

Activités biologiques des extraits de Abrahamia Suarezensis *Randrian. & Lowry (ANACARDIACEAE)*

[Biological activities of extracts from Abrahamia Suarezensis *Randrian. & Lowry (ANACARDIACEAE)]*

Aina Raharilavitra¹, Dimbiniala Andriamamonjisoa², Mbolatiana Falisoa Rasoanaivo³, Raominasolo Jesuca Rasolofomanana⁴, Stephan Richard Rakotonandrasana⁵, Bernard Anselme Ravelonjato⁶

^{1, 2, 3, 4, 5, 6}Centre National d'Application de Recherches Pharamaceutiques Ambodivoanjo-Ambohitato, Rue RP, Rahajarizafy Antoine de Padoue, BP 702, 101 Antananarivo, Madagascar
Auteur correspondant : Aina Raharilavitra. E-mail : fitiaagape@gmail.com



Résumé - La présente étude a été réalisée en vue d'évaluer les activités biologiques des rameaux feuillés de *Abrahamia suarezensis* (Anacardiaceae), une plante endémique de Madagascar non utilisée en médecine traditionnelle malagasy. Les extraits hexanique (ESHex), acétate d'éthyle (ESAc) et aqueux épuisé (ESAq) ont présenté chacun une activité antifongique forte avec une concentration minimale inhibitrice CMI < 2µg.ml⁻¹. Les tests in vitro sur *Plasmodium falciparum* des extraits bruts ont montré une activité antiplasmodiale modérée pour ESHex (CI₅₀ = 9,91µg.ml⁻¹) et ESAc (CI₅₀ = 14,11µg.ml⁻¹) puis une activité forte pour ESBu (CI₅₀ = 2,75µg.ml⁻¹), ESBuF (CI₅₀ = 4,39µg.ml⁻¹) et ESAq (CI₅₀ = 2,86µg.ml⁻¹). L'extrait ESAc a causé une inhibition de 80% pour une dose de 1mg.ml⁻¹ et une inhibition de 100% avec la dose de 3mg.ml⁻¹ lors du test antianaphylactique. Les extraits ESAc, ESBu et ESBuF possèdent une activité anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème supérieur à 55% à la dose de 300mg.kg⁻¹. De même, l'effet analgésique des extraits ESAc et ESBuF s'est révélé très importante à une concentration de 300mg.kg⁻¹. Lors d'un test de transit intestinal, ESAc et ESBuF ont montré un effet antidiarrhéique respectivement de 64,97 % et 59,92 % à la dose de 250mg.kg⁻¹.

Mots clés - *Abrahamia suarezensis*, activité analgésique, activité antidiarrhéique, activité anti-inflammatoire, activité antifongique

Abstract - This present study was carried out to evaluate biological activities present in the leafy branches of *Abrahamia suarezensis* (Anacardiaceae), a plant endemic to Madagascar not used in traditional malagasy medicine. The extracts of hexanic (ESHex), ethyl acetate (ESAc) and marc aqueous (ESAq) showed strong antifungal activity with minimum inhibitory concentration MIC < 2µg.ml⁻¹. Evaluation test in vitro on *Plasmodium falciparum* showed an moderate antiplasmodial activity for ESHex (CI₅₀ = 9,91µg.ml⁻¹) and ESAc (CI₅₀ = 14,11µg.ml⁻¹) then strong activity for ESBu (CI₅₀ = 2,75µg.ml⁻¹), ESBuF (CI₅₀ = 4,39µg.ml⁻¹) et ESAq (CI₅₀ = 2,86µg.ml⁻¹). The ESAc extract caused an inhibition of 80% for a dose 1mg.ml⁻¹ and an 100% inhibition for 3mg.ml⁻¹ during the antianaphylactic test. The ESAc, ESBu and ESBuF extracts have anti-inflammatory activity with a percentage of edema inhibition more than 55% at a dose 300mg.kg⁻¹. Likewise, the analgesic effect of ESAc and ESBuF extracts was found to be very significant at a concentration of 300mg.kg⁻¹. During an intestinal transit test, ESAc and ESBuF showed an antidiarrheal effect of 64,97 % and 59,92 % respectively at a dose of 250mg.kg⁻¹.

Keywords - *Abrahamia suarezensis*, analgesic activity, antidiarrheal activity, anti-inflammatory activity, antifongic activity

I. INTRODUCTION

Les plantes sont depuis toujours une source potentielle de médicaments [1] [2]. Madagascar dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. Elle comporte 14 000 plantes dont 3 250 espèces sont médicinales [3] [4] [5]. L'étude de la valorisation des ressources naturelles constitue un des défis principaux de l'humanité pour un développement durable. La recherche de nouvelles molécules biologiquement actives entreprise au sein de la biodiversité végétale constitue une voie prometteuse. *Abrahamia suarezensis*, endémique de Madagascar et non utilisée en médecine traditionnelle malagasy, s'est avérée être une plante à vertus thérapeutiques intéressantes ayant des activités antihistaminique et antioxydante [6]. Un criblage biologique des extraits bruts de *Abrahamia suarezensis* a été entreprise en vue d'évaluer ses autres activités biologiques et de mieux orienter l'étude phytochimique bioguidée.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par les rameaux feuillés d'*Abrahamia suarezensis* récoltés dans la forêt sèche dégradée d'Ampasimena, District d'Antsiranana II, Région de DIANA Madagascar. La plante a été identifiée par le Dr HDR Stephan Richard RAKOTONANDRASANA du Département Botanique et Ethnobotanique du Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) et un spécimen d'herbier de référence ST 1026 a été déposé au Centre d'herbier de plantes médicinales de Madagascar du CNARP.

Les rameaux feuillés ont été séchés dans une chambre climatisée à la température de 55°C jusqu'à ce qu'ils soient secs puis broyés avec un broyeur mécanique WILLEY MILL modèle 2 et stockés dans des sachets poreux.

