



FACULTE DES SCIENCES

DOMAINE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

MENTION PHYSIOLOGIE ANIMALE PHARMACOLOGIE ET COSMETOLOGIE

Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie

LPGPC

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Option : PHARMACOLOGIE

ETUDE DE L'ACTIVITE CICATRISANTE DE L'EXTRAIT MJ009 CHEZ LE RAT

Présenté par : MIADANTSARA Wilhelmine Jouecellina

Le 28 Février 2017

Devant le jury composé de :

Président	: RANDRIANAVONY Patricia,	Professeur
Rapporteur	: RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy,	Professeur Titulaire
Examinateur	: RASAMINDRAKOTROKA Andry, Faculté de Médecine d'Antananarivo	Professeur Titulaire de Chaire,

Année : 2015-2016

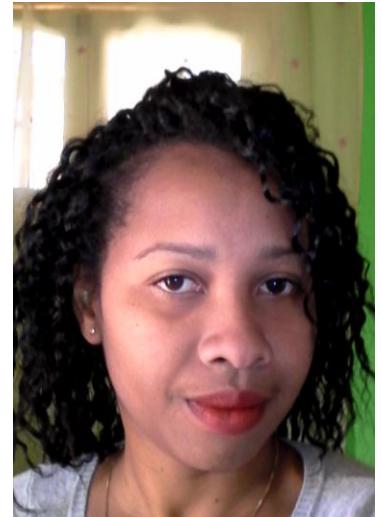
Nom : MIADANTSARA

Prénoms : Wilhelmine Jouecellina

Adresse : CUR Ankatsos II bloc 14 porte 4

E-mail : miadantsara@gmail.com

Tél : 0327902236



ETUDE DE L'ACTIVITÉ CICATRISANTE DE L'EXTRAIT MJ009 CHEZ LE RAT

Promotion : KANTY, 2015-2016

Option : PHARMACOLOGIE

Rapporteur : Professeur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy

Laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie.

Département de Physiologie Animale et de Pharmacologie.

B.P : 8357

E-mail : frandimbi@gmail.com

Faculté des Sciences

Université d'Antananarivo

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer particulièrement toutes mes vifs remerciements :

Au Professeur RANDIMBI VOLOLONA Fanantenanirainy qui m'a accueillie dans son Laboratoire et m'a guidée tout au long de mes études et de mes recherches, ses sages conseils ont permis l'accomplissement de ce travail.

Je ne saurais oublier Professeur RANDRIANA VONY Patricia pour ses précieux conseils et ses suggestions judicieuses, pour l'intérêt qu'elle a accordé à mon travail et qui a appuyé à notre formation depuis le premier cycle.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Andry RASAMINDRAKOTROKA, Professeur titulaire de Chaire à la Faculté de Médecine d'Antananarivo, d'avoir accepté et examiné ce travail en dépit de vos lourdes responsabilités. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude

Au Docteur Nat QUANSAH, Directeur du SIT Study Abroad, Summer program Madagascar, d'avoir bien voulu nous aider dans les enquêtes ethnopharmacologiques et corriger la version anglaise de mon résumé, malgré son programme chargé.

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe du Laboratoire LPGPC et surtout à la promotion KANTY qui m'ont apporté leur aide et leurs soutiens dans la réalisation de ce travail.

A titre personnel je remercie tous les membres de ma famille spécialement mes chers parents pour leurs soutiens et encouragements, je tiens également à remercier mes chers amis.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	IV
I. INTRODUCTION.....	1
II. MATERIELS ET METHODES.....	5
A. PARTIE CHIMIQUE.....	5
1. Extraction.....	5
2. Criblage phytochimique.....	5
B. PARTIE PHARMACOLOGIE.....	7
1. Préparation de la crème de base.....	7
2. Préparation de la crème avec 10% d'extrait MJ009.....	8
3. Modèle expérimental.....	8
4. Création des plaies expérimentales.....	8
5. Etude de l'activité cicatrisante de l'extrait MJ009.....	8
C. EXPRESSION ET ANALYSES DES RESULTATS.....	10
III. RESULTATS.....	11
A. PARTIE CHIMIQUE.....	11
1. Rendement de l'extraction.....	11
2. Criblage phytochimique.....	11
B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE.....	12
III. DISCUSSION.....	16
IV. CONCLUSION	18
REFERENCES.....	19

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Tests utilisés pour mettre en évidence les familles chimiques présentes dans l'extrait MJ009.....	6
Tableau II. Les ingrédients et leur proportion dans la crème de base.....	7
Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait.....	11

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Plaies 24 heures après la première application des crèmes ; plaies avec croûte chez le lot traité avec l'extrait MJ009 10% (a), sans croûte et humides chez le lot témoin (b).....	12
Figure 2. Œdème au niveau de la berge des plaies témoins (a) et réduction de l'œdème au niveau de la berge des plaies traitées avec l'extrait MJ009 (b).....	13
Figure 3. Plaies au cinquième jour de traitement : humides chez le lot témoin (a) et sèches avec des bourgeons chez le lot traité avec l'extrait MJ009 (b).....	13
Figure 4. Plaies au quatorzième jour, encore ouvertes chez le témoin (a) et recouvertes d'un nouveau tissu épithélial chez le lot traité avec l'extrait MJ009 (b).....	14
Figure 5. Variation de la surface des plaies témoins et traitées avec l'extrait MJ009 appliqué sous forme de crème 10 %, une fois par jour en fonction du temps d'observation ($\bar{m} \pm e.s.m$; n=6; $P < 0,05$).....	14
Figure 6. Variation de la vitesse de contraction des plaies traitées avec l'extrait MJ009 sous forme de crème à 10 %, appliquée une fois par jour et celle des plaies témoins ($\bar{m} \pm e.s.m$; n = 6; $P < 0,05$).....	15

LISTE DES ABREVIATIONS

%	: Pourcent
°C	: Degré Celsius
Coll	: Collaborateurs
e.s.m	: Ecart-type standard à la moyenne
G	: Gramme
J	: Jour
TGFβ	: Transforming Growth Factor β
IL	: Interleukine
LPGPC	: Laboratoire de Pharmacologie Générale de Pharmacocinétique et de Cosmétologie
\bar{m}	: Moyenne
MEC	: Matrice Extra Cellulaire
Mj(n)	: Mesure au (n) ^{ème} jour
Mj(n - 1)	: Mesure initiale du (n) ^{ème} jour
mm²	: Millimètre carré
n	: Nombre des animaux utilisés
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
R	: Rendement
Sn	: Surface lors de la dernière mesure
TGFα	: Transforming Growth Factor α
t(n) – t (n -1)	: Variation du temps entre (n) et (n-1)
TNF	: Tumeur Nécrosis Factor
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La plaie est une interruption dans la continuité d'un tissu (KARABINTA K. D. A., 2010). Elle constitue une des causes de consultation médicale et d'hospitalisation d'urgence. Il est estimé que presque 6 millions d'individus souffrent de plaies chroniques à travers le monde, et le double de cet effectif souffrent de plaies aigues (PERRIER P., 2012). Au niveau de la peau, elle peut être provoquée par des coupures, des traumatismes ou par une incision chirurgicale et même par une piqûre (WILLIAMSON D., 2000).

