

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE ET ANTIHISTAMINIQUE DE L'EXTRAIT ÉTHANOLIQUE DE *LYGODIUM LANCEOLATUM* DESV. (LYGODIACEES) / EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIHISTAMINIC ACTIVITIES OF THE *LYGODIUM LANCEOLATUM* DESV (LYGODIACEAE) ETHANOL EXTRACT

RAZAFIN-DRABAZO F^{1,2,*}, RAZAFINDRAKOTO Z¹, RANDRIANIRINA M J¹,
RAMAHANITRAHASIMBOLA D^{1,3}, RAJAONARISON J F², ANDRIANJARA C¹

1 : Laboratoire de Pharmacognosie Appliquée, Institut Malgache des Recherches Appliquées (IMRA), Fondation Suzanne et Albert Rakoto-Ratsimamanga, Avarabohitra, Antananarivo ;

2 : Laboratoire de Recherche en Biotechnologie, Environnement et Santé (LRBES), Ecole Doctorale "Génie du Vivant et de Modélisation (EDGVM)", Faculté des Sciences, de Technologies et de l'Environnement (FSTE), Université de Mahajanga.

3 : Mention Pharmacie, Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo

Auteur correspondant : RAZAFIN-DRABAZO Floréane: razafy_flo@yahoo.fr

Tel : +261 32 04 800 39),

Résumé

Lygodium lanceolatum Desv (Lygodiaceae), connu sous le nom vernaculaire *karakarantoloha*, *famahatrakangabe*, *kidito*, est une fougère rampante endémique de Madagascar et des Comores. L'infusion de sa partie aérienne est largement utilisée dans la médecine traditionnelle Malgache pour soulager les symptômes allergiques et en particulier la crise d'asthme. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique et sa crise pourrait être provoquée par des phénomènes allergiques. Pour ces raisons, nous avons mené cette étude qui vise à évaluer *in vivo*, l'effet anti-inflammatoire de son extrait brut éthanolique, et *in vitro*, son activité antihistaminique sur la bronchoconstriction provoquée par ce médiateur aminé libéré par les mastocytes activés lors d'une réaction allergique. D'une part, l'extrait brut obtenu par macération éthanolique de la poudre de la partie aérienne de cette plante, à la dose de 200 mg/kg administré par voie orale, réduit de manière temps-dépendante l'œdème inflammatoire de la patte induit par la carragénine à 2% chez la souris. La réduction est de $55,17 \pm 12\%$ à la 60^{ème} minute et de $81,33 \pm 9\%$ à la 120^{ème} minute. D'autre part, il inhibe aussi de manière non compétitive, l'activité broncho-constrictrice de l'histamine sur la trachée isolée de cobaye. À la concentration de 125 µg/ml, il peut réduire jusqu'à 40% l'effet maximal de l'histamine. La fraction butanolique obtenue par partages liquide-liquide successifs à polarité croissante effectués sur l'extrait brut éthanolique est deux fois plus active que ce dernier. A la concentration de 62,5 µg/ml, elle réduit à 45% l'effet maximal de l'histamine. Le ou les principe(s) bioactif(s) responsable(s) de cet effet inhibiteur pourrait (aient) donc une ou des molécule(s) polaire(s) soluble(s) dans le butanol. Ces résultats préliminaires pourraient expliquer, du moins en partie, sa vertu antiasthmatisque exploitée empiriquement dans la médecine traditionnelle Malgache.

Mots clés : *Lygodium lanceolatum*, asthme, antihistaminique, anti-inflammatoire.