2.2. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique, utilisant les méthodes préconisées par Fong et *al.* [7] a été entrepris sur un extrait éthanolique (ESeOH) pour déceler les familles chimiques présentes dans la plante. Il est basé sur des réactions de précipitation et des réactions de coloration spécifiques à chaque classe de substances naturelles effectuées.

2.3. Extraction

La plante sèche broyée (450g) est extraite par macération dans l'éthanol (1,35l) à température ambiante (3 x 24h). Après filtration et évaporation du solvant à pression réduite, l'extrait éthanolique ESeOH (56g) est repris avec de l'eau et soumis à un partage liquide-liquide successivement avec de l'hexane, l'acétate d'éthyle et du butanol pour donner des extraits hexanique ESHex (20,56g), acétate d'éthyle ESAc (8,70g), butanolique ESBu (4,5g) et aqueux épuisé ESAq (7,15g).

L'extrait butanolique détanifié ESBuF (0,802g) a été obtenu par dissolution de l'extrait butanolique dans du méthanol (8ml pour 300mg d'extrait). Une quantité suffisante de chloroforme y est progressivement ajoutée pour obtenir une solution à 8% de MeOH. Une précipitation des tanins est immédiatement observée. Le mélange est placé à 4°C pendant 4 heures. La solution obtenue est ensuite filtrée et le filtrat évaporé sous pression réduite [8].

2.4 Activités biologiques

2.4.1 Activité antifongique

L'étude a pour objectif d'évaluer la sensibilité *in vitro* de souches de *Candida albicans* sous forme hyphale, en utilisant une méthode de microdilution en milieu liquide conforme au protocole décrit par le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dans la référence M27-A3 [9], pour mesurer l'activité antifongique de manière quantitative, exprimée en $\mu\text{g.ml}^{-1}$. La croissance des germes se traduit par la turbidité du milieu, qui peut être mesurée à une longueur d'onde de 525nm. Chaque test est réalisé en triplicat pour permettre le traitement statistique des résultats. Chaque extrait (5mg) a été mis en suspension dans 1ml d'un mélange diméthylsulfoxyde/eau (DMSO/H₂O) dans une proportion v/v. Ensuite, cette solution a été stérilisée par filtration à travers une membrane de 0,45 μm .

Une pré culture composée de 5 colonies bien isolées du germe-test *Candida albicans* a été prélevée à partir d'une culture en milieu solide SSGG. Ces 5 colonies ont été transférées dans 20ml de milieu SLGG et incubées à 35 °C pendant 48 h. La préculture a été préalablement diluée à 10^{-1} avant utilisation.

La microplaque composée de 96 puits disposés en 12 colonnes a été utilisée pour le remplissage et l'ensemencement des puits. Chaque solution de l'extrait à tester a été déposée dans les puits sous un volume de 20 μ l, avec une concentration initiale de 1000 μ g.ml $^{-1}$ et a été diluée de moitié à chaque fois en allant de la colonne 2 à la colonne 11. Les puits de la colonne 1 ont été laissés vides (blanc pour le spectrophotomètre) et ceux de la colonne 12 ont reçu 20 μ l du solvant de dilution de l'extrait. La microplaque a ensuite été mise à sécher dans l'étuve pendant une nuit à 35 °C. Après séchage, 100 μ l de l'inoculum ont été ajoutés dans chaque puits, puis l'ensemble a été mis à incuber à 35 °C pendant 48h. Comme contrôle antifongique, le fluconazole a été utilisé avec des concentrations testées allant respectivement de 593 à 0 μ g.ml $^{-1}$.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration de l'extrait à laquelle aucune croissance visible (100 % d'inhibition) du germe-test dans le milieu. Elle a été déterminée par la comparaison de la densité optique (DO) de chaque milieu d'essai à celle du témoin de culture en utilisant le test de Student appliqué au faible effectif. Les DO des turbidités des puits ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque et chaque valeur obtenue en triple est comparée à celle du témoin de culture.

2.4.2. Activité antiplasmodiale

Le test consiste à mettre la souche de *Plasmodium falciparum* FCM29 en contact avec des concentrations différentes d'extrait dans des puits d'une microplaque de 96 puits [10]. La croissance intra-érythrocytaire du parasite est suivie en utilisant une sonde fluorescente, Sybr-Green I, spécifique à l'ADN double brin. La fluorescence émise par le complexe ADN-Sybr-Green I formé est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence (Flx 800, Biotek). Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN [11].

La souche de *Plasmodium falciparum* FCM29 maintenue en culture continue par la méthode de Trager et Jensen [10] est utilisée. Avant le test, la parasitémie est estimée par comptage visuel au microscope à partir d'un frottis sanguin, coloré au Diff-quick. Une dilution de la culture avec des hématies saines a été réalisée pour avoir un inoculum avec 1% de parasitémie et 2% d'hématocrite.

Les extraits à tester sont dissouts dans un premier temps dans 20 μ l de DMSO, ensuite l'ICM (Incomplet media) est ajouté dans les préparations afin d'obtenir des solutions mères de concentration égale à 1mg.ml $^{-1}$. A partir des solutions mères, une dilution en cascade (coefficient de dilution = $\frac{1}{2}$) avec l'ICM est réalisée (de 50 μ g.ml $^{-1}$ à 0, 39 μ g.ml $^{-1}$) puits par puits dans une microplaque de 96 puits.

Pour le test, l'ICM (50 μ l) est distribué dans les microplaques à 96 puits. Chaque extrait à tester (50 μ l) est ensuite réparti dans chaque puits et 100 μ l d'inoculum enrichi de 20% de sérum humain O $^{+}$ y sont versés. Chaque test est effectué en triple. Des antipaludiques de référence (la N quinine, la quinine et la chloroquine), un témoin positif et un témoin négatif ont été utilisés,

- Témoin positif : 100 μ l d'hématies saines additionnées de 100 μ l d'inoculum (croissance des parasites).
- Témoin négatif : 20 μ l d'hématies saines (pas de croissance des parasites). Toutes les microplaques sont incubées à 37°C dans un incubateur contenant une cloche à bougie pendant 72h.