Elle est classée suivant sa profondeur, son origine, sa gravité et la durée de sa cicatrisation. Selon la durée de la cicatrisation, on peut classer les plaies en plaie aiguë et plaie chronique. La plaie aiguë se cicatrice vite et spontanément en quelques jours ou en quelques semaines. Tandis que la plaie chronique s'étend dans le temps. Elle est généralement causée par une pathologie locale ou générale, comme une escarre ou une nécrose tissulaire. Une plaie aigue peut aussi évoluer en plaie chronique en cas de diabète, d'insuffisance vasculaire ou d'infection chronique (TEOT L., 2007).

La cicatrisation est un phénomène naturel spontané qui consiste à la régénération tissulaire en cas de blessure. Elle aboutit au comblement de la perte en substance au niveau de la plaie et à sa fermeture. La vitesse de la cicatrisation d'une plaie ainsi que la qualité de la cicatrice dépendent de l'état général de l'organisme. La cicatrisation se déroule en 5 phases : l'hémostase suivie de la phase inflammatoire, ensuite les phases proliférative et d'épidermisation et enfin la phase de remodelage (FOIT M., 2013). L'hémostase se produit dans les minutes qui suivent la lésion, elle empêche la fuite de sang et en même temps déclenche la phase inflammatoire. En effet, la lésion abime les petits vaisseaux sanguins entraînant l'irruption de sang en dehors des vaisseaux. L'organisme cherche immédiatement à arrêter cette hémorragie par une vasoconstriction qui dure 3 à 5 secondes ou quelques minutes selon l'intensité du traumatisme. Cette vasoconstriction est suivie directement par la coagulation qui aboutit à la formation du caillot (MARTIN C. et coll., 2008). Après l'agrégation plaquettaire, la coagulation du sang consiste à la formation d'un caillot fibrino-plaquettaire, principalement fait de plaquettes incluses dans un réseau de fibres de fibrine entrecroisées avec de la fibronectine plasmatique, de thrombospondine et d'autres protéines. Le caillot assure la protection des tissus mis à nu par la lésion, sert de réservoir de cytokines et de facteurs de croissance libérés lors de la dégranulation des plaquettes et constitue une « matrice extracellulaire provisoire ». La matrice extracellulaire (MEC) provisoire est composée de collagènes et de fibrines, elle sert de support aux capillaires et aux cellules afin de construire le tissu de granulation. Elle permet aussi la

migration des cellules inflammatoires vers le tissu lésé. Le tissu de granulation contient des macrophages, de nouveaux vaisseaux et des fibroblastes. Les cytokines dans le caillot assurent le recrutement des macrophages et des lymphocytes circulants vers la zone lésée (DIANE S. C., 2012).

Cette mobilisation des cellules pro inflammatoires commence 2 h environ après la lésion et dure 4 jours en moyenne. Cette phase est caractérisée par un érythème, œdème, chaleur et douleur au niveau de la zone lésée. Elle est la conséquence de la vasodilatation qui augmente la perméabilité des capillaires, à l'origine de la fuite du plasma sanguin riche en granulocytes neutrophiles (PARK E. H., 1998). Ces derniers sont attirés au niveau de la lésion par chimiotactisme et ont pour mission de nettoyer, de détruire et de phagocytter les débris cellulaires et les microorganismes présents sur le site lésé en secrétant des cytokines et des enzymes protéolytiques. Après 2 à 3 jours, les neutrophiles disparaissent et sont remplacés par les monocytes et les macrophages. Les macrophages poursuivent le nettoyage et libèrent des facteurs de croissance qui favorisent l'angiogenèse ou qui activent les fibroblastes, ils libèrent également des cytokines : les PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF α (Transforming Growth Factor α), TGF β (Transforming Growth Factor β), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TNF α (Tumeur Nécrosis Factor), IL1 (Interleukine1), IL6 (Interleukine 6) dans la matrice extra cellulaire provisoire (COUDANE F., 2009).

La phase de granulation commence vers le quatrième jour et dure jusqu'au 21^{ème} jour, pendant cette période fibroblastes prolifèrent. Cette phase est caractérisée par des granulations au niveau de la surface des plaies (MARTIN P., 1997). En effet, les endothéliocytes intacts de la paroi des vaisseaux sanguins forment des bourgeons capillaires sous forme de petites boucles rouges, c'est l'angiogenèse (LAWRENCE W. T., 1998). Ces nouveaux capillaires apportent les nutriments et l'oxygène nécessaires à la réparation de la lésion. Les facteurs de croissance secrétés par les macrophages stimulent les fibroblastes qui synthétisent du collagène, de l'élastine et de la réticuline, un tissu conjonctif de remplacement se dépose sur les boucles capillaires et prend un aspect granuleux. Il remplace le caillot qui est progressivement détruit par les macrophages et son rôle est de combler la perte de substance tissulaire. Ensuite, les fibroblastes donnent des myofibroblastes contractiles responsables de contraction des berge de la plaie et sa fermeture (CLARK R. A. F., 1978). Enfin, le caillot se rétracte et la phase d'épidermisation ou la phase d'épithérialisation a lieu. Elle consiste à la formation de nouveaux kératinocytes par la mitose dans cellules intactes au niveau des berge de la plaie et de leur migration sur la surface de la plaie. Pendant cette phase, les fibres de collagène commencent

leur maturation. Leur orientation se modifie, elles tendent à se disposer comme dans le tissu conjonctif normal. En s'appauvrissant progressivement en eau et en vaisseaux, le tissu de granulation devient plus ferme. La croûte tombe dès que l'épiderme retrouve son épaisseur normale, et le tissu de granulation se transforme progressivement en tissu cicatriciel (DAVID H., 2005). Lorsque l'épithélium migre au centre de la plaie, la fonction de barrière de la peau est restaurée en grande partie. La fermeture de la plaie est suivie d'une étape de remodelage de la matrice extracellulaire qui peut durer de 2 mois à quelques années suivant la profondeur de la plaie après sa fermeture. Cette étape est suivie d'une phase de régression qui peut persister jusqu'à 2 ans : elle est caractérisée par une raréfaction de granulations, la structure collagénique devient plus dense car les collagènes de types III sont remplacés par des collagènes de Type I, et le réseau vasculaire se réorganise, c'est la phase de maturation (STEPHAN B. et coll., 2008).

