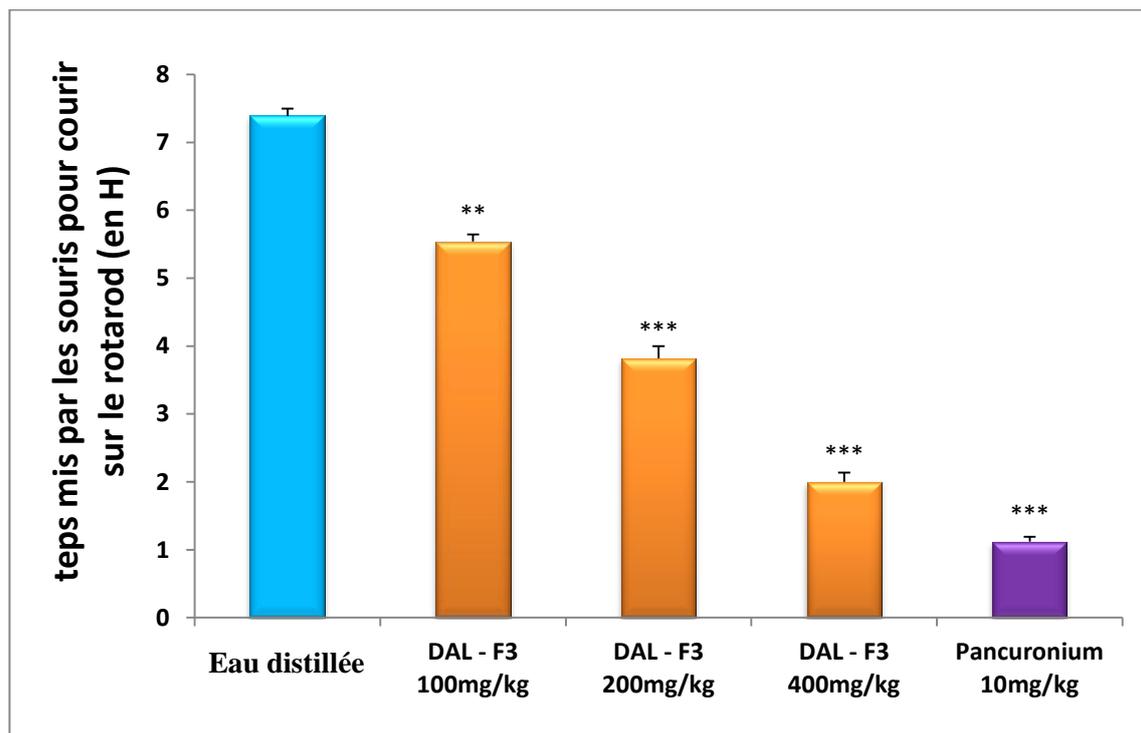


Figure 5 : Variation du temps mis par les souris pour courir sur le ROTAROD (moyenne \pm e.s.m ; n=5; $p < 0,001$ ** ; $p < 0,0001$ ***).

III. TESTS IN VITRO : Effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ sur la contraction des muscles striés squelettiques.

III.1) Effet myorelaxant de DAL – F₃ sur le rectus abdominis isolé précontracté par l'ACh :

L'injection de l'ACh à la concentration de 10^{-6} M dans le bain provoque la contraction maximale du rectus abdominis isolé de grenouille. **La figure 6** montre que l'injection de l'extrait DAL – F₃ au plateau de contraction, de manière cumulative aux concentrations croissantes dans le bain provoque la relaxation du rectus abdominis isolé précontracté par l'ACh. Cet effet myorelaxant de DAL – F₃ augmente significativement avec les concentrations testées. En effet, le relâchement maximal est obtenu à la concentration égale à 2mg/ml dans le bain.

Après calcul par régression linéaire, la valeur de la concentration efficace de l'extrait DAL – F₃ pour obtenir 50% de relaxation musculaire maximale est égale à **0,91±0,03M**.

