



RÉPUBLIQUE DU BENIN
UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI



FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE

THÈSE N° 31 / ED / SV

Présentée pour l'obtention du Titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI

Option: Pharmacologie et Physiologie

Spécialité: Pharmacologie des substances Naturelles et Physiologie de l'Effort

**EVALUATION DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS AQUEUX
DE *Sterculia setigera* Delile (Sterculiaceae) ET DU MELANGE
Aframomum melegueta (Roscoe) K. Schum (Zingiberaceae)-
Citrus aurantifolia (Christm et Panzer) Swingle (Rutaceae)
SUR L'ASTHME INDUIT PAR L'EFFORT**

Par

Judith Fifamin AHOUNOU

soutenue publiquement le le 20 Octobre 2011 devant la commission d'examen composée de:

Président : Messanvi F. GBEASSOR, Professeur Titulaire (Université de Lomé, Togo)

Rapporteurs : Bialli SERI, Professeur Titulaire (Université de Cocody, Côte d'Ivoire)

Mansourou MOUDACHIROU, Professeur Titulaire (FAST/UAC)

Sylvin OUEDRAOGO, Maître de Recherches (CNRST/IRSS, Ouagadougou, Burkina Faso)

Membres: Pierre H. DANSOU, Professeur Titulaire, (INJEPS/UAC) **Directeur**

Joachim Djimon GBENOU, Maître de Conférences (FAST/UAC) **Co-Directeur**

Année 2011

SOMMAIRE

<i>DEDICACES ET REMERCIEMENTS</i>	<i>i</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>1</i>
<i>GENERALITES</i>	<i>7</i>
<i>MATERIELS ET METHODES D'ETUDE</i>	<i>48</i>
<i>RESULTATS</i>	<i>78</i>
<i>DISCUSSION</i>	<i>109</i>
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>	<i>123</i>
<i>REFERENCES</i>	<i>127</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>147</i>
<i>TABLES DES MATIERES</i>	<i>169</i>

DEDICACES

Je dédie ce travail:

A mon Père, in memoriam, j'ai beaucoup bénéficié de ton amour, de tes conseils et de ton soutien depuis ma tendre enfance. Ce travail est comme une gerbe sur l'anonymat de ta tombe. Que ton âme repose en paix dans le Royaume des Cieux!

A ma Mère, pour toute l'attention et l'amour dont tu as fait preuve à mon égard; tous les efforts consentis; tous les conseils que tu m'as prodigués; toutes les souffrances que tu as endurées; je te dis infiniment merci.

Le vœu de mon cœur et ma prière à DIEU pour toi, c'est qu'il te comble de toutes les grâces dont tu as besoin. Trouve dans cet ouvrage, l'aboutissement de tes efforts.

Merci pour tout et que Dieu t'accorde longue vie pour qu'à mon tour je puisse te témoigner ma gratitude. Amen!

A mon époux François AIKPE, avec tout mon amour, je te remercie pour ton soutien inconditionnel durant toutes ces longues années d'études. Ton amour et ton affection remplissent mes jours de bonheur. Ce travail est le tien. Profond attachement.

A mes frères et sœurs, Aristophane, Gloria, Binoche, faites montre de courage et d'abnégation dans le travail, afin de mieux faire que votre sœur. Vous êtes comme moi l'espoir de la famille. Faites-le pour vous-mêmes et pour le bonheur de toute la famille. Seul le travail paie!

A mes enfants, Emmanuela et Marie-Ange, je vous remercie pour votre gentillesse et votre patience durant mes nuits d'études. Votre présence m'apporte joie et bonheur.

A mes collègues et amis de promotion, ZOCLANCLOUNON Emmanuel, ATIUKPE Arcadius, BOUCO Patrice, pour votre esprit de déférence et de collaboration dont je suis l'objet de votre part. Ce travail est le vôtre.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui, par leur soutien et leur gentillesse ont permis l'aboutissement de ce travail. Mes remerciements s'adressent particulièrement:

- **Au Professeur DANSOU H. Pierre**, Professeur Titulaire, Président de l'Ecole Doctorale Sciences et Techniques des Activités Physiques et du Sport (INJEPS/UAC), Directeur de cette thèse, pour la disponibilité, la qualité de la formation et la rigueur au travail que j'ai reçus de vous. Vous avez accepté de me guider avec beaucoup de sagesse et de m'encadrer durant la préparation de cette thèse. J'espère que ce travail vous apparaîtra digne de la confiance que vous m'avez accordée et de l'exemple que vous me donnez. Je vous exprime toute ma profonde gratitude et ma parfaite reconnaissance.

- **Au Professeur GBENOU D. Joachim**, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences et Techniques de l'UAC, Co-directeur de cette thèse pour votre disponibilité et votre compréhension. Pour la direction théorique et pratique aux essais biologiques et analyses chimiques au laboratoire. Vous aviez participé à ma formation scientifique. Votre rigueur a permis l'aboutissement de ce travail. Qu'il me soit permis de vous exprimer mes sentiments de parfaite et sincère gratitude.

- **Au Professeur MOUDACHIROU Mansourou**, Professeur Titulaire, Responsable du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles essentielles (LAPHE).

C'est un grand honneur pour moi, de trouver ici l'occasion d'exprimer à cet homme qui allie la rigueur scientifique aux qualités humaines, ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance pour ses conseils scientifiques, son appui pédagogique et son soutien moral et matériel.

- **Au Professeur SERI Bialli**, Professeur Titulaire de Neurophysiologie à l'Université de Cocody, UFR Biosciences (Côte d'Ivoire).

Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans le jury chargé de juger ce travail malgré vos multiples occupations et tous les problèmes que

connait actuellement la Côte d'Ivoire. Vous nous donnez l'occasion de profiter de vos connaissances. Nous vous témoignons toute notre reconnaissance pour la disponibilité et l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

-Au Professeur GBEASSOR F. Messanvi, Professeur Titulaire de Physiologie/Pharmacologie à l'Université de Lomé au Togo.

Vous avez bien voulu examiner cette thèse avec intérêt. Nous vous exprimons toute notre reconnaissance et vous remercier pour vos précieux conseils.

- Au Dr OUEDRAOGO Sylvin, Maître de Recherche à l'IRSS, Chef de département Médecine et Pharmacopée Traditionnelles de l'IRSS à Ouagadougou, Chercheur-Enseignant en Pharmacologie appliquée, pour la disponibilité, la sympathie et les encadrements théoriques et pratiques aux essais biologiques au laboratoire lors de mon stage au Burkina-Faso. Je vous exprime toute ma profonde gratitude et ma parfaite reconnaissance.

- Au Professeur AKPLOGAN Barnabé, Maître de Conférences, Directeur de l'INJEPS pour m'avoir fait confiance et soutenu tout au long de mes recherches.

- A Monsieur ADJOVI Gilbert, Professeur Certifié d'Education Physique et Sportive, praticien de la médecine traditionnelle, pour votre collaboration et votre esprit d'ouverture. Merci pour nous avoir donné la recette de plantes pour traiter l'asthme.

- Au Dr SOME Noya, Dr LOMPO Marius, Dr MILLOGO/KONE Hassanata, Dr KINI Félix, Mr TISSOLOGO Issa tous chercheurs au Département MEPHATRA/PH de l'Institut de Recherche en Science de le Santé, Ouagadougou, Burkina Faso. Pour les encouragements, les conseils et les suggestions tant scientifiques que techniques pour la réalisation de ce travail. Je vous exprime toute ma gratitude pour la chaleureuse et franche collaboration.

-Au Dr TOSSOU S. Richard, pour vos précieux conseils en méthodes statistiques et en méthodologie de recherche.

-Au Dr GBAGUIDI Fernand, Chargé de recherches, pour votre soutien et conseils.

-Au Dr ATTAKPA Eugène, pour votre disponibilité et votre contribution dans la mise en forme du document final.

-Aux doctorants AKOUETE David, AGBODJOGBE Wilfrid et AGBODJOGBE Basile

pour votre esprit d'équipe et vos soutiens d'encouragement. Nous resterons cette étoile qui brillera pour toujours.

-A tous les étudiants chercheurs du Laboratoire de Physiologie de l'Effort de l'INJEPS.

-A tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

GRATITUDE A LA CONFEJES

Nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance **au Secrétaire Général de la Conférence des Ministres de la Jeunesse et des Sports des Pays et Gouvernements ayant le français en partage (CONFEJES)**, en la personne de Monsieur **Youssef Fall**, pour son soutien financier dans la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici nos plus sincères, notre remerciement et profonde gratitude.

LISTE DES ABREVIATIONS

- Ach** : Acetylcholine
AIE : Asthme induit par l'exercice
Atr : Atropine
ATS : American Thoracic Society
BIE : Bronchospasme induit par l'exercice
CONFESJES : Conférences des Ministres de la Jeunesse et du Sport des Pays et Gouvernements ayant le français en partage
CPR: C-reactive protein
CV : Capacité Vitale
CVEX : Capacité Vitale expiratoire
CVF : Capacité Vitale Fonctionnelle
CVF : Capacité Vitale Forcée
CVIN: Capacité Vitale inspiratoire
DAG: diacylglycérol
DEM25 : Débit expiratoire maximal à 25% de la CVF
DEM50 : Débit expiratoire maximal à 50% de la CVF
DEM75 : Débit expiratoire maximal à 75% de la CVF
DEMM25-75 : Débit expiratoire maximal moyen entre 25% et 75% de la CVF
DEP : Débit expiratoire de pointe
ERS : European Respiratory Society
G1: groupe ayant reçu l'eau tiède
G2: groupe ayant reçu *Aframomum melegueta* seul
G3: groupe ayant reçu *Aframomum melegueta*- *Citrus aurantifolia*
HRB : Hyperréactivité bronchique
IgE : Immunoglobulines
IMC: Indice de Masse Corporelle
INJEPS: Institut National de la Jeunesse de l'Education Physique et du Sport
IP₃ : inositol 1, 4,5 triphosphate
IRSS : Institut de Recherche en Sciences de la Santé
LAPEF : Laboratoire de Physiologie de l'Effort
LAPHE : Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles

MC: Masse Corporelle
MEPHATRA/PH : Médecine-Pharmacopée Traditionnelles et Pharmacie
MT : Médecine Traditionnelle
N: Effectif
NANC: NonAdrénérgique Non Cholinergique
NANCe : Non Adrénergique Non Cholinergique excitateur
NANCi : Non Adrénergique Non Cholinergique inhibiteur
NKA : Neurokinine A
PDG : Prostaglandine
PLC: Phospholipase C
PMA : Puissance maximale aérobie
SLVA: Structures lisses des voies respiratoires
T: Taille
TVO: trouble ventilatoire obstructif
VA : Voies Aériennes
VEMS : Volume expiratoire maximal seconde
VEMS/CV : Rapport de Tiffeneau
VMM : Ventilation maximale minute
 $\dot{V}O_2$: Consommation d'oxygène
 $\dot{V}O_{2max}$: Consommation maximale d'oxygène
VT : Volume courant
 μ L : Microlitre

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Echelle OMS de toxicité aiguë des produits chimiques (2002).....	59
Tableau II : Echelle de toxicité aiguë de Hodge et Sterner., (1943).....	60
Tableau III: Groupes chimiques mis en évidence dans les extraits aqueux de <i>Sterculia setigera</i> et du mélange <i>Aframomum melegueta</i> - <i>Citrus aurantifolia</i>	80
Tableau IV: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Aframomum melegueta</i> et de <i>Citrus aurantifolia</i>	81
Tableau V: Evolution du pourcentage de mortalité en fonction de la dose 2 heures après administration en IP de l'extrait aqueux de <i>Sterculia setigera</i> Del.....	85
Tableau VI: Evolution du pourcentage de mortalité corrigé selon le programme informatique PCS et leur probit, 2 heures après administration de l'extrait aqueux de <i>Sterculia setigera</i> Del.....	87
Tableau VII: Evolution du pourcentage de mortalité en fonction de la dose 2 heures après administration de l'extrait aqueux du mélange <i>Aframomum melegueta</i> - <i>citrus aurantifolia</i> ..	88
Tableau VIII: Evolution du pourcentage de mortalité corrigé selon le programme informatique PCS et leur probit 2 heures après administration de l'extrait aqueux <i>Aframomum melegueta</i> K. Schum - <i>citrus aurantifolia</i>	90
Tableau IX: Valeurs des DL50 en 2h (i.p.), des Indices de Sécurité et classification sur l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943) des extraits.....	90
Tableau X : Valeurs des CL ₅₀ des extraits aqueux.....	94
Tableau XI : Caractéristiques anthropométriques des sujets étudiés selon le type de traitement.....	104
Tableau XII: Valeur moyenne du VEMS et du pourcentage de diminution au cours du traitement.....	105

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La radiographie de face de la cage thoracique permettant d'apprécier les phases de la respiration (West, 2003).....	10
Figure 2 : Eléments de base du système du contrôle respiratoire. L'information provenant des différents capteurs alimentent le contrôleur central: le signal de sortie de celui-ci se rend aux muscles respiratoires et leur fait modifier la ventilation: cette ventilation annule les perturbations qui ont agi sur les capteurs. On a ainsi une boucle de rétroaction négative (West, 2003).....	11
Figure 3 : Histologie de l'épithélium respiratoire. Immunothérapie spécifique: mécanismes et conséquences thérapeutiques futures. Revue de Respir N° 28 (Avril 2010, Service de Pneumologie, CHRU Strasbourg).....	20
Figure 4 : Représentation schématique des différents évènements qui conduisent à la toux, à la formation du mucus et au BIE (Anderson et Holzer, 2000).....	21
Figure 5 : Système nerveux autonome du muscle lisse bronchique (Barnes, 1992).....	27
Figure 6 : Les différentes réponses de la cellule musculaire lisse (CML) des voies aériennes (Mark et al., 2004).....	30
Figure 7 : Plante de <i>Aframomum melegueta</i>	38
Figure 8 : Gousse sèche de <i>Aframomum melegueta</i>	39
Figure 9 : Graines de <i>Aframomum melegueta</i>	39
Figure 10 : Fruits de <i>Citrus aurantifolia</i> sur arbre.....	41
Figure 11 : Fruit de <i>Citrus aurantifolia</i> coupé en morceaux.....	42
Figure 12 : Feuilles de <i>Sterculia setigera</i> sur arbre.....	43
Figure 13 : Tapis roulant.....	54
Figure 14 : Dispositif utilisé pour l'exploration ventilatoire	54
Figure 15 : Dispositif d'extraction de type Clavenger.....	57

Figure 16: Dispositif expérimental pour les études sur organes isolés (MEPHATRA/PH/IRSS/Burkina Faso., 2010).....	65
Figure 17 : Photo du dispositif de BHATT, (1977).....	67
Figure 18: Photographie du dispositif expérimental pour l'induction de la toux.....	69
Figure 19: Résumé schématique du protocole expérimental de la phase clinique.....	74
Figure 20: Courbe débit volume lors de la spirométrie.....	75
Figure 21: Méthode semi quantitative de dilutions successives en série géométrique de raison 2.....	76
Figure 22a: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Aframomum melegueta</i>	82
Figure 22b: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	82
Figure 23: Structure des composés chimiques majoritaires identifiés dans les huiles Essentielles.....	83
Figure 24 : Souris NMRI disséquée (Echelle 5/6).....	84
Figure 25: Droite de toxicité générale aiguë de l'extrait aqueux de <i>Sterculia setigera</i> Del chez les souris NMRI (voie ip).....	86
Figure 26: Droite de toxicité générale aiguë de l'extrait aqueux du mélange <i>Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia</i> chez les souris NMRI (voie ip).....	89
Figure 27 : Photos de : estomac, foie et cœur des souris témoins et traités aux deux extraits aqueux à 3000mg/kg des deux extraits aqueux (Echelle 5/6).....	92
Figure 28: Photos de : rate, poumons et reins des souris témoins et traités aux deux extraits aqueux à 3000mg/kg des deux extraits aqueux(Echelle 5/6).....	93
Figure 29 : Graphes comparatifs de la toxicité des extraits sur les larves de crevette.....	94
Figure 30: Enregistrement de l'effet du mélange <i>Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia</i> sur la contraction à l'acétylcholine ($10^{-5}M$) E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 E10, correspondent respectivement aux concentrations 3.10^{-2} , 10^{-1} , 3.10^{-1} , 6.10^{-1} , 1, 2, 3, 6, 10, 14 mg/mL de l'extrait aqueux du mélange <i>Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia</i>	95

Figure 31 : Effet de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-citrus aurantifolia* sur la contraction induite par l'Acétylcholine 10^{-5} M en absence (carré) et en présence du propranolol 10^{-6} M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type. (n : 5-7)...96

Figure 32: Effet de l'atropine sur la contraction à l'acétylcholine.....96

Figure 33 : Effet de l'extrait aqueux total du mélange *Aframomum melegueta -citrus aurantifolia* sur la contraction induite par l'Acétylcholine 10^{-5} M (carré) et le KCl 4.10^{-2} M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type (n:5-7).....97

Figure 34 : Enregistrement de l'effet de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* et du sur la contraction à l'acétylcholine.
E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 correspondent respectivement aux concentrations 3.10^{-2} , 10^{-1} , 3.10^{-1} ; 6.10^{-1} ; 1; 1,5; 2; 3, 6, 10mg/mL de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera*.....98

Figure 35 : Effet de l'extrait aqueux de S.s. sur la contraction induite par l'Acétylcholine 10^{-5} M (Point) et en présence du propranolol 10^{-6} M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type (n : 5-7)..... 98

Figure 36 : Effet de l'extrait aqueux de S.s. sur la contraction induite par l'Acétylcholine 10^{-5} M (carré) et le KCl 4.10^{-2} M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type (n : 5-7).....99

Figure 37: Courbes des taux d'inhibition de l'œdème, induit après les traitements, des pattes droites des cobayes..... 100

Figure 38: Histogrammes des durées de séjour des pattes gauches des cobayes dans l'eau à 50° C après les traitements.....101

Figure 39: Courbes de l'évolution des températures rectales des cobayes après induction de l'hyperthermie suivie des traitements.....101

Figure 40 : Histogramme des fréquences des contractions des intercostaux SS: *Sterculia setigera* Delile (*Sterculiaceae*), AMCA: mélange *Aframomum melegueta* K. Schum. (*Zingiberaceae*)+ *Citrus aurantifolia* Swingle (*Rutaceae*), N=6.....103

Figure 41 :Histogramme des taux d'inhibition des contractions des intercostaux SS: *Sterculia setigera* Delile (*Sterculiaceae*), AMCA: mélange *Aframomum melegueta* K. Schum. (*Zingiberaceae*)+ *Citrus aurantifolia* Swingle (*Rutaceae*), N=6.....103

Figure 42: Evolution du VEMS au cours de l'expérience.....106

Figure 43: Evolution du pourcentage de diminution pendant l'expérience.....106

Figure 44: Variation de la concentration sanguine de CRP.....108

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION-PROBLEMATIQUE-HYPOTHESES

L'asthme est une pathologie respiratoire dans laquelle, la plupart du temps, un sujet se sensibilise à des agents congénitaux prédisposants (facteurs héréditaires) ou à des agents extérieurs favorisants (allergènes, pollens, air inhalé, etc). Elle se caractérise par des difficultés respiratoires survenant par crises, variables dans le temps et qui sont réversibles spontanément ou sous l'effet d'un traitement (Advenier et *al.*, 1987). C'est un blocage respiratoire survenant par crises à la suite d'un rétrécissement des bronches lié à une hypersensibilité bronchique. Cette pathologie est définie comme " un problème clinique caractérisé par une réponse exagérée de la trachée et des bronches à une variété de stimuli " (Beasley et *al.*, 2000). Il se manifeste par une gêne respiratoire, une dyspnée, une hyperventilation, une respiration sifflante, une toux, etc...

C'est une affection classique observée généralement chez des sédentaires. L'exercice physique, sous certaines conditions, peut entraîner une crise dyspnéique ou paroxystique: on parle alors de bronchospasme induit par l'exercice ou BIE. Le rôle de l'exercice dans ce phénomène n'est toutefois pas facile à clarifier. En effet, il est difficile de préciser si l'exercice intervient en tant que révélateur ou bien en tant que facteur aggravant une maladie asthmatique latente ou patente. De cette difficulté, découle, sans doute, le double langage dans la terminologie actuellement utilisée: asthme induit par l'effort (AIE) lorsque l'exercice est révélateur d'un asthme patent; bronchospasme induit par l'exercice (BIE) lorsque l'exercice est à l'origine d'un asthme latent. Par ailleurs, la terminologie utilisée semble être liée à la nature des sujets, l'AIE étant plus utilisée chez les sujets non-sportifs et le BIE chez les sujets sportifs.