Un cicatrisant accélère la cicatrisation en agissant sur une ou plusieurs étapes de la cicatrisation. Par exemple, le CYTOLNAT de Cicoplast® accélère la réparation car il possède une activité antibactérienne et anti-inflammatoire. Le MADECASSOL^R stimule la synthèse des fibres de collagène du tissu conjonctif et inhibent les enzymes responsables de leur dégranulation (MAQUART F., 1990). Le CICATRYL^R, un antiseptique renforce le processus inflammatoire et accélèrent ainsi la cicatrisation. Le Calendula est également un bon anti-inflammatoire, ce qui fait de lui une excellente cicatrisation (RAZAFIMBOLA E., 2013).

Malgré l'existence de médicaments pharmaceutiques destinés à accélérer la cicatrisation, nombreux sont encore les gens qui utilisent les plantes médicinales. En Amérique, les fleurs de *Bougainvillea spectabilis* (Bougainviller) (NYCTAGINACEAE) sont écrasées sous forme de pâte, et sont utilisées en cataplasme pendant quelques heures sur une plaie (YAMADA H., 1994). En Côte d'Ivoire, le latex d'*Alafia miltifora* (Staph) de la famille des (APOCYNACEAE) est appliqué sur la plaie pour accélérer la cicatrisation de la plaie (DAVID E. T. et coll., 2007). *Allium sativum* (ail) (LILIACEAE) est utilisé sous forme de pâte, et le jus de *Saccharum officinaru* (canne à sucre) (POACEAE) est appliqué sur la plaie comme antioxydant et accélèrent ainsi la cicatrisation, les feuilles du *Capsicum annurum* (Piment) (SOLANACEAE) favorisent la synthèse de collagène améliorant la cicatrisation (YAMADA H., 1994).

A Mexico, *Acalypha Indica* (Herber chatte) (EUPHORBIACEAE) est utilisé en l'appliquant directement sur la plaie (GUTIERREZ P. R. M. et VARGAS R. S., 2006). Les rhizomes du *Curcuma aromatica* (Gingembre) (ZINGIBERACEAE), par leur activité anti- inflammatoire

et antibactérienne possèdent une activité cicatrisante (SANTHANAM G. et NAGARAJAN S., 1990).

A Madagascar, les plantes médicinales tiennent encore une place importante dans la vie quotidienne de la population Malagasy, aussi bien en milieu Urbain qu'en milieu Rural (BOITEAU P., 1982). Pour traiter les plaies, les gens utilisent par exemple *Centellaasiatica* (Loviansahontanety) (APIACEAE), les feuilles de l'*Eucalyptus globulus* (MYRTACEAE) (BOITEAU P., 1986). Les feuilles d'*Ageratum conyzoides L* (Hanitrinipantsaka, Bemaibo) (ASTERACEAE) appliqués sur les plaies fraîches, les feuilles fraîches de *Seigesbeckia orientalis* (Satrikoazamaratra) (ASTERACEAE) utilisées comme cataplasme pour accélérer la cicatrisation.

D'après les enquêtes ethnobotaniques que nous avions effectuées à Befandriana-Nord, région Sofia, les feuilles de la plante utilisées dans ce mémoire sont utilisées pour soigner les plaies. Les données que nous avons obtenues montrent qu'elles accélèrent la cicatrisation, ce qui nous a incité à étudier son activité au Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie, à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. Cette activité a été étudiée sur des plaies expérimentales chez le rat.

MATERIELS

ET

MÉTHODES

II. MATERIELS ET METHODES

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Préparation de l'extrait

Les feuilles de la plante utilisées dans ce mémoire ont été récoltées à Befandriana-Nord au mois de janvier 2016. Elles ont été séchées à l'ombre, dans une salle bien aérée la température ambiante, pendant 30 jours. Deux cent cinquante grammes de feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau. La poudre ainsi obtenue a été macérée dans un mélange Ethanol-Eau (60 : 40) pendant 3 jours. Le macérât a été filtré à l'aide d'un coton, et le filtrat a été évaporé à sec, sous vide, à la température de 65°C à l'aide d'un distillateur pour avoir l'extrait brut, codé MJ009. Le rendement(r) a été calculé selon la formule :

$$R(\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse de la poudre}} \times 100$$

2. Criblage phytochimique

Cette manipulation consiste à déterminer les grandes familles de composés chimiques présentes dans la plante. Il s'agit d'un test qualitatif basé sur des réactions de coloration ou de précipitation, résultats de la réaction chimique entre les réactifs et la famille chimique correspondante.

Les signes suivants ont été utilisés pour quantifier la teneur relative des différentes familles :

- : Absence
- + : Présence en faible teneur
- ++ : Présence en teneur moyenne
- +++ : Présence en forte teneur

Tableau I. Tests utilisés pour mettre en évidence les familles chimiques présentes dans l'extrait MJ009 (FONG H. H. S. et coll., 1977).

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observations
ALCALOÏDES		DRAGENDORFF, MAYER, WAGNER	Précipitation
TANINS		Gélatine + NaCl	Précipitation verte
		Gélatine + FeCl ₃ Méthanol	Précipitation Bleue
COMPOSES PHENOLIQUES		Gélatine 1%	Précipitation
STEROÏDES ET TRITERPENES	LIERMAN BURCHARD	Anhydride acétique + H ₂ SO ₄	Coloration violette
	BADGET KEDDE	Acide picrique	Coloration rouge
	SALKOWSKI	H ₂ SO ₄	Anneau de séparation rouge
FLAVONOÏDES	WIL-STATER	Ruban de Mg + HCl concentré	Coloration rouge
LEUCANTHOCYANES	BATH-SMITH	HCl concentré+bain marie	Coloration rouge violacée
ANTHOCYANES		HCl à froid	Coloration rouge
POLYSACCHARIDES		+ 3 Volumes d'éthanol	Trouble
SUCRES REDUCTEURS		Liqueur de Fehling+ Bain-marie	Précipitation rouge brique
COUMARINES		NaOH 10%	Fluorescence à l'UV
SAPONINES	MOUSSE	HCl + Agitation	Persistante d'une mousse (3cm d'épaisseur) après 30mn

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

Pour faciliter son application, l'extrait MJ009 a été appliqué sous forme de crème, émulsion eau dans l'huile contenant 10% de l'extrait (ALLO O., 2005).