Pour la lecture, une solution de Sybr-Green I est préparée en ajoutant 100 μ l de Sybr-Green I dans 900 μ l de DMSO. 50 μ l de cette préparation sont ajoutées dans chaque puits. Après 1 heure d'incubation, la fluorescence émise par le complexe ADN-Sybr-Green I est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence (Flx 800, Biotek). L'IC $_{50}$ (concentration d'extrait qui inhibe 50% de croissance des parasites) est calculée à partir de l'équation de la courbe obtenue en représentant les pourcentages d'inhibition de la croissance parasitaire en fonction des concentrations de l'extrait. Elle est dite active et intéressante si la valeur trouvée est inférieure à 20 μ g.ml $^{-1}$. Si cette valeur est supérieure à 20 μ g.ml $^{-1}$, elle est active mais pas intéressante. Celle-ci est non active si aucune valeur n'est trouvée.

2.4.3. Activité anti anaphylactique

L'activité anti anaphylactique d'un extrait sur un iléon isolé de cobaye est évaluée *in vitro* mettant à profit la réaction de Schultz-Dale [12].

Les cobayes utilisés ont été activement sensibilisés par deux injections par voie intrapéritonéale d'ovalbumine à la dose de 1mg.ml^{-1} (antigène de sensibilisation) dans une solution aqueuse d'hydroxyde d'alumine à 2% qui sert d'adjuvant.

Cette sensibilisation a entraîné une réaction d'hypersensibilité immédiate lors d'un nouveau contact de l'organe issu de l'animal sensibilisé avec l'antigène de sensibilisation.

Principalement, les anticorps responsables de la réaction d'hypersensibilité appartiennent à la classe IgE. Les principaux médiateurs provenant du tissu pulmonaire des cobayes sont l'histamine et d'autres médiateurs préformés dans les granules mastocytaires comme les SRS-A (Slow Reacting Substance of Anaphylaxis). L'importance de ces médiateurs dans l'anaphylaxie du cobaye *in vivo* a également été confirmée par des études effectuées par Laekeman et Herman en 1979 [12].

La contraction de l'organe isolé issu d'un animal présensibilisé à l'ovalbumine est obtenue après un nouveau contact de cet organe avec l'ovalbumine qu'il a reconnu comme antigène. Cette contraction est d'origine histaminique parce qu'elle est inhibée par la mépyramine [12].

La réaction de SCHULTZ-DALE implique la participation d'au moins 3 agents humoraux qui sont l'histamine, la sérotonine et l'acétylcholine dans la contraction de l'iléon de cobaye sensibilisé. L'histamine est un des principaux médiateurs libérés des mastocytes au cours de la réaction de Schultz-Dale [13] [14]. La réaction se fait en trois étapes :

2.4.3.1. Sensibilisation active du cobaye à l'ovalbumine

Une solution d'hydroxyde d'aluminium 2% servant d'adjuvant a été préparée préalablement dans du sérum physiologique 0,9% dans le but d'amplifier la réponse immune. Ensuite l'ovalbumine (1mg.ml^{-1}) a été mélangée avec cette solution durant 20 minutes environ et injectée (1ml par animal). Trois lots de trois cobayes ont été utilisés pour l'expérience. L'injection de l'ovalbumine au niveau intrapéritonéal de l'animal est répétée au 7^{ème} jour. Cette injection est pratiquée à ce niveau afin de sensibiliser les mastocytes séreux des différents organes du péritoine. Les animaux ont été utilisés pour l'expérience entre le 21^{ème} et le 31^{ème} jour après la première sensibilisation afin de disposer de leurs mastocytes et de leurs organes effecteurs sensibilisés.

2.4.3.2. Préparation de l'iléon isolé

Des groupes de cobayes sont sensibilisés par la solution d'ovalbumine mélangée à de l'hydroxyde d'alumine servant d'adjuvant le premier jour. Après 7 jours, l'animal est resensibilisé. Pendant ce temps, l'organisme rencontre pour la deuxième fois l'allergène. Ainsi, les lymphocytes B vont fabriquer des anticorps ou immunoglobulines de type E et G censés reconnaître l'allergène. Après 21 jours, l'animal est sacrifié puis, une partie de l'iléon est prélevé et nettoyé en enlevant les tissus. L'iléon est découpé en morceau d'environ 0,5cm, et placé dans la solution physiologique pour assurer sa survie.

Le montage des nœuds est nécessaire pour la mise en place de l'organe dans la cuve : l'un des nœuds est monté au fond de la cuve à organe remplie de solution de Krebs maintenue à la température $37,2^{\circ}\text{C}$; l'autre nœud fixe l'organe au stylet pour signaler la contraction sur le papier enregistreur. L'organe est relié au capteur de mouvement et au transducteur. La tension de l'organe est réglée 0,25g. Le temps d'équilibration est suivi pendant 5 minutes pour permettre à l'organe de s'adapter aux conditions de l'expérience. La solution de Krebs est renouvelée toutes les cinq minutes.

2.4.3.3. Test de l'extrait à différentes concentrations

L'extrait a été testé avec les concentrations de 1mg.ml^{-1} et 3mg.ml^{-1} . Il est incubé pendant 10min afin de le mettre en contact avec l'organe.

2.4.4. Activité anti-inflammatoire

La méthode de l'œdème de la patte de rat induite par la carraghénine a été utilisée pour cette évaluation *in vivo* [15].