Abstract

Lygodium lanceolatum Desv (Lygodiaceae), commonly known as «*karakarantoloha*, *famahatrakangabe*, *kidito*», is a crawling fern endemic to Madagascar and Comoros. The infusion of its aerial part is widely used in Malagasy traditional medicine to alleviate allergic symptoms and specifically asthma crisis. Asthma is a chronic inflammatory disease and its crisis could be provoked by allergic phenomena. For these reasons, we have conducted this study which aims to evaluate, *in vivo*, the anti-inflammatory effect of its ethanol extract and, *in*

vitro, its anti-histaminic activity on the bronchoconstriction provoked by this amine factor largely released by activated mastocytes during allergic phenomena. On the one hand, the crude extract obtained by the ethanol maceration of the aerial part powder of this plant can reduce, in time-dependent manner, the carrageenan-induced edema of the hind paw in mice at the dose of 200 mg/Kg administrated orally. The reduction can reach to $55.17 \pm 12\%$ at the 60th min and to $81.33 \pm 9\%$ at the 120th min. On the other hand, the same extract also, inhibits non-competitively, the contracting activity of the histamine in isolated guinea pig trachea. At the concentration 125 µg/ml, it can reduce to 40% the histamine maximal contracting effect. The butanol fraction, obtained from successive liquid-liquid partitions by solvents in increasing polarity realized on the ethanol crude extract, is two time more potent than the crude extract. Effectively, at the concentration 62.5 µg/ml, it can reduce to 45% the histamine maximal broncho-contracting effect. It suggests that the bioactive compound(s) responsible(s) of this inhibitory activity could be polar molecule(s) soluble(s) in butanol. All of these preliminary results could explain, at least partly, its anti-asthmatic virtue in Malagasy traditional medicinal.

Key words: *Lygodium lanceolatum*, asthma, antihistaminic activity, anti-inflammatory effect.

Introduction

Madagascar est connu par sa richesse en biodiversité avec une flore et une faune exceptionnelle. Cette biodiversité est pourtant constamment menacée par les impacts du changement climatique et la forte pression anthropique. La grande île compte plus de 12 000 espèces de plantes dont 80% sont endémiques (Goodman, 2008). C'est un paradis de plantes médicinales et les remèdes naturels ont toujours été la principale méthode thérapeutique adoptée par les malgaches. Parmi ces plantes, *Lygodium lanceolatum* Desv appelé localement *karakarantoloha*, *famahatrakangabe*, *kidito* a été choisi pour faire l'objet de cette étude. C'est une fougère rampante endémique de Madagascar et des Comores. L'infusion de sa partie aérienne est utilisée dans la médecine traditionnelle malgache pour soulager diverses maladies comme l'hypertension artérielle, l'ulcère gastrique, la fatigue musculaire, et les symptômes allergiques en particulier la crise d'asthme.

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique dont la crise, généralement induite par des phénomènes allergiques, peut être mortelle si la prise en

charge rapide par des broncho-dilatateurs n'est pas adéquate. Il constitue un problème majeur de santé publique dans le monde entier. La prévalence mondiale de l'asthme ne cesse d'augmenter ces dernières années. Actuellement, on estime qu'environ 300 millions de la population mondiale souffrent de l'asthme (Wolff, 2012). A Madagascar, il touche plus de 12% des malgaches (Mehdi, 2008). La prise en charge de l'asthme est basée sur un traitement de soulagement par des broncho-dilatateurs et un traitement de fond à visée anti-inflammatoire (Rabe, 2001). Face à cela, cette étude consiste à évaluer l'activité antiasthmatique de *Lygodium lanceolatum* Desv.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

La partie aérienne de *Lygodium lanceolatum* a été récoltée à Mandraka, situé à 65 Km à l'Est d'Antananarivo au mois de février 2016. Elle a été ensuite séchée à l'ombre puis broyée.

Etudes Phytochimiques

Préparation des extraits et fractions

L'extraction des métabolites secondaires de la poudre de *Lygodium lanceolatum* a été faite par macération dans l'éthanol 94° pendant 24 h. Le jus obtenu a ensuite été filtré sur papier Joseph puis divisé en trois parties. La première partie a été tout de suite évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite, à 40° C, pour avoir l'extrait brut éthanolique codé EBFEV26. La deuxième partie a été filtrée à travers une couche de polyamide pour enlever les polyphénols puis évaporée pour avoir l'extrait dénommé EBFEV26-ST. Et La troisième partie a été fractionnée par chromatographies de partage liquide-liquide successives entre l'eau distillée et un solvant de polarité croissante (dichlorométhane puis acétate d'éthyle et en fin, butanol). Après forte agitation du mélange pendant 5 min et décantation de 15 min, les fractions ont été séparées et évaporées. Les extraits et les fractions ont été conservés à 4° C avant leur utilisation.