1. Préparation de la crème de base

L'extrait MJ009 a été préparé sous forme de crème eau dans l'huile à la concentration de 10%. La phase aqueuse a été constituée d'eau distillée et du bicarbonate et la phase grasse a été composée d'huile de tournesol, d'acide stéarique et de stéaryl alcool. Les 2 phases ont été chauffées séparément dans 2 récipients différents .La cire d'abeilles a été râpée, puis fondue dans un récipient en inox, l'acide stéarique, l'alcool stéaryl et l'huile ont été versés dans le même récipient, et le mélange a été chauffé à la température de 80°C. Dans un autre récipient, le bicarbonate a été dissout dans de l'eau, et le mélange a été chauffé au bain marie, à la température de 80°C. Ensuite, la phase aqueuse a été versée petit à petit dans la phase grasse en fouettant sans arrêt jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène, et la crème ainsi obtenue a été laissée se refroidir à la température ambiante.

Tableau II. Ingredients pour préparer 70 g de crème de base

PHASES	INGREDIENTS	QUANTITE
Phase aqueuse	Eau distillée	26,48 ml
	Bicarbonate de soude	7 g
Phase grasse	Huile de tournesol	23 ml
	Cire d'abeille	8,45 g
	Alcool stéaryl	0,84 g
	Acide stéarique	0,84 g

2. Préparation de la crème contenant 10% d'extrait

Pour préparer une crème contenant 10% de MJ009, 0,5 g de l'extrait a été mélangé avec 4,5 g de la crème de base, puis le mélange a été homogénéisé.

3. Modèle expérimental

Des rats mâles de souche Wistar, âgés de trois mois et pesant entre 100 g et 150 g ont été utilisés. Ils ont été élevés au sein de l'animalerie du Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC) dans les mêmes conditions. Ils ont été nourris avec de la provende LFL 1420, à la température de 25°C environ, avec 12h/12h de lumière et d'obscurité. Ils ont été répartis en 2 lots de 3 rats : un lot témoin traité avec la crème de base et un lot traité avec la crème contenant 10% de l'extrait MJ009.

4. Création des plaies

Avant de créer les plaies, les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'éther diéthylique (BHASKAR A. et coll., 2012). Ensuite, la partie dorsale des animaux a été épilée à l'aide d'une cire épilatoire tiède. La partie épilée a ensuite été nettoyée avec de l'eau savonneuse, et deux plaies circulaires symétriques de 1 cm de diamètre ont été créées de part et d'autre de la colonne vertébrale à l'aide d'un dispositif circulaire comportant une lame tranchante de 1cm de diamètre (DELEAGE A., 2011). La plaie a ensuite été nettoyée avec un coton imbibé d'eau puis séchées à l'aide d'un papier buvard.

Vingt-quatre heures après leur création, les plaies ont été nettoyées. Un coton imbibé d'eau a été appliqué 2 minutes sur la plaie pour ramollir la croûte, ensuite celle-ci a été enlevée à l'aide d'une coton tige. Puis elles ont été nettoyées avec de l'eau et séchées à l'aide d'un papier buvard, et 10 mg de crème de base ont été appliqués sur les plaies des animaux témoins, tandis que 10 mg de crème contenant de l'extrait à 10% chez les animaux du second lot par un doux massage circulaire.

5. Etude de l'activité cicatrisante de l'extrait MJ009

L'effet de l'extrait MJ009 sur la cicatrisation a été étudié sur les différentes phases de la cicatrisation : la phase inflammatoire, la phase de prolifération et d'épithérialisation, ainsi que sur son effet sur la contraction des plaies. Son effet sur le temps de fermeture des plaies a également été étudié, et la vitesse de contraction des plaies a été calculée. Les plaies ont été

observées et photographiées tous les jours à la même heure et sous les mêmes conditions jusqu'à leur fermeture complète.

L'effet de l'extrait MJ009 sur la phase inflammatoire a été étudié en suivant le temps d'apparition et de disparition des signes de l'inflammation : la rougeur, l'oedème et l'exsudat au niveau des plaies. Puis, sur la phase de proliférative, le temps d'apparition des bourgeons sur la surface des plaies traitées avec l'extrait ont été enregistrés et comparés avec celui du lot témoin. Pendant la phase d'épithérialisation, le temps d'apparition du nouveau tissu épithérial au niveau de la surface des plaies par rapport au témoin a été noté. Faisant suite à cette phase, la plaie se ferme et le temps de fermeture des plaies traitées avec l'extrait a été noté et comparé avec celui des plaies du lot témoin.

Tous les jours, à la même heure, la surface des plaies a été mesurée par planimétrie directe. Pour ce faire, un papier millimétré transparent a été placé directement sur la plaie, et son contour a été tracé avec un marqueur à pointe fine et le nombre de carreaux dans le contour a été compté pour déterminer la surface de la plaie (BALAZS L., 2001).

Et enfin, la vitesse de cicatrisation a été étudiée en calculant la vitesse de la contraction de la plaie par la formule ci-après:

$$V = \frac{S_n - S_{n-1}}{T_n - T_{n-1}}$$

Où

v : vitesse de la contraction de la plaie exprimée en mm²/jour

S_{n-1} : surface de la plaie la veille de la mesure

S_n : surface de la plaie au jour de la mesure

T_{n-1} : temps à la veille de la mesure

T : temps au moment de la mesure

C. EXPRESSION ET ANALYSE DES RESULTATS

Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart – type réduit, et ces moyennes ont été comparées entre elles en utilisant le test « t » de Student avec un degré de signification de $P < 0,05$.

RESULTATS

III. RESULTATS

A. PARTIE CHIMIQUE

1. Rendement de l'extraction

Après l'évaporation à sec du filtrat, 28 g d'extrait sont obtenus, soit un rendement de 11,2%.

2. Résultats du criblage phytochimique

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait MJ009 révèle la présence d'alcaloïdes, de sucres réducteurs, de stéroïdes et de tanins en forte teneur. Tandis qu'il contient une teneur moyenne en flavonoïdes, et enfin les leuconthocyanes, les anthocyanes et les polysaccharides sont présents en faible teneur (Tableau III).