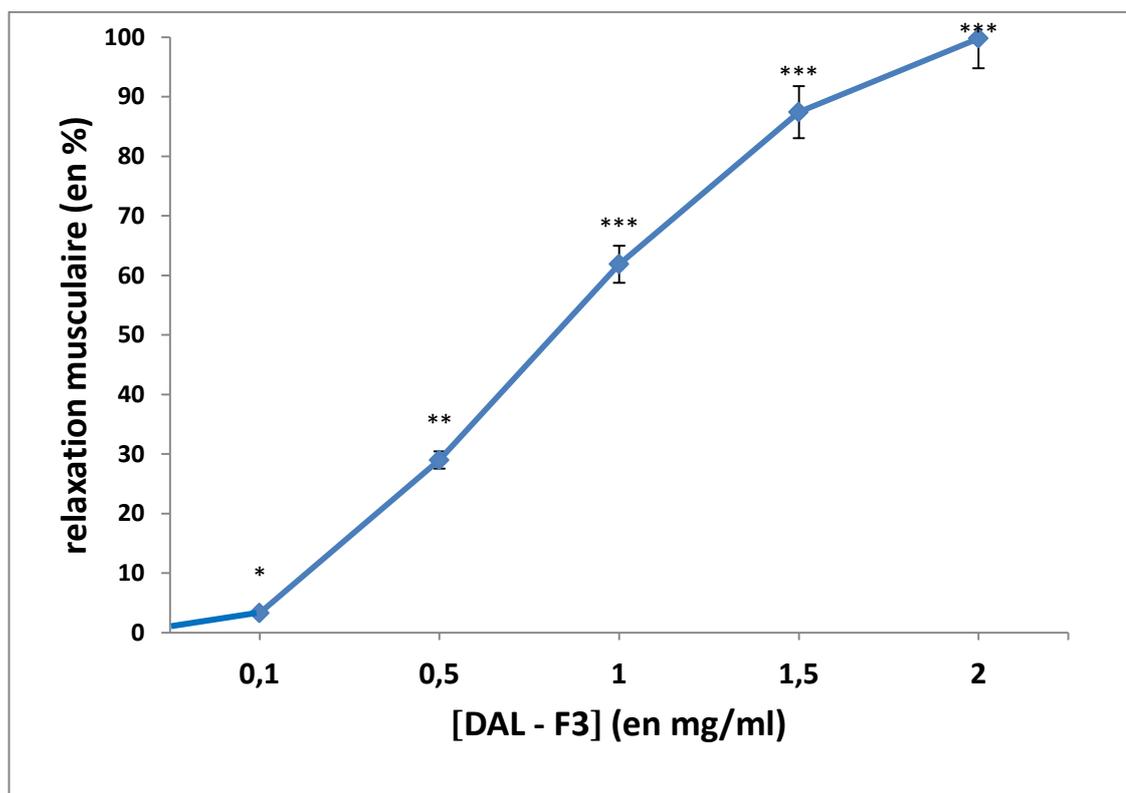


Figure 6 : Effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ sur le rectus abdominis isolé précontracté par l'ACh à 10^{-6} M, (moyenne ± e.s.m ; n=5; *p<0,05 ; p<0,001** ; p<0,0001***).

III.2) Effet de DAL – F₃ vis-à-vis de l'effet contractile de l'ACh:

La **Figure 7** montre que l'injection de manière cumulative de l'ACh aux concentrations croissantes dans le bain provoque les contractions du rectus abdominis isolé de grenouille. En effet, les contractions maximales du muscle sont obtenues à la concentration égale à 10^{-6} M dans le bain. Elle montre aussi qu'en présence de l'extrait DAL – F₃, les courbes se déplacent vers la droite ; alors que le plateau de contraction est toujours atteint avec l'ACh à partir de 10^{-6} M dans le bain. Le **Tableau VI** nous montre que les valeurs des CE₅₀ d'ACh augmentent de façon significative avec les concentrations de DAL – F₃ testées. Ces résultats indiquent que l'extrait DAL – F₃ possède un effet antagoniste de type compétitif vis-à-vis de l'ACh.

Tableau VI : Valeurs de CE₅₀ de l'ACh en absence et en présence de DAL – F₃ aux différentes concentrations (moyenne ± e.s.m ; n=5 ; **p<0,001 ; ***p<0,0001).

	ACh seule	ACh + DAL – F ₃ à 1mg/ml	ACh + DAL – F ₃ à 1,5mg/ml	ACh + DAL – F ₃ à 2mg/ml
CE₅₀ ACh (M)	9,9±0,39 x10 ⁻⁸	1,02±0,18 x 10 ^{-7**}	2,33±0,72x10 ^{-7***}	3,21±0,53x10 ^{-7***}

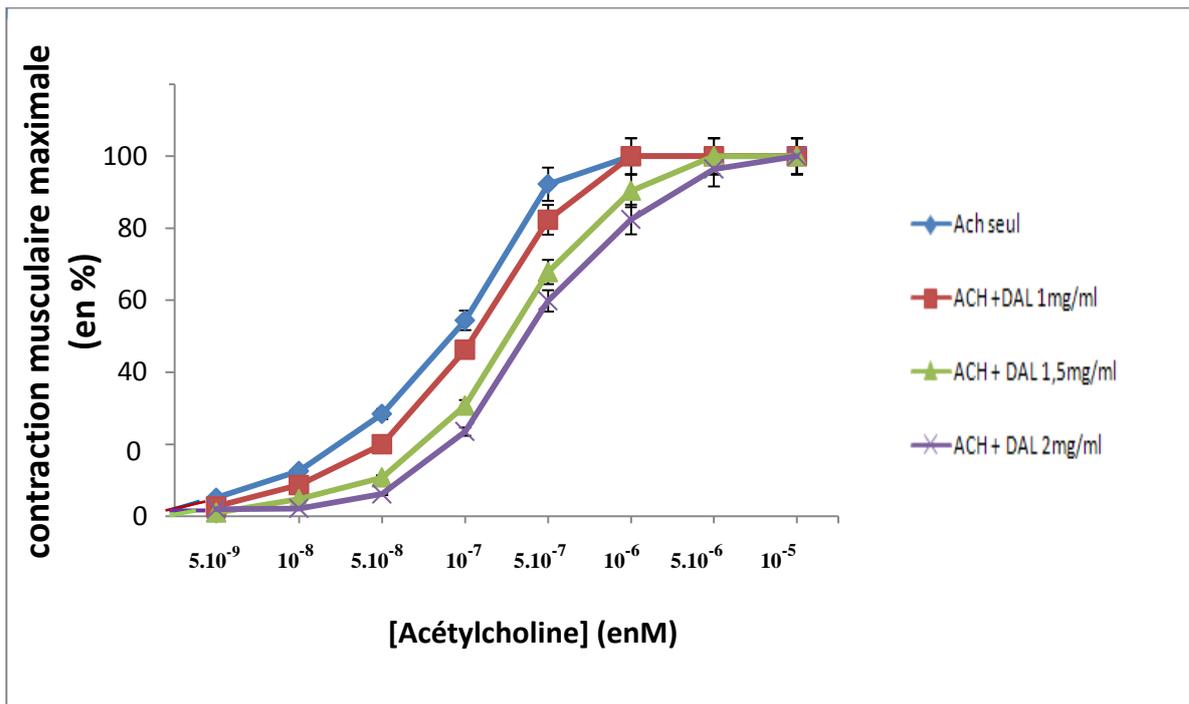


Figure 7 : Courbes des contractions du rectus abdominis isolé provoquées par l'Ach en absence et en présence de DAL – F₃ aux différentes concentrations (moyenne ± e.s.m ; n=5).