Criblage phytochimique

Cette partie de l'étude a pour objectif de détecter les grandes familles chimiques présentes dans la plante. Pour cela, deux méthodes ont été utilisées, celle de Fong et ses collaborateurs (1977), dont le principe est basé sur l'utilisation des réactifs spécifiques conduisant à la formation d'un complexe insoluble sous forme de précipité ou d'un complexe soluble coloré et celle de Wagner et ses collaborateurs (1984) qui est basée sur l'observation des spots sur CCM (Chromatographie sur Couche Mince) sous UV à 365 et à 254 nm après révélation ou non.

Etudes pharmacologiques

Matériels animaux

Des souris femelles, de race OF1, de poids variant entre 20 et 25 g ont été utilisées pour les tests *in vivo*. Ces animaux ont été élevés dans l'animalerie de l'IMRA (Institut Malgache de Recherches Appliquées). Leur nourriture est constituée exclusivement par la provende NFL sous forme des petits granules. Pour les tests *in vitro*, des cochons d'Inde, de sexe mâle ou femelle, pesant entre 250 à 300 g, vendus auprès des éleveurs locaux, ont été utilisés. Ils ont été conditionnés à l'animalerie de l'IMRA pendant au moins une semaine avant leur utilisation.

Tests pharmacologiques

Étude de l'activité antihistaminique

La trachée isolée de cochon d'Inde a été utilisée pour l'étude *in vitro* de l'effet des extraits végétaux sur l'activité broncho-constrictrice de l'histamine. L'organe a été prélevé, nettoyé, découpé en anneaux de 2 à 3 mm de longueur puis monté dans une cuve à organe isolé contenant de la solution de Krebs-Henseleit aérée en permanence au carbogène (95% d'O₂ et 5% de CO₂) et maintenue à 37°C. La composition de cette solution de survie préparée dans de l'eau distillée est (en mM) : NaCl : 120 ; NaHCO₃ : 25 ; KCl : 4,72 ; CaCl₂ : 2,5 ; MgSO₄ : 0,5 ; KH₂PO₄ : 1,2 et D-glucose : 11. L'organe a été suspendu sous une tension initiale de 1,5 g. Après montage, l'organe a été laissé s'adapter et s'équilibrer avec les conditions de l'expérimentation pendant 90 min. Pendant ce temps d'équilibration, des lavages qui consistent au renouvellement de la solution de survie, ont

été effectués toutes les 20 min. A la fin de l'équilibration, l'organe a été sensibilisé avec 10^{-5} M d'histamine. La solution a ensuite été renouvelée deux fois pour laver l'excès d'histamine, puis l'organe a été laissé au repos jusqu'au retour progressif de sa tension à son niveau initial. Ce temps de repos a été entrecoupé de renouvellement du milieu de survie toutes les 15 min. La réponse de l'organe aux stimulations pharmacologiques est traduite par des modifications de la force de tension qui sont captées par un transducteur isométrique de marque Ugobasile, amplifiées et enregistrées (Duxco).

Dans l'objectif d'étudier l'effet des extraits et des fractions sur l'activité de broncho-constrictrice de l'histamine, des concentrations croissantes et cumulatives de cet agoniste (10^{-9} à 2×10^{-2} M) ont été testées en absence (témoin) ou en présence de différentes concentrations de l'extrait ou de la fraction. Pour cela, l'extrait végétal (0,250 ou 0,125 mg/ml) ou la fraction (0,062 ou 0,125 mg/ml) a été incubé dans la cuve à organe pendant 10 min et sans lavage et les différentes concentrations d'histamine ont été testées de manière cumulative. Dans ces conditions (avec ou sans l'extrait ou fraction), la concentration qui provoque 50% de l'effet contracturant maximal de l'histamine (CE_{50}) et son effet maximal ont été calculés.