Tableau III. Les familles chimiques présentes dans l'extrait MJ009

FAMILLES CHIMIQUES	TENEUR
ALCALOÏDES	+++
SUCRES REDUCTEURS	+++
STEROÏDES ET TRITERPENES	+++
TANINS	+++
FLAVONOÏDES	++
LEUCONTHOCYANES ET ANTHOCYANES	++
POLYSACCHARIDES	+

B. PARTIE PHARMACOLOGIQUE

L'application de l'extrait sous forme de crème, une fois par jour accélère la fermeture des plaies par rapport au témoin. La durée de la phase inflammatoire est plus courte chez les animaux traités avec l'extrait par rapport à celle du lot témoin, et le tissu de granulation apparaît plus tôt chez les animaux traités avec l'extrait.

L'étude de l'effet de l'extrait MJ009 sur la formation de croûte montre que vingt-quatre heures après la création des plaies, toutes les plaies présentent des signes de l'inflammation : rougeur et œdème au niveau de la berge des plaies, et la surface des plaies traitées avec l'extrait MJ009 sont recouverts d'une croûte épaisse, contrairement aux plaies témoins qui sont humides (Figure 1).



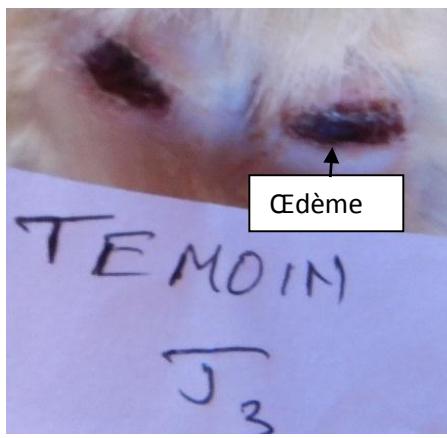
(a)



(b)

Figure 1. Aspect des plaies 24 heures après la première application des crèmes ; plaies avec croûte chez le lot traité avec l'extrait MJ009 10% (a), sans croûte et humide chez le lot témoin (b).

Au troisième jour de traitement, nous voyons son effet sur la phase inflammatoire. La berge des plaies du lot témoin présente encore un œdème inflammatoire, tandis que l'application de l'extrait MJ009 réduit les signes inflammatoires chez le lot traité : la rougeur et l'œdème sont très faibles par rapport au témoin et disparaissent au 5^{ème} jour chez le lot traité, cette rougeur ne disparaît qu'au 8^{ème} jour chez le lot témoin (Figure 2).



(c)



(d)

Figure 2. Aspect de l'œdème au niveau de la berge des plaies témoins (c) et réduction de l'œdème au niveau de la berge des plaies traitées avec l'extrait MJ009 (d).

Au cinquième jour du traitement, des granulations apparaissent au niveau de la surface des plaies traitées avec l'extrait MJ009 et le tissu migre vers la surface de la plaie. Par contre, les plaies témoins ne présentent pas encore de granulations, et leur berge est encore enflée, et leur surface est encore humide (Figure 3).



(e)



(f)

Figure 3. Plaies après 5 jours de traitement : humides chez le lot témoin (e) et sèches avec des bourgeons chez le lot traité avec l'extrait MJ009 (f).

Au quatorzième jour, les plaies traitées avec l'extrait MJ009 à 10% sont complètement fermées, et sont recouvertes d'un épithélium fin et rose et la croûte tombe. Par contre la plaie traitée avec la crème de base ne ferme qu'au dix-huitième jour (Figure 4).



(g)



(h)

Figure 4. Plaies au quatorzième jour, encore ouvertes chez le témoin (g) et recouvertes d'un nouveau tissu épithérial chez le lot traité avec l'extrait MJ009 (h).

En appliquant l'extrait MJ009 tous les jours, la surface des plaies diminue par rapport à celle du témoin. Juste après leur création, la surface des plaies est égale à $78,50 \pm 1,30 \text{ mm}^2$. La surface des plaies traitées avec l'extrait se contracte très vite entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour de traitement. Au 3^{ème} jour la surface des plaies traitées avec l'extrait est égale à $62,76 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ contre $71,93 \pm 4,52 \text{ mm}^2$ chez les plaies témoin et au 6^{ème} jour $12,94 \pm 0,73 \text{ mm}^2$ chez le lot traité contre $62,35 \pm 4,55 \text{ mm}^2$ chez la plaie témoin.

Au 12^{ème} jour la surface des plaies traitées avec l'extrait MJ009 est égale à $0,22 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ contre $19,73 \pm 1,01 \text{ mm}^2$ pour les plaies témoins ($P < 0,05$) (Figure 5).

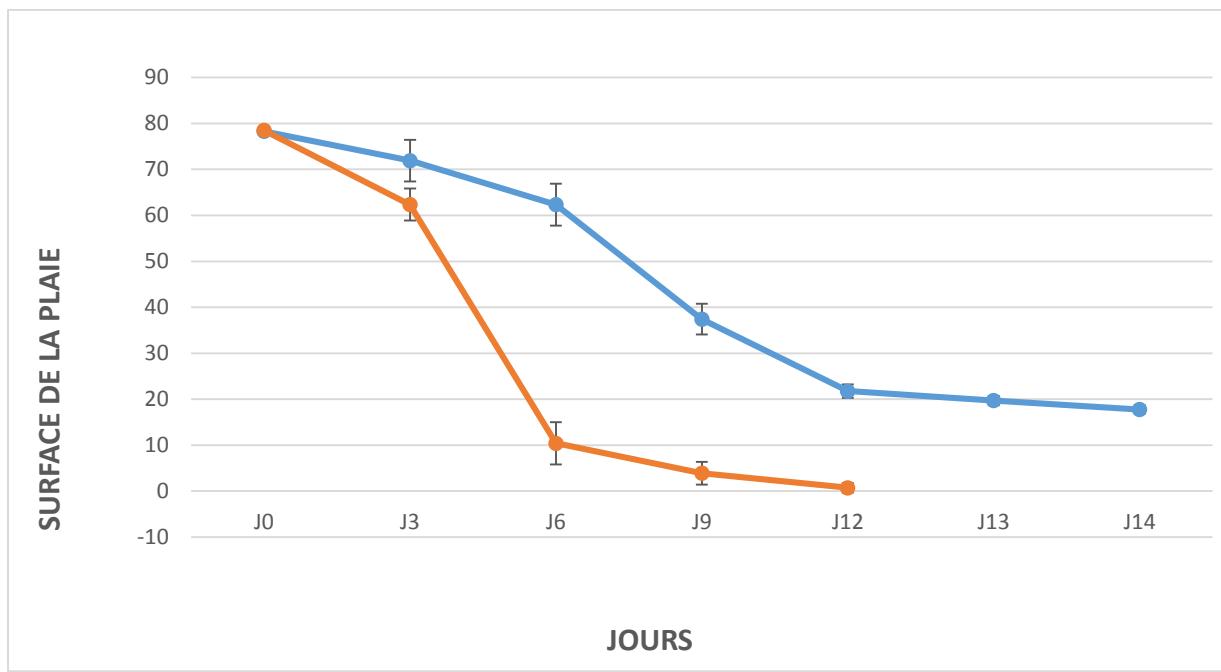


Figure 5. Variation de la surface des plaies traitées avec l'extrait MJ009 (■) et celle des plaies traitées avec la crème de base (■) appliqués une fois par jours par voie topique ($\bar{m} \pm \text{e.s.m}$; $n=6$; $P < 0,05$).