IV. TOXICITE AIGÛE

L'administration de l'extrait DAL – F₃ par voie orale jusqu'à la dose de 4g/kg ne provoque aucune mortalité chez les souris. Par contre des effets secondaires sont observés. Il s'agit d'une diminution de l'activité motrice, une somnolence, une paralysie des pattes postérieures, une respiration de CHEYNE STOKES et une ptose de la paupière. Les **Figures 8, 9 et 10** montrent quelques uns de ces effets secondaires chez la souris.

Le Tableau VII montre que la durée de ces manifestations ainsi que le nombre des animaux atteints augmentent avec les doses de DAL – F₃ administrées. Les premiers effets secondaires observés chez tous les animaux traités avec l'extrait DAL –F₃ aux doses 1, 2 et 4g/kg sont la diminution de l'activité motrice et la somnolence. Ces effets apparaissent 30minutes après de l'administration de l'extrait DAL – F₃ à la dose de 1g/kg, chez 60% des animaux. Par contre, elle apparait 10 minutes et 5 minutes après l'administration de l'extrait aux doses de 2g/kg et 4g/kg et atteignent 100% des animaux.

La paralysie des pattes postérieures apparait en second lieu. Elle s'observe chez les lots traités avec l'extrait DAL – F₃ aux doses 2g/kg et 4g/kg. Cet effet apparaît respectivement après 10 et 5 minutes et persiste pendant 2h55 et 4h30 minutes et atteint respectivement 60 et 100% des animaux.

A la dose de 4g/kg, d'autres effets secondaires se manifestent après 5minutes et 15 minutes de l'administration de l'extrait chez 80% et 100% des animaux. Il s'agit respectivement d'une ptose palpébrale et une respiration de CHEYEN STOKES.

Tableau VII : Effets secondaires observés chez les souris après l'administration de l'extrait de DAL – F₃ par voie orale aux doses de 1g/kg, 2g/kg et 4g/kg.

DAL – F₃ (g/kg)	Effets secondaires	1^{ère} apparition (min)	Durée (min)	Animaux atteints (%)
1g/kg	Diminution de l'activité motrice + sommolence	30	97	60
2g/kg	Diminution de l'activité motrice + sommolence	10±2	175	100
	Paralysie des pattes postérieures	40±3	125	60
4g/kg	Diminution de l'activité motrice + sommolence	5±2	256	100
	Paralysie des pattes postérieures	30±3	235	100
	Respiration de CHEYNE STOKES	15±2	215	100
	Ptose de la paupière	5±3	255	80

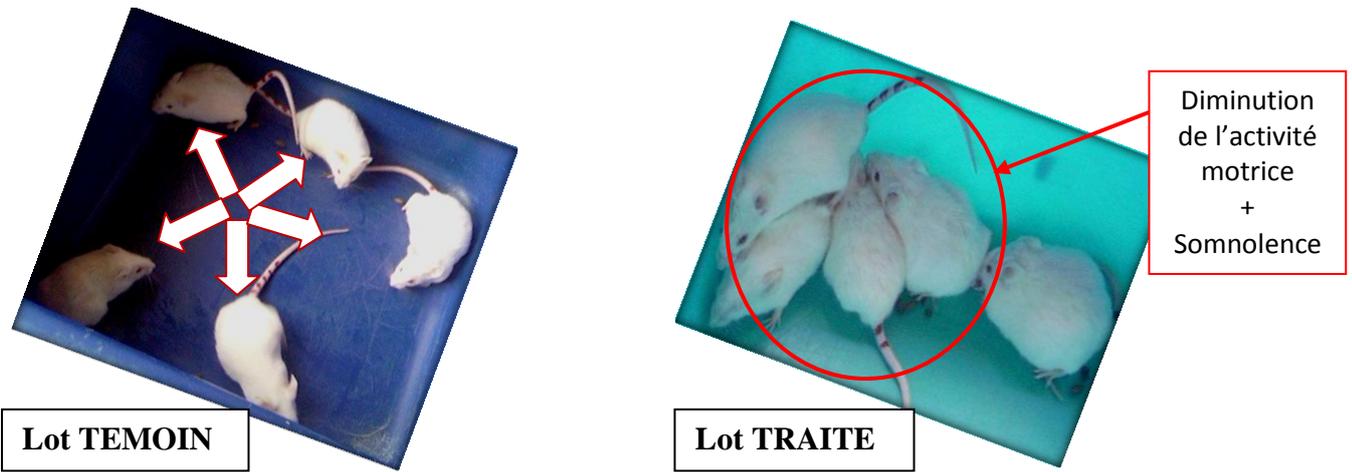


Figure 8 : Diminution de l'activité motrice et somnolence après l'administration de l'extrait DAL – F₃ administré par voie orale aux doses de 1g/kg, 2g/kg et 4g/kg, par rapport au lot témoin.