L'Asthme Induit par l'Effort (AIE) se caractérise par l'inhalation d'un grand volume d'air au cours des efforts physiques intenses et soutenus. On assiste alors à un bronchospasme résultant de la contraction et du rétrécissement des muscles lisses bronchiques, manifestations de l'asthme d'effort. Ce bronchospasme provoque la diminution du diamètre des voies aériennes augmentant une résistance transitoire des voies aériennes. Il entraîne des symptômes que sont l'apparition d'un souffle court, la toux, une respiration sifflante, quelques minutes après le début de l'effort.

D'après Weiler (1996), le diagnostic de l'AIE est fait sur une chute d'au moins 10 à 15 % du volume d'expiration maximal forcé en une seconde (VEMS). La survenue des difficultés respiratoires entraîne notamment des gênes qui ne permettent pas aux sportifs de bien mener à bout l'activité physique et diminuant ainsi leur performance.

La prévalence de l'AIE augmente malgré les traitements antiasthmatiques, médicamenteux de plus en plus performants (Nystad *et al.*, 2000). Un environnement agressif (pollution), une sédentarité et une obésité accrues, ou à l'inverse une activité physique exagérée, participent à cette augmentation de prévalence. Elle est estimée de 4 à 20% au niveau de la population occidentale générale (Wilber *et al.*, 2000) et de 11 à 55% au niveau de la population de sujets sportifs (Haby *et al.*, 1995; Rundell *et al.*, 2000 ; Medelli *et al.*, 2006). Une étude réalisée par Haby *et al.* (1995) a montré jusqu'à 40% d'AIE chez des enfants n'ayant aucun symptôme d'asthme. Selon les travaux de Kippelen *et al.* (2003), l'exposition prolongée à l'air froid et/ou sec, au même titre que l'hyperventilation dans un environnement chargé d'allergènes et/ou polluants, semblent jouer un rôle majeur dans le développement de cette affection respiratoire. Une étude réalisée en Afrique, par Ouatarara *et al.* (2004) chez des handballeuses ivoiriennes a estimé la prévalence de l'AIE à 14%. Chez des jeunes sud-africains, Terblanche *et al.* (1990) ont évalué la prévalence de l'AIE à 4,05% alors qu'une autre étude menée sur des jeunes kényans urbains par Ng'ang'a *et al.* (1997) a estimé la prévalence de l'AIE à 21,3%.

Au Bénin, Messan *et al.* (2008) ont exprimé la prévalence du BIE à 35% chez des basketteurs. Mètodakou (2008) a présenté une prévalence de 31% chez des enfants exposés à la pollution automobile. Une étude récente menée par Médjigbodo (2009) chez des étudiants de l'INJEPS révèle une prévalence du bronchospasme de 19%.

Il apparaît alors clairement que l'AIE constitue un problème pathologique très préoccupant dans les pays en développement.

Le traitement de l'AIE est fait par le salbutamol (VENTOLINE®) qui soulage la plupart du temps le sportif. Selon Jaci (2004), l'asthme est aujourd'hui une maladie qui se soigne très bien. Plus il est repéré tôt, plus les séquelles seront limitées.

Dans les pays en voie de développement, les problèmes du médicament se posent en terme d'insuffisances quantitative, qualitative et d'accessibilité économique (Zohoun et Flénon, 1997). Les conséquences sont la désertion ou la fréquentation tardive des formations sanitaires par les populations. Celles-ci, font souvent recours à la médecine traditionnelle.

En Afrique, la médecine traditionnelle fait partie intégrante du patrimoine culturel des populations, encore promu, solidement gardé en mémoire et observé à travers les comportements des uns et des autres. Près de 80% de la population l'utilise pour résoudre les problèmes de santé primaires. La plupart des pays africains l'ont mis à contribution pour leur besoin de santé en l'incluant dans leur système de santé (OMS, 2002).

Au Bénin, il est bien établi que le médicament reste un problème préoccupant surtout à cause de la faiblesse des ressources économiques des populations, limitant ainsi l'achat des produits pharmaceutiques. Plusieurs maladies sont traitées par la médecine traditionnelle ; au nombre de celles-ci, est cité l'asthme, répertorié dans les affections les plus fréquentes au Bénin (Zohoun et Flénon, 1997).

Pour les médicaments dits conventionnels, en plus de leur faible accessibilité, leur usage n'est pas encore rentré dans le réflexe des malades en zones rurales. Depuis plusieurs décennies, les populations africaines ont recours aux différentes plantes pour traiter les maladies et une large proportion de la population mondiale utilise des préparations à base de plantes dans le traitement des maladies (Marston *et al.*, 1993). A l'heure actuelle l'efficacité de plusieurs de ces plantes n'est plus à démontrer. La proximité et l'accessibilité des plantes, mais surtout leur efficacité dans les différents traitements par rapport aux produits pharmaceutiques constituent les raisons majeures qui sous-tendent notre étude.

Aux quatre coins du monde, décideurs politiques, professionnels de la santé et grand public s'interrogent sur l'innocuité, l'efficacité, la qualité, la disponibilité, la préservation et le développement futur de ce type de soins de santé (OMS 2002). C'est ainsi que dans le cadre de sa stratégie et plan d'action pour 2002-2005, l'OMS avait proposé d'aider les pays pauvres à :

- intégrer les aspects pertinents de la médecine traditionnelle dans les systèmes nationaux de soins de santé en formulant des politiques nationales en matière de médecine traditionnelle et en mettant en œuvre des programmes de sa mise en pratique;
- promouvoir l'innocuité, l'efficacité et la qualité des pratiques en médecine traditionnelle en donnant des orientations sur les normes en matière de réglementation et d'assurance qualité ;
- améliorer l'accès à la médecine traditionnelle et la rendre plus abordable, promouvoir l'usage rationnel de la médecine traditionnelle.

Par une approche pluridisciplinaire s'appuyant sur la socio-anthropologie, l'ethnobotanique et les interviews auprès des paysans, sages et praticiens de la médecine béninoise, nous avons identifié au Bénin, trois espèces végétales que sont *Aframomum melegueta* (N° AA6374/HNA), *Citrus aurantifolia* (N° AA6375/HNB) et *Sterculia setigera* (N° AA6376/HNB), connues pour leurs vertus médicinales

L'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* et celui de *Sterculia setigera* sont utilisés par la population, entre autres, dans le traitement de l'asthme.

Dans le milieu sportif où certains sportifs se trouvent confronter lors d'exercices intensifs à des difficultés ventilatoires, nous nous sommes donc posé la question de savoir si l'administration de ces extraits de plantes ne pourrait pas retarder ou réduire l'apparition du bronchospasme induit par l'exercice?

Pour répondre à cette question, les objectifs suivants sont fixés:

OBJECTIFS

Objectif Général

L'objectif général de cette étude est d'évaluer l'activité antiasthmatique des extraits aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* et de *Sterculia setigera* sur l'asthme induit par l'effort.

Objectifs spécifiques

- Effectuer des récoltes et préparer des extraits aqueux du mélange *Aframomum melegueta – Citrus aurentifolia* et de *Sterculia setigera*,
- Déterminer les grands groupes chimiques des extraits,
- Evaluer la toxicité des extraits, et déterminer les doses létales (DL₅₀) et les concentrations létales (CL₅₀) des extraits aqueux,
- Déterminer l'activité anti-inflammatoire, antitussive et bronchodilatatrice des extraits,
- Déterminer la prévalence de l'Asthme d'effort chez les sportifs,
- Evaluer l'effet des extraits sur quelques paramètres ventilatoires chez les sportifs,
- Déterminer l'effet des extraits aqueux sur le taux de la protéine C réactive (CRP) chez les sportifs.

Les hypothèses suivantes ont été formulées:

HYPOTHESES

- L'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* et celui de *Sterculia setigera* contiennent des composés chimiques actifs dont les propriétés biologiques pourraient être mises à profit dans le traitement de l'asthme.

- Les deux extraits possèdent des activités anti-inflammatoires et antitussives.
- Les deux extraits sont sans danger pour les doses efficaces.
- Les deux extraits aqueux ont un effet antiasthmatique sur la contraction des muscles lisses des voies respiratoires.
- L'administration de ces deux extraits de plantes repousse le seuil d'intensité où l'effort devient difficilement supportable par le sportif du fait des troubles respiratoires.
- L'administration de ces deux extraits de plantes réduit le taux de protéines C réactives chez les sportifs.

GENERALITES

I- RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA RESPIRATION

La respiration de l'homme est, au niveau de l'organisme, une ventilation pulmonaire. Au niveau tissulaire, c'est un échange nutritif de gaz entre un tissu liquide (le sang) et l'air pulmonaire (au niveau des poumons) ainsi que les gaz dissous dans la lymphe interstitielle (au niveau des tissus). Enfin, la respiration est encore l'utilisation ou le rejet de ces gaz nutritifs par chacune des cellules de l'organisme.

La respiration est une fonction qui, habituellement automatique, peut être conduite de façon contrôlée. Elle constitue une des interfaces entre activités spontanée ou volontaire.

La respiration représente également une interface entre l'intérieur et l'extérieur (son mouvement se déploie en profondeur mais reste visible de l'extérieur; l'air échangé circule entre un espace interne et l'espace extérieur). Elle est en interaction permanente avec les postures et les mobilités quotidiennes du corps et permet d'assurer une physiologie d'ordre cellulaire. C'est aussi une interface entre une action musculaire et le relâchement, entre tonicité et détente...etc.

I-1- LA MECANIQUE VENTILATOIRE

La fonction première du système ventilatoire est de renouveler de l'air alvéolaire. D'un point de vue mécanique, le fonctionnement de la ventilation est relativement simple. Il est nécessaire de générer une force d'origine musculaire suffisante pour vaincre les résistances qui s'opposent à l'écoulement des gaz puis de permettre à l'oxygène de l'air ambiant de pénétrer dans le sang veineux et au gaz carbonique d'en sortir (Préfaut, 1985). Les poumons et le thorax sont les deux éléments qui composent le système respiratoire. Le thorax est composé de deux parties : une partie osseuse qui forme la cage thoracique et une paroi musculo-aponévrotique.

L'ensemble des mouvements générés par une coordination d'activités musculaires constitue la ventilation pulmonaire.

L'air se déplace d'une région de haute pression vers une région de basse pression. Ce mouvement d'air s'effectue selon la résistance des conduits aériens liée aux pressions atmosphérique et alvéolaire. Entre chaque cycle respiratoire survient un équilibre des pressions qui empêche momentanément le mouvement de l'air. La ventilation est un processus entièrement mécanique entraînant des variations de volume, de pression et un écoulement des gaz.

La ventilation pulmonaire fait intervenir deux phases : l'inspiration et l'expiration.

I-1-1-L'inspiration

C'est un processus actif qui entraîne la contraction des muscles inspiratoires. Lors de l'inspiration, l'air entre dans les poumons via la cavité nasale puis la trachée et le dioxygène (O₂) contenu dans l'air passe à travers la paroi des alvéoles pulmonaires. Il se fixe alors dans les capillaires sanguins directement sur les globules rouges (hématies) et à l'inverse, le CO₂ dissous dans le plasma sanguin passe dans le sens inverse du sang vers l'air pulmonaire pour être expulsé par l'expiration (West, 2003).

Le sang alors oxygéné est ainsi transporté dans l'ensemble du corps (organes puis cellules) par les artères grâce à la circulation sanguine. Au niveau des cellules, il se produit la respiration cellulaire où l'O₂ est consommé et le CO₂ produit est rejeté à l'extérieur.

La phase inspiratoire est donc une phase active de pompage de l'air par les poumons. Elle met en jeu la contraction de muscles intercostaux et surtout du diaphragme sous l'influence du nerf phrénique. Ce qui fait que la coupole diaphragmatique s'abaisse, refoulant les organes de l'abdomen vers le bas pour induire une augmentation du volume des poumons. Les muscles intercostaux externes se contractent pour entraîner le thorax vers le haut et vers l'avant. En augmentant de volume, la paroi du thorax s'écarte de la surface du poumon pour provoquer une diminution de la pression intra pleurale. Cette baisse permet une augmentation de la pression transpulmonaire. La dilatation des poumons est responsable d'une augmentation de la taille des alvéoles pulmonaires et de la baisse de la pression alvéolaire. La pression atmosphérique devient alors supérieure et favorise donc l'entrée d'air dans les poumons (**Figure 1**). A la fin de cette phase, il y a un nouvel équilibre qui s'établit entre les deux pressions. Il n'y a plus de mouvement d'air.

I-1-2-L'expiration

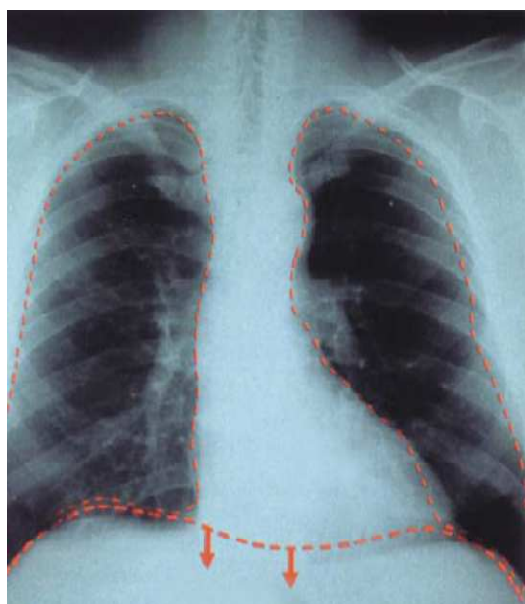
La phase expiratoire met en jeu un relâchement des muscles intercostaux et l'air est chassé des poumons. Le CO₂ produit est dissous dans le plasma sanguin et réacheminé vers les poumons par la circulation sanguine veineuse pour être expulsé.

C'est un mécanisme passif qui ne nécessite pas comme l'inspiration une force musculaire lorsque l'individu est au repos, en position de décubitus dorsal. La force musculaire que génère l'expiration correspond au retour élastique du système respiratoire vers sa position d'équilibre. Ces forces ont pour but de ramener le système à un volume plus petit avec une force d'autant plus importante que le volume pulmonaire aura été augmenté lors de

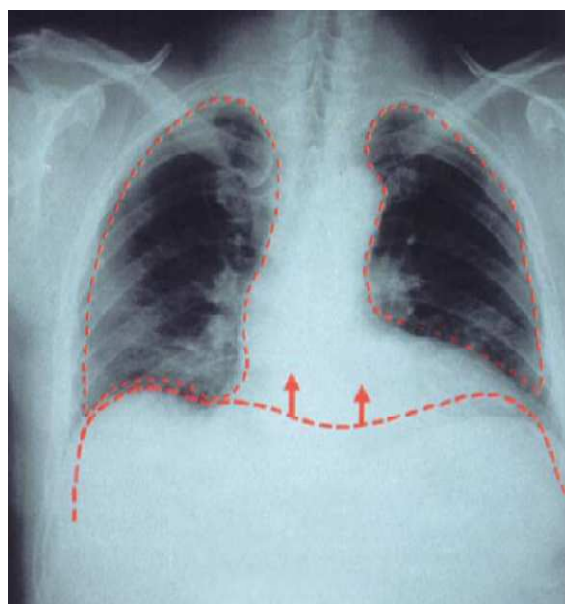
l'inspiration. Les forces résistantes à l'expiration sont représentées par les voies aériennes et l'inertie du système.

Ainsi, lorsque les neurones inspiratoires ne déchargent plus, le retour élastique du système va entraîner une diminution du volume pulmonaire et une augmentation de la pression intra pulmonaire. Cette dernière deviendra supérieure à la pression atmosphérique et l'air sortira des poumons (West, 2003). Cependant, dans des conditions non physiologiques, comme l'exercice physique, les volumes d'air sont beaucoup plus importants.

Un simple phénomène passif n'est plus suffisant, d'autant plus que la pression intra pleurale peut descendre à -30 mmHg pendant l'exercice. La réduction du volume des poumons dépend alors d'un phénomène actif de contraction des muscles abdominaux et intercostaux internes (Figure 1).



INSPIRATION



EXPIRATION

Figure 1 : La radiographie de face de la cage thoracique permettant d'apprécier les phases de la respiration (West, 2003).

I-2- LA REGULATION DE LA VENTILATION PULMONAIRE

Le renouvellement continu et régulier de l'air alvéolaire confère à la ventilation pulmonaire un caractère rythmique. Des cycles respiratoires se succèdent périodiquement et présentent alternativement une phase inspiratoire et une phase expiratoire dans lesquelles les muscles respiratoires se contractent et se relâchent. Le maintien d'une ventilation pulmonaire implique

donc l'excitation cyclique des muscles respiratoires par leur nerf moteur. Ce contrôle nerveux, organisé en boucle de rétroaction négative (**Figure 2**), trouve son origine dans des réseaux de neurones situés dans le tronc cérébral: ce sont les centres respiratoires.

Le cortex cérébral peut dominer l'activité de ces centres lorsqu'un contrôle volontaire est nécessaire. Les centres respiratoires reçoivent et intègrent des informations provenant de différents capteurs et, en retour, envoient des impulsions aux muscles respiratoires.

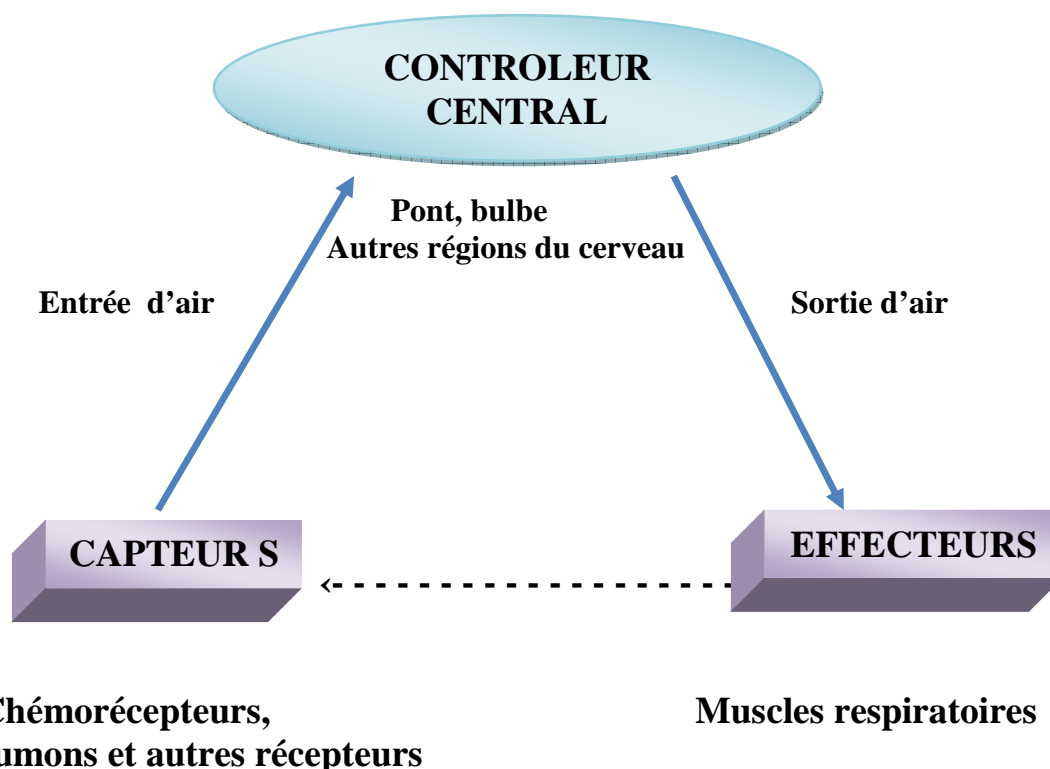


Figure 2 : Eléments de base du système du contrôle respiratoire. L'information provenant des différents capteurs alimente le contrôleur central: le signal de sortie de celui-ci se rend aux muscles respiratoires et leur fait modifier la ventilation: cette ventilation annule les perturbations qui ont agi sur les capteurs. On a ainsi une boucle de rétroaction négative (West, 2003).