Les rats ont été répartis en 6 lots de 3, pesés et mis à jeun pendant 12 heures avant la manipulation. Pour chaque rat, le volume initial (V0) de la patte postérieure droite a été mesuré avec un pied à coulisse digitale avant l'administration des extraits pour la dose de 300mg.kg⁻¹.

- Lot 1 (témoin négatif) : les animaux ont reçu de l'eau distillée,
- Lot 2 (témoin positif) : les animaux ont reçu la solution de Diclofénac à la dose de 25mg.kg⁻¹
- Lot 3 : les animaux ont reçu la solution de l'extrait hexanique (ESHex).
- Lot 4 : les animaux ont reçu la solution de l'extrait acétate d'éthyle (ESAc).
- Lot 5 : les animaux ont reçu la solution de l'extrait butanolique (ESBu).
- Lot 6 : les animaux ont reçu la solution de l'extrait butanolique détanifié (ESBuF).

Après 30min de l'administration orale des extraits en solution, chaque rat a reçu une injection de 100µl de carraghénine de 1% sous le coussinet plantaire de la patte postérieure droite. Les volumes de la patte ont été mesurés toutes les 30min de T₀ à T₅ (0min, 30min, 60min, 90min, 120min, 180min). La formule suivante a été utilisée pour la détermination moyenne du pourcentage d'augmentation (%AUG) du volume de la patte :

$$\%AUG = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

V_t : volume de la patte au temps t

V₀ : volume initial de la patte

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème selon la formule :

$$\%INH = \frac{\%AUG(\text{témoin}) - \%AUG(\text{traité})}{\%AUG(\text{témoin})} \times 100$$

2.5.5. Activité analgésique

La méthode d'injection de l'acide acétique par le test de Writhing a été utilisée, elle est basée sur celle décrite par Koster et *al.*, modifiée par Collier et *al.* [16] [17]. Ce test consiste à injecter de l'acide acétique par voie intra-péritonéale (IP) chez les souris. L'acide acétique provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractérisées par du mouvement d'étirement des pattes postérieurs et du muscle dorso-ventral de l'animal.

Avant le test, les souris ont été mis à jeun pendant 16h. Elles ont été réparties en 4 lots de 3 animaux dont un témoin, un lot traité avec l'extrait Acétate d'éthyle (ESAc), un autre avec l'extrait butanolique (ESBu) et le dernier traité avec l'extrait butanolique détanifié (ESBuF).

Dilués avec du DMSO, les extraits de concentration à 300mg.kg⁻¹ ont été injectés par IP et du sérum physiologique (NaCl 9‰) est injecté aux animaux du lot témoin. L'injection par IP de l'acide acétique 1,2% a été faite après 30min de celles des extraits. Dix minutes après l'injection de l'acide, les contorsions ont été comptées et ceci s'est effectué pendant une période de 10min.

L'activité analgésique de la plante a été évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition des contorsions selon la formule :

$$\%inhibition = \frac{\text{nombre moyen de contorsion témoin} - \text{nombre moyen de contorsion traité}}{\text{nombre moyen de contorsion témoin}} \times 100$$

2.4.6. Activité antidiarrhéique

L'induction de la diarrhée a été effectuée par administration d'huile de ricin [18] [19] [20].

Des souris Swiss (32g - 40g) ont été utilisés pour cette étude. Tous les animaux ont été logés et maintenus dans une animalerie normalisée en vertu des conditions normales de température (24 ± 2°C), l'humidité relative, et de 12h de Cycle lumière/obscurité.

Cinq groupes d'animaux ont été mis à jeun pendant 18h. Le premier groupe a servi de témoin et a reçu de l'eau distillée. Le second groupe a eu le médicament standard, l'Immodium (10mg.kg⁻¹). Le troisième, le quatrième et le cinquième groupe ont reçu respectivement les extraits acétate d'éthyle (ESAc), butanolique (ESBu) et butanolique détanifié (ESBuF) à la dose de 250mg.kg⁻¹. Les animaux de chaque groupe ont reçu 0,3ml d'huile de ricin par voie orale.

Chaque extrait a été solubilisé dans du DMSO (400µl) puis mélangé avec à 1600µl d'eau distillée pour avoir 1ml de solution. Trente minutes après administration de l'huile, les extraits en solution ont été administrés à titre de 0,25ml par animal. Après 30min, 0,25ml du repas coloré composé du charbon actif, gomme arabic et de l'eau distillée a été administré. Enfin, pour l'évaluation de l'activité du péristaltisme intestinal, chaque animal a été sacrifié pour mesurer la fréquence des matières fécales après 30min. Cette mesure est marquée par le déplacement du repas coloré dans la lumière de l'intestin.

Le pourcentage d'inhibition de la défécation est calculé selon la formule :

$$\% \text{ inhibition de la défécation} = \frac{\text{Longueur totale du témoin} - \text{longueur de traité de l'extrait}}{\text{Longueur totale du témoin}} \times 100$$

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique sur l'extrait éthanolique (ESEtOH) a révélé la présence de stéroïdes, de flavonoïdes du type flavonol, de tanin condensé et de polyphénol.

3.2. Extraction

L'extraction par la macération de la poudre de plante dans l'éthanol suivie d'un partage liquide -liquide de la solution aqueuse de l'extrait éthanolique avec l'hexane, l'extraction acétate d'éthyle, butanolique ainsi que la détanification de l'extrait butanolique précédemment décrite a donné les résultats présentés dans le tableau 2.