Étude de l'activité anti-inflammatoire

Cette étude consiste à évaluer la capacité de l'extrait de la plante à inhiber l'œdème inflammatoire induit par la carragénine selon la méthode de Winter et ses collaborateurs (1962). L'inflammation chimique a été provoquée par l'injection de 100 μ l de carragénine à 2% préparée dans la solution

physiologique NaCl à 0,09% sur la route plantaire de la patte postérieure droite de souris. Les animaux, mis à jeun depuis 18 h, ont été répartis en 4 lots contenant chacun 5 souris. Les souris du 2^e et du 3^e lot ont été traitées respectivement avec 100 et 200 mg/kg d'EBFEV26. Celles du 4^e lot ont reçu de l'indométacine à la dose de 8 mg/kg. Tandis que les animaux du 1^{er} lot qui a servi de témoin n'ont reçu que de l'eau distillée qui est le véhicule utilisé pour la préparation des produits testés. Toutes ces administrations ont été réalisées par gavage à raison de 0,25 ml/souris, 1 h avant l'injection de la carragénine. Le volume de la patte enflammée a été mesuré avant et juste après l'injection de carragénine, puis 30, 60, 120 et 180 minutes à l'aide d'un pléthysmomètre de marque Ugobasile. Le pourcentage de l'inhibition de l'œdème de la patte a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(P_o - P_t)}{P_o} \times 100$$

Avec :

P_o : pourcentage d'augmentation du volume de la patte des souris du lot témoin

P_t : pourcentage d'augmentation du volume de la patte des souris du lot traité

Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous forme des moyennes \pm erreurs standards à la moyenne (esm). Les analyses statistiques ont été effectuées au moyen du test de Student qui consiste à comparer les moyennes des lots traités à l'extrait ou au produit de référence avec celle du lot témoin. Pour des valeurs de $p < 0,05$ (*), la différence est considérée comme statistiquement significative, à $p < 0,01$ (**), hautement significative et à $p < 0,001$ (***), très hautement significative (Rahmani, 2016).

Résultats et discussion

Criblage phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique effectué sur EBFEV26 ont montré qu'il est riche en familles moléculaires polaires comme les tanins condensés et les polysaccharides, tandis que les saponines et les Leucoanthocyanes sont en moyenne proportion. En revanche, les flavonoïdes sont à l'état de trace. Les autres familles apolaires comme les alcaloïdes, les terpènes ou les stéroïdes sont soit absentes, soit à une teneur indétectable par méthode utilisée.

Test pharmacologique

Activité antihistaminique

Les effets des extraits ou des fractions vis-à-vis de l'activité contracturante de l'histamine sur la trachée isolée de cochon d'Inde sont illustrés par les figures 1 et 2. Ces résultats indiquent que le produit testé inhibe, de manière non-compétitive, l'activité bronchoconstrictrice de l'histamine. En effet, à une concentration de 0,125 mg/ml, il inhibe à 38,94% l'effet maximal contracturant de l'histamine et à 0,25 mg/ml, l'inhibition est de 47,94%. Parmi les fractions obtenues à partir d'EBFEV26, c'est la fraction butanolique (EBFEV26-BuOH) qui est la plus active avec un pourcentage d'inhibition de l'effet maximal d'histamine de 32,74% à 0,062 mg/ml contre 18,22% à la même concentration pour la fraction aqueuse (Fig. 2). Les autres fractions ne présentent aucun effet significatif sur l'activité de l'histamine (Résultats non montrés). L'effet de l'extrait brut sans polyphénols (EBFEV26-ST) est illustré par la figure 1A. Il perd son effet inhibiteur si ces polyphénols sont enlevés. Les polyphénols

d'EBFEV26 sont représentés majoritairement par des tanins condensés. Ces tanins sont donc très probablement responsables de l'effet inhibiteur non-compétitif de la plante vis-à-vis de l'histamine.

L'histamine est l'un des médiateurs chimiques impliqués dans le spasme bronchique lors des crises d'asthme allergique. Elle agit sur les récepteurs histaminiques de type 1 (H_1) pour provoquer la contraction des muscles lisses bronchiques [Paul, 2006]. Ainsi, les antagonistes spécifiques de ces récepteurs H_1 pourraient prévenir les actions de l'histamine au niveau des bronches. Les résultats obtenus montrent que l'extrait EBFEV26 antagonise l'effet de l'histamine mais de façon non-compétitive indiquant que l'extrait étudié ne contient pas de molécule capable de reconnaître et d'interagir avec le récepteur histaminique. Dans ce cas, on peut conclure que l'EBFEV26 ne se fixe pas sur le site de fixation de l'histamine mais elle modifie l'affinité de cette dernière sur son récepteur d'où la baisse de son effet broncho-spasmodique.