I-3- L'EXPLORATION FONCTIONNELLE RESPIRATOIRE

L'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) permet de mesurer les volumes et les débits pulmonaires caractéristiques de la respiration. Elle est un outil indispensable dans le dépistage et la surveillance d'anomalie de la fonction ventilatoire (Perdrix et Maître, 2001).

I-3-1- Mesure des volumes pulmonaires

La mesure des volumes pulmonaires qu'un individu peut mobiliser, se réalise au cours d'un examen spirométrique. La respiration de repos, encore appelée volume courant (le volume d'air inspiré ou expiré au cours d'un cycle ventilatoire normal) est un volume dynamique variable selon l'intensité d'un exercice et la position dans laquelle la mesure est réalisée (debout ou assise). En pratique, l'évolution de ce volume en fonction du temps permet d'obtenir la courbe volume-temps. En ramenant le volume à l'unité de temps, on obtient un débit moyen. Les modifications du volume courant se situent entre deux positions définissant la capacité vitale (CV). La capacité vitale correspond au volume maximal qu'un sujet peut mobiliser. Elle représente donc la variation de volume enregistrée entre les positions d'inspiration complète et d'expiration complète.

En spirométrie lente, la mesure de ce volume peut se faire de plusieurs manières. Après avoir vidé au maximum ses poumons, le sujet réalise une inspiration lente et complète. La mesure obtenue correspond à la capacité vitale inspiratoire (CV_{IN}). La manœuvre inverse peut être également réalisée et l'on obtient la mesure de la capacité vitale expiratoire (CV_{EX}). Trois essais sont habituellement nécessaires pour déterminer la CV dans la mesure où deux d'entre elles sont reproductibles à 5% (Préfaut, 1985). La CV peut être également mesurée au cours d'une manœuvre forcée. Cette capacité vitale forcée (CVF) correspond au volume d'air expiré, de la position d'inspiration complète à celle d'expiration complète. Le volume d'air maximum expiré à la première seconde lors de la CVF est appelé Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS). L'index reflétant le degré d'obstruction est le rapport VEMS sur CV appelé rapport de Tiffeneau (Tiffeneau et Pinelli, 1948). En milieu clinique, le VEMS et le rapport VEMS/CV sont révélateurs de trouble ventilatoire obstructif ou d'asthme, s'ils sont respectivement inférieurs à 80% et 70% de leurs valeurs théoriques.

I-3-2- Mesure des débits pulmonaires

Par convention, les débits pulmonaires moyens sont mesurés lors d'une manœuvre d'expiration forcée. Il est demandé au sujet de gonfler son thorax au maximum puis de vider ses poumons le plus rapidement de manière continue et complète. Les débits maximaux instantanés peuvent être mesurés sur tous les points de la courbe, mais par convention, quatre sont retenus : le débit expiratoire de pointe (DEP) et les débits à 75, 50, 25% de la capacité vitale (Fry et Hyatt, 1960). Le DEP reflète le diamètre des voies aériennes centrales et la force exercée par les muscles expiratoires. Il diminue dans les troubles ventilatoires obstructifs et

restrictifs. Les DEM50% et DEM25% et DEMM25%-75% permettent d'explorer les petites voies aériennes.

En règle générale, lorsque surviennent des difficultés respiratoires comme le bronchospasme ou l'asthme, le diagnostic se fonde sur les valeurs enregistrées des volumes et débits pulmonaires pour explorer les voies aériennes centrales et périphériques.

II- ASTHME ET BRONCHOSPASME INDUIT PAR EFFORT

Asthme induit par l'exercice (AIE) et bronchospasme induit par l'exercice (BIE) sont des termes que l'on utilise pour décrire un même phénomène physiopathologique en fonction de la nature des sujets et des circonstances de mise en évidence. Cependant, ces deux termes ne sont pas toujours interchangeables, d'où l'importance de les clarifier.

II-1-DEFINITIONS

II-1-1- Asthme

L'asthme est un processus inflammatoire qui entraîne un déficit ventilatoire réversible, s'expliquant par une augmentation de la résistance à l'entrée de l'air. C'est un syndrome multifactoriel caractérisé par une dyspnée sifflante paroxystique à recrudescence nocturne. Selon Sheffer (1991) : « L'asthme est un désordre inflammatoire des voies aériennes, cette inflammation est secondaire à un infiltrat inflammatoire polymorphe, comprenant notamment des mastocytes et des éosinophiles. Sur le plan fonctionnel, c'est un trouble obstructif expiratoire réversible. Sur le plan anatomique, c'est une inflammation bronchique chronique avec œdème, bronchospasme et hypersécrétion bronchique. D'où les termes associés à cette pathologie, HRB: hyperréactivité bronchique et TVO: trouble ventilatoire obstructif.

L'asthme touche tous les groupes d'âges mais se déclare souvent pendant l'enfance (Pinet et al., 2002).

II-1-2- Asthme induit par exercice (AIE)

L'Asthme induit par exercice (AIE) désigne un rétrécissement aigu et transitoire des voies aériennes qui survient le plus souvent chez les sportifs ayant un antécédent d'asthme, au terme de l'effort. Selon Berube (1991) et Karila (2001), l'AIE est une obstruction aiguë des voies aériennes qui se traduit au plan fonctionnel par une diminution de 15% et plus du volume expiratoire maximum par seconde (VEMS). Si ce pourcentage du VEMS s'accroît, on

qualifie l'AIE de léger (15 à 20%), de modéré (20 et 40%,) ou de grave (40% et plus). Mais d'autres études plus récentes ont permis de retenir une chute du VEMS d'au moins 10% dans leur majorité pour évaluer l'AIE (Mannix et *al.*, 1996; Leuppi et *al.*, 1998; Wilber et *al.*, 2000; Rundell et *al.*, 2003; Rundell et *al.*, 2004; Durand et *al.*, 2005 ; de Souza et Pereira, 2005).

Pour Weiler (1996), près de 90% des asthmatiques sont susceptibles de présenter un AIE et ce dernier peut constituer un révélateur de l'asthme chez 14% des sportifs sains.

II-1-3- Bronchospasme induit par l'exercice

Le terme Bronchospasme induit par exercice (BIE) désigne un rétrécissement aigu et transitoire des voies aériennes (VA) qui survient le plus souvent chez les sportifs non asthmatique, au terme de l'effort (entraînements et compétitions). Tous les individus qui démontrent quantitativement le BIE post exercice par une baisse de la fonction pulmonaire sont asthmatiques à un degré donné.

II-2- CAUSES

De nombreux facteurs sont nécessaires ou favorables à la survenue d'un AIE :

II-2-1- L'intensité de l'effort

Le niveau élevé du débit ventilatoire est l'élément essentiel, obligeant à respirer par la bouche et permettant de faire progresser vers les régions profondes du poumon de nombreuses particules allergéniques ou des molécules irritantes (polluants, chlore des piscines...).

II-2-2- Le nombre et la taille des bronches déshydratées

Si les petites voies aériennes sont très déshydratées, l'AIE survient dans les 5 à 10 minutes, même chez un sujet non asthmatique. Plus la taille des voies aériennes concernées par la déshydratation est petite, plus l'AIE est grave.

II-2-3- La durée de l'exercice

Les efforts de courte durée (1 à 2 minutes) ne sont pas suffisamment longs pour déshydrater les voies aériennes au delà de la 10^{ème} génération, même si le débit ventilatoire est élevé.

C'est ce qui explique la bonne tolérance de l'enfant asthmatique aux efforts anaérobies (sprints par exemple). L'AIE se révèle lors d'effort intense et prolongé (Karila, 2001).

II-2-4- La respiration buccale

Elle est rendue obligatoire par le débit d'air inspiré trop élevé pour l'étroitesse des voies nasales. Cette respiration court-circuite une muqueuse nasale très vascularisée où le réchauffement et l'humidification de l'air seraient facilités.

II-2-5- Les caractéristiques de l'air inspiré

Un faible degré d'hygrométrie (air sec) et une température basse (air froid) contribuent à renforcer l'AIE des sportifs (Karila, 2001).

II-3- HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE

L'hyperréactivité bronchique se définit comme une tendance du muscle lisse de l'arbre bronchique à se contracter plus intensément, en réponse à un stimulus donné par rapport à la réponse obtenue chez des individus normaux. Cette condition est présente chez tous les patients asthmatiques. La manifestation la plus importante de cette contraction musculaire est une diminution du calibre des voies aériennes qui peut être aisément mesuré au laboratoire par le test de fonction pulmonaire. Snashall et Pauwels (1987) définissent l'hyperréactivité comme étant un état de sensibilité anormale de l'arbre trachéobronchique vis à vis d'une grande diversité de stimuli tels que les médicaments agonistes, des substances chimiques irritantes, l'osmolarité ou l'air froid. La principale réponse des bronches est la broncho constriction aiguë. Selon De Vries et *al.* (1991), le terme hyperréactivité bronchique, du point de vue clinique, fait simplement référence au fait que certains malades réagissent par une obstruction bronchique quand ils sont exposés à des stimuli non allergiques de faible intensité, qui ne causent pas de semblable réponse chez les sujets normaux. Plus tard, Woolcock (1993), propose qu'il y a hyperréactivité bronchique lorsque la lumière des bronches hyper réactives diminue trop et facilement en réponse à des facteurs stimulants.

Considérée de nos jours comme étant une caractéristique fondamentale et complexe de l'asthme, l'hyperréactivité bronchique est la réponse des bronches à une obstruction ou inflammation suite à l'inhalation de médiateurs chimiques et/ou allergiques, d'air froid et sec, de médicaments ou après un exercice physique. L'obstruction ou l'inflammation bronchique

s'objective par la diminution ou la chute du VEMS d'au moins 10% par rapport à la valeur de repos (Durand *et al.*, 2005).

II-4 - INFLAMMATION BRONCHIQUE

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères.

Les causes de l'inflammation sont nombreuses et variées: agent infectieux, substance étrangère inerte, agent physique, lésion cyto-tissulaire post-traumatique (Connell *et al.*, 2000).

L'inflammation commence par une réaction de « reconnaissance » faisant intervenir le système immunitaire ou des protéines circulantes (anticorps, protéines du complément, facteur de Hageman...). Le système immunitaire assure les mécanismes de défense de l'organisme contre les différentes agressions, afin de protéger l'intégrité du milieu grâce à la réponse immunitaire.

L'organisme possède un remarquable potentiel de défense. Il peut déclencher des opérations complexes contre des microorganismes et de nombreuses substances étrangères. Les cellules (monocytes, macrophages, lymphocytes...) responsables de la mise en branle de la réponse immunitaire doivent non seulement reconnaître ce qui est propre à l'organisme, mais encore identifier les macromolécules étrangères à l'organisme. Elles se mettent alors en action pour le détruire ou le neutraliser et ainsi préserver l'homéostasie.

A la phase de reconnaissance, fait suite, à la mise en jeu séquentielle de tout un ensemble de cellules et de médiateurs dont l'ordre d'intervention est complexe et variable. Certains médiateurs, comme les prostaglandines et les cytokines, agissent sur plusieurs types cellulaires et contrôlent parfois leur propre production par régulation rétroactive. Dans le cas de l'AIE, l'inflammation bronchique est la réponse des cellules musculaires lisses à une agression. Cette réponse fait intervenir des phénomènes d'immunité, c'est à dire de résistance aux agressions.

L'inflammation des voies aériennes est un facteur clé de l'hyperréactivité provoquant l'obstruction bronchique. Un ensemble d'éléments intervient dans la réponse inflammatoire

selon la nature des stimuli. Dans les situations extrêmes, ce sont les éosinophiles qui jouent un rôle clé en libérant des médiateurs pro inflammatoires et cytotoxiques, des cytokines. Il en résulte un œdème, une hypersécrétion de mucus, une broncho constriction, une desquamation des cellules épithéliales et une hyperréactivité bronchique. Cependant, la plupart des cellules

présentes dans les voies aériennes comme les cellules T, les mastocytes, les macrophages, les cellules épithéliales, les fibroblastes et même les cellules musculaires lisses bronchiques sont impliquées. La composante vasculaire est à l'origine de l'œdème (Commodaro, 2010) et fait intervenir plusieurs médiateurs que sont :

L'éosinophile : c'est une des cellules-clé de l'inflammation bronchique. Il agit par l'intermédiaire de nombreux médiateurs cytotoxiques et broncho constricteurs. L'éosinophilie sanguine et alvéolaire est corrélée à la sévérité de l'asthme.

Les lymphocytes B : ils sécrètent des substances chimiques appelées anticorps, qui détruisent les germes toxiques. Lorsque des microbes envahissent l'organisme, les lymphocytes commencent à se multiplier et forment des cellules plasmiques. Chaque cellule plasmique peut produire une grande quantité d'anticorps (Alexandre et *al.*, 2007).

Les lymphocytes T4 : ils sont prédominants et leur action pro inflammatoire se fait par l'intermédiaire de cytokines.

Les cytokines : ce sont des glycoprotéines régulatrices qui ont pour but d'induire, de contrôler ou d'inhiber l'intensité et la durée de la réponse immunitaire, ainsi que les mécanismes d'hématopoïèse, certaines différenciations et proliférations tissulaires (Guillaume, 2006).

Les macrophages : habituellement alvéolaires, ils deviennent bronchiques et agissent par le biais de médiateurs et de cytokines. Ils possèdent des récepteurs pour l'immunoglobuline E et pourraient intervenir dans la présentation de l'antigène.

Les mastocytes : ils jouent le rôle de starter dans la réaction allergique immédiate. Ces cellules agissent en cascade et en synergie avec activation première des cellules présentes dans l'épithélium bronchique.

Plus de 50 médiateurs ont été recensés, jouant le rôle de recruteurs et d'amplificateurs de la réponse inflammatoire. Les conséquences de l'inflammation sont:

- la destruction des couches cellulaires superficielles dénudant la membrane basale,
- une augmentation de l'épaisseur de la membrane basale par une fibrose sous-épithéliale,

- une augmentation par régénération des cellules caliciformes qui participent à l'hypersécrétion.

II-5- EPITHELIUM BRONCHIQUE

L'épithélium bronchique constitue une barrière physique séparant l'environnement extérieur des structures pulmonaires. Le maintien de l'intégrité épithéliale constitue un élément important des mécanismes de défense du système respiratoire.

Dans des situations normales, l'épithélium des voies aériennes suite, à des lésions, est capable de réparation rapide (Erjefalt et *al.*, 1997). L'épithélium des voies aériennes est multi stratifié. Il est constitué d'une couche de cellules basales, de cellules ciliées et sécrétrices de mucus (**Figure 3**). Les cellules basales sont fermement attachées à la membrane basale sous-jacente alors que les cellules ciliées et sécrétrices le sont beaucoup moins.

Les cellules ciliées sont les plus abondantes. Ces cellules ciliées jouent un rôle fondamental dans l'épuration pulmonaire en assurant la clairance muco-ciliaire. Les cils (200-300/cellule) se situent au pôle apical, mesurent (5-7 mm de long, 0.25mm de diamètre), et battent à une fréquence régulière de 10 à 20 battements par seconde. Entre les cils existent quelques microvillosités.

Les cellules caliciformes (1 pour environ 5 cellules ciliées) ont un noyau refoulé vers la base par des vacuoles supra nucléaires contenant du mucigène qui participe, avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses à la formation du mucus. Celui-ci permet d'emprisonner les impuretés de l'air inspiré et d'absorber certains gaz (SO₂, ozone...) et possède des propriétés rhéologiques et anti-bactériennes. Il se compose à 95 % d'eau et d'électrolytes, 2 % de mucines, 1 % de protéines, 1 % de lipides, 1 % de sels inorganiques. Les cellules ciliées persistent dans les bronches de petit calibre au delà des cellules caliciformes. Le nombre de cellules caliciformes augmente avec celui des impuretés dans l'air inspiré. Le nouveau-né en est dépourvu. A l'opposé, il existe une hyperplasie des cellules caliciformes chez les fumeurs. Les cellules basales sont des petites cellules situées dans la partie profonde de l'épithélium contre la membrane basale. Elles sont très importantes dans le renouvellement cellulaire (cellule de réserve) car elles sont capables de remplacer n'importe quel autre type de cellule bronchique.

Les cellules neuroendocrines sont minoritaires (3 à 5 % des cellules épithéliales, visibles en microscopie électronique ou sur coupe histologique après un immunomarquage à l'aide de marqueurs neuro-endocrines. Ces cellules se regroupent pour former des corps neuro-

épithéliaux : chémorécepteurs capables de détecter les variations de teneur en O₂ ou CO₂ de l'air.

Ainsi, lors d'une agression, ce sont les cellules des couches supérieures (ciliées et sécrétrices) qui se détachent. Cette atteinte sélective des cellules ciliées et sécrétrices de mucus est très nette chez les asthmatiques. L'élimination bronchique de substances exogènes va être compromise chez les patients asthmatiques. Les cellules ciliées et sécrétrices de mucus étant des acteurs essentiels de l'épuration mucociliaire. Dans le cas de lésion complète de l'épithélium, la réparation est initiée à partir des cellules mésenchymateuses de la membrane basale qui se différencient en cellules épithéliales et migrent pour couvrir les zones dénudées de la membrane basale (Erjefalt et *al.*, 1997). Lorsque la membrane basale est complètement couverte par une couche de cellules épithéliales, la structure normale de l'épithélium se reconstitue par des processus de prolifération et de différenciation cellulaires.

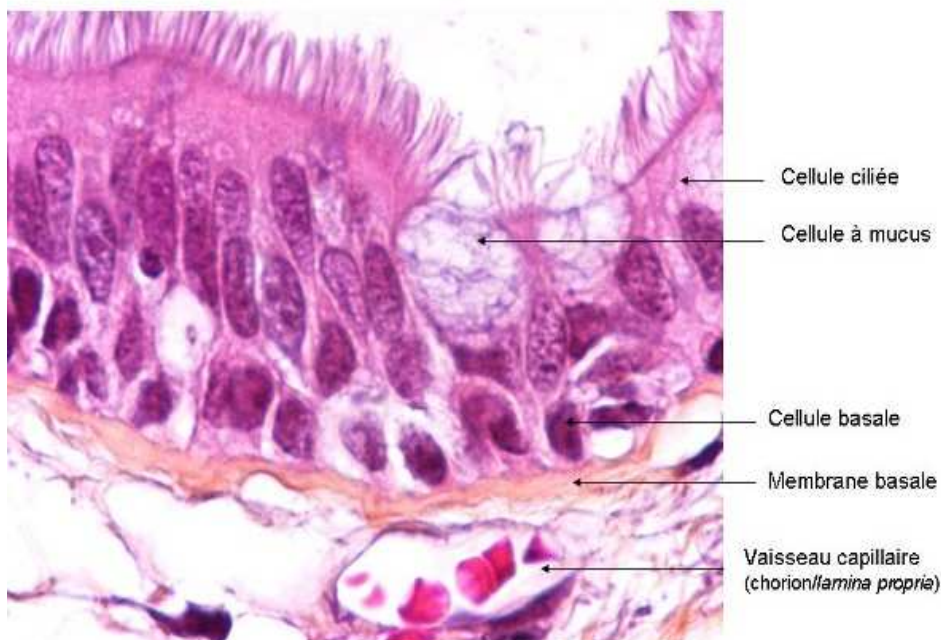


Figure 3 : Histologie de l'épithélium respiratoire. Immunothérapie spécifique: mécanismes et conséquences thérapeutiques futures. Revue de Respir N° 28 (Avril 2010, Service de Pneumologie, CHRU Strasbourg)

III- PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AIE

Il est admis actuellement que le stimulus responsable de l'apparition de l'asthme lié à l'effort est la perte de chaleur au niveau des voies aériennes (Lockhart et *al.*, 1985). La physiopathologie actuelle de l'AIE est une synthèse des différentes théories qui se sont

succédées depuis les années 70. Il s'agit de la théorie thermique, osmotique et inflammatoire (Anderson et *al.*, 2000).

III-1- THEORIE DE LA PERTE D'EAU

L'air qui pénètre dans les bronches est réchauffé (à la température corporelle) et humidifié avant d'atteindre la délicate membrane des alvéoles. Cette humidification se fait au dépend du liquide périciliaire, puis de l'eau intracellulaire des cellules épithéliales. Pour ce faire, c'est la quantité de chaleur dégagée par les liquides des surfaces des voies aériennes supérieures qui servira à réchauffer et à saturer la quantité d'air initiale (Deal et *al.*, 1979). Lorsqu'on fait de l'exercice, la quantité d'air qui entre dans nos voies respiratoires augmente substantiellement. Il faut donc de plus en plus d'eau pour humidifier cet air.