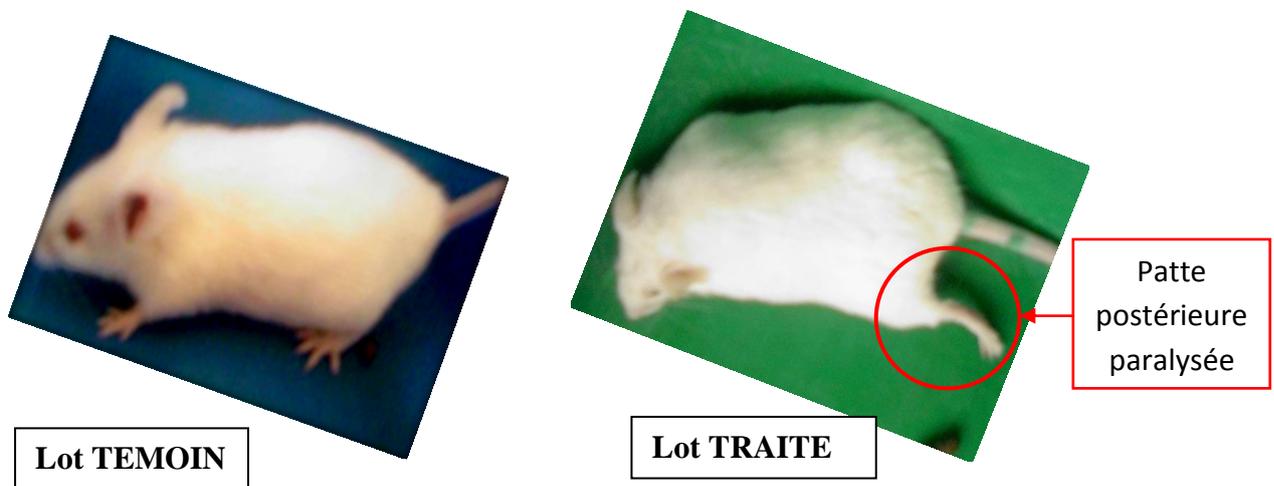


Figure 9 : Paralysie des pattes postérieures chez une souris traitée avec l'extrait DAL – F₃ aux doses de 2g/kg et 4g/kg, par rapport au lot témoin.

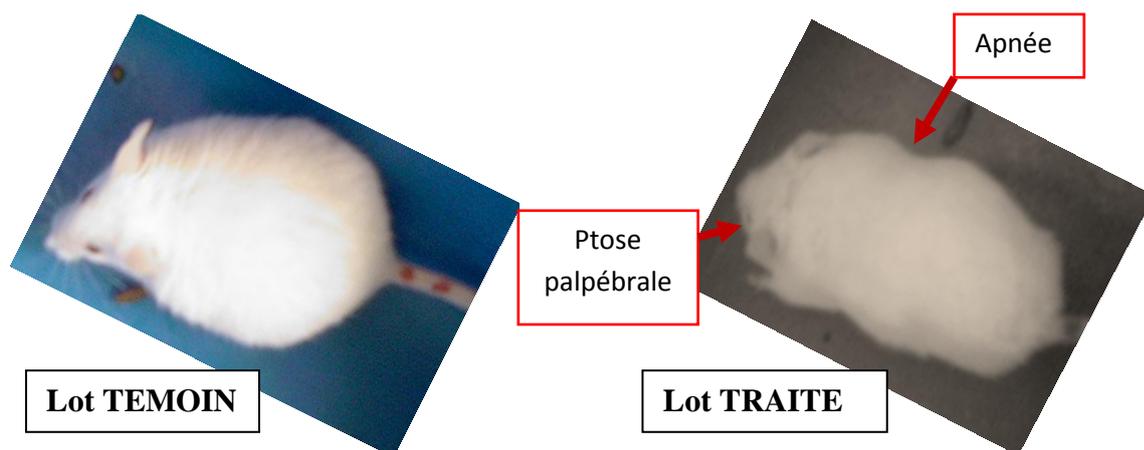


Figure 10 : Ptose palpébrale et respiration de Cheyne Stockes chez les souris traitées avec l'extrait DAL – F₃ à la dose de 4g/kg, par rapport au lot témoin.

DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence l'effet myorelaxant de l'extrait DAL – F₃ par des tests in vivo et in vitro chez la souris et la grenouille.

Les fibres musculaires striées squelettiques représentent l'élément de base de l'activité motrice (BACOU F., 1988). La contraction de ces fibres est à l'origine du tonus musculaire qui est contrôlée par l'ensemble des centres nerveux dont la moelle épinière est la principale responsable (BUSER P. et coll., 1975). Les myorelaxants provoquent la dépression du système nerveux central en agissant au niveau du système mésencéphalique bulbaire ou médullaire dont la conséquence au niveau périphérique est la diminution du tonus musculaire et la perte de motricité volontaire (YVES C. et coll., 2008).