Détermination de l'activité anti-inflammatoire

L'injection de 0,1 ml de carragénine à 2% dans une solution saline isotonique sous la voûte plantaire droite de souris a induit un œdème inflammatoire à l'origine de l'augmentation progressive du volume de la patte avec un maximum après 1 h. EBFEV26, aux deux doses testées, réduit de façon temps-dépendante cet œdème (Fig. 3). A 100 mg/kg par voie orale, il inhibe de façon hautement significative ($p = 0,003 < 0,01$) l'inflammation à partir de 120 min après l'injection de la carragénine par rapport au lot

témoin avec un pourcentage d'inhibition de $66,39 \pm 2,2\%$ (Fig. 3). De plus, à la dose de 200 mg/kg, il inhibe aussi de façon hautement significative ($p < 0,01$) à la première heure après l'induction de l'inflammation à la carragénine. Pour le lot de référence, à une

heure après l'injection de la carragénine, l'indométacine réduit le volume de l'œdème de manière très hautement significative ($p=0,0002 < 0,001$) avec un pourcentage d'inhibition de $70,37 \pm 3,7\%$.

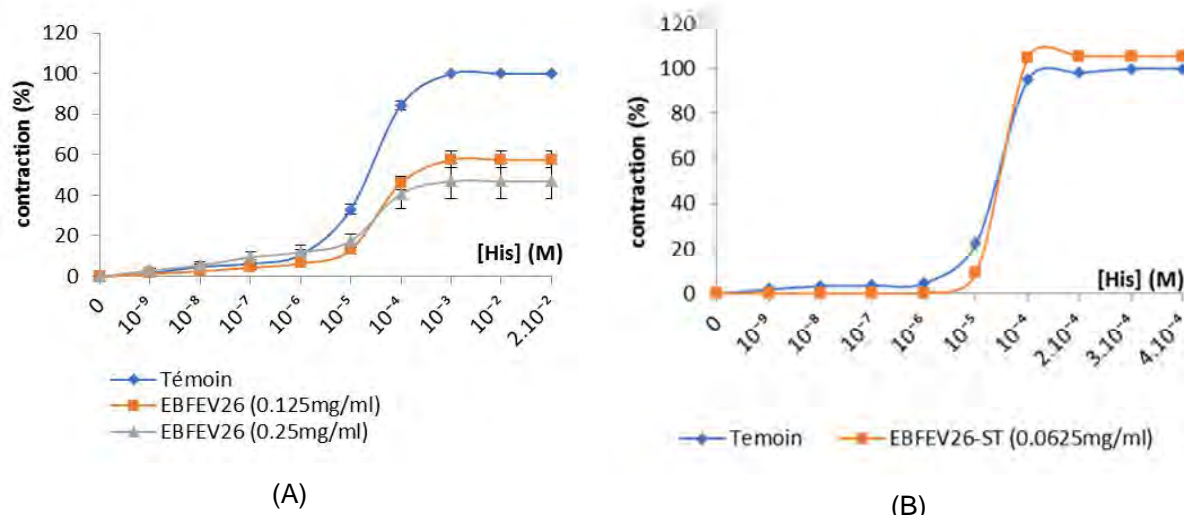


Figure 1. Effets des extraits bruts de *Lygodium lanceolatum* vis-à-vis de l'activité broncho-constrictive de l'histamine sur la trachée isolée de cochon d'Inde. L'histamine a été testée à des concentrations croissantes et cumulatives de 10^{-9} à 2×10^{-2} M. (A) : extrait brut éthanolique (EBFEV26) et (B) : extrait brut sans polyphénols (EBFEV26-ST). Chaque point représente la moyenne \pm esm de 4 déterminations indépendantes ($n=4$)