Après quelques minutes d'exercice, les pertes d'eau au niveau de l'épithélium des bronches deviennent si importantes qu'elles provoquent un assèchement des bronches. Il se produit alors une libération de substances (médiateurs chimiques) qui provoquent la constriction des bronches (**Figure 4**).

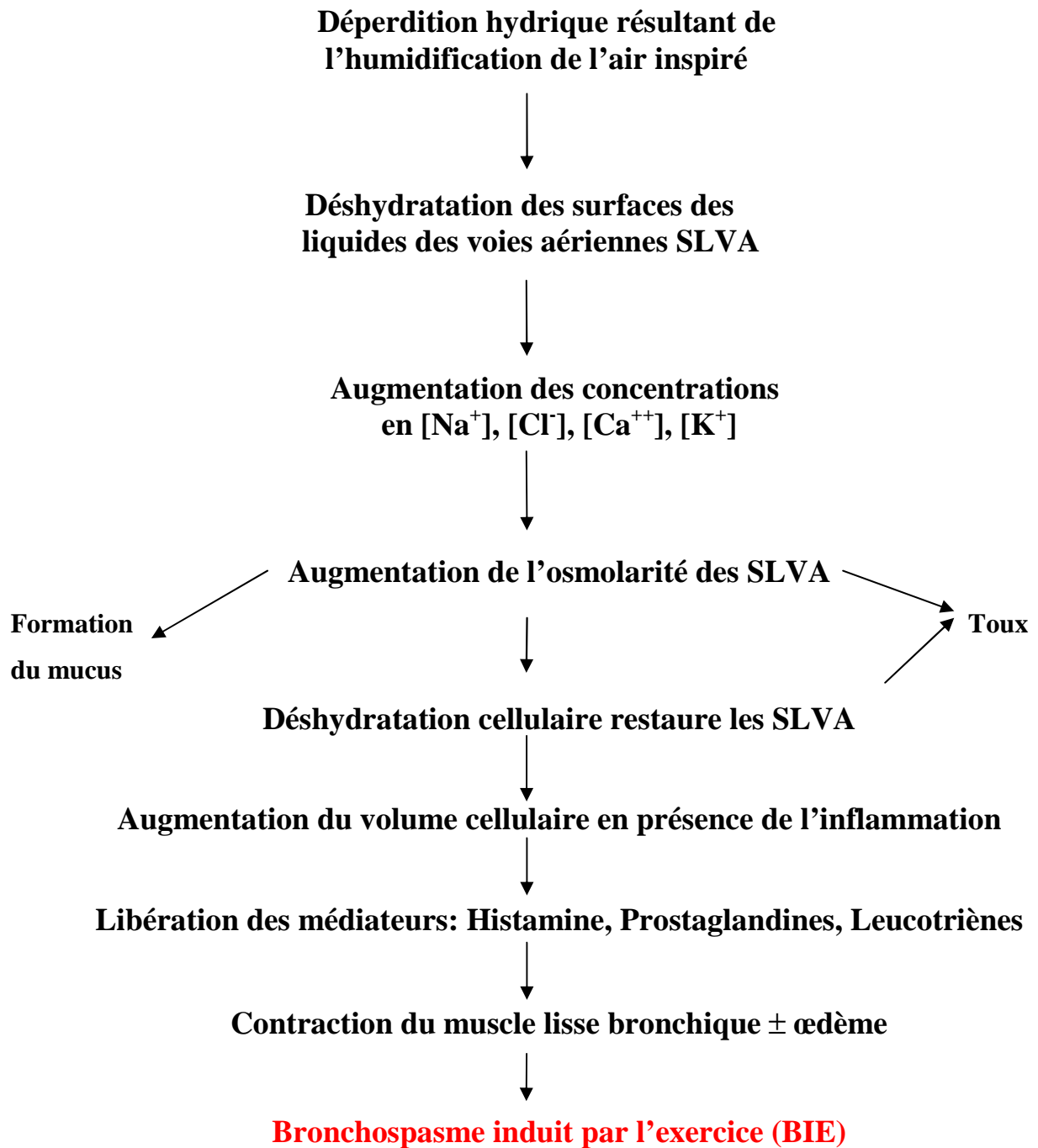


Figure 4: Représentation schématique des différents évènements qui conduisent à la toux, à la formation du mucus et au BIE (Anderson et Holzer, 2000)

III-2- THEORIE DU REFROIDISSEMENT ET DU RECHAUFFEMENT DES VOIES AERIENNES

En 1986, les tenants de la théorie du «refroidissement des voies aériennes» procédaient à une révision de la théorie développée par les études de Deal et al (1979) et de Fadden (1990). L'idée de base ayant nécessité cette révision considérait la théorie du «refroidissement des voies aériennes» comme n'étant pas capable de produire seule, le rétrécissement des bronches. Selon certains auteurs, le réchauffement rapide des voies aériennes qui survient au terme des exercices jouerait un important rôle dans l'avènement de l'obstruction bronchique. L'augmentation de la quantité d'air circulant dans les voies respiratoires jumelée à la nécessité de réchauffer l'air avant qu'il n'atteigne les alvéoles a pour effet de refroidir de façon marquée la paroi interne des bronches. Cependant, une fois l'exercice terminé, la dilatation importante des vaisseaux sanguins amène un flot de sang qui réchauffe alors rapidement la muqueuse des bronches. Cette valse des températures (chaud-froid-chaud), au niveau des voies respiratoires aurait pour effet de libérer des substances inflammatoires responsables de la constriction des bronches. Les médiateurs inflammatoires ainsi libérés, sont responsables de la contraction du muscle bronchique, de la stimulation des fibres sensibles locales et parfois d'un œdème des parois (non obligatoire). Cet œdème amplifie le rétrécissement des voies aériennes et donc la sévérité de l'AIE.

Suite à cette réflexion, une théorie fera son apparition c'est à dire celle basée sur l'échange thermique liée à la quantité de chaleur du fait de l'augmentation du flux sanguin dans les vaisseaux. En effet, l'hyperventilation induite par l'exercice, faciliterait le transfert d'une partie de cette chaleur dans l'environnement extérieur. Mais au terme de l'exercice, la baisse de la ventilation (allant vers ses valeurs de repos), provoque l'évacuation partielle de cette quantité de chaleur générée par l'augmentation du débit sanguin. Le périphérique de l'appareil respiratoire connaîtrait donc une accumulation de chaleur qui engendrerait une forte vasodilatation. Cet engorgement des vaisseaux sanguins exercerait par endroits des pressions physiques sur l'appareil respiratoire et provoquerait donc une broncho constriction.

III-2- 1-Ventilation d'allergènes

L'hyper ventilation de grands débits d'air pollué reste l'élément essentiel de tous les stimuli. Ainsi, le débit ventilatoire observé au repos est fréquemment, trois ou quatre fois plus élevé

au cours d'épreuves physiques. Les espaces anatomiques du nez et la grande surface de la muqueuse nasale très vascularisée sont aptes à réchauffer et à humidifier l'air inspiré.

Cependant, ces structures sont souvent débordées lors d'efforts intenses de longue durée nécessitant des cycles respiratoires de grands débits d'air. Ainsi une partie de l'air inspiré non traité s'échappe par cycle ventilatoire et atteint directement les territoires des voies aériennes inférieures. Le cumul de quantités d'air non humidifié et non réchauffé expose les voies aériennes du sportif aux allergènes (certains pollens, déjections d'acariens et protéines animales) et aux substances chimiques (dioxyde de soufre, dioxyde d'azote et monoxyde de carbone) présents dans l'air ambiant. C'est le cas des cyclistes professionnels, des hockeyeurs sur glace, des skieurs et des sportifs résidant en climat chaud et humide et en ambiance d'air pollué. De ce fait, certains sportifs développent ce type d'asthme appelé l'asthme allergique.

Le mécanisme de l'allergie est caractérisé par une réaction allergique survenant immédiatement après le contact avec un antigène. Cette réaction fait suite à l'activation des mastocytes.

III-2- 2-Rappels sur l'innervation des voies aériennes

L'homéostasie bronchique est sous le contrôle direct du système nerveux végétatif et des interactions permanentes qui existent entre les systèmes cholinergiques et adrénrgiques lors de multiples fonctions des voies aériennes (Godard et *al.*, 1993 et 1996). L'innervation des voies aériennes humaines est assurée par des fibres nerveuses autonomes efférentes et sensibles afférentes. Le système nerveux autonome est représenté dans les poumons par le système parasympathique cholinergique, le système sympathique adrénrgique et le système non adrénrgique non cholinergique (NANC). Ces trois systèmes régulent de nombreuses fonctions comme celle du tonus et des sécrétions bronchiques, le débit cardiaque, la perméabilité vasculaire ou encore la libération de médiateurs par les mastocytes (Michoud et *al.*, 1994). Il a été d'abord suggéré que la réactivité excessive des voies aériennes observée dans l'asthme, résultait d'un déséquilibre des mécanismes de régulation nerveux, favorisant la composante excitatrice (système cholinergique, NANC excitateur dit NANCe) par rapport à la composante inhibitrice du système nerveux autonome (système adrénrgique, NANC inhibiteur, dit NANCi).

III-2- 2-1- Le système parasympathique

Encore appelé système cholinergique (Barnes, 1986), il est médié par le nerf vague au relais bronchique. Il est le plus important système de contrôle du tonus et de la sécrétion bronchique. Le système parasympathique a comme neuromédiateur l'acétylcholine (Ach) qui est libérée par les fibres cholinergiques post ganglionnaires. Elle agit sur les muscles lisses des grosses bronches, sur l'épithélium bronchique et sur les glandes sous muqueuses et les vaisseaux bronchiques. L'activation des fibres cholinergiques peut se faire à l'intérieur des voies aériennes par des médiateurs inflammatoires qui peuvent augmenter les neurotransmissions en facilitant la libération d'Ach dans les ganglions parasympathiques situés dans la paroi bronchique.

L'acétylcholine ($C_7H_{16}NO_2$) est un neurotransmetteur actif dans de nombreuses parties du cerveau et du corps. Il est particulièrement actif notamment dans les neurones du cerveau antérieur basal, partie du cerveau touchée par la maladie d'Alzheimer. Dans le système nerveux central, l'acétylcholine est importante pour les fonctions mémorielles et intellectuelles. L'acétylcholine joue un rôle important dans la stimulation de l'interaction entre les neurones. La nicotine ($C_{10}H_{14}N_2$) obtient le même effet, de sorte que l'usage de tabac peut favoriser la contraction, aussi via la dopamine. L'acétylcholine influence aussi le cœur et le contrôle des muscles squelettiques quelconques. L'acétylcholine fût le premier neurotransmetteur découvert. Elle est notamment produite dans l'intestin grêle. Des substances comme l'atropine ($C_{17}H_{23}NO_3$) peuvent bloquer le fonctionnement du neurotransmetteur. Les cyanogènes et les pesticides qui contiennent des organophosphates, bloquent l'enzyme acétylcholinestérase. Il se produit un excès d'acétylcholine dans la synapse qui entraîne une inactivité moléculaire. La libération d'acétylcholine se fait massivement à partir de vésicules de stockage situées dans les terminaisons nerveuses.

Lors de l'arrivée de l'influx nerveux, elle donne naissance, en se fixant sur les récepteurs membranaires, à une dépolarisation qui entraîne des potentiels d'actions, des mouvements ioniques du Na^+ vers l'intérieur de la cellule et du K^+ vers l'extérieur. Ce phénomène nécessite la présence de Ca^{2+} (Bernard Michel, 1981). Les récepteurs de l'Ach appelés muscariniques appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Il existe cinq différents récepteurs muscariniques (M1, M2, M3, M4 et

(Van Koppen et Kaiser, 2003). Ces récepteurs sont responsables de la transmission parasympathique postganglionnaire. Les récepteurs M1, M3 et M5 possèdent une activité excitatrice tandis que M2 et M4 sont inhibiteurs. Dans les voies respiratoires, on retrouve les récepteurs M2 et M3 sur les muscles lisses (Mak et *al.*, 1992), ainsi que les récepteurs M1 et M2 sur les ganglions et les nerfs parasympathiques (Yang et Biggs, 1991 ; Lammers et *al.*, 1989).

La contraction des muscles lisses et la broncho constriction sont régulées par le récepteur M3 (Roffel et *al.*, 1990). La stimulation des autorécepteurs M2 inhibe la libération de l'acétylcholine (Walker, 1999). Les fibres cholinergiques constituent l'innervation excitatrice prédominante dans les voies respiratoires (Racke et Matthiesen, 2004). Le neurotransmetteur associé à ce système neuronal est l'acétylcholine, une molécule ayant la capacité de se fixer autant aux récepteurs de type muscarinique qu'aux récepteurs nicotiques (Kawashima et Fujii, 2000).

III-2- 2-2- Le système sympathique

Le système nerveux adrénérique innerve de nombreuses parties du corps, en particulier l'intestin, le cœur, les poumons, les vaisseaux sanguins. Ce système a une innervation moins importante que celle du système parasympathique. Le système adrénérique fonctionne via l'activation de récepteurs spécifiques α et β (Ahlquist, 1948).

Les récepteurs α sont peu nombreux, on les trouve sur les cellules musculaires lisses vasculaires et bronchiques. Les récepteurs β -adrénériques sont de deux sous-types β_1 et β_2 -adrénériques (Lands, 1967). Les récepteurs β de sous type β_2 présents en grand nombre sont retrouvés sur les cellules musculaires lisses vasculaires et bronchiques, les cellules à mucus, les cellules épithéliales et les mastocytes. Les fibres adrénériques contrôlent également les vaisseaux sanguins bronchiques (Daniel et *al.*, 1986). Les récepteurs β -adrénériques, exprimés sur les muscles lisses des voies respiratoires, provoquent une broncho dilatation lorsqu'ils sont activés (Carstairs et *al.*, 1985). Lorsque les bronches sont préalablement contractées, les agonistes β_2 sont capables d'induire une broncho dilatation et aussi de réduire la dégranulation des mastocytes et l'activité des nerfs cholinergiques. Une déficience dans le fonctionnement de ces récepteurs est susceptible de contribuer à la symptomatologie de l'asthme (Barnes, 1996).

Les récepteurs β_1 sont situés au niveau du cœur et des reins. L'activation de ces récepteurs adrénergiques Bêta 1 entraîne une activation cardiaque donc la contraction des fibres myocardiques. Au niveau du rein, ils augmentent la sécrétion de rénine. La classe de médicaments appelée Bêta-bloquant vont inhiber les récepteurs Bêta entraînant une diminution de l'excitabilité des fibres cardiaques.

Les récepteurs β_2 sont situés au niveau des fibres musculaires lisses du poumon et de l'utérus. Ces récepteurs servent à relaxer les fibres. Au niveau du poumon, ils évitent les spasmes bronchiques (asthme).

Selon Walker (1999) les deux neurotransmetteurs adrénergiques sont la noradrénaline ($C_8H_{11}NO_3$) et l'adrénaline ($C_9H_{13}NO_3$).

III-2- 2-3- Le système non adrénergique non cholinergique (NANC)

Le système NANC est composé du système NANC excitateur (NANCe) et du système NANC inhibiteur (NANCi).

Le NANCe nécessite un signal efférent antidromique de neuropeptides excitateurs par les fibres C sensibles chémosensibles du nerf vague (Karlsson et *al.*, 1984). Certains de ces neuropeptides seraient colocalisés avec la noradrénaline dans les terminaisons nerveuses sympathiques (Potter, 1988). Les neurotransmetteurs du NANCe peuvent entraîner une broncho constriction comparable à celle déclenchée par la stimulation cholinergique. Ces neurotransmetteurs peuvent agir soit, directement sur le muscle lisse ou indirectement, en modulant la stimulation cholinergique ou sérotoninergique (Karlsson et *al.*, 1984).

L'effet relaxant du NANCi est dû d'une part, à une action directe des neuropeptides sur le muscle lisse, et d'autre part, à une action indirecte, en inhibant la libération d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses cholinergiques (Richardson, 1981).

Le muscle lisse des voies aériennes est sous le contrôle de fibres nerveuses efférentes et afférentes du système nerveux autonome (**figure 5**). Ce contrôle passe par la libération de neurotransmetteurs du système cholinergique, du système adrénergique et des deux composantes du système non adrénergique non cholinergique (NANC). L'innervation cholinergique constitue le plus important système broncho constricteur chez l'homme comme chez l'animal (Barnes, 1986). Elle est responsable du tonus basal des voies aériennes (Widdicombe, 1963).

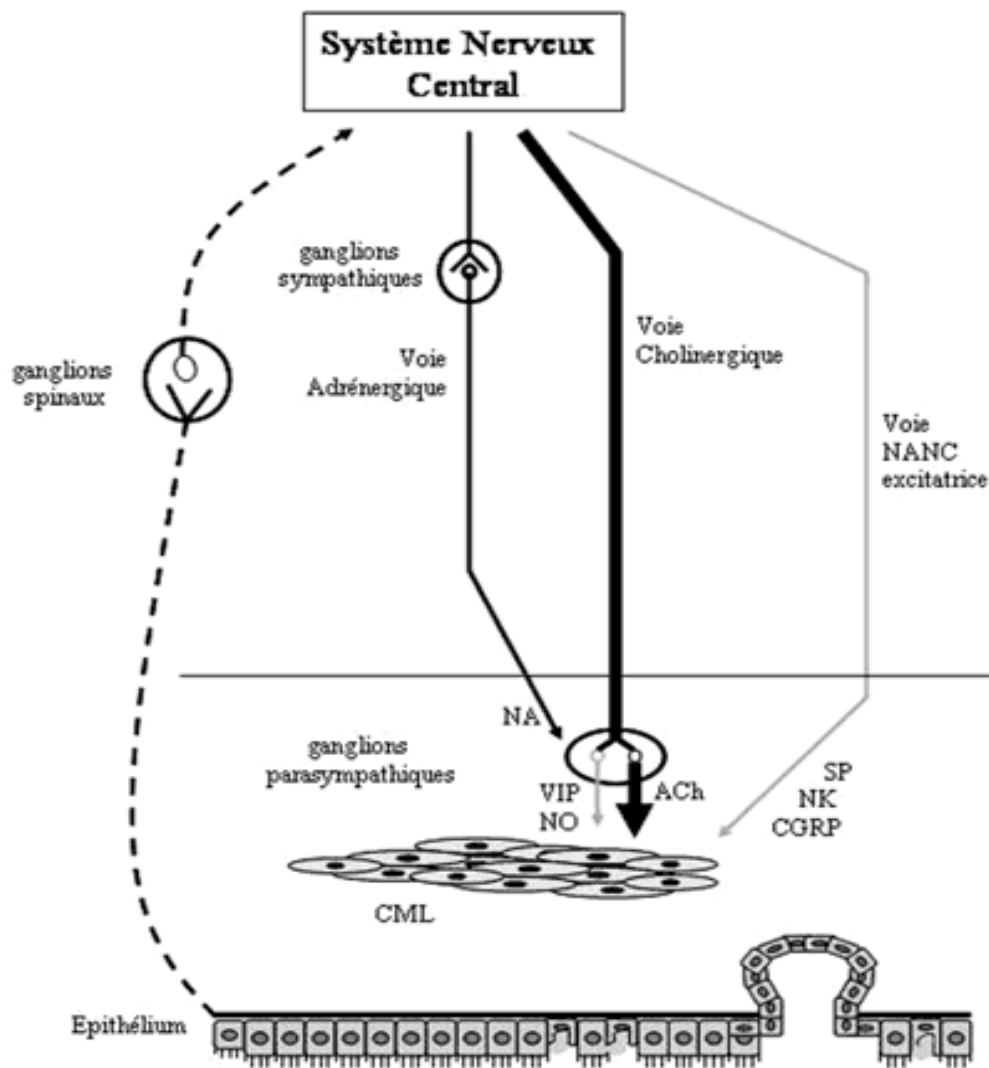


Figure 5: Système nerveux autonome du muscle lisse bronchique (Barnes, 1992).