La mesure journalière de la surface des plaies nous a permis de calculer la vitesse de la contraction des plaies traitées avec l'extrait MJ009 et celle du lot témoin. Cette vitesse est maximale au 6^{ème} jour chez les plaies traitées avec MJ009 contre 9^{ème} jour chez le témoin. En outre, la vitesse de contraction des plaies chez les rats traités avec l'extrait est supérieure à celle des rats témoins. Au 6^{ème} jour, elle est égale à $61,91 \pm 0,7 \text{ mm}^2/\text{jour}$ chez les plaies traitées avec l'extrait, et $24,92 \pm 1,2 \text{ mm}^2/\text{jour}$ chez le lot témoin au 9^{ème} jour ($P < 0,05$) (Figure 6).

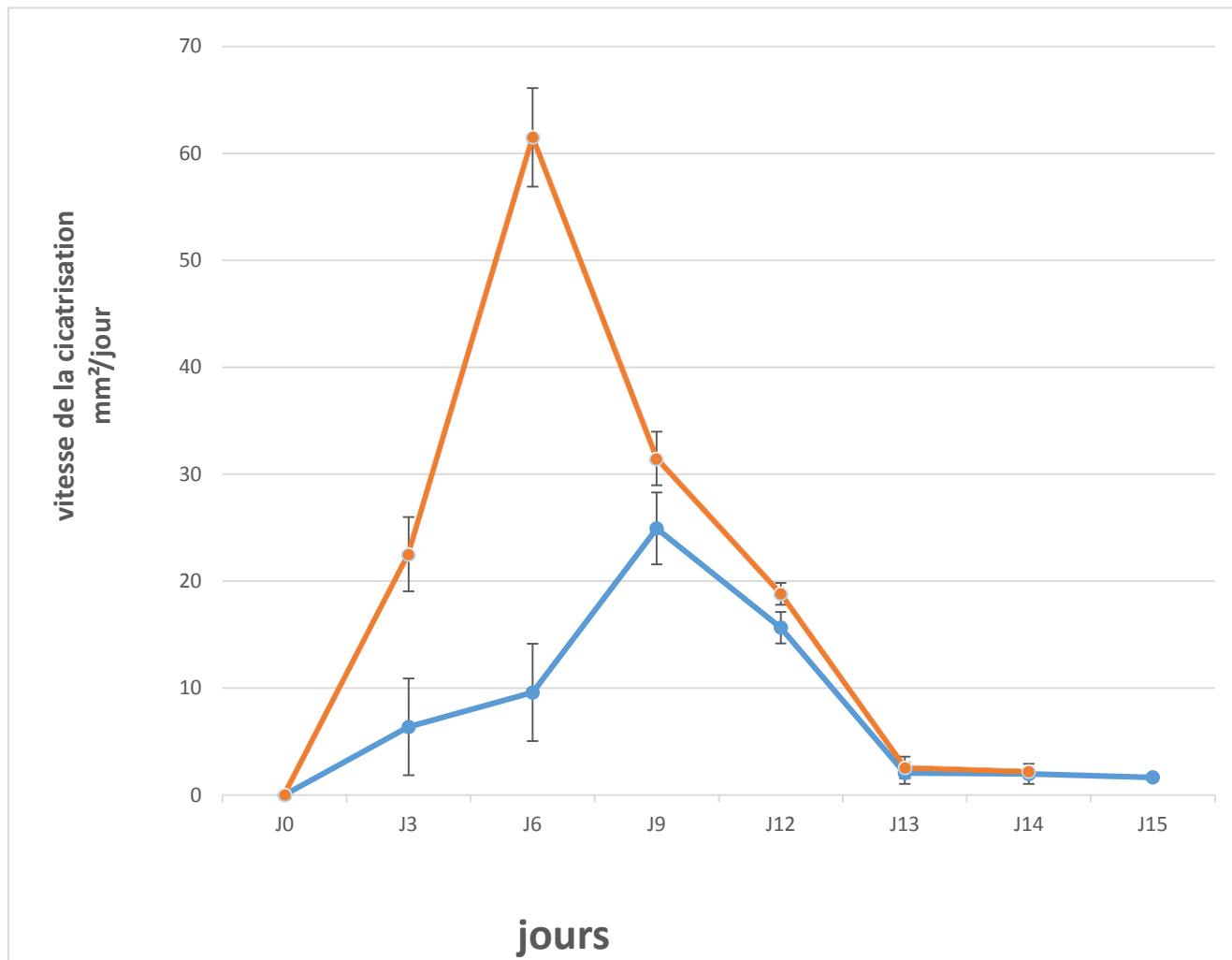


Figure 6. Variation de la vitesse de contraction des plaies traitées avec la crème contenant 10 % MJOO9 (■) et la crème de base (□) appliquées une fois par jour, par voie topique en fonction du temps chez le rats ($\bar{m} \pm \text{e.s.m}$; n=6 ; P<0,05).

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

Notre objectif a été d'étudier l'activité de l'extrait MJ009 appliqué sous forme de crème eau dans huile sur les plaies expérimentales. Nos résultats montrent que l'application de cet extrait accélère la cicatrisation, il réduit la durée de la phase inflammatoire et accélère l'apparition des granulations et la fermeture des plaies traitées avec l'extrait par rapport aux plaies témoins.

D'après nos observations, les plaies traitées avec extrait MJ009 sont recouvertes de croûte avant les plaies témoins. Cette croûte résulte de la coagulation sanguine, ce qui nous permet de dire que l'extrait accélère l'hémostase. En 2002, BIAYE M. a rapporté que l'extrait des feuilles de *Guiera senegalensis* accélère la coagulation sanguine, et ils ont attribué cette propriété aux tanins. Or les résultats du criblage phytochimique effectué sur MJ009 montrent une forte teneur en tanins. Par analogie, comme l'extrait MJ009 contient des tanins, on peut avancer l'hypothèse que cette famille chimique participe à l'hémostase chez les plaies traitées avec MJ009.