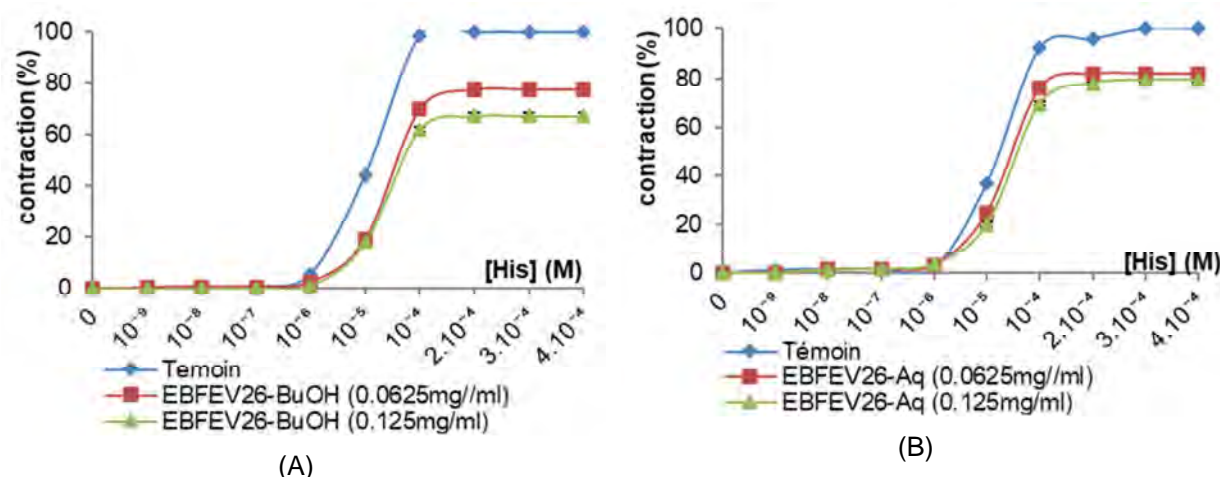


Figure 2 : Effets des fractions issues de l'extrait brut éthanolique (EBFEV26) de *Lygodium lanceolatum* vis-à-vis de l'activité broncho-constrictive de l'histamine sur la trachée isolée de l'Inde. L'histamine a été testée à des concentrations croissantes et cumulatives de 10^{-9} à 2×10^{-2} M. (A) : fraction butanolique et (B) : fraction aqueuse. Chaque point représente la moyenne \pm esm de 4 déterminations indépendantes ($n=4$).

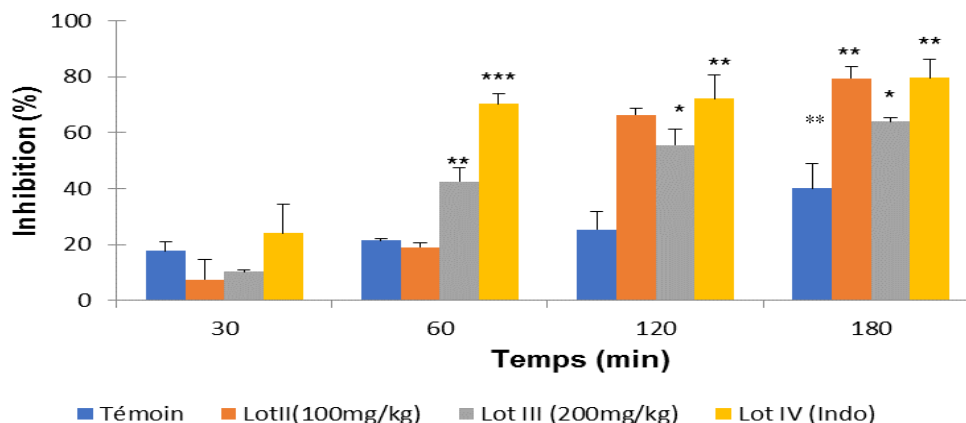


Figure 3 : Activité anti-inflammatoire de l'extrait brut éthanolique (EBFEV26) de *Lygodium lanceolatum* et de l'indométacine (Indo) chez la souris sur un modèle inflammatoire provoqué par injection de la carragénine (2%). (Les résultats sont représentés par les moyennes \pm esm de 3 déterminations indépendantes (n=3). (*) : $p < 0,05$, différence statistiquement significative ; (**) : $p < 0,01$, différence statistiquement hautement significative ; (***) : $p < 0,001$, différence statistiquement très hautement significative).