Les cellules musculaires lisses (CML) des voies aériennes sont innervées par des fibres nerveuses afférentes (traits tirés) et efférentes (traits pleins). La voie adrénergique est pauvre, son médiateur est la noradrénaline (NA). La voie cholinergique est la plus importante, son médiateur est l'acétylcholine (ACh). La voie non adrénergique non cholinergique (NANC, traits gris), est soit excitatrice et les médiateurs sont la substance P (SP), les neurokinines (NK) et la calcitonine gene related peptide (CGRP), soit inhibitrice et les médiateurs sont le peptide intestinal vasoactif (VIP) ou le monoxyde d'azote (NO) (Barnes, 1992).

IV- STRUCTURE DES MUSCLES LISSES DES VOIES RESPIRATOIRES (MLVR)

Le muscle lisse des voies respiratoires (MLVR) est l'un des effecteurs principaux de la réactivité bronchique. Les connaissances dans le domaine des mécanismes cellulaires de la contraction de ce muscle se sont considérablement enrichies ces dernières années grâce à l'utilisation des techniques d'étude des cellules isolées (Daniel et *al.*, 1986 ; Gabella, 1990). Les MLVR montrent une hétérogénéité structurale et fonctionnelle tout au long de l'arbre trachéo-bronchique.

En effet, des réponses caractéristiques sont enregistrées à différents endroits de l'arbre trachéo-bronchique suite à des stimulations électriques induites par des variations de champ électrique (Kamikawa, 1994). Cette observation suggère qu'ils sont innervés différemment par les neurones efférents moteurs du système nerveux autonome (Kamikawa, 1994). Il faut souligner que la densité d'innervation des MLVR augmente de la région proximale vers la distale ou périphérique. De plus, les bronchioles sont pratiquement sous contrôle nerveux, alors que la trachée et les bronches principales sont sous contrôle myogénique (Daniel et *al.*, 1986; Rodger, 1992).

Les cellules des MLVR sont considérées comme étant de type multi-unitaire. En effet, chaque fibre musculaire est dotée de ses propres terminaisons nerveuses et la communication électrique entre les cellules est réduite par le manque de jonctions communicantes de type "*gap junctions*" (Daniel et *al.*, 1986; Daniel, 1988; Small et Foster, 1988; Gabella, 1990; Daniel et *al.*, 1991; Rodger, 1992). Par ailleurs, dans certaines situations physiopathologiques comme par exemple l'asthme, les cellules se transforment en cellules de type unitaire (excitables). Elles sont capables de générer des potentiels d'action (Aicasaka et *al.*, 1975; Bai, 1991) et sont normalement absentes chez la plupart des MLVR de plusieurs espèces animales (Kirkpatrick, 1975; Rodger, 1992 et 1993). Le rôle physiologique principal des MLVR est de contrôler le diamètre des voies aériennes par leur aptitude à se contracter et à se relaxer en réponse à une variété de stimuli (Coburn, 1979; Coburn et Baron, 1990; Gerthoffer, 1991). Des progrès considérables ont été réalisés au cours des dernières années sur la connaissance des événements biochimiques qui déterminent le degré de la contraction des muscles lisses (Coburn et Baron, 1990; Stull et *al.*, 1993; Somlyo et Somlyo, 1994; Johnson et Snyder, 1995; Word, 1995). Par contre, ceux impliqués dans la relaxation ont été beaucoup moins étudiés.

IV-1- COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DES MUSCLES LISSES DES VOIES RESPIRATOIRES (MLVR)

Deux formes de couplage excitation-contraction sont connues au niveau des muscles lisses: un couplage électromécanique et l'autre pharmaco mécanique (Rodger, 1992; Challis *et al.*, 1993; Somlyo et Somlyo, 1994). Le couplage électromécanique dépend de la dépolarisation du sarcolemme des MLVR. La dépolarisation en effet, active les canaux calciques en particulier le canal calcique de type L, permettant ainsi un influx calcique (Coburn et Baron, 1990; Rodger, 1992 et 1993; Srnaïl et Foster, 1994). Dans le cas d'un couplage pharmaco mécanique (le plus important physiologiquement) les spasmogènes agissent pour mobiliser le Ca^{2+} (Rasmussen *et al.*, 1990) à partir du réticulum sarcoplasmique (RS) à la suite d'une production d'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3).

Les agonistes activent les récepteurs spécifiques couplés à une protéine Gq. Ainsi activées, les protéines Gq stimulent une phospholipase C-P (Baron *et al.*, 1993), laquelle hydrolyse le phosphatidyl 4,5 biphosphate (PIP_3) en IP_3 et en diacyl glycerol (DAG) confère **figure 6**. L' IP_3 , diffuse dans le cytoplasme jusqu'à un récepteur canal (RIP_3) (Coburn et Baron, 1990; Kajita et Yamaguch, 1993; Challis *et al.*, 1993; Cuthbert *et al.*, 1994). L'ouverture du RIP_3 , facilite la libération rapide de quantités importantes de Ca^{2+} stocké dans le RS (Bemdge, 1993). Ceci provoque une élévation transitoire de la concentration en Ca^{2+} , laquelle est probablement responsable de l'activation des conductances ioniques de la membrane de surface (Janssen et Sims, 1992; Janssen et Sims, 1993; Carl *et al.*, 1996). Il y a dépolarisation de la membrane de surface, ce qui active indirectement les canaux calciques contrôlés par le potentiel ou Voltage Operated Channels (VOC). L'influx du Ca^{2+} via cette voie pourrait induire une libération du Ca^{2+} du RS par le phénomène connu sous le nom du " Ca^{2+} induced Ca^{2+} release" par l'activation du canal calcique.

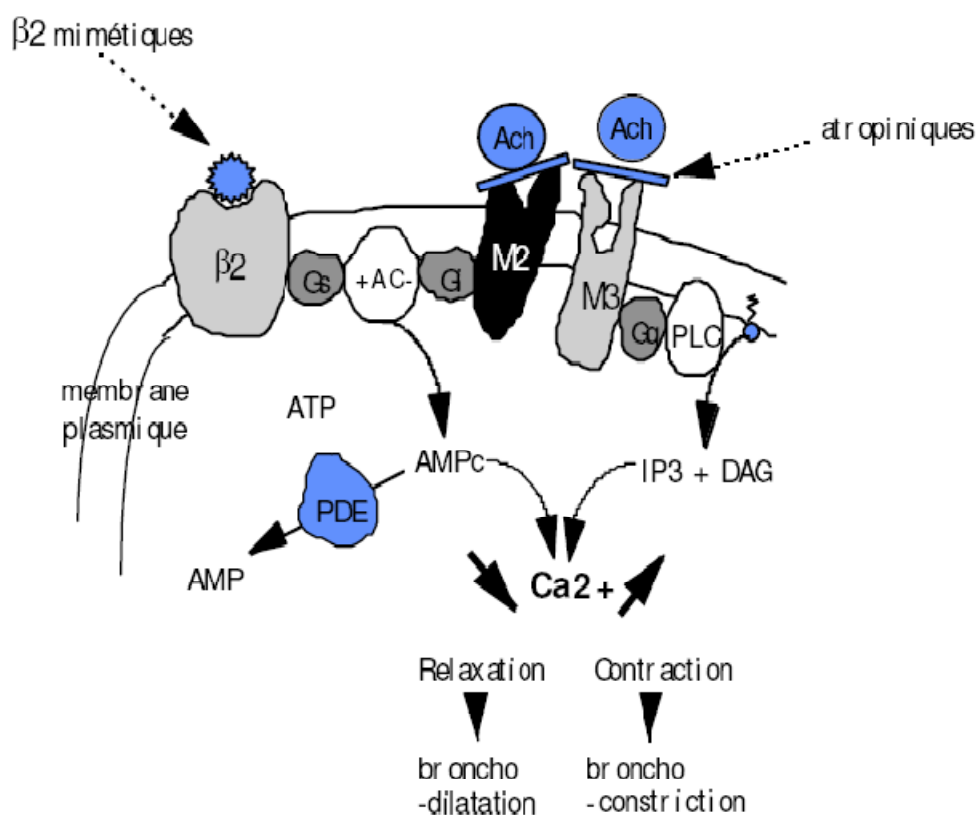
IV-2- LES RECEPTEURS MUSCARINIQUES COUPLES AUX PROTEINES G

En réponse à la fixation du ligand (neurotransmetteur - signal sensoriel), les récepteurs muscariniques liés aux protéines G modulent les propriétés des canaux ioniques. Ils sont totalement distincts des canaux ioniques et exercent leurs effets via une protéine périphérique "collée" au côté cytoplasmique appelée protéine G.

Le récepteur activé par la fixation du neurotransmetteur active la protéine G qui module directement ou indirectement (via un second messenger) l'ouverture des canaux ioniques. Les protéines G convertissent et amplifient le signal. Ils assurent une transmission

synaptique lente et interviennent aussi dans la régulation de la libération du neurotransmetteur par l'élément pré synaptique.

L'activation des sous types M1 et M3 (fibres lisses autres que vasculaires) couplés à la production de l'inositol-phosphate (IP3) ou de diacylglycérol (DAG) via une hydrolyse des phospholipides membranaires par l'effecteur-enzyme, la Phospholipase C (PLC), va provoquer une mobilisation accrue du calcium, à partir des stocks intracellulaires ou du milieu extracellulaire (**figure 6**). Le calcium, second messenger dans ce cas, va être à l'origine des effets biologiques (Exemple: contraction musculaire, sécrétion glandulaire ou métabolisme).



AC : adénylate cyclase ; Ach : acétylcholine ; AMP : adénosine monophosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; β2 : récepteur β2 noradrénergique ; Ca²⁺ : ion calcium ; DAG : diacylglycérol ; G_s : protéine G stimulatrice ; G_i : protéine G inhibitrice ; IP₃ : inositol triphosphate ; M₂ ou M₃ : récepteurs muscariniques de type 2 ou 3 ; PDE : phosphodiesterase ; PLC : phospholipase C.

Figure 6 : Les différentes réponses de la cellule musculaire lisse (CML) des voies aériennes (Mark et al., 2004).

V- EVALUATION DU AIE

Le bronchospasme induit par l'exercice peut être diagnostiqué soit, à partir d'un questionnaire faisant état des symptômes éventuels et les antécédents familiaux du sportif, soit sur la base

des tests spirométriques suite à une provocation bronchique induite par l'exercice, soit par les deux à la fois. Cependant, le diagnostic du BIE n'est pas simple, puisque les valeurs de la sensibilité et de la spécificité des tests restent largement inférieures à 85% et à 92% respectivement selon Rundell et *al.* (2001).

La fiabilité dans l'évaluation du bronchospasme induit par l'exercice nécessite la prise en compte des variables milieu de vie et alimentation.

VI- PRISE EN CHARGE PHARMACOLOGIQUE DE L'ASTHME

Le but de tout traitement ou de toute thérapie est la guérison complète ou le soulagement du patient. Mais l'asthme ne peut être guéri, ses symptômes peuvent tout de même être soulagés. Les antiasthmatiques n'ont que peu d'efficacité. Ils ont un effet bronchodilatateur et inhibent les symptômes (toux, inflammation, dyspnée) de l'asthme.

Les broncho dilatateurs ou anti asthmatiques sont des médicaments utilisés dans les obstructions bronchiques. Ces médicaments vont relâcher les fibres musculaires lisses des bronches et donc augmenter le calibre des bronches. Ils sont aussi anti-inflammatoires.

En effet, l'objectif prioritaire du traitement de l'asthme serait de limiter l'aggravation du BIE et de permettre aux sportifs de prendre part aux entraînements et aux compétitions. Cet objectif peut être réalisé de la manière suivante :

- Une médication quotidienne pour contrôler le processus inflammatoire
- Une médication au salbutamol avant l'exercice.

Les travaux menés sur l'efficacité du salbutamol déjà à partir des années 70, indiquaient clairement que les deux formes du salbutamol (oral et aérosol) produisaient une broncho dilatation significative au repos, mais seule la forme aérosol était efficace pour prévenir le BIE chez beaucoup de sujets (Anderson et *al.*, 1975). Les auteurs de ces travaux expliquent que les mesures du Débit Expiratoire de Pointe (DEP) des sujets atteignent des valeurs maximales 15 min après inhalation de 200 µ g de salbutamol aérosol par rapport à 90 min après le salbutamol oral. Ces auteurs concluent que par rapport à sa forme orale, le salbutamol aérosol serait plus efficace contre le bronchospasme.

VII- QUELQUES SUBSTANCES D'ORIGINE NATURELLE DANS LA PRISE EN CHARGE DE L'ASTHME

Hijazi *et al.* (2000), Kenkt *et al.* (2002) ont démontré que la consommation de certains antioxydants (flavonoïdes) contenus dans les fruits riches en vitamine C, même à des niveaux bas, réduit la survenue de l'asthme.

Puisque l'effet broncho-dilatateur du salbutamol est dose dépendante, il est alors nécessaire de trouver d'autres traitements efficaces de longue durée. L'utilisation des plantes médicinales riches en substances naturelles organiques à propriétés anti-asthmatique telles que les flavonoïdes, les tannins, les mucilages, les alcaloïdes et les huiles essentielles serait indiquée.

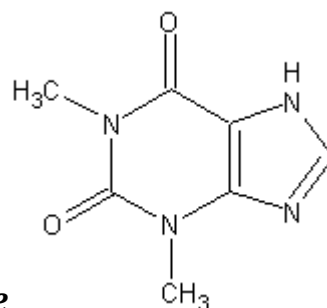
VII- 1- LES ALCALOÏDES

C'est un nom générique donné à des substances organiques azotées de caractère basique, d'origine végétale et de structure chimique variée et complexe. Ils possèdent à faible dose, des effets physiologiques marqués chez l'homme et l'animal. Ils sont des dérivés des acides aminés.

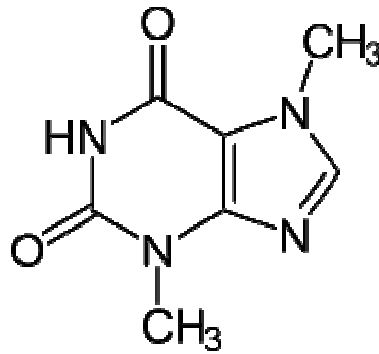
Ils ont une action sympathomimétique ou sympatholytique, parasymphatomimétique, anti cholinergique sur le système nerveux autonome (Peter *et al.*, 2003). Ils possèdent des propriétés relaxantes et anti-inflammatoires sur le muscle lisse bronchique (Terao, 2002).

Exemple: La théophylline et la théobromine.

Ces molécules sont des isomères et sont bénéfiques dans l'évolution des pneumopathies, l'asthme bronchique et la toux.



La théophylline



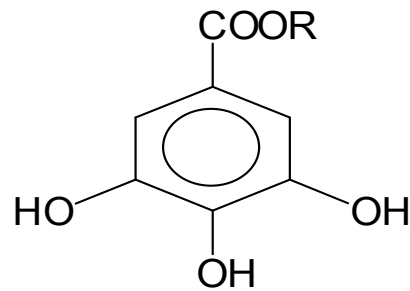
La théobromine

VII-2- LES TANINS

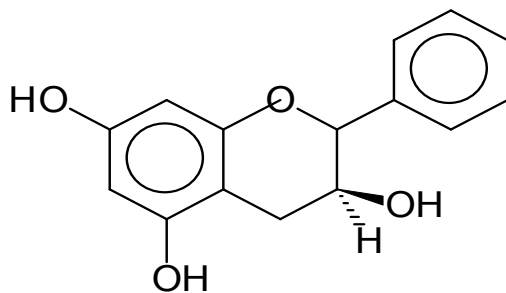
Les tanins sont des substances naturelles phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses (Bruneton, 2009). Ce sont des métabolites secondaires des plantes que l'on trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles, fruits etc.) où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites. Sur le plan chimique, ils sont constitués soit de polyol (glucose le plus souvent), ou de catéchine ou de triterpénoïde auquel sont attachés des unités galloyles (ou leurs dérivés) soit d'oligomères ou polymères de flavanols. Ils jouent les rôles suivants :

- imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes
- vasoconstriction sur les petits vaisseaux superficiels
- favorise la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure
- Activité inhibitrice de systèmes enzymatiques
- Antioxydants
- Vasoconstricteurs et protecteurs vasculaires
- Anti-inflammatoires
- Antiseptiques,
- antiviraux (protecteur des membranes cellulaires vis-à-vis de la fixation des virus et inhibiteurs de leur réplication)
- Astringents et anti-diarrhéiques
- Protecteurs et asséchants cutanés

Il existe des tanins hydrolysables et des tanins condensés.



Noyau de base des tanins galliques (**tanins hydrolysables**)



Cathécol (noyau de base des **tanins condensés**)

VII-3- LES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé (Ghedira, 2005). Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires. Ils exercent une multitude d'activités biologiques. Ils ont notamment des propriétés :

- antioxydantes,
- vasculoprotectrices,
- anti hépatotoxiques, antiallergiques,
- anti-inflammatoires,
- antiulcéreuses et même antitumorales significatives,
- Diminue la perméabilité des capillaires sanguins et renforce leur résistance : effet vasculoprotecteur et veinotrope
- Anti cancérogène et inhibition la croissance des cellules tumorales in vitro (Bruneton, 2009).

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3. Leur biosynthèse se fait par action des enzymes en différentes classes de flavonoïdes.



Squelette de base des flavonoïdes.

VII-4- LES MUCILAGES

Ils sont des métabolites secondaires des végétaux à propriétés :

- Emollients, antalgiques et antiseptiques (toux, gargarismes).
- Adoucissants, antiprurigineux dans les affections dermatologiques.
- Laxatifs mécaniques.
- Epaississant, absorbant.
- Adoucissants en cas d'irritation ou de gêne oculaire (Bruneton, 2009).

VII-5- LES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles constituent l'ensemble des composés volatiles, généralement odorants contenus dans les végétaux et formant la partie organique du mélange obtenu par distillation du végétal.

Elles se rencontrent presque exclusivement dans l'embranchement des spermatophytes. Tous les organes peuvent en renfermer : les sommités fleuries, les résines, les fruits, les graines, les feuilles, les tiges, les racines, les rhizomes, les bois et les écorces.

Elles contiennent des constituants qui peuvent avoir des propriétés physico-chimiques et des structures très différentes : il s'agit des composés aliphatiques, aromatiques, terpéniques et sesquiterpènes (Hurtel, 2008).

Les terpénoïdes, surtout oxygénés sont souvent majoritaires. Ils sont les plus recherchés et les plus appréciés. Ils occupent une place très importante parmi les substances odorantes. Ils sont tonifiants et antiseptiques.

Les sesquiterpènes sont anti-inflammatoires et calmants, tonifiants et énergétisants, anti-infectieux.

Les huiles essentielles sont des antiseptiques naturels qui s'absorbent par voie respiratoire ou digestive. Ils augmentent l'activité des cils des cellules de la muqueuse des bronches, facilitant ainsi l'évacuation du mucus bronchique. Ils possèdent un pouvoir anti-inflammatoire (Bruneton, 2009) et procurent une sensation de "bien-être" respiratoire qui est sans toxicité aux doses prescrites (pour un enfant jusqu'à 6 gouttes par jour, pour un adulte jusqu'à 12 gouttes par jour par voie buccale).

VIII- PLANTES DE L'ETUDE

VIII-1- *AFRAMOMUM MELEGUETA* (ROSCOE) (K. SCHUM)

VIII-1-1- Aspects botaniques

Aframomum melegueta (Roscoe) (K. Schum) est une plante forestière non-ligneuse (Guedje , 1996) de la famille des Zingibéraceae.

Règne: végétal

Nom scientifique: *Aframomum melegueta*

Famille: Zingiberaceae

Genre: *Aframomum*

Espèce: *melegueta*

Noms vernaculaires: Fon et goun: atakoun, Yoruba: oburo, atanre, atayè, ataliya, ata isa, tètègboko

Noms Français: graine de paradis, poivre de guinée, maniguette, malaguettes, poivre de meleguette.

Noms Anglais: grains of paradis, guinea pepper, melegueta pepper.

C'est une herbe pérenne rhizomateuse en tige feuillée atteignant 2 m de hauteur (**Figure 7**). Elle possède des feuilles basales surmontées d'une ligule tronquée d'à peine 1mm de long; un limbe linéaire-lancéolé, acuminé au sommet, atteignant 22 x 2,5 cm. On retrouve à sa base, des tiges inflorescentes en épis uniflores.