Nous avons également constaté que la durée de la phase inflammatoire est plus courte chez les plaies traitées avec l'extrait par rapport aux témoins. On pourrait avancer que cet effet est dû à la présence précoce de croûte chez les plaies traitées avec MJ009. En effet, cette croûte protège les plaies contre les agents pathogènes extérieurs et forme une matrice provisoire permettant la migration des cellules inflammatoires vers la lésion pour la nettoyer, et sert aussi de réservoir de cellules inflammatoires et facteurs de croissance (FOLKAMAN J. et SHING Y., 1992). Pendant la phase inflammatoire, les cellules inflammatoires telles que les leucocytes, les neutrophiles et les macrophages, assurent le nettoyage de la plaie et la protègent contre les agents infectieux (MATHIEU P. R. et coll., 2010). Des études effectuées sur les feuilles de *Combretum micranthum* (COMBRETACEAE) par AKROUM S. (2011) montrent que les flavonoïdes inhibent la croissance et le développement des bactéries comme les *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. En plus, les tanins contenus dans l'extrait de *Quercus infectoria* (FAGACEAE) possèdent une activité antibactérienne (MAHAMAT B., 1995). Or notre extrait MJ009 contient des tanins et des flavonoïdes. Nous pouvons avancer une hypothèse que la diminution de la durée de la phase inflammatoire serait due à l'activité antibactérienne de ces familles chimiques.

Nos observations montrent que les granulations apparaissent plus tôt chez les plaies traitées avec l'extrait par rapport aux témoins. La diminution de la phase inflammatoire explique en partie l'apparition de la phase de bourgeonnement, parce que ces granulations n'apparaissent que si la plaie soit propre (MARTIN P., 1997). Ces granulations sont constituées de bourgeons

capillaires néoformés à partir de la paroi des vaisseaux intacts, et du collagène, de l'élastine et de réticuline synthétisés à partir des fibroblastes (CLARK R. A. F., 1978). Il se pourrait que l'extrait stimule l'angiogenèse et les fibroblastes pour former ces granulations. C'est le cas de l'extrait de *Zizyphus lotus* DJERROU Z. (2011) dont les tanins favorisent l'angiogenèse et stimulent les fibroblastes. Ces nouveaux capillaires apportent les nutriments et l'oxygène nécessaires à la division cellulaire active au niveau de ces fibroblastes pour combler la perte de substance tissulaire (MOHAN H., 2005 ; MOLAN P. C., 2006). Ces fibroblastes donnent aussi des myofibroblastes qui en se contractant ferment les plaies traitées avec l'extrait MJ009 avant les plaies témoins (LE TOUZE A. et ROBERT M., 1993).

Au vu de ces résultats, l'activité cicatrisante de l'extrait MJ009 serait due à la présence soit des tanins ou des flavonoïdes. Des études approfondies portant sur sa purification et des études histologiques seraient nécessaires afin de mieux expliquer le mécanisme d'action de l'extrait MJ009 sur son activité cicatrisante.

CONCLUSION

V. CONCLUSION

Les résultats des expériences menées sur les plaies ouvertes expérimentales chez le rat montrent que l'extrait MJ009 accélère la cicatrisation. Il réduit la phase inflammatoire et accélère l'apparition de tissus de granulation. Ces effets pourraient être dus à la présence des tanins et des flavonoïdes dans l'extrait. Des recherches ultérieures sont nécessaires pour identifier les molécules responsables de ces effets afin de préciser leur mécanisme d'action.

REFERENCES

REFERENCES

ALLO O. (2005).

Pharmacie galénique B.P.

2ème Ed. Groupe liaison, France, 97-98.

AKROUM S. (2011).

Etude Analytique et Biologique des flavonoïdes naturels.

Thèse de Doctorat en sciences, Université Mentouri de Constantine, 14-22.

BALAZS L. (2001).

Integrative and comparative physiology.

Am. J. Psychol., 280 (2): 472-666.

BHASKAR A., NITHYA V. (2012).

Evaluation of the wound healing activity of *hibiscus rosasiensis L* (Malvaceae) in wistar albino rats.

Ind. J. Pharmacol., 44 (6): 694-698.

BIAYE M. (2002).

Actions pharmacologiques des tanins.

Thèse de doctorat en Pharmacie, Univ. Cheik Anta Diop de Dakar (Sénégal), 15-16.

BOITEAU P. (1982).

Précis de matière médicale malgache.

Ed. La librairie de Madagascar, 14 – 15.

BOITEAU P. (1986).

Précis de matière malgache.

Plantes médicinales de Madagascar.

Ed. KARTHALA, Amazon, France, 37-61.

CLARK R. A. F. (1978).

Autancour tissue repaire, basic ad biologic.

J. Am. Acad. Dermatol., **13**: 1-10.

COUDANE F. (2009).

Fonction et régulation des peptidyl-arginine désaminases dans l'épiderme et au cours de la cicatrisation.

Thèse de Doctorat, Univ. Toulouse III Paul Sabatier (France), 67-87.

DAVID H. (2005).

Bilan des connaissances actuelles sur la cicatrisation des plaies cutanées chez le chien et le chat.

Thèse de doctorat Vétérinaire.

Université Paul-Sabatier de Toulouse, 44-79.

DAVID E. T., DIMO T., NGONDI J., NMANGA N., PENLAP B. V., BODA M.,

NJIFUTIEN N. (2007).

Screening of Alafia multiflora for Antibacterial, Antiradical Activity and LD50 Investigation.

Int. J. Pharmacol., **3**: 327-333.

DELEAGE A. (2011).

Mise en évidence de l'effet d'un peptide sur l'épidérmisation dans un modèle expérimental de cicatrisation épidermique chez le porc.

Thèse de doctorat en vétérinaire, Université CLAUDE-BERNARD-LYON I, 17-35.

DJERROU Z. (2011).

Etude de l'effet Pharmacol toxicologique de la plante des plantes médicinales d'Algérie.

Activité cicatrisante et innocuité de l'huile végétale de *Zizyphus lotus*.

Thèse de Doctorat en sciences, Université Mentouri de constantine, 43-47.

DIANE S. C. (2012).

Soins des plaies, l'hyper granulation, un obstacle à la cicatrisation des plaies.

Perspective infirmière.

Ed. Diane St-Cyr, Canada, 51-53.

FOIT M. (2013).

La cicatrisation favorisée par les l'huile essentielles.

Mémoire pour la certification de conseiller en huiles essentielles—Trevis France, 5-6.