La suppression du tonus musculaire qui se traduit par la relaxation des muscles striés squelettiques est un des objectifs en anesthésiologie, car elle permet aux chirurgiens d'effectuer les actes chirurgicaux sans provoquer des reflexes médullaires (JACQUES Q. et coll., 2007). L'utilisation des substances curarisantes comme adjuvants en anesthésie permet d'atteindre cet objectif (ROBERT R., 2002). Les études effectuées par ABID M. et ses collaborateurs, en 2006, sur l'extrait de *Pachyrhizus erozus* (LEGUMINACEAE), utilisant les méthodes sur plan incliné et rotarod, ont montré que l'extrait de cette plante diminue de façon significative la performance musculaire des souris. Ensuite, les expériences effectuées par RAKOTONIRINA V.S. et ses collaborateurs, en 2001, sur l'extrait de *Cyperus anticutatives* (CYPERACEAE) utilisant ces mêmes méthodologies ont montré les mêmes résultats. Ces auteurs ont conclu que la diminution de la performance des souris placées sur ces deux appareils est due à la dépression du système nerveux central qui se traduit par un effet sédatif et la perte de l'activité motrice volontaire de ces animaux.

Les résultats de nos tests in vivo, utilisant ces mêmes méthodes, ont montré que l'extrait DAL – F₃ diminue les performances musculaires des souris placées sur ces deux dispositifs expérimentaux. Par analogie, l'extrait DAL – F₃ posséderait une activité myorelaxante au niveau du centre médullaire dont la conséquence est la perte de l'activité motrice volontaire des souris. Les études de la toxicité aigüe de DAL – F₃ montrent qu'il provoque la diminution de l'activité motrice et une somnolence ceux qui pourraient provoquer la perte de reflexe de motricité, faisant tomber facilement les souris de ces appareils.

PICK et ses collaborateurs, en 1945, ont montré que, l'alcaloïde de l'*Erythrina sp* (FABACEES), provoque au niveau central la dépression du système nerveux central et au niveau périphérique, il interrompt la formation d'une dépolarisation au niveau post-synaptique de la

plaque motrice. Les résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait DAL – F₃, montrent la présence des alcaloïdes aux fortes concentrations. L'activité myorelaxante d'origine centrale de DAL – F₃ pourrait être attribuée à cette même famille chimique et la paralysie des pattes postérieures et la chute de la paupière des souris observées lors de l'étude de toxicité pourraient être attribuée à son activité au niveau périphérique sur les muscles striés squelettiques.

Par ailleurs, selon la définition de WILLIAM STOKES et JOHN CHEYNE, la respiration de type Cheyne Stokes est une respiration caractérisée par une alternance régulière et périodique d'apnée et d'hyperpnée. Ce type de respiration a été observé chez les souris traitées par l'extrait DAL – F₃ à la dose de 4g/kg. Selon ces auteurs, il est causé par un défaut d'irrigation sanguine au niveau des centres respiratoires. BUZZELLO et ses collaborateurs, en 1982, ont rapporté que les curarisants tels que le Vancuronium et le Pancuronium provoquent un effet vagolytique au niveau des centres pneumo-respirateurs qui ont pour conséquence la dépression du système nerveux respiratoire.

Les tests *in vitro* ont pour objectif d'étudier l'effet de l'extrait DAL–F₃ sur les contractions des muscles striés squelettiques en utilisant le rectus abdominis comme modèle expérimental. Les études menées par DONDAS N. et coll., en 2004, ont démontré la présence des récepteurs cholinergiques type nicotinique sur le rectus abdominis de grenouille. Ce qui nous a permis de choisir ce muscle comme modèle expérimental. En outre, CLAUDE BERNAD a démontré en 1856, que l'activité myorelaxante périphérique des curarisants résulte de leur capacité à bloquer le mécanisme physiologique de la transmission neuromusculaire en compétition avec l'Acétylcholine au niveau des récepteurs cholinergiques post-synaptiques. Sachant que la fixation de 2 molécules d'Acétylcholines sur les sous unités alpha des récepteurs cholinergiques type nicotinique au niveau de la membrane des fibres striées squelettiques va déclencher l'activation des canaux cationiques dont la conséquence est le déclenchement des mécanismes mis en jeu dans la contraction musculaire (MARTIN C. et coll., 2006). En effet, l'action intracellulaire au niveau des fibres striées squelettiques se fait par l'activation des récepteurs ioniques couplés avec un canal ionique par l'agoniste, permettant l'entrée massive dans la cellule des ions Na⁺ et Ca⁺⁺ et la sortie des ions K⁺ provoquant le potentiel de plaque motrice à l'origine de la réponse cellulaire qui est la contraction musculaire (PAGE C.P et coll., 1999). Par contre, la fixation d'un antagoniste compétitif sur ses mêmes types de récepteurs empêche leur activation dont la conséquence est l'absence de la réponse cellulaire qui se traduit par le relâchement musculaire (PAGE C.P et coll., 1999 ; MARTIN C. et coll., 2006). Comme le Pancuronium®, un curarisant de synthèse, grâce à son groupement quaternaire est capable de se fixer sur ces récepteurs en compétition avec l'ACh dont la conséquence est une relaxation musculaire au niveau périphérique (BUCKETT W.R. et coll., 1969 ; SPEIGT T.M., 1998).