Elle a des fleurs trimères, hermaphrodites, de couleur rose à rose pâle avec un calice de 4,5 cm de longueur, tubulé et fendu latéralement dessus. Elle possède une corolle tubulée à la base avec trois-lobée dont un lobe ovale et étalé atteignant 10 cm de diamètre. Son étamine fertile et l'anthère sont au niveau du lobe médian du connectif trapézoïdal.

Son fruit est une grosse baie qui contient des graines colorées en brun-rouge foncé, couvertes de protubérances, aromatiques et très piquantes (**figure 8**). Il apparaît à la base de la tige au niveau du sol. Il est de forme ovoïde et à un sommet effilé à trois valves. A l'intérieur du fruit,

se trouvent de petites graines (**figure 9**) ($\pm 3,5$ mm de diamètre), abondantes, subglobuleuses et à surface rugueuse.

VIII-1-2- Répartition géographique

Aframomum melegueta (Roscoe) (K. Schum) est une plante répandue dans les régions forestières du Gabon, Congo, Iles du Golfe de Guinée, Cameroun et Afrique Occidentale, elle est cultivée dans les milieux ombragés des cacaoyères et elle serait rare en forêt naturelle. Au Ghana, le rendement en plantation atteint 400 à 600 kg de capsules par ha (Rodolfo et al., 2008). C'est une plante sciaphile (Guedje, 1996). Elle pousse en formant de petites touffes de 2 à 5 tiges. Elle est cultivée un peu partout en Afrique et au Bénin, précisément dans le département de l'Ouémé.

VIII-1-3-Forme d'utilisation en thérapeutique traditionnelle: aspect pharmaco chimique

Dans les pays africains, *Aframomum melegueta* (K. Schum) est très utilisé dans de nombreuses cuisines comme condiment et lors des rituels (Adjanohoun et al., 1986). Il est fortement utilisé dans le traitement de plusieurs maladies en médecine traditionnelle africaine. Après séchage, la graine d'*Aframomum melegueta* est utilisée comme succédané du poivre. Elle entre dans la composition de plusieurs plats africains. Elle est parfois incorporée au vin de palme et aux alcools locaux. Elle est utilisé comme: purgatif, vermifuge et contre la variole (Adjanohoun et al., 1986). C'est aussi un remède contre les infections intestinales, les brûlures d'estomac et les indigestions du fait qu'elle stimule les sécrétions gastriques.

Umukoro et al. (2007), Okoli et al. (2007) ont testés son effet analgésique et anti-inflammatoire in vivo sur les rats RBC. De même, c'est un aphrodisiaque de part sa capacité d'accroître le désir et les performances sexuels (Kamtchouing. et al., 2002). *Aframomum melegueta* (K. Schum) est utilisé en association avec les feuilles de *Croton zambesicus* pour conjurer le mauvais sort et dans le traitement de l'état d'anxiété. Il est aussi utilisé avec les racines de *Raufofia vomitoria* pour favoriser la chance, les problèmes psychologie, l'envoutement, la sorcellerie, la folie....etc (Adjanohoun et al., 1986).

L'huile essentielle de *Aframomum melegueta* contient du paradol, du shogaol, du gingerdione, l'a-humulène et le gingerol (Fernandez et al., 2004). Ces composés oxygénés sont anti-inflammatoires et calmants, tonifiants et énergétisants, anti-infectieux et antiseptiques.

Au Bénin, les populations du Sud et du Centre, le mélangent au citron vert (*Citrus aurantifolia*) pour traiter l'asthme.



Figure 7: Plantes de *Aframomum melegueta*
(Adjanohoun et al., 1986)



Figure 8: Gousse sèche de
Aframomum melegueta

(Achetées au marché de Adjarra (département de l'Ouémé) Bénin, 2009).



Figure 9: Graines de
Aframomum melegueta

VIII-2- *CITRUS AURANTIFOLIA* (CHRISTM. ET PANZER) SWINGLE

VIII-2-1- Aspects botaniques

Nom scientifique: *Citrus aurantifolia*

Famille: Rutacées

Genre: *Citrus*

Espèce: *aurantifolia*

Noms vernaculaires: Fon, Goun: Clé; Yoruba: osan wuwè

Nom français: Citron vert

Noms anglais: Mexican lime ou lemon.

Citrus aurantifolia est un arbuste de la famille des Rutacées. Il est cultivé partout dans le monde. Il s'agit d'un petit arbre épineux à feuilles persistantes, atteignant 5 à 8m de haut, à fût généralement court, à cime dense et au feuillage vert foncé (**Figure 10**). Son écorce est lisse, grise, à tranche jaunâtre. Les feuilles composées sont de formes variables, ovales, à bord denticulé assez arrondi et à base arrondie. Les fleurs sont blanches, odorantes, de 2,5 cm de diamètre environ et poussent à la base des feuilles. Son fruit est ovoïde de 4 à 5cm de diamètre environ ayant une peau mince très adhérente, verte ou jaune, odorante et à pulpe jaune verdâtre (**Figure 11**). La pulpe est très acide et est répartie en neuf à onze loges contenant chacune de nombreux pépins anguleux en forme de poire. Cette plante a une floraison et une fructification qui durent presque toute l'année surtout après les premières pluies. Elles peuvent être provoquées par l'irrigation ou l'arrosage en saison sèche.

VIII-2-2- Répartition géographique

Citrus aurantifolia est originaire du nord de l'Inde, d'Afrique tropicale, du Sénégal à l'Erythrée. C'est une espèce qui est cultivée partout dans le monde. Elle est fréquemment plantée dans les jardins et vergers des zones tropicales humides comme des régions semi-arides ou arides. Il est possible d'obtenir deux à trois floraisons par année.

Au Bénin, on la retrouve dans toutes les régions.

VIII-2-3-Forme d'utilisation en thérapeutique traditionnelle: aspect pharmaco chimique

Les feuilles de *Citrus aurantifolia* sont utilisées comme antiseptiques pour les affections respiratoires, la rhinite, la bronchite, la toux, la rétention urinaire, l'ictère, de même que les maladies diurétiques.

Le fruit (pulpe) est riche en vitamine C et sert comme traitement contre le scorbut et l'asthénie. Le fruit est utilisé aussi contre le paludisme, les calculs rénaux et biliaires sans compter le fait qu'il est utilisé à la cuisine et sert de jus pour les boissons. Les tiges et les racines peuvent servir de cure-dents.

Citrus aurantifolia renferme différents types de flavonoïdes. Ces derniers sont des

antioxydants puissants qui permettent de neutraliser les radicaux libres du corps et préviennent contre l'apparition des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et de maladies liées au vieillissement. Les principaux flavonoïdes contenus dans *Citrus aurantifolia* sont l'ériocitrine et l'hespérétine. La partie blanche de la pelure de *Citrus aurantifolia* contient une grande quantité de ces flavonoïdes, la pulpe et la chair du fruit en contenant moins (Minato et al., 2003; Miyake et al., 1998).

Citrus aurantifolia est une bonne source de vitamine C. Le rôle que joue cette vitamine dans l'organisme va au-delà de ses propriétés antioxydantes. Elle contribue aussi à la santé des os, des dents et des gencives.

Des études ont montré que l'ériocitrine et l'hespérétine extraits de la pelure du citron ou de son jus pouvaient diminuer ou prévenir l'augmentation des dommages oxydatifs chez des animaux soumis au stress oxydatif (Minato et al., 2003; Miyake et al., 1998).

Chez l'humain, une étude d'intervention a été réalisée chez des femmes diabétiques auxquelles on a donné, pendant une période de trois semaines, des flavonoïdes d'agrumes sous forme de supplément (environ 1 g par jour) ou un placebo (Blostein-Fujii et al., 1999). Cette prise de supplément n'a eu aucun effet sur la susceptibilité à l'oxydation des lipoprotéines (protéines produites principalement par le foie et qui transportent les lipides dans le sang). Rappelons que l'oxydation des lipoprotéines contribue au développement des maladies cardiovasculaires. D'autres flavonoïdes des agrumes ont montré des effets antiprolifératifs in vitro contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Kawaii et al., 1999). Ces propriétés des flavonoïdes du citron pourraient potentiellement servir à l'élaboration de thérapies antitumorales (Ogata et al., 2000).

Les flavonoïdes des agrumes et de leurs jus pourraient avoir un potentiel hypocholestérolémiant. En effet, des études réalisées chez l'animal ont montré que l'hespérétine et un mélange de flavonoïdes contenant principalement de l'hespérétine et de la naringine abaissaient le cholestérol sanguin (Kawaguchi et al., 1997; Bok et al., 1999).

Citrus aurantifolia contient aussi de limonoïdes qui posséderaient aussi une propriété antioxydante (Yu et al., 2005). De plus, certains limonoïdes du *Citrus aurantifolia* démontrent une activité antifongique contre certains pathogènes (Govindachari et al., 2000). Selon Gharagozloo et al. (2002), son fruit est récolté avant maturité à des fins alimentaires (ingrédient de Coca Cola) et médicinales (remède contre l'obésité, l'asthme, l'hypertension, la rougeole).



Figure 10: Fruits de *Citrus aurantifolia* sur arbre
Ouando (département de l’Ouémé) Bénin, 2009.



Figure 11: Fruit coupé en morceaux
Récolté à Ouando (département de l’Ouémé) Bénin, 2009.

VIII-3- *STERCULIA SETIGERA* DELILE

VIII-3-1- Aspects botaniques

Nom scientifique: *Sterculia setigera*

Famille: Sterculiaceae

Genre: *Sterculia*

Espèce: *setigera*

Noms vernaculaires: Fon, Goun: Azilokwe, nyinnyinfou; Haoussa: Koukouki;

Sterculia setigera est un arbre de la famille des Sterculiaceae. C'est une plante qui pousse spécialement dans le nord Bénin. Il fait partie des espèces végétales protégées du Parc W à la frontière bénino-nigérienne. Les feuilles sont très grandes (40 cm), lobées comme celles du figuier aux quelles elles ressemblent. Elles sont lisses sur le dessus, au revers plus clair et tomenteux (**Figure 12**). Les fleurs sont petites, au calice campanulé à 5 lobes, groupées en panicules, de couleur jaune verdâtre. Elles poussent directement sur les branches (le *Firminia* est une espèce "cauliflore"). Elles apparaissent en juin, juillet suivant le climat. Le fruit est une gousse contenant quelques graines. Au lieu de rester fermées jusqu'à la maturité, comme chez les légumineuses, les gousses de *Sterculia setigera* s'ouvrent pour laisser les graines mûrir à l'air libre, sans protection.

VIII-3-2- Répartition géographique

Sterculia setigera se retrouve au Sénégal, au Cameroun, en Angola, en Afrique orientale jusqu'en Erythrée. Au Bénin, elle est abondante dans la région Nord (Parc W du Niger).

VIII-3-3-Forme d'utilisation en thérapeutique traditionnelle: aspect pharmaco chimique

Sterculia setigera est utilisé comme arbre d'ornement ou arbre d'ombrage, du fait de son feuillage dense. Son bois léger et dur est recherché pour la construction des toitures. Une étude menée au Sénégal a montré que la densité des cultures (arachide, mil et sorgho) augmente avec la distance au tronc de *Sterculia setigera* (Bakhoun et al., 2001).

Il est utilisé en décoction pour préserver contre les maladies néonatales. Il constitue également un remède pour soulager les douleurs pulmonaires chez les personnes asthmatiques. Les fruits sont utilisés dans le traitement anti inflammatoire et contre les épis gastralgies. Ses racines sont utilisées comme diurétiques. L'écorce est utilisée contre le vomissement et la morsure de serpent. Les feuilles traitent la constipation, la diarrhée, le paludisme chez l'enfant et servent de fourrage en saison sèche pour le bétail. C'est une plante à usages magico-religieux (Adjanooun et al., 1988).



Figure 12: Feuilles de *Sterculia setigera* sur arbre
Okpara (département du Borgou) Bénin, 2009.

IX- DONNEES SUR LA TOXICITE

IX-1- CONCEPTS DE LA TOXICOLOGIE

IX-1-1 Notion de la toxicologie

La toxicologie est l'ensemble des connaissances et données scientifiques portant sur les capacités de nuisance d'une substance toxique. Elle porte sur la nature de la substance toxique, ses propriétés physicochimiques, ses modes d'intoxication, les manifestations toxiques et le traitement des intoxications. Elle s'intéresse à plusieurs secteurs de l'activité humaine: l'agriculture, l'alimentation, l'industrie pharmaceutique, l'environnement, les milieux de travail, etc. (Lapointe, 2004).

IX-1-2- Notion de poison ou toxique

Un poison ou toxique, est une substance capable de perturber le fonctionnement normal d'un organisme vivant (Lapointe, 2004). Il peut être de source naturelle (ex.: poussières, pollen) ou

artificielle (ex.: urée, formaldéhyde), ou de nature chimique (ex.: acétone) ou de nature physique (ex.: ondes ou rayonnement, vibration, bruit) ou biologique (ex.: aflatoxines, anthrax). Les études de toxicité chez l'animal, permettent d'en déterminer l'innocuité relative (l'évaluation du risque) et d'en proposer les mesures préventives appropriées (restriction d'emploi, utilisation en circuit fermé ...).

IX-1-3- Classification des effets toxiques

Les effets toxiques peuvent être classés de différentes façons, selon par exemple:

- la durée: aiguë, chronique;
- le type d'action: locale, systémique;
- le mécanisme d'action: stimulant, inhibiteur;
- le tissu ou l'organe affecté: sang (hématotoxique), foie (hépatotoxique), rein (néphrotoxique), le système nerveux (neurotoxique); cœur (cardiotoxique);
- la nature de l'effet : irritant, sensibilisant, asphyxiant, cancérigène (Lapointe, 2004).

Les effets des toxiques sur les organismes vivants peuvent se manifester par la génotoxicité, la cancérigénicité, la neurotoxicité, des effets sur la reproduction et le comportement. (Descotes, 1992).

IX-2- LA TOXICITE AIGUE D'UNE DROGUE

Elle caractérise les manifestations toxiques après administration d'une dose massive unique ou répétée dans les 24 heures d'une substance. Elle peut être immédiate si les manifestations toxiques sont observées dans les deux heures qui suivent l'administration de la substance ou retardée si les manifestations toxiques sont observées dans les 24 heures. Elle se traduit par un toxidrome et une atteinte des organes à fonction vitale. Son évaluation permet d'apprécier les doses qui entraînent la mort de l'animal et les circonstances de la mort. A cet effet, la dose minimale mortelle (DMM) et la dose létale 50% (DL50) sont généralement déterminées.

La Dose Minimale Mortelle (DMM) est la dose minimale de la substance capable de tuer un animal après administration (l'arrêt cardiaque signe la mort).

Elle peut servir à faire le choix des niveaux de doses retenues pour la détermination de la DL50 (Claude, 1988).

La Dose Létale 50% (DL50) est la dose de substance capable de provoquer, par la voie d'administration choisie, la mortalité cumulée de 50% des animaux d'une population mise en expérience. Elle s'évalue à partir de lots d'animaux auxquels correspondent des doses croissantes de la substance.

L'observation des manifestations de la toxicité aiguë ou toxidrome est nécessaire au cours de l'étude de toxicité aiguë d'une substance. Il s'agit de faire un examen d'organes (foie, rein, poumons, coeur ...) et de décrire toutes les modifications de comportement ou d'état observés.

La valeur de la DL50 d'une substance permet de la situer sur l'échelle comparative de toxicité de substances chimiques de HODGE et STERNER (Claude, 1988).

IX-3- LA TOXICITE PAR ADMINISTRATION REITEREE: TOXICITE SUBAIGUË, SUB-CHRONIQUE ET TOXICITE CHRONIQUE

Ces épreuves ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et /ou pathologiques consécutives aux administrations répétées de la substance active examinée et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie. Les expérimentations se font sur deux espèces de mammifères dont un non rongeur.

La première épreuve durera 2 à 4 semaines (toxicité sub-aiguë), la deuxième 1 à 3 mois (toxicité sub-chronique) et la dernière 3 à 6 mois (toxicité chronique). Le choix des voies d'administration doit tenir compte de celles prévues pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption. Le mode et le rythme des administrations ne sont pas strictement codifiés mais doivent être clairement indiqués ainsi que la durée des essais. Il est utile de choisir la dose la plus élevée de façon à faire apparaître des effets nocifs, les doses inférieures permettent alors de situer la marge de tolérance du nouveau produit chez l'animal. L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement, de la croissance, de la formule sanguine et des épreuves fonctionnelles particulièrement celles qui se rapportent aux organes excréteurs. Elle est faite aussi sur la base des comptes rendus nécrosiques, accompagnés des examens histologiques qui s'y rattachent (Ruckebusch, 1981).

IX-4- TEST DE CYTOTOXICITE

C'est une méthode d'évaluation préliminaire de la toxicité in vivo qui n'est pas totalement superposable à un test sur les cellules humaines en culture. Bien qu'il y ait une corrélation entre les deux types de cellules, certains auteurs suggèrent d'effectuer les deux tests avant de

conclure, ce qui donnerait une fiabilité de 75% contre 50% pour les tests sur les larves seules (Pelka et *al.*, 2000).

Dans la littérature, ce test est proposé comme une simple méthode de bio-essai d'évaluation préliminaire de toxicité dans la recherche de produits actifs naturels (Solis et *al.*, 1999). Il est utilisé pour la détection des toxiques fongiques (Harwig et *al.*, 1997), la toxicité d'extraits de

plantes (Mclaughlin et *al.*, 1991), la toxicité des métaux lourds (Martinez et *al.*, 1998), la toxicité des pesticides (Jaki et *al.*, 1999), les toxines de cyanobactéries (Barahona et *al.*, 1999) et les tests de cytotoxicité des matériaux dentaires (Meyer et *al.*, 1982).

Il y a une corrélation entre cytotoxicité des larves de crevette et cytotoxicité des cellules humaines; notamment les cellules pulmonaires d'une part et les cellules du colon d'autre part (José et *al.*, 2002).

MATERIEL ET METHODES

I- CADRE DE L'ETUDE

Nos travaux se sont déroulés au:

- Laboratoire de Chimie, de Pharmacologie et de Toxicologie du Département Médecine-Pharmacopée Traditionnelle/Pharmacie (MEPHATRA/PH) de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS) à Ouagadougou, Burkina-Faso, secteur 29.
- Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) des Facultés des Sciences et Techniques (FAST) et des Sciences de la Santé (FSS) de l'Université d'Abomey-Calavi du Bénin situé dans l'enceinte de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) à Cotonou.
- Laboratoire de Physiologie de l'Effort de l'Institut National de la Jeunesse de l'Education Physique et du Sport (INJEPS) de l'Université d'Abomey-Calavi situé à Porto-Novo.

II- MATERIEL ET METHODES D'ETUDE

II-1- MATERIEL DE L'ETUDE PRECLINIQUE

II-1-1- Matériel végétal

Il est constitué :

- des graines de *Aframomum melegueta*, achetées dans le marché de Adjarra (département de l'Ouémé) en Juin 2009,
- des feuilles et des fruits du *Citrus aurantifolia* récoltés à Ouando (Porto-Novo) en Août 2009,
- des feuilles de *Sterculia setigera* récoltées à Okpara (département du Borgou) en Juillet-Août 2009.

Toutes ces plantes sont identifiées et authentifiées par l'Herbier National de l'Université d'Abomey Calavi où chaque spécimen est conservé sous:

- N° AA6374/HNA pour *Aframomum melegueta* (Roscoe) K. Schum,
- N° AA6375/HNB pour *Citrus aurantifolia* (Christm. et Panzer) Swingle et
- N° AA6376/HNB pour *Sterculia setigera* (Del) (voir certificat d'identification en annexe 1).

II-1-2- Matériel d'étude phytochimique

II-1-2-1- Matériel d'extraction et de caractérisation

Il est composé de:

- Broyeur à lames (Gladiator Est. 1931 Type BN 1 Mach. 40461 1083)
- Verrerie diverse de Laboratoire
- Etuve de marque Memmert Type UL30 F-Nr. 840 452 (30-220°C)
- Rotavapor (Evaporateur rotatif type Büchi RE 11 muni d'un Büchiter Bath)
- Centrifugeuse (Type 4225 Centrifuge) non réfrigérée
- Balance Sartorius modèle 1702 001 (sensibilité 1/10 000 grammes; portée maximale 520 grammes)
- Lyophilisateur de marque CHRIST[®] Type ALPHA 1-2 (BIOBLOCK SCIENTIFIC) muni d'une pompe (Marque ROTARY VANE VACUUM PUMP Type RZ2 série 21525419).