FOLKAMAN J., SHING Y. (1992).

Angiogenesis.

J. Biol. Chem., **267**: 10931-10934.

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

"Phytochemical screening plants".

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

GUTIERREZ P. R. M., VARGAS R. S. (2006).

Evaluation of the wound healing proprieties of *Acalypha langiana* in diabetic rats.

Fitoterapia, **77** (4): 286-289.

KARABINTA K. D. A. (2010).

Propriété cicatrisante des feuilles d'*Opilia Celtidifolia* (Guill. et Perr.). Endll. ExWalp (OPILIACEAE).

Thèse de Doctorat en Pharmacie, Univ. Bamako (Mali): 14-26.

LAWRENCE W. T. (1998).

Physiology of the acute wound.

Clin. Plast. Surg., **25** (3): 21-40.

LE TOUZE A., ROBERT M. (1993).

La cicatrisation et cicatrice.

Ed. Chirurgicales Pédiatrique, Strasbourg France, 2-3.

MAHAMAT B. (1995).

Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae:C.micrathum, Guiera Sénegalensis et Terminalia viceenniode.
Fitoterapie, **66** (1): 86-87.

MAQUART F. (1990).

Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpenes extracted from centellaasiatica.

Connect Tissue Res., **24**: 17-20.

MARTIN C., ANDRE J. M., KATSANIS G., POIRIERE J. (2008).

Histologie, organs, systems et appareils.

Rev.Faculté de médecine Pierre MarieCurie, PCEM2-DCEM1, France, 67-70.

MARTIN P. (1997).

Wound healing-amng for perfect skin regeneration.

Science, **276** (5309): 74-81.

MATHIEU P. R., RODER, KHASROTEHRANI K. (2010).

Skin wound healing modulation by macrophages.

Int. J. Clin. Exp. Pathol., **3** (7): 643-653.

MOHAN H. (2005).

Inflammation and healing. In textbook of Pathology.

Ed. Jaypee Brothers, New Delhi, 133-179.

MOLAN P. C. (2006).

The evidence supporting the use of honey as a wound dressing.

Int. J. Low Extrem Wounds, **5**: 40-54.

PARK E. H. (1998).

Studies on the Pharmacologiques action of cactus: identification it anti-inflammatory effect.

Arch. Pharma., **21** (1): 30-40.

PERRIER P. (2012).

Prise en charge des plaies, prévention et prise en charge des cicatrices.

Ed. Université de Genève, 1-38.

RAZAFIMBOLA E. (2013).

Contribution à l'amélioration de la qualité des phytomedicaments à base des *singesbeckia orientalis*.

Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université d'Antananarivo, 12-19.

SANTHANAM G., NAGARAJAN S. (1990).

Wound healing activity of *circuma aromatic* and Pilte.

Fitoterapia, **61** (5): 458-459.

STEPHAN B., BREM H., STOJADINOVIC O., MARJANA T. C. (2008).

Growth factors and cytokines in wound healing.

Wound. Repair. Regen., **16**: 585-601.

TEOT L. (2007).

Plaies pansements et doubleuse des soins.

Plaies sans douleur : un challenge multidisciplinaire.

Ed. Hôpital Lapeyronie-CHU Montpellier, 30-34.

WILLIAMSON D. (2000).

Préparation du lit de la plaie.

Ostom Wound Management, **46**: 14-35.

YAMADA H. (1994).

Pectic polysaccharides from Chinese herbs: Structure and biological activity.

Carbohydrate Polymers, **25**: 269-276.

ETUDE DE L'ACTIVITE CICATRISANTE DE L'EXTRAIT MJ009 CHEZ LE RAT

AUTEUR : MIADANTSARA Wilhelmine

Jouecellina

ADRESSE : CU Ankatsosso II bloc 14 porte 4

E-MAIL : miadantsara@gmail.com

ANNEE : 2015-2016

RAPPORTEUR : Pr. RANDIMBIVOLOLOLONA

Fananantenainirainy

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

B.P. 8351

E-mail : frandimbi@gmail.com

Domaine des Sciences et Technologies

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

RESUME

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'effet de l'extrait MJ009 appliqué sous forme de crème (10%) sur la plaie ouverte chez le rat. Son effet sur les différentes phases de la cicatrisation ainsi que sur la vitesse de contraction des plaies ont été étudiés.

L'application de la crème contenant 10% de l'extrait MJ009 diminue la durée de la phase inflammatoire à 4 jours contre 8 jours chez les témoins. Il accélère l'apparition des granulations au bout de 5 jours contre 8 jours chez les témoins. Il accélère aussi l'épithérialisation qui a lieu au 12ème jour contre 18ème jour chez les témoins. Les plaies traitées avec l'extrait se ferment au bout de 14 jours contre 20 jours chez les témoins, avec une vitesse de cicatrisation élevée au 6^{ème} jour égale à $61,91 \pm 0,7 \text{ mm}^2/\text{jour}$ contre $24,92 \pm 1,2 \text{ mm}^2/\text{jour}$ chez les témoins au 9^{ème} jour ($P < 0,05$). Ces résultats montrent que MJ009 possède une activité cicatrisante. Il contient des flavonoïdes, des tanins, des sucres réducteurs, des stéroïdes, des triterpènes, des leuconthocyanes, des anthocyanes et des polysaccharides. Les flavonoïdes ou les tanins pourraient être responsables de cette activité.

Mots clés : cicatrisante, granulation, épithérialisation, rat, plaies ouvertes.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of extract MJ009. It was applied in the form of a cream containing 10% of the extract on open wound in the rats. Its effect on the various phases of the wound healing as on the speed of contraction of the wounds was studied.

MJ009 accelerates the wound healing. The wounds treated with the extract close on the 14th day versus 20 days for the control group. It decreases the duration of the inflammatory phase at 4 days versus 8 days for the control group, and accelerates the appearance of the granulations on the 5th day versus 8th day for the control animals. It also accelerates the epithelialization which takes place on the 12th day versus 18th day for the control group, with a high wound healing speed equal to $61.91 \pm 0.7 \text{ mm}^2/\text{day}$ on the 6th day versus $24.92 \pm 1.2 \text{ mm}^2/\text{day}$ on the 9th day for the control group ($P < 0,05$). These results show that MJ009 possesses a wound healing activity. It contains flavonoïdes, tannins, reducing sugars, steroids, triterpenes, leuconthocyanes, anthocyanes and polysaccharides. Flavonoïdes, and tannins could be responsible for this activity.

Key words: wound healing, granulation, epithelialization, rat, open wounds