Tableau 1 Masses des extraits selon le mode d'extraction

Extrait	ESEtOH	ESHex	ESAc	ESBu	ESBuF	ESAc
Masse (g)	56	20,56	8,70	4,5	0,802	7,15

3.3. Activités biologiques

3.3.1. Activité antifongique

Un test d'activité antifongique avec le fluconazole (témoin de référence), un antimycosique bistriazolé à usage systémique indiqué surtout dans le traitement de candidoses vaginales et périnéales aiguës et récidivantes a été effectué en premier lieu afin de valider le protocole expérimental et de standardiser la taille de la suspension de germe-test utilisée à chaque essai. L'évaluation de l'activité antifongique du fluconazole contre *Candida albicans* par la méthode de microdilution en milieu liquide a conduit à une valeur de la CMI inférieure à 1,16µg.ml⁻¹. L'activité antifongique des 5 extraits évaluée *in vitro* sur *Candida albicans* sous forme hyphale par la méthode de microdilution, utilisant le milieu SLGG comme milieu de culture est résumée dans le tableau 3.

Tableau 2 Evaluation in vitro des extraits sur *Candida albicans*

Extrait	ESEtOH	ESHex	ESAc	ESBu	ESBuF	ESAc
CMI (µg.ml ⁻¹)	1000	< 2	500	< 2	4	< 2

A la lecture des résultats obtenus, ESEtOH et ESEtOH qui contiennent des composés moyennement polaires sont dotés d'activité antifongique faible.

L'extrait ESHex apolaire ou peu polaire puis ESBu et ESAq polaires présentant chacun une CMI $<2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et ESBuF une CMI égale à $4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ sont très actifs contre *C.albicans*. Les métabolites secondaires responsables de l'activité antifongique prometteuse d'*Abrahamia suarezensis* sont donc de différentes polarités.

3.2.2. Activité antiplasmodiale

Le test préliminaire *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* des cinq extraits issus de l'extraction des rameaux feuillés a donné les résultats résumés dans le tableau 4 :

Tableau 3. Evaluation *in vitro* des extraits sur *Plasmodium falciparum*

Extrait	ESEtOH	ESHex	ESAc	ESBu	ESBuF	ESAq
CI ₅₀ ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	9,91	14,11	2,75	15,82	4,39	2,86

Au vu de ces résultats, ESHex apolaire ou peu polaire et ESBu polaire sont dotés d'une activité antiplasmodiale modérée sur *P.falciparum*. L'extrait à l'acétate d'éthyle ESBu (IC₅₀= $2,75 \mu\text{g.ml}^{-1}$) contenant des composés moyennement polaires et ESBuF (IC₅₀= $2,86 \mu\text{g.ml}^{-1}$) polaire, ESAq (IC₅₀= $2,86 \mu\text{g.ml}^{-1}$) très polaire présentent une activité forte sur *P.falciparum*.

Les six extraits testés sont actifs *in vitro* sur *P. falciparum* le germe-test et les principes actifs seraient de différentes polarités.

3.2.3. Activité antianaphylactique

Ayant une propriété antihistaminique intéressante avec un pourcentage d'inhibition à 96% [6], l'extrait acétate d'éthyle ESBu a été soumis à un test antianaphylactique selon la méthode de Schultz- Dale. Les résultats sont illustrés sur la figure 1.

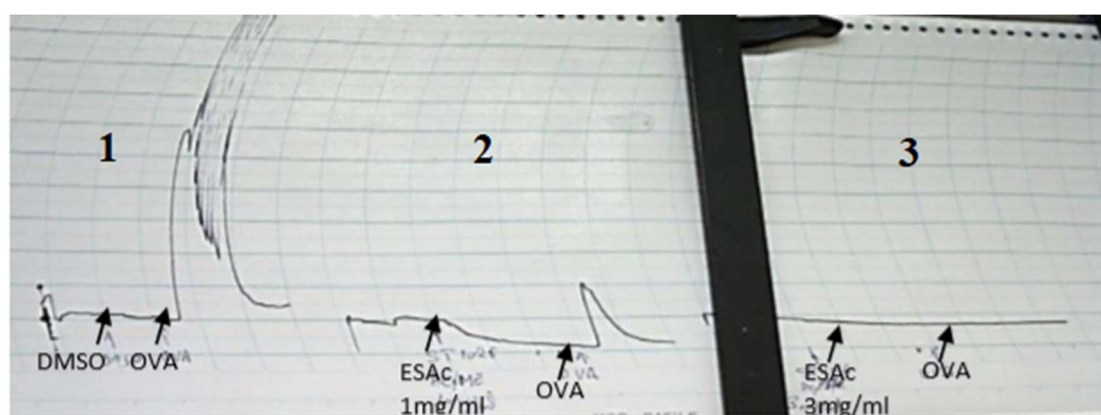


Fig. 1. Enregistrement sur papier des diagrammes du test antianaphylactique

Stimulées par l'injection de l'ovalbumine, des contractions sont observées juste après montrant que l'organe répond bien aux stimulations de l'ovalbumine (courbe 1).

L'extrait à tester est administré en premier lieu et après 10min de contact, l'OVA est injectée. L'effet de l'extrait a été observé pendant 10min.

Les courbes 2 et 3 montrent l'effet de l'extrait ESBu solubilisé dans 50 μl de DMSO sur la contraction de l'iléon isolé de cobaye sensibilisé par l'antigène de sensibilisation.

A la concentration de 1mg.ml^{-1} , ESBu a entraîné un relâchement de l'organe. Après injection de l'OVA, une inhibition partielle de la contraction induite est observée en présence de l'extrait ESBu.

La hauteur de la courbe de contraction du témoin est de 70mm alors que celle de la contraction en présence de l'ESBu est de 19mm correspondant à environ 80% d'inhibition.

Avec la concentration à 3mg.ml^{-1} de ESBu, l'extrait a entraîné une inhibition totale de la contraction induite par injection de l'OVA traduisant un effet antianaphylactique.

3.2.4. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits a été déterminée sur l'œdème inflammatoire aigue de la patte de rat, provoqué par l'injection d'une solution de carraghénine à 1% dans l'aponévrose de la plante du pied du rat. Le suivi de l'évolution de l'œdème s'est fait par la mesure des pattes toutes les 30min après l'injection.

Les résultats obtenus résumés dans le tableau 4 ont été comparés à ceux du Diclofénac, un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien.