II-1-2-2- Solvants et réactifs d'analyse

La liste des solvants et réactifs d'analyse se trouve en annexe 1.

II-1-3- Matériel d'extraction et d'analyse des huiles essentielles

Il est constitué de:

- un ballon
- un essencier de type Clavenger
- un réfrigérant à boules en mode ascendant.

Le solvant utilisé ici est l'eau.

- un chromatographe en phase gazeuse de marque Trace GC Thermo Quest CE Instrument.

II-1-4 - Matériel d'étude de la toxicité

II-1-4-1- Matériel animal pour l'étude de la toxicité aigue

Des souris mâles et femelles de souche NMRI pesant entre 20 et 40 g ont été utilisées. Elles sont fournies par l'animalerie de l'Institut de la Recherche en Sciences de Santé (IRSS) de Ouagadougou. Ces souris sont nourries au son de blé et à l'eau de robinet. Elles sont acclimatées à une température comprise entre 23-25° C et 75% d'humidité.

II-1-4-2- Matériel animal pour l'étude de la cytotoxicité

Pour la recherche de la cytotoxicité, les larves de crevette saumure (*Artemia salina*) sont utilisées. Il existe une corrélation entre cytotoxicité des larves de crevette et cytotoxicité des cellules humaines pulmonaires (José et *al.*, 2002).

II-1-4-3- Equipements de laboratoire

II-1-4-3-1-Etude de la DL₅₀ chez les souris NMRI

Le matériel d'étude de la DL₅₀ chez les souris NMRI est constitué de :

- l'eau distillée pour la dissolution des extraits,
- seringues de gavage et seringues de 1cc graduées pour l'administration des extraits,
- verreries diverses,
- balance Sartorius modèle 1702 001 (sensibilité 1/10 000 grammes ; portée maximale 220 grammes) pour la pesée des poudres de drogues,
- Balance Berkel (Type E 811709, portée maximale 5kg, minimale 0,005kg) pour la pesée des souris.

II-1-4-3-2-Etude de la CL₅₀ chez les larves de crevette saumure (Artemia salina)

Le matériel est composé de:

- l'eau de mer pour la préparation des solutions mères,
- tubes à essai pour ensemercer les larves,
- pipettes pour prélever les larves mortes,
- agitateurs magnétiques de marque kila[®]-Werke.

II-1-5- Matériel d'étude des propriétés broncho relaxantes

II-1-5-1- Matériel animal

Des rats mâles de souche Wistar pesant en moyenne $288,02 \pm 13,41$ g sont utilisés. Ils proviennent de l'animalerie de l'Institut de la Recherche en Sciences de Santé (IRSS) de Ouagadougou (température comprise entre 23-25° C et 75% d'humidité). Ils sont nourris au son de blé et à l'eau de robinet courante.

II-1-5-2-Equipements de laboratoire

Le matériel d'étude «*in vitro*» sur la trachée isolée de rat est constitué de :

- un dispositif d'étude d'organes isolés (trachée, aorte, intestin) muni de 4 cuves de capacité $20 \pm 0,1$ mL chacune et de 4 capteurs isométriques (Type EMKA TECHNOLOGIES),
- un amplificateur (Type EMKA TECHNOLOGIES, ps 100w-2),
- un enregistreur ordinateur (Intel (R), Pentium (R) 4 CPU 2,93 GHz muni d'un système Microsoft Windows XP Professionnel Version 2002, Service Pack 1) et d'un programme de mesure (Programme UVESSELS de Denis Wagner du 29/06/1999),
- une trousse de dissection pour le prélèvement de l'organe et de micropipettes de 100 μ L et de 1000 μ L pour l'administration des extraits.

II-1-5-3- Réactifs et substances des tests sur la trachée « *in vitro* »

II-1-5-3-1- Réactifs

Les réactifs sont constitués de l'eau distillée, de la solution de Krebs modifiée (voir composition en annexe 1) et de l'uréthane (Fluka 94300, Lot 1139888) comme anesthésique.

II-1-5-3-2- Substances chimiques d'étude

Les substances utilisées sont diluées dans l'eau distillée. Il s'agit de:

- KCl (LABOSI P 1295, Lot 083151) $4 \cdot 10^{-2}$ M,
- Acétylcholine (SIGMA A-2661, Lot 35H07845) 10^{-5} M,
- Propranolol 10^{-6} M et de l'atropine fournis gracieusement par le laboratoire de Chimie, de Pharmacologie et de Toxicologie du Département Médecine-Pharmacopée Traditionnelle/Pharmacie (MEPHATRA/PH) de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS) à Ouagadougou, Burkina-Faso, secteur 29.

II-1-6 - Matériel d'étude des propriétés anti-inflammatoires

II-1-6-1- Matériel animal

Des *Cavia porcellus* (Cochon d'inde) des deux sexes et de poids moyen $351,74 \pm 15,67$ g achetés en Août 2009 auprès des éleveurs à Adja-Ouèrè, à Ikpinlè et à Pobè dans le département du Plateau sont utilisés. Ils sont acclimatés pendant trois semaines aux conditions

de l'animalerie de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), (lumière 12 h, obscurité 12 h, humidité 70% et température 28°C) et alimentés aux menus de leurs éleveurs d'origine, constitués essentiellement de son de maïs et de feuilles *Paspalum vaginatum* (panicum).

II-1-6-2-Equipements et réactifs de laboratoire

Le matériel d'étude est composé de:

- un dispositif de Bhatt (1977) modifié muni de deux seringues pour la détermination des volumes d'œdème,
- un bath water, Büchi RP 400 pour le test de bain de pied,
- un thermomètre à sonde pour le test antipyrétique,
- une solution de formaldéhyde à 1% pour induire l'œdème,
- une solution aqueuse de la levure de bière (LB) à 20%, pour induire l'hyperthermie,
- l'acétylsalicylate de lysine (Aspégic) et l'indométacine sont utilisés comme produits de référence antalgique et antipyrétique.
- un chronomètre pour mesurer le temps.

II-1-7- Matériel d'étude des propriétés antitussives

II-1-7-1- Matériel animal

Le matériel animal utilisé est le même que celui de l'étude des propriétés anti-inflammatoires.

II-1-7-2-Equipements et réactifs de laboratoire

Le matériel utilisé est composé de :

- une solution d'acide citrique à 20% pour induire la toux sèche,
- un bocal cylindrique clos dans lequel l'animal est placé pour inhaler le gaz d'acide citrique,
- une cage en verre (20 x 20 x 40 cm³) pour le décompte des contractions intercostales,
- une pompe à air de marque BüchiVac[®] V-500 et un pulvérisateur qui permettent de pulvériser la solution d'acide citrique dans le bocal.
- le Néo-Codion[®] qui est un produit de référence utilisé pour le traitement symptomatique des toux sèches,
- un chronomètre pour mesurer le temps.

II-2- MATERIEL DE L'ETUDE CLINIQUE

II-2-1-Matériel végétal

Il est constitué :

- des graines de *Aframomum melegueta* achetées à Adjarra (département de l'Ouémé) en Février 2011 et réduites en poudre fine et conservée pour la suite de l'opération
- des feuilles et fruits de *Citrus aurantifolia* récoltés à Porto-Novo en Mars 2011.

II-2-2-Matériel technique

Il est constitué :

- d'une toise de fabrication locale conçue selon les normes requises, pour mesurer la taille des sujets debout pieds nus. Elle est graduée de 0 à 200 cm,
- d'un pèse-personne de marque Hana gradué de 0 à 120 Kg, pour apprécier la masse corporelle des sujets,
- d'un tapis roulant (**Figure 13**) dont les caractéristiques sont les suivants: «YK-06860, frequency 50/60 Hz, imput voltage 220 V, imput power 2,5HP, imput curent 8A, n°20907292551». Il a permis d'effectuer le test physique.
- d'un spiromètre de marque SPIROBANK II S/N 001267 MIR régulièrement étalonné. La norme utilisée est celle du groupe éthique africain incorporé dans le logiciel du spiromètre (**Figure 14**).



Figure13: Tapis roulant «YK-06860, frequency 50/60 Hz, imput voltage 220 V, imput power 2,5HP, imput curent 8A, n°20907292551»

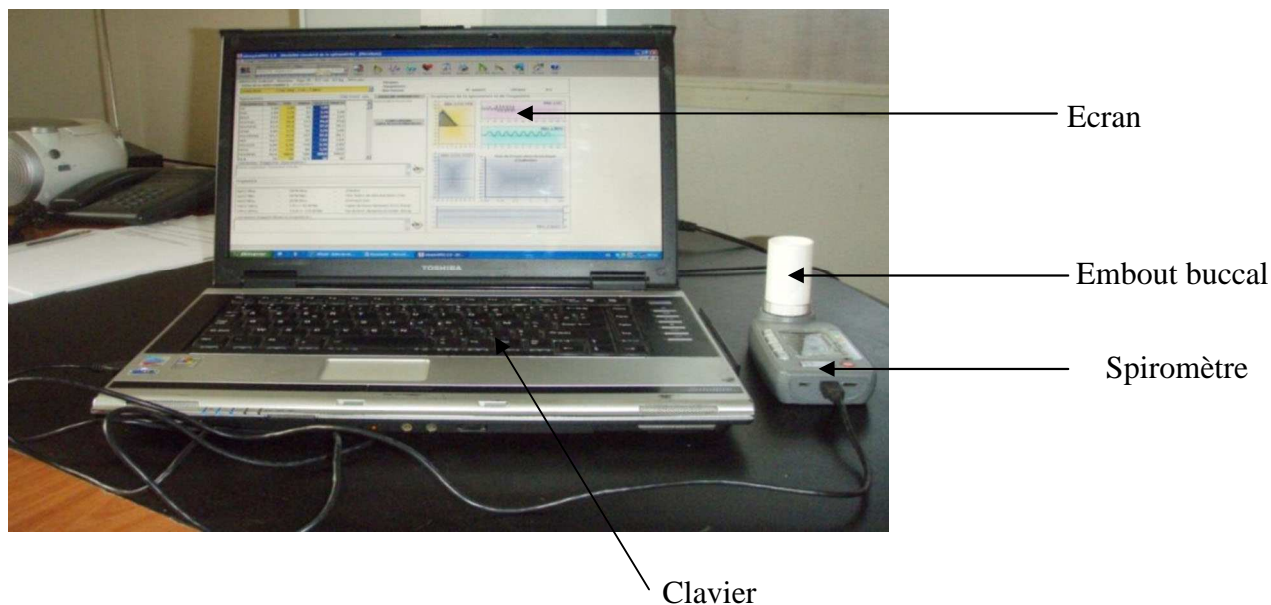


Figure 14: Dispositif utilisé pour l'exploration ventilatoire

II-3- METHODES DE L'ETUDE PRECLINIQUE

II-3-1- Préparation des extraits aqueux

Les graines de *Aframomum melegueta* et les feuilles *Sterculia setigera* Del ont été séchées à l'ombre et réduites en poudre. Les feuilles et les fruits du *Citrus aurantifolia* ont été utilisés frais.

L'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* est obtenu à partir de la décoction de 125 g de feuilles et 290 g de fruits de *Citrus aurantifolia* dans 1L d'eau distillée. Ensuite on ajoute au filtrat 125 g de la poudre des graines de *Aframomum melegueta*. Après 05 heures d'agitation, le mélange est filtré et centrifugé à 2000 tours/minute pendant 5 minutes avant d'être lyophilisé.

Celui de *Sterculia setigera* est obtenu par la décoction de 125 g de la poudre des feuilles de *Sterculia setigera* Del dans 1 litre d'eau distillée. Le filtrat est centrifugé à 2000 tours/minute pendant 5 minutes puis lyophilisé.

II-3-1-1- Rendement de l'extraction

II-3-1-1-1- Taux d'humidité résiduelle

$$\text{THR} = \frac{(P_0 - P)}{P_0} \times 100$$

Avec THR = Taux d'Humidité Résiduelle, P0 = poids initial du matériel végétal

P = poids final du matériel végétal après chauffage à 100 °C à l'étuve (jusqu'à poids constant).

II-3-1-1-2-Rendement d'extraction

$$R = \frac{P}{(P0 - THR)} \times 100$$

Avec R = rendement de l'extraction, P0 = poids initial du matériel végétal utilisé pour la macération, P = Poids du lyophilisat obtenu, THR = Taux d'humidité résiduel

II-3-2- Screening phytochimique

La méthodologie expérimentale adoptée pour faire le screening phytochimique est la même pour les deux extraits de plantes. C'est la méthode de Houghton et Amala (1998) basée sur des réactions différentielles de précipitations et de coloration complétée et améliorée (voir le détail en annexe 1).

II-3-2-1- Caractéristiques phytochimiques

L'interprétation des résultats du screening phytochimique est faite en se référant aux réactions de colorations et/ou de précipitations attendues respectivement des tests de caractérisation des principaux groupes chimiques.

II-3-3- Extraction des huiles essentielles

La technique d'extraction utilisée est celle de l'Hydro distillation. C'est la méthode la plus utilisée. La matière végétale est mise en contact direct avec l'eau en ébullition dans un ballon à fond rond. Le ballon, muni d'un essencier en verre de type Clavenger est chauffé à l'aide d'une chauffe ballon électrique. L'essencier est surmonté d'un réfrigérant à boules en mode ascendant. L'hydro distillation s'effectue à la pression atmosphérique et à la température de l'eau en ébullition. La matière végétale est introduite dans le ballon rempli d'eau à moitié ou au deux tiers de son volume (**Figure 15**).

La vapeur entraîne les produits volatils constituants de l'huile essentielle et monte dans le système réfrigérant. Par condensation, le mélange eau huile essentielle tombe dans l'essencier tandis que l'eau contenue dans celui-ci retourne dans le ballon par siphonage. L'huile moins dense et non miscible à l'eau, surnage et peut être récupérée à l'aide d'une pipette.

Chaque distillation dure en moyenne entre 180 et 240 minutes; les huiles essentielles récupérées sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre et pesées.

II-3-4-Analyse chromatographique de l'huile essentielle

L'analyse chromatographique est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de Marque Trace GC Thermo Quest, CE Instruments. Il est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un injecteur split/splitless et d'une colonne apolaire DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). La température du four est programmée de 50 à 300° C avec un gradient de température de 5°C/min. L'injecteur et le détecteur sont maintenus respectivement à 240° C et 250° C. Le débit du gaz vecteur hydrogène est de 35 mL/min, celui du gaz combustible air est de 350 mL/min. La quantité d'huile injectée est de 1 μ L à 5% dans du pentane.

Les composants sont identifiés sur la base de leurs temps de rétention et leurs indices de Kovats. Les indices expérimentaux sont comparés à ceux de la littérature (Jennings et *al.*, 1989; Adams, 2001) et de la banque de données du laboratoire.

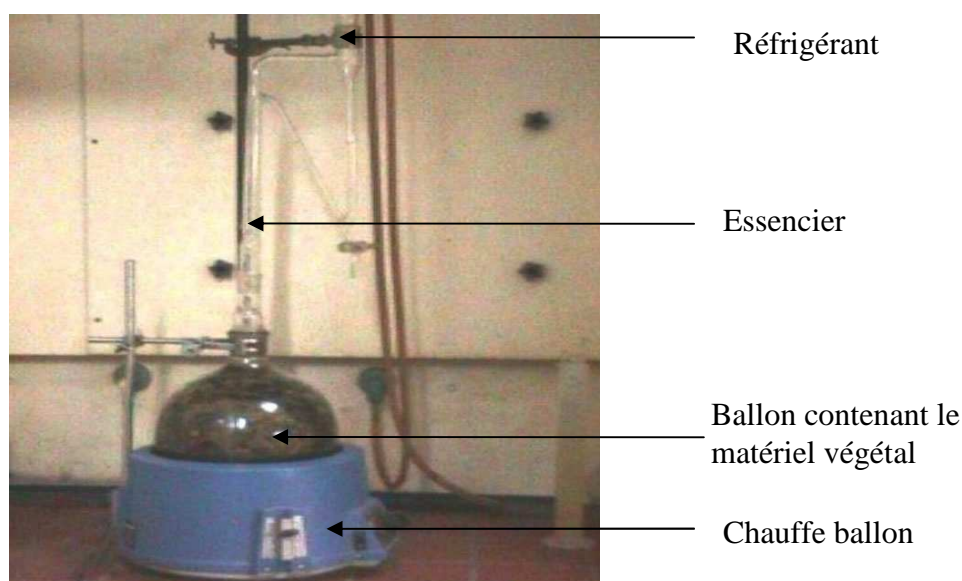


Figure 15: Dispositif d'extraction de type Clavenger

II-3-5-Etude de la toxicité aiguë

II-3-5-1-Protocole d'étude de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë des différents extraits a été évaluée. L'évaluation a été faite selon une adaptation du Laboratoire de Toxicologie de l'IRSS à partir de la méthode initiale de Trevan

(1927) et ses différentes modifications successives: Miller et Tainter (1944) ; Lichtfield et Wilcoxon (1949); Prieur et *al.* (1983); Descotes (1985) en utilisant le programme informatique de Tallarida et Murray (1987).

La détermination de la DL₅₀ a été réalisée avec les lyophilisats des décoctés aqueux des extraits. La méthode consiste à déterminer la dose efficace des extraits de plantes administrée qui tue 50% des animaux soumis à l'expérimentation.

II-3-5-1-1- Constitution des groupes expérimentaux

Des lots de 5 souris ont été constitués de la façon la plus homogène possible (poids moyen = 32,29 ± 2,43 g). Ces différents lots de souris ont été mis à jeun 18 heures avant le test et ont reçu par voie intra péritonéale respectivement des doses croissantes des extraits à étudier et l'eau distillée. Elles ont été ensuite suivies pendant 72 heures et le nombre de morts dans chaque lot et les modifications de comportement au cours du test ont été notées.

II-3-5-1-2- Traitement des groupes expérimentaux et modalité de détermination de la DL₅₀ par voie intra-péritonéale (IP)

Après un essai préliminaire, 6 lots de 5 souris mâles et femelles ont été constitués pour la détermination de la dose létale 50%.

Pour la recherche de la dose létale 50% (DL₅₀) du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*, 5 lots ont reçu respectivement des doses de 1000, 1250, 1500, 1750 et 2000 mg/kg de poids corporel de l'extrait lyophilisé. Le dernier lot (lot témoin) a reçu de l'eau distillée.

Pour l'extrait aqueux de *Sterculia setigera*, 05 lots ont reçu respectivement des doses de 100, 250, 500, 750 et 1000 mg/kg de poids corporel de l'extrait lyophilisé. Le dernier lot (lot témoin) a reçu de l'eau distillée.

Les produits sont administrés aux animaux par la voie intra péritonéale (IP). Le volume d'administration est inférieur à 0,5mL (volume maximal requis par voie IP). Les animaux, une fois traités, ont été observés pendant 2, 24, 48 et 72 heures qui suivent l'administration des extraits. Au cours de l'observation, les symptômes d'intoxication des animaux ont été notés. Les souris mortes dans chaque lot ont été dénombrées pour la détermination de la DL₅₀.

II-3-5-1-3-Modalité de détermination de la DL50 par voie orale (*per os*)

Après un essai préliminaire, 5 lots de 5 souris mâles et femelles ont été constitués pour la détermination de la dose létale 50% *per os* de chacun des extraits.

Quatre lots ont reçu respectivement des doses de 1000, 1500, 2000 et 3000 mg/kg de poids corporel de chaque extrait. Le dernier lot (lot témoin) a reçu de l'eau distillée.

Les produits ont été administrés aux animaux par la voie orale (*per os*). Le volume d'administration était inférieur à 0,5 mL.

Les animaux une fois traités ont été observés pendant les 2 heures qui suivent l'administration des extraits et sont ensuite alimentés. Après ils sont observés pendant 24, 48 et 72 h, périodes au cours desquelles les symptômes d'intoxication ont été notés.

Les souris mortes dans chaque lot ont été dénombrées pour la détermination de la DL₅₀.