Les résultats des tests in vitro montrent que l'extrait DAL – F₃ possède un effet myorelaxant sur le rectus abdominis isolé de grenouille. Les résultats du premier test in vitro montrent que l'injection de l'ACh à la concentration finale de 10⁻⁶M dans le bain entraîne la contraction maximale du muscle. L'activation du complexe ACh – récepteurs entraîne une réponse tissulaire qui est la contraction musculaire. Par contre, l'injection d'une manière cumulative de l'extrait DAL – F₃ au plateau de cette contraction maximale, aux concentrations croissantes dans le bain, provoque le relâchement maximal du muscle. Par analogie, les molécules de l'extrait DAL – F₃ pourraient se fixer au niveau de la sous unité alpha de ces mêmes types de récepteurs d'une manière compétitive avec celles de l'agoniste qui est l'ACh, en provoquant le relâchement musculaire. Selon MARTIN C. et ses collaborateurs, en 2006, lorsque 95% des récepteurs cholinergiques post-synaptiques sont occupés par les molécules antagonistes, le relâchement musculaire maximal est obtenu. D'après la figure 6, à la concentration égale à 2mg/ml dans le bain, l'extrait DAL – F₃ provoque la relaxation musculaire maximale soit 99,8±0,22%, il se pourrait qu'à cette concentration, tous les récepteurs localisés au niveau de ce muscle isolé ont été occupés par les molécules de DAL – F₃.

DOBELIS P. et ses collaborateurs, en 1999, ont montré que l'alcaloïde méthyllucaconitine de la plante *Delphinium brownii* est un antagoniste compétitif des récepteurs cholinergiques nicotiniques de la plaque motrice. Les résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait DAL – F₃ montrent la présence des alcaloïdes aux fortes concentrations et les résultats du second test in vitro montrent que l'incubation de l'organe dans le bain en présence de l'extrait DAL – F₃ aux différentes concentrations déplace les courbes effet-concentrations d'ACh vers la droite avec une antagonisation significative. Par analogie, l'effet périphérique de DAL – F₃ pourrait être attribué à cette même famille chimique qui antagonise de manière compétitive les récepteurs cholinergiques post-synaptiques localisés au niveau du rectus abdominis isolé de grenouille.

CONCLUSION

Les résultats de notre travail montrent que l'extrait DAL – F₃ provoque un effet myorelaxant tant au niveau central qu'au niveau périphérique. Au niveau central, il possède un effet myorelaxant qui se traduit par la diminution de l'activité motrice volontaire. Au niveau périphérique, il possède un effet antagoniste type compétitif caractérisant son activité curarisante. A forte dose, l'extrait ne provoque aucune mortalité, donc il n'est pas toxique.

En perspective d'avenir, des travaux supplémentaires portant sur le fractionnement bio-guidé de l'extrait DAL – F₃ permettront de déterminer le ou les mécanisme(s) d'action du ou des principe(s) actif(s) contenu(s) dans cet extrait.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABID M., HRISHIKESHAVAN H.J., ASAD M. (2006)
Pharmacological evaluation of Pachyrrhizus erosus seeds for central nervous system depressant activity.
Ind.J.Physiol.Pharmacol.50(2):143-151.
- ADAMS H.R. (2001)
Neuromuscular blocking agents.
Vet. Pharmacol.Ther.Wiley-Blackwell.p:137-150.
- ALBRECHT E., HABERER J.P., BUCHSER E. (2006)
Manuel pratique d'Anesthésie. Ed.Elsevier Masson.p :
- ALLMARK M.G., BACHINSKI W.M. (1949)
A method of assay for curare using rats.
J.Am.Pharm.Ass. **38**: 43-45.
- BACOU F., VIGNERON P.(1988)
Proprieties des fibres musculaires squelettiques. Influence de l'innervation motrice
Reprod. Nutr. Develop. 28 (GA).p:1387-1453.
- BESSET M., VERWAERDE P., AUTEFAGE (2001)
Les curares : études bibliographiques
Revue.Méd.Vet.152(**10**) :667-680
- BISSET N.G. (1992)
War and hunting poisons of the New World.Notes of the early history of curare
J. Ethnopharmacol. **36**:1-26.
- BOWMAN W.C. (1986)
Présynaptic nicotinic autoreceptor.
Trends. Pharmacol.Sci.**101**:136-137.
- BOWMAN W.C. (1990)
Pharmacology of neuromuscular functions
London:Wright.p:1-316
- BOWMAN W.C. (1996)
Préjunctional mechanisms involved in neuromuscular transmission
Jones.RM.Aitkenhead AR.Foëx P.
London:BRJ.p:1-27
- BOWMAN W.C. (2006)
Neuromuscular block
Br. J. Pharmacol.147(SI):277-286.
- BUCKETT W.R., CHRISTINE E.B., MARJORIBANKS., MARWICK F.A., MORTON M.B. (1969).
The pharmacology of pancuronium bromide, a new potent steroidal neuromuscular blocking agent.
Br.J.Pharmac.Chemother **32**:671-682.