Tableau 4. Pourcentage d'augmentation de l'œdème

Lot	Extrait	T0	T1	T2	T3	T4	T5
1	Carraghénine 1%	0	27,044	61,006	83,753	104,298	99,79
2	Diclo (25mg.kg ⁻¹)	0	2,124	2,811	3,186	3,998	5,871
3	ESHex (300mg.kg ⁻¹)	0	27,212	38,989	62,275	79,574	80,772
4	ESAc (300mg.kg ⁻¹)	0	24,645	26,847	51,136	67,614	81,747
5	ESBu (300mg.kg ⁻¹)	0	20,309	20,847	28,178	33,894	44,385
6	ESBuF (300mg.kg ⁻¹)	0	9,621	10,49	32,464	43,389	46,803

Chez le lot témoin négatif (lot 1), l'injection de la carraghénine entraine un œdème avec un pourcentage d'augmentation de volume de la première 30 mn à la quatrième 30min qui va de 27,044 à 104,298 (T1 à T4). Selon ces données, le volume maximal est atteint en deux heures.

Chez le lot témoin positif (lot 2) et les extraits ESAC (lot 4), ESBu (lot 5), ESBuF (lot 6), l'augmentation de volume est moins importante sauf pour l'extrait ESHex (lot 3) qui ne diffère que peu de la valeur du témoin négatif. Les extraits présentent un effet différencié sur l'œdème provoqué par la carraghénine. La figure 2 montre les pourcentages d'inhibition de l'œdème par le Diclofénac et les extraits.

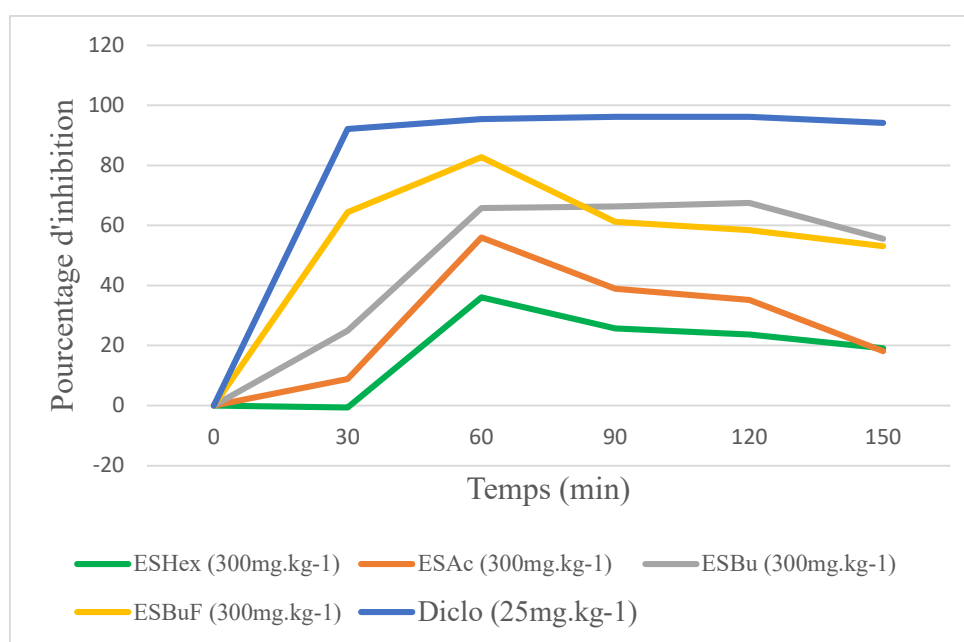


Fig. 2. Variation de l'inhibition de l'œdème par les extraits et le témoin en fonction du temps.

Dès les 30 premières minutes, le Diclofénac et l'ESBuF ont causé un pourcentage d'inhibition important respectivement de 92,15 et 64,423%. Les extraits ESHex, ESAC, ESBu inhibent progressivement l'œdème et les pourcentages d'inhibition sont respectivement de 36,091 ; 55,994 et 65,828% à la soixantième minute à partir de laquelle les effets inhibiteurs des extraits

diminuent de façon continue sauf ceux du témoin positif et de ESBu. Pour ces derniers ils commencent à baisser progressivement aux cent vingtièmes minutes.

Les extraits de la plante présentent chacun une activité anti-inflammatoire sauf l'ESHex. L'extrait butanolique détannifié (ESBuF) est le plus actif suivi de l'extrait butanolique (ESBu). L'extrait acétate d'éthyle (ESAc) présente une activité modérée.

Les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes responsables des inflammations, et aussi moduler l'adhésion des monocytes [21]. Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) [22]. De plus, le flavonol présente un effet anti-inflammatoire par la réduction de divers cytokine inflammatoire en réduisant l'extravasation des leucocytes [23].

La présence des composés phénoliques révélée par le criblage phytochimique notamment des flavonoïdes du type flavonol pourraient être à l'origine de cette activité surtout pour l'ESBuF enrichi en flavonoïdes après détannification.

3.2.5. Activité analgésique

L'activité analgésique a été évaluée par l'effet inhibiteur de la douleur aiguë par des extraits de la plante à une concentration de 300mg.kg⁻¹. Le test de Writhing [17] consiste à évaluer le pourcentage d'inhibition des contorsions abdominales des souris induites par l'injection de l'acide acétique à 1,2%. Les contorsions sont dues à la transmission des messages douloureux liés à la production et à la libération locale des substances algogènes (histamine, sérotonine, prostaglandine, etc) [24] [25].

L'injection des extraits ESBuF et ESBu ont provoqué une inhibition totale (100%), aucune contorsion n'a été observée sur les souris. Par contre, l'ESBu n'a montré aucune inhibition sur les animaux.