Les deux lots traités avec l'extrait de *Lygodium lanceolatum* présentent une inhibition de l'œdème dans les deux phases d'inflammation induite par la carragénine mais l'effet est plus marqué après 2 h de l'induction de l'inflammation. A une dose croissante, il réagit spécialement dans la première phase de l'inflammation (une heure après injection de la carragénine), donc surtout au niveau de la libération des médiateurs chimiques comme l'histamine, la sérotonine et la bradykinine impliqués dans la phase vasculaire. Cela contribue à l'utilisation de la plante dans le traitement de la crise d'asthme tandis que la deuxième phase se manifeste à partir de la deuxième heure après l'induction de la carragénine. Elle est caractérisée par la production de prostaglandines qui sont des médiateurs responsables de l'inflammation et de la douleur. Dans ce cas, l'extrait est efficace pour traiter l'inflammation car il inhibe l'œdème de manière hautement significative à partir de 2 h après injection de la carragénine.

Conclusion

Cette étude a permis de démontrer une inhibition non-compétitive de l'activité broncho-constrictrice de l'histamine qui est un agoniste fortement libéré par les mastocytes au cours d'une réaction allergique par l'extrait de *Lygodium lanceolatum*. Cette plante est donc plus indiquée dans le traitement de l'asthme allergique. Cette activité inhibitrice est probablement due aux tannins condensés. Par contre, l'effet anti-inflammatoire de la plante pourrait contribuer à sa vertu antiasthmatique en neutralisant les molécules pro-inflammatoires. Nos perspectives consisteront donc à purifier les fractions montrant l'effet anti-inflammatoire intéressant d'un côté et les tannins condensés à l'origine de l'effet inhibiteur de l'autre côté.

Références bibliographiques

- Chaabi, M. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae),

- Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae).
- Fong, E.H.S., Tin-Wa M., Farnsworth N.R., Dobberstein R.H., (1977). Phytochemical screening methods Rev. Department of Pharmacognosy and Pharmacology, College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago, USA
- Goodman, M. (2008). Paysages naturels et biodiversité de Madagascar.
- Mehdi, C. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines: *Euphorbia stenoclada* Baill.(Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de doctorat en sciences Pharmaceutiques et en Chimie Organique. Université Louis Pasteur et Université Mentouri (Constantine), 266 pages.
- Paul, J. D., Niall O'Donnell, Jason P. R., Kacy, N.W., Lars K., Rabin, L.T. (2006). The histamine H4 receptor mediates Allergic Airway Inflammation by regulating the activation of CD4+ T Cell. *J. Immunol*, **176**(11): 7062-7070
- Rabe K.F., Chmidt D.T. (2001) Pharmacological treatment of asthma today *Eur. Resp. J.*, **18**(34): 34s-39s.
- Riviere C., Nicolas J-P., Caradec M.L., Desire O., Schmitt A. (2005). Les plantes médicinales de la région nord de Madagascar : Une approche ethnopharmacologique. In Chaabi. M.2008. *Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines* : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei*(Girard) Batt. Plumbaginaceae). *Ethnopharmacologia*, **36** : 37.
- Rahmani, S., Belboukhari, N., Sekkoum, K., Cheritia.I. (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (PLUMBAGINACEA). *Algerian journal of arid environment*, **6** (1) : 80-86.
- Wagner H., Baldt. S., Zgainski. E.M. (1984). Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas Ed Springer Verlag, Berlin: 145-161
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. (1962). Carragenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs. *Experimental Biology and Medicine*, **111**:544. DOI: 10.3181/00379727-111-27849.
- Wolff, P.T., Arison L., Rahajamiakatra A., Raserijaona F., Niggemann B. (2012). High Asthma Prevalence and Associated Factors in Urban Malagasy School Children. *J. Asthma*, **49**(6): 575-580.