- BUZELLO W., NOLDGE G. (1982)
 Repetitive administration of pancuronium and vecuronium in patients undergoing long lasting operations.
 Br.J.Anaesth.**54**:1151-1157
- CARRUTHERS J.D., CARRUTHERS J.A. (1992)
 Treatment of glabellar frown lines with C.Botulinum – A – Exotoxine.
 J.Dermatol.Surgery and oncology.18 (1):17 – 21.
- CLAUDE B. (1851)
 Leçon sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses
 Compte-rendu.Société Biologique (Paris)p :195-206
- CLAUDE B. (1856)
 Analyse physiologique des propriétés musculaires et nerveuses au moyen des curares.
 Acad .Sci. (Paris), **43**:825-829.
- CLARK R.P., BERBIS C.E.(1989)
 Botulinum Toxin: A treatment for facial asymmetry caused by facial nerve paralysis
 Plastic and reconstructive Surgery.82(2):353-355.
- COLQUHOUN D. (1986)
 On the principles of post synaptic action of neuromuscular blocking agents.
 New neuromuscular blocking agents.
 Handbook of Experimental pharmacology.(Berlin). Springer-Verlag. **79**:59-113.
- DELPHAUT J., GREGOIRE H., LANZAM (1957)
 Simple apparatus for recording agitation of rats; effects of various neurostimulants
 J.Am Pharm.Ass 151(7):1401-1404.
- DOBELIS P., MADL J.E., PFISTER J.A., MANNERS G.D., WALROND (1999)
 Effects of Deolphanium Alkaloids on neuromuscular transmission
 J. Pharmacol.Exp.Ther.291(2):538-546.
- DONDAS N., KARATAS Y., DIKMEN A. (2004)
 Characterization of nicotinic cholinergic receptors
 Indian.J.Pharmacol 36(2):72-75.
- DUNHAM N.W., MIYA (1957)
 A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice
 J.Am.Pharmaceut.Assoc.46(3):208-210.
- ELIZABETH M.W., OKPAKOD.T., FRED J.E. (1996)
 Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material.
 Pharmacological methods.Ed.John Wiley.,Sons.
 Fitoterzpia.**20**:178.
- ERBGUTH F.J. (2004)
 Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum* and the idea of the therapeutic use of the botulinum toxin.
 Mouvement disorders. Ed. John Wiley.Sons. **8**:2-6

- FOLDES F.F. (1993)
Anesthesia before and after curare.
Anesthesiol.Reanim.18(5):128-131
- GANONG W.R. (1963)
Physiologie médicale: neuromuscular junction
Rev.Med.Physiol.p:53-54
- GRIFFITH H.R., JONHSON E. (1942)
The use of curare in general anesthesia.
Anesthesiol. **3**:418-420.
- GUENARD H. (2001)
Physiologie humaine.
Herve Guenard. **3**:20 – 51
- HALL L.W., CLARKE K.W. (1991)
Relaxation of the skeletal muscles during anesthesia.
Toronto, ONT:Baillière Tindall-Veterinary.Anesthesia.London. **3**:113-132
- HOLLANDER A. (1987)
Transmission neuromusculaire et curarisation
Encycl.Méd Chir (Paris,France). 10, 36 (390A),p:10- 11.
- IGAN C. (1982)
Practical manuals of the industrial utilization of medical plants and aromatical plants
Rev. Faculty of pharmacy, Bucharest Roumania; p: 1-34.
- JACQUES Q., ALEXANDRE S., FINGERHUT A. (2007).
Dictionnaire médical. Ed.Elsevier Masson.p :238.
- JAMES D., DUTCHER (1946).
Curare Alkaloids from *chondodendron tomentosum*.Ruiz and Pavon.
J.Am.Chem.Soc.63(3):419-424.
- JENNIFER M., HUNTER M.B (1995)
Neuromuscular blocking drugs.
Drug Therapy.Alastair.Ed.J.J.Wood.M.D.332(25):1691-1699.
- JONES B.J., ROBERTS D.J. (1968)
The quantitative measurement of motor incoordination in naïve mice using an accelerating rotarod.
J.Pharm.Pharmacol.**20**:302-304.
- KARATAS Y., ERGUN Y., GOCMEN C., SECILMIS A., SINGIRIK E., DIKEN A., BAYSAL F. (2000)
Possible postsynaptic action of aminoglycosides in the frog rectus abdominis.
Acta Med.Okayama 54 (2) 49-56.
- KITCHEN., IAN (1984)
Isolated skeletal muscle
Textbook of in vitro practical pharmacology
Blackwell Scientific Publication.Ed.Osney Mead.(Oxford)p :70-78.

- KING H. (1935)
Curare alkaloids .tubocurarine.
J.Chem.Soc.p:1381-1389.
- KUKREJA R., SINGH B.R (2009)
Botulinum neurotoxins: Structure and mechanism of action
Microbial toxins. Current Research and future trends.Caster Academic Press.
- MALONE M.H., CHESNEY J.D., KOUZI S.A. (1991)
A pharmacological evaluation of the diterpene-sclareol in intact rats.
Fitoterapia, **19**:123-129.
- MARTIN C., RIOU B., VALLET B. (2006)
Physiologie de la transmission neuromusculaire.
Physiologie Humaine Appliquée. Ed.Annette.p :163-873
- MEISTELMAN C. (1998)
Pharmacologie des curares
Encycl.Méd.Chir.Elsevier,(Paris).p :336-355.
- MOUSSARD C., MOUGIN C., OUDET P. (2005)
Biologie moléculaire : Biochimie des communications cellulaires
Ed.De Boeck Université. p : 142 – 145.
- PAGE C.P., CURTI M.J., SUTTER M.C., WALKER M.J., HOFFMAN B.B. (1999).
Pharmacologie intégrée.
Ed.De Boeck Université. p:54-56.
- RAKOTONIRINA V.S., BUM EN., RAKOTONIRENA A., BOPELET M. (2001)
Sedative properties of the decoction of the rhizom of *Cyperus anticaltivates*.
Fitoterapia, **72**: 22–29.
- RANDALL L.O., HEISE G.A., SCHALLEK W., BAGDON R.E., BANZINGER R., BORIS A.,
MOC R.A., ABRAMS W.B. (1961)
Pharmacological and clinical studies of valium.
Curr.Ther.Res, **3**: 405-425.
- RIGOARD S., BUFFENOIR K., BAUCHE S., GIOT J.P., KOENIG J., HANTAÏ D.,
LAPIERRE F., WAGER M. (2009)
Organisation structural, moléculaire, formation et maturation de la jonction neuromusculaire.
Neurochir.55(S1).p:34-42.
- RIVLIN A, TATOR C. (1977)
Objectif clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in rat
J.Neurosurg.**47**:577-578.
- ROY R.K., RAY N.M., DAS A.K. (2005)
Squeletal muscle relaxant effect of *Chonemorpha macrophylla* in experimental animal.
Indian.J.Pharmacol 37(2):116-119.
- SIMIAND J., KEANE P.E., BIZIERE K., SOUBRIE P. (1989)
Comparative study in mice of Tétrazepam other centrally activity skeletal muscle relaxant.
Arch.Int.Pharmacodyn.**297**:272-285