Les extraits ESBuF et ESBu présentent une capacité inhibitrice de la production et de la libération des substances algogènes, cette capacité pourrait être due probablement à la présence des flavonoïdes dont certains ont montré des propriétés anti-inflammatoires en inhibant l'activité des enzymes responsables des inflammations [21]. Les flavones et les flavonols comme la quercétine, la kaempférol, et la myrecétine ont une capacité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) et par conséquent la synthèse des prostaglandines n'a pas eu lieu [22] [26].

3.2.6. Activité anti diarrhéique

L'huile de ricin contenant de l'acide ricinoléique, un agent qui irrite la muqueuse intestinale [27], a été utilisé en vue de provoquer la diarrhée chez les souris. Cette irritation modifie le mécanisme de réabsorption hydro-électrolyte intestinale, en faveur de la sécrétion, à l'origine de la diarrhée sécrétoire [28].

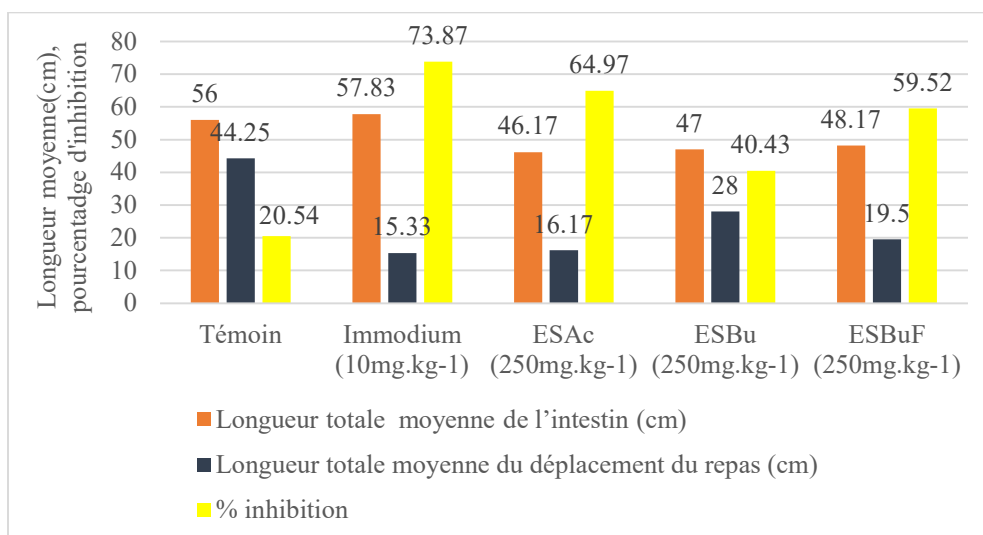


Fig 3. Effet antidiarrhéique des extraits

Au vu de l'histogramme sur la figure 3, les extraits réduisent la diarrhée chez les souris à la dose de 250mg.kg⁻¹. Il y a une diminution de l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale induite par l'huile de ricin. La distance parcourue par le repas est inversement proportionnelle à l'efficacité des extraits. Ces derniers augmenteraient la réabsorption des électrolytes et de l'eau au niveau de la paroi intestinale ou diminueraient leur sécrétion. ESAC (64,87% d'inhibition) présentent la meilleure activité antidiarrhéique et vient ensuite l'extrait ESBuF (59,52% d'inhibition) enrichi en flavonoïdes.

Le screening phytochimique a révélé la présence des tanins dans la plante, leur propriété astringente modifie la perméabilité de la muqueuse intestinale, et empêche ainsi la sortie d'eau et d'électrolytes, ce qui réduit le péristaltisme et le volume du fluide dans la lumière intestinale des animaux traités [29].

L'extrait ESBuF a engendré une inhibition de 59,52% supérieures à celle de ESBu (40,43%). Des composés appartenant à des classe(s) de métabolite(s) secondaire(s), autres que les tanins, présents dans ces extraits pourraient posséder une activité anti-diarrhéique.

Les flavonoïdes présents dans la plante empêchent la sécrétion intestinale provoquée par l'irritation induite par l'acide ricinoléique, un constituant chimique de l'huile de ricin, en inhibant la synthèse des prostaglandines [30] [22]. Du fait de la non libération de prostaglandine, la réaction inflammatoire provoquée par l'acide ricinoléique de l'huile de ricin diminue entraînant ainsi la réduction de l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau de la paroi intestinale.

IV. CONCLUSION

L'étude biologique d'*Abrahamia suarezensis* rentre dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles endémiques de Madagascar. Le criblage phytochimique mené sur l'extrait éthanolique des rameaux feuillés de cette plante a révélé, la présence de flavonoïdes et de tanins condensés. Le criblage biologique entrepris a montré que les extraits à l'acétate d'éthyle ESAC, butanolique ESBu et butanolique détannifié ESBuF présentent un certain nombre d'activités biologiques intéressantes : antifongique et antiplasmodiale, antianaphylactique, anti-inflammatoire, analgésique et antidiarrhéique. Une étude phytochimique bioguidée sur les extraits ESAC, ESBu et ESBuF sera entrepris afin d'isoler et d'identifier les composés actifs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Centre National d'Application de Recherches Pharmaceutiques (CNARP) de Madagascar pour son accueil ainsi que pour le financement qui a permis la réalisation de ces travaux.