SCHWARTZ D. (1963)

Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes : comparaison d'un pourcentage à un pourcentage théorique principe des tests.

Flammarion.Médecine-science (Paris – Vi^è) p :37-44.

SPEIGHT T.M., AVERY G.S. (1998)

Pancuronium bromide: A review of its pharmacological proprieties and clinical application

Drugs.4: 168-226.

TASSONY E., GEMPERLE M., SZAPPANYOS (1975)

Physiologie de la plaque motrice et son exploration.

Encycl.Méd Chir « Anesthésie-réanimation » (Paris, France). **12**:6-50.

TAYLOR P. (1998)

Neuromuscular bloking agents.

The pharmacological basis of therapeutics.Goodman and Gilman's.Ed.Joell.G.H, Lee.E.L.,Alfred G.G.(New York) **10**:220-232.

UNNA, H., GREESLIN J. G. (1944)

Pharmacologic action of *Erythrina alkaloids* II. Free, liberated and combined alkaloids.

J. Pharmaco. Exp.Ther. **80**: 53-61.

VELLARD J. (1955)

Les curares: leur préparation par les Indiens sud – Américains

J.Soc.Am 44(**44**) : 67-68.

VOGEL H.G. (1927)

Neuromuscular blocking activity.Drug discovery and evaluation.Pharmacological assays.Ed.Vogel.H.G.

Springer-Verlag.Berlin.Heidelberg.New York.p:210-398.

WINTERSTEINER O., DUTCHER J.D. (1943)

Curare alcaloids from *Chondrodendron tomentosum*.

Science.**97**:467-470.

YVES C., CHRISTIAN J. (2008)

Pharmacologie : les myorelaxants

Abrégés de Pharmacie.Ed.Elsevier Masson.**6**:109-122.

« ETUDE DE L'ACTIVITE CURARISANTE DE L'EXTRAIT DAL – F₃ CHEZ LA SOURIS ET LA GRENOUILLE »

Auteur : RASOLOFONDRATSIMBA Felana Nomena
Lot: V S 52 U bis Avaratr'Ankatso Tanà 101

Laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie
Générale et de Pharmacocinétique

Année : 2009 – 2010

B.P. : 8357

Rapporteur : Mr RANDIMBIVOLOLONA
Fanantenanirainy
Professeur titulaire en Pharmacologie

E-mail : frandimby@gmail.com

Faculté des Sciences
Université d'Antananarivo

RESUME

L'objectif de la présente étude a été d'évaluer l'activité curarisante de l'extrait DAL – F₃ par des tests in vivo et in vitro chez la souris et sur le rectus abdominis isolé de grenouille.

In vivo, l'administration de DAL – F₃ par voie orale aux doses 100mg/kg, 200mg/kg et 400mg/kg provoque la diminution de l'activité motrice volontaire. In vitro, l'injection de DAL – F₃ aux différentes concentrations dans le bain contenant l'organe isolé contracté par l'Acétylcholine provoque le relâchement du muscle isolé. La contraction maximale du muscle a été obtenue avec l'Acétylcholine à 10⁻⁶M dans le bain. Tandis que le relâchement maximal du muscle est obtenu avec DAL – F₃ à 2mg/ml dans le bain, avec une CE₅₀ égale à 0,91±0,03M.

Cette activité curarisante de l'extrait DAL – F₃ pourrait être attribuée aux alcaloïdes qui agissent au niveau du système nerveux central et qui pourraient antagoniser de manière compétitive les récepteurs cholinergiques type nicotinique de la plaque motrice.

L'étude de toxicité aigüe montre que l'extrait DAL – F₃ n'est pas toxique.

Mots clés : curarisants, relâchement musculaire, jonction neuromusculaire, muscles striés squelettiques.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the curare-like activity of DAL – F₃ by in vivo and in vitro assays in mice and on rectus abdominis of the frog.

In vivo, the oral administration of DAL – F₃ at doses of 100mg/kg, 200mg/kg and 400mg/kg in mice led to reduction of the muscular voluntary activity. In vitro, the injection of DAL – F₃ at different concentrations in the bath containing the organ led to relaxation of the isolated muscle. The maximal contraction of the muscle was obtained to 10⁻⁶M of Acetylcholine in the bath. But the maximal relaxation of this muscle was obtained to 2mg/ml of extract DAL – F₃ in the bath, with EC₅₀ 0,91±0,03M.

This curare activity of DAL – F₃ could be attributed to alkaloids action on the central nervous system and to that could antagonize the nicotinic receptors of the neuromuscular junction.

The test of toxicity showed that the extract of DAL – F₃ is not toxic.

Keys words: neuromuscular blocking agents, relaxant muscle, junction neuromuscular, skeletal muscles.