REFERENCES

- [1]. **Larsonn J., Gottfries J., Bohiin L., Backlund A., (2005).** Expanding the ChemGPS chemical space with natural products, *Journal of Natural Products*, 68, 985-991.
- [2]. **Cutler S.J., Cutler H.G., (2000).** Biologically active natural products: Pharmaceuticals. CRC Press, New-York, 277.
- [3]. **Boiteau P., Allorge-Boiteau L., (1993).** Plantes médicinales de Madagascar // www.ethnopharmacologia.org/bibliotheque-ethnopharmacologie/plantes_medicinalesdeMadagascar/.
- [4]. **Allorge-Boiteau L., (2008).** Plantes de Madagascar. Atlas. Edition, 322-01.
- [5]. **Rafidison V., Ratsimandresy F., Rakotondrafara A., Rakotondrajaona R., Rasamison V., Rakotoarisoa F.M., Rakotonandrasana S.R., (2019).** Synthèse et analyse des données sur les inventaires de plantes médicinales de Madagascar. *Ethnobotany Research and Application* dx.doi.org/10.32859/era.18.40.1-19.
- [6]. **Raharilavitra A., Andriamamonjisoa D., Rasolofomanana R.J., Randriamboangiarivonisoa M.C., Rakotonandrasana S.R., Rakotoarison O., Rabesiaka L., Andrianjakaniaina M., Ravelonjato B.A., (2023).** Flavonoïde d'*Abrahamia Suarezensis* Randrian. & Lowry (Anacardiaceae). *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*. 37 (1),589-597.
- [7]. **Fong H.H.S., Tin-wa M., Farnsworth N.R., (1977).** Phytochemical screening. Rev. College of pharmacy, University of Illinois, Chicago (USA), 275 –277.

- [8]. Saucier C., Mirabel M., Daviaud F., Longieras A., and Glories Y., (2001). Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (12), 5732-5735.
- [9]. Rex J.H., Barbara D., Alexander D., Andes, Beth A.S., Steven D.B., Vishni C., Mahmoud A.G., Ana E.I.G., Cynthia C., Knapp, Luis O.Z., Michael A., Pfaller, Daniel 53J., Sheehan, Thomas J.W., (2008). CLSI Reference Method for Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; approved. Standard-third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. USA, 19087-1898.
- [10]. Trager W., Jensen J.B., (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673-675.
- [11]. Bennett N., Paguio M., Gligorijevic B., Seudieu C., Kosar A.D., Davidson E., Roepe P.D., (2004). Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 48 (5), 1807-1810.
- [12]. Laekeman G.M., Herman A.G., (1979). The Shultz-Dale reaction of the Guinea pig Ileum: Influence by β -Adrenoceptor Agonists and Theophylline; 9 (4), 358-359.
- [13]. Mitchell R.W., Antonissen L.A., Kepron W., Kroegerea et Stephens N.L., (1986). Effet de l'atropine sur l'hyperréactivité de l'herbe à poux canine muscle lisse de la trachée. *J Pharmacol Exp Ther* 236, 803-809.
- [14]. Lichtenstein L.M., (1973). The control of IgE-mediated histamine release: Implications for the Study of Asthma. In: Austen K.F., Lichtenstein L.M., editors. *Asthma: Physiology, Immunopharmacology and Treatment*; New-York: Academic Press, 91-110.
- [15]. Winter C.A, Risley F.A, Nuss G., (1962). Carragenin induced oedema in hand paw of the rat as assays anti-inflammatory drugs. *Pro. Soc. Exo. Biol. Med.*, 111 (62), 544-547.
- [16]. Koster R., Anderson M., De Beer J., (1959). Acetic acid for analgesic screening, Federal Proceeding 8, 412-417.
- [17]. Collier H.O.J, Dinneen, Jonhson C.A., Scheider C., (1968). The abdominal contraction response and its suppression by antinociceptive drugs in the mouse. *British J. Pharmacol. Chemother*, 32, 295-310.
- [18]. Awouters F., Niemegeers C.J.E., Lenaerts F.M., Janseen P.A.J., (1978). Delay of castor oil diarrhea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostagandin biosynthesis. *Journal of Pharmacol*, 30, 41-45.
- [19]. Shoba F.G., Thomas M., (2001). Study of antidiarrheal activity of four medicinal plants in castor oil-induced diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 73-76.
- [20]. Méité S., N'guessan J.D., Bahi C., Yapi H.F., Djaman A.J., Guédé Guina F., (2009). Antidiarrheal activity of the ethyl acetate extract of *Morinda morindoides* in rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 2001-2007.
- [21]. González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M.J., (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrition hospitalaria*, 22 (3), 287-293.
- [22]. Tapas A.R., Sakarkar D.M. et Kakde R.B., (2008). Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research*, 7 (3), 1089-1099.
- [23]. Li Y., Yao J., Han C., Chaudhry M.T, Wang S., Yin Y., (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Review Nutrients*, 8, 1-14.
- [24]. Bruno Brochet (2005). Bases neurophysiologiques et évaluation d'une douleur aiguë et chronique. *La revue du praticien* 55, 2181-2188.
- [25]. Yohannes T., Teshome N., Ephrem E., (2017). Analgesic and anti-inflammatory activities of 80% methanol root extract of *Jasminum abyssinicum* Hochst. ex. DC. (Oleaceae) in mice. *J Ethnopharmacol*; 8741 (16):31812–31818.
- [26]. Alaoui K., Lagorce J.F., Cherrah Y., Hassar M., Amarouch H., Roquebert J., (1998). Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*, in : *Annales pharmaceutiques françaises*. 220-228.
- [27]. Ukwuani A.N., Salihi S., Anyanwu F.C., Yanah Y.M., Samuel R., (2012). Antidiarrheal activity of aqueous leaves extract of *Vitex doniana*. *Int.J.Pharm. Res.*, 8 (3), 231-237.

-
- [28]. **Helmut V.A., Paul J.T., Sidney F.P., (1972).** Effect of oleic and ricinoleic acids on net jejuna water and electrolyte moment perfusion studies in man. *J. Clin. Invest.*, **53**, 374 - 379.
- [29]. **Ashok P.K., Upadhyaya, (2012).** Tannins are astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1 **(3)**, 45-50.
- [30]. **Venkatesan N., Vadivu T., Sathiya N., Arokya A., Sundarajan R., Sengodan G., Vijaya K., Thandavarayan R., (2005).** Antidiarrheal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. *J. Pharm. Sci.*, **8** : 39 - 45.