Au cours des 72 h d'observation qui ont suivi l'administration de chacun des deux extraits évalués (en *IP* et en *per os*), les animaux morts ont été automatiquement disséqués. Le foie, le rein, le pancréas, la rate, les poumons, l'estomac et les intestins sont prélevés pour une comparaison macroscopique avec les témoins.

II-3-5-2-Analyse des résultats

L'analyse des résultats de la toxicité aiguë est basée sur la détermination de la valeur de la dose létale 50% (DL₅₀) des extraits. Un tracé du pourcentage de mortalité en fonction des doses de l'extrait utilisé a été réalisé au moyen du logiciel EXCEL 2007.

La comparaison des rapports DL₉₉/DL₅₀ et DL₅₀/DL₁ a servi de tests pour valider la droite de toxicité et si les rapports sont égaux, l'expérimentation est validée. La DL₅₀ rapportée à l'échelle de toxicité de l'OMS (2002) et celle de la toxicité de HODGE et STERNER (1943) a permis de classer les extraits étudiés.

Tableau I: Echelle de toxicité aiguë des produits chimiques OMS (2002)

Classes de risque	DL ₅₀ pour le rat ou la souris (mg/kg)				Indications de risque
	Orale		Dermale		
	Solides	Liquides	Solides	Liquides	
Ia: extrêmement dangereux	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40	Très toxique
Ib: très dangereux	5-50	20-200	10-100	40-400	Toxique
II: modérément dangereux	50-500	200-2 000	100-1000	400-4 000	Nocif
III: peu dangereux	< 500	< 2 000	< 1 000	< 4 000	Attention

Tableau II : Echelle de toxicité aigüe de Hodge et Sterner, (1943)

Classe de toxicité	DL ₅₀ (rat, souris : mg/kg)	Dose pour un enfant de 12,5kg
Extrêmement toxique	< 1	8 mg (le fait d'en goûter)
Très toxique	1 à 50	500 mg (le fait d'avaler une petite gorgée)
Moyennement toxique	50 à 500	5g (le fait d'en avaler une cuillerée à café)
Faiblement toxique	500 à 5 000	60 g (le fait d'en consommer un coquetier)
Pratiquement non toxique	5 000 à 15 000	180g
Relativement sans danger	> 15 000	> 180 g

Le rapport DL₉₉/DL₁ a été calculé afin d'apprécier l'indice de sécurité (IS) des drogues.

Si IS < 5 = l'indice de sécurité est faible.

Si 5 < IS < 10 alors l'indice de sécurité est acceptable

Si IS > 10 alors l'indice de sécurité est bon (OMS, 2002).

L'estimation de l'écart type de la DL₅₀ selon la méthode de Miller et Tainter (Valette, 1972) se fait de la manière suivante: on lit sur le graphique les doses correspondant respectivement à 16 % et 84 % de mortalité (probits 4 et 6); en soustrayant le premier du second, on obtient la valeur 2 S qui est l'accroissement de dose nécessaire pour accroître la réponse de 2 probits. L'écart type approché est donné par:

$$E = \frac{2S}{\sqrt{2N'}}$$

N' = nombre total d'animaux dans les groupes qui ont donné des pourcentages de mortalité compris entre 6,7 et 93,3 % (soit en probit: 3,5 et 6,50).

II-3-5-3-Traitement statistique des résultats

Le traitement statistique des résultats toxicologiques a été effectué à l'aide du logiciel PHARM/PCS (Pharmacologic Calculation System) version 4.2 du "Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs "Second Edition (New York Inc.) avec une précision de $p < 0,001$.

II-3-6-Etude de la cytotoxicité

C'est un test préliminaire de toxicité non clinique qui a été proposé par Michael et *al.* (1956) et plus tard mis au point par Vanhaecke et *al.* (1981) et Solis et *al.* (1999).

II-3-6-1- Protocole de l'étude

II-3-6-1-1-Incubation des œufs de crevette saumure et obtention des larves

Les œufs de *Artemia salina* ont été mis en incubation à la température du Laboratoire (28 - 30°C) dans un erlen de 1000 mL contenant de l'eau de mer prélevée dans l'océan Atlantique. L'ensemble est mis sur un agitateur va-et-vient pendant 48 heures sous agitation douce. Pendant ce temps, les œufs éclosent pour donner naissance à de jeunes larves de crevette. Après l'éclosion, les jeunes larves actives sont séparées des coquilles d'œufs à l'aide d'une source lumineuse. Elles sont ensuite collectées avec une pipette et transférées dans un autre erlen contenant toujours de l'eau de mer.

II-3-6-1-2-Préparation des solutions des extraits

Les solutions mères des extraits aqueux sont préparées dans l'eau de mer à une concentration de 100 mg/L.

Dans 10 tubes à essai, sont réalisées une gamme de concentrations décroissantes des extraits aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* et de *Sterculia setigera* en procédant à une dilution, en série géométrique de raison 2, de chaque solution mère.

II-3-6-1-3-Réalisation de la CL₅₀ des extraits

Dans les tubes à essai contenant une gamme de concentrations décroissantes de chaque extrait (50 mg/mL dans le premier tube et $4,88 \cdot 10^{-2}$ mg/mL dans le dernier) nous ensemençons 16 larves contenus dans 1mL d'eau de mer. Tout l'ensemble est incubé pendant 24 heures à la température du Laboratoire (28 à 30° C).

II-3-6-1-4-Lecture et dénombrement des larves mortes

Après 24 heures, les tubes à essai sont examinés. Le nombre de survivants dans chaque tube est compté et le nombre de larves mortes est enregistré. Les larves sont considérées comme mortes, si elles ne présentent pas de mouvement interne ou externe pendant quelques secondes d'observation. Ces résultats sont consignés dans un tableau. Les larves ne reçoivent

pas de nourriture. Pour s'assurer que la mort observée dans les essais est attribuée uniquement aux extraits et non à la faim, on compare les tubes à des tubes témoins contenant des solutions larvaires uniquement. Les larves de crevette artémias peuvent survivre jusqu'à 48 h sans denrées alimentaires (Michael et al., 1956; Harwig et al., 1971) du fait qu'ils se nourrissent de leur sac vitellin (Migliore et al., 1997).

II-3-6-1-5-Détermination de la CL 50

La concentration létale (CL₅₀) à laquelle 50% des larves ont été tuées, a été déterminée à partir du graphe présentant le nombre de mort de larves en fonction des différentes concentrations. Cette valeur est obtenue à partir de la droite de meilleur ajustement de la moitié du nombre de décès sur la courbe puis sur l'axe des concentrations (Latha et al., 2007).

II-3-6-2- Traitement statistique

Après avoir observé l'homogénéité et la normalité des variables, nous avons effectué la comparaison entre les variables des extraits et la variable du lot témoin à l'aide des logiciels STATISTICA Statsoft version 5.5 et le logiciel Microsoft Excel 2007 sous Windows VISTA. Les comparaisons des valeurs moyennes ont été effectuées au moyen des tests paramétriques: Test de student en série non appariée. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$.

II-3-7- Etudes des propriétés broncho relaxantes

II-3-7-1-Protocole d'étude

II-3-7-1-1-Prélèvement et préparation des anneaux

Pour l'étude des effets des drogues sur l'organe isolé, les rats de sexe mâle ont été mis à jeun pendant 18 heures avant le test. Ils ont ensuite été anesthésiés avec de l'uréthane 40% à raison de 1,5 g/kg de poids corporel par voie intraveineuse. Une fois le rat endormi, la trachée est prélevée le plus près possible de la tête et transférée dans un récipient contenant une solution physiologique solution de Kreb's (Schramm, 2000).

La trachée est ensuite découpée transversalement entre les segments de cartilage, pour obtenir 4 à 5 anneaux du muscle trachéal. Ces anneaux sont ensuite rincés et montés dans la cuve à organe isolé de 20mL \pm 10% et contenant la solution de Krebs maintenue à 37°C grâce à un

bain-marie. Un bulleur permet l'oxygénation des fragments d'organes ainsi placés à 95% d'oxygène et à 5% de dioxyde de carbone. L'anneau de trachée est monté de façon parallèle entre les supports triangulaires munis de crochet dont l'un des bouts est fixé à l'intérieur de la cuve et l'autre relié au capteur isométrique de type 60g et de marque EMKA. Après la mise en place de la trachée dans la cuve, la préparation est soumise à une masse comprise entre 300mg et 500mg, pendant 1 h de sorte à obtenir des contractions régulières et spontanées (Loenders et *al.*, 1992). Elle est ensuite équilibrée progressivement à la masse de 1,5g pendant 30min. Pendant ces 90 min d'incubation et de stabilisation, on réalise un rinçage toutes les 15 minutes afin de renouveler le milieu de survie de l'organe. Le dispositif expérimental est représenté par la photo de la **figure 16**.

II-3-7-1-2- Contraction au KCl

Le principe de l'étude est basé sur celui de Magnus (1904) qui consiste à injecter une dose unique de KCl ($4.10^{-2}M$) dans la cuve à organe isolé et d'enregistrer les modifications de contractions induites. Ces modifications permettent de vérifier la fonctionnalité des fibres musculaires lisses de la trachée au cours de la dépolarisation. En effet, la dépolarisation active les canaux calciques voltage-dépendant (ou voltage-operated channels (VOC), permettant ainsi un influx calcique et une contraction des muscles lisses (Coburn et Baron, 1990; Rodger, 1992 et 1993).

Après la contraction de l'organe par le KCl, des doses de chaque extrait sont ajoutées au bain selon la méthode de Magnus (1904).

II-3-7-1-3-Contraction à l'Acétylcholine ($C_7H_{16}NO_2$)

L'acétylcholine ($10^{-5}M$) (Kouloumenta et *al.*, 2006) est injectée dans la cuve. Quand le plateau de contraction est atteint, la méthode cumulative est réalisée avec des concentrations croissantes de chaque extrait.

II-3-7-1-4-Effet du Propranolol ($C_{16}H_{21}NO_2$)

Afin de vérifier une implication des récepteurs β_2 -adrénergiques dans l'activité bronchodilatatrice des extraits aqueux, certaines préparations sont incubées en présence du propranolol $10^{-6}M$.

II-3-7-1-5- Effet de l'Atropine (C₁₇H₂₃NO₃)

L'effet anti-spasmodique de l'atropine est examiné en l'introduisant à concentration cumulative (10⁻⁸M à 10⁻⁵M) dans la cuve, quinze (15) minutes après l'administration de l'acétylcholine.

II-3-7-1-2-Analyse des données

La relaxation produite par chaque extrait aqueux est exprimée en pourcentage (%) de relaxation. Les courbes concentrations-réponses sont tracées et les concentrations efficaces 50% (EC50) sont déterminées.

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes ± SEM pour la mise en évidence de l'effet broncho relaxant des extraits aqueux, de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*, sur les anneaux de trachée.

Le pourcentage de relaxation de la contraction dû à un évènement (acétylcholine, KCl ou propranolol) est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Pr} = \frac{(\text{H1} - \text{H2})}{\text{H1}} \times 100$$

Avec Pr = Pourcentage de la relaxation de la contraction

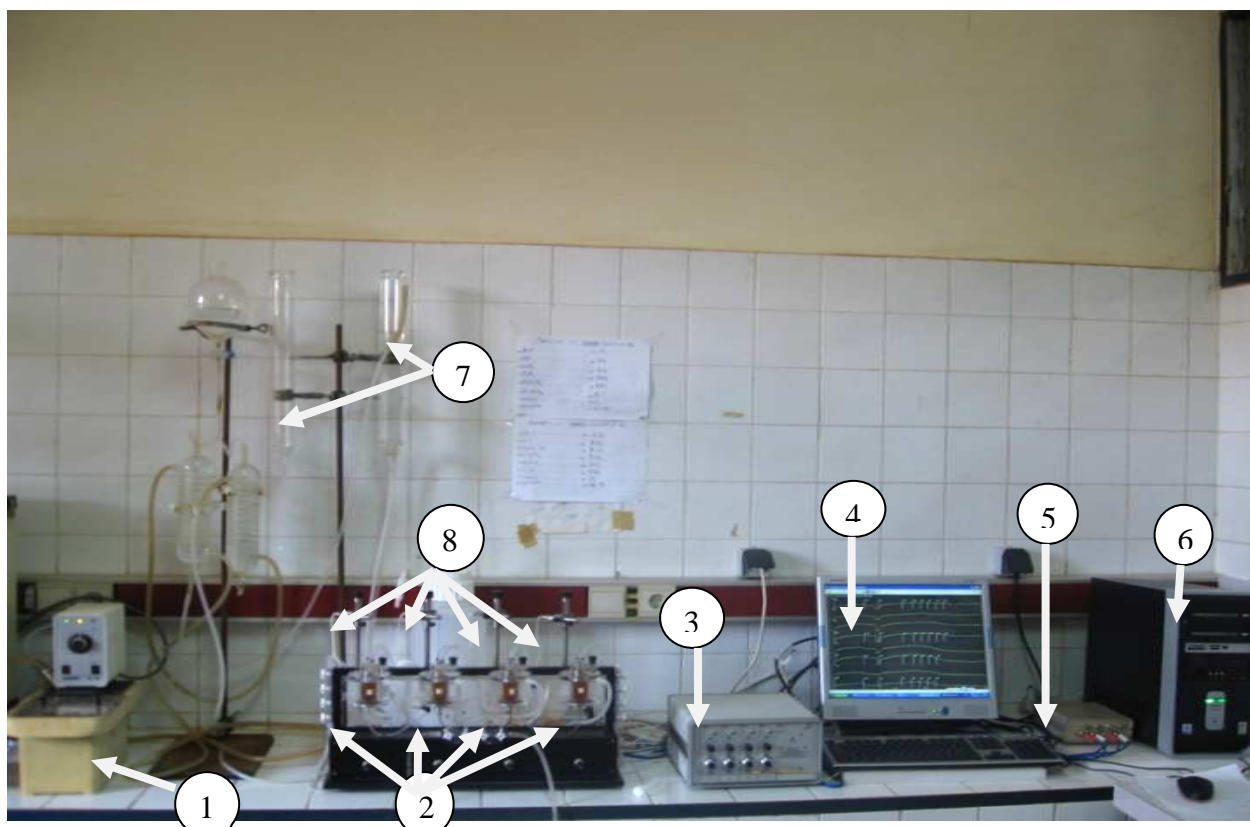
H1 = Hauteur du pic atteint suite à un premier évènement

H2 = Hauteur du pic atteint suite à un second évènement

Les différentes figures ont été tracées au moyen du logiciel EXCEL 2003 et du Logiciel Prism 2.01

II-3-7-1-3-Traitement statistique des résultats

Les données statistiques ont été traitées avec le logiciel PCS, one way analysis of variance. Le test t-student a permis la comparaison des moyennes. Les résultats ont été exprimés sous forme moyenne ± SEM (Means Standard Error). Le seuil de significativité est fixé à p< 0,05.



1: Bain-marie **2:** Cuves à organe isolé **3:** amplificateur **4:** Moniteur **5:** Programme de mesure **6:** Disque dur **7:** Réservoirs de solution physiologique **8:** Capteurs isométriques

Figure 16: Dispositif expérimental pour les études sur organes isolés (MEPHATRA/PH/IRSS/Burkina Faso., 2010).

II-3-8- Etudes des propriétés anti-inflammatoires

II-3-8-1- Protocole d'étude

Pour chaque test, 6 lots de 5 animaux sont constitués. Tous les animaux sont mis à jeun au moins 18 heures à l'avance, mais ils ont de l'eau *ad libitum*.

II-3-8-1-1- Induction de l'œdème

L'œdème est provoqué par l'injection, dans l'aponévrose de la plante de la patte droite arrière des cochons d'Inde, de 0,1mL de solution de formol à 1%. Les mesures du volume du pied sont effectuées à 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 et 360 minutes après l'injection (Abéna et *al.*, 1995, 1997, 2007). Trente minutes avant l'injection de la solution de formol, les animaux à traiter reçoivent par voie orale 1000 mg/kg et 1500 mg/kg de poids corporel d'extrait de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* dans 4 mL d'eau

distillée. L'indométacine (anti-inflammatoire non stéroïdien, fréquemment utilisé pour réduire la fièvre, la douleur, la raideur et l'inflammation et qui agit par inhibition de la production de prostaglandines (molécules qui provoquent ces symptômes) est utilisée comme produit de référence à la dose de 100 mg/kg. Les animaux témoins au niveau de tous les tests reçoivent 4 ml d'eau distillée. Au total 6 lots de 5 animaux sont utilisés.

Le volume de la patte est déterminé par la méthode d'immersion (dispositif de Bhatt modifié) ce qui provoque une augmentation du niveau d'eau. Le niveau de l'eau est ramené à sa position initiale dans la grande seringue à l'aide des seringues 1 et 2 (**Figure 17**). Le volume de la patte qui correspond à la quantité d'eau déplacée est directement lu sur la seringue 1.

II-3-8-1-2- Activité antalgique/analgésique

Elle est recherchée chez les animaux par la méthode de "foot soaking". Une heure après l'administration orale des solutions des extraits de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* -*Citrus aurantifolia* à 1000 mg/kg et à 1500 mg/kg, la patte gauche de chaque animal est placée dans de l'eau chaude maintenue à 50°C. Le temps que met l'animal pour retirer sa patte est mesuré et est considéré comme temps de réaction. L'acétylsalicylate de lysine (Aspégic) à 50mg/kg est utilisé comme produit de référence.

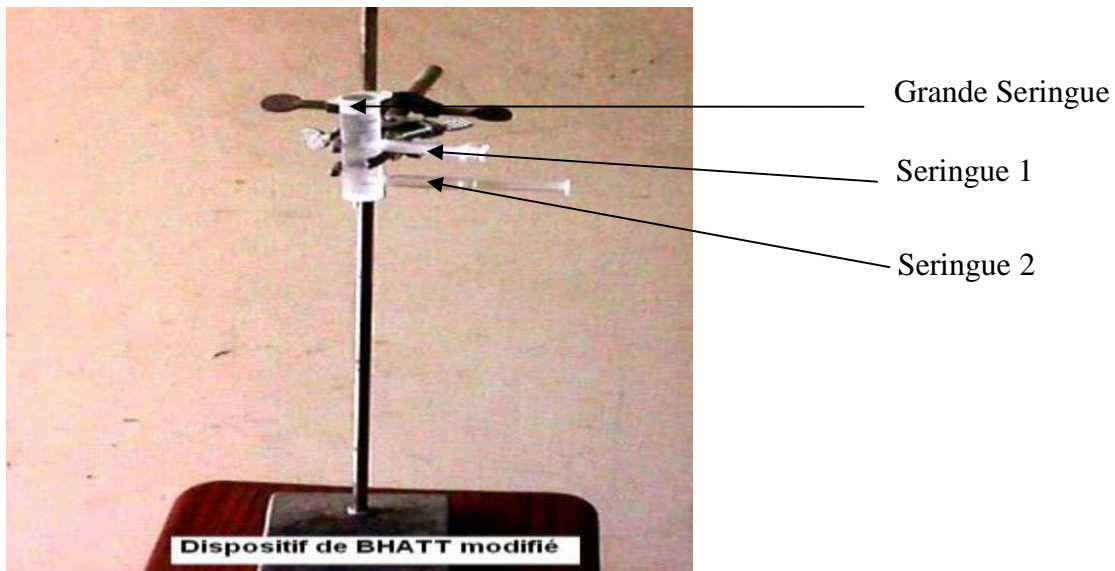


Figure 17 : Photo du dispositif de Bhatt et *al.* (1977) modifié

II-3-8-1-3- Activité antipyrétique

L'hyperthermie est induite par administration en intra-péritonéale (*ip*) au niveau de l'abdomen, d'une solution aqueuse de la levure de bière (LB) à 20% à la dose de 4mL/kg aux cochons d'Inde. Les températures rectales témoins sont mesurées 24 h après l'injection de la levure de bière à l'aide d'une sonde (Adoukonou et *al.*, 2007). Deux doses ont été testées (1000 mg/kg et 1500 mg/kg) par extrait aqueux. L'acétylsalicylate de lysine (Aspégic) à 50mg/kg de poids d'animaux est utilisé comme produit de référence.

II-3-8-2- Analyse des résultats

Le volume de l'œdème V_T à un temps t_i donné est : $V_T = V_{t_i} - V_0$

Avec V_0 = le volume initial du pied, V_{t_i} = le volume du pied au temps t_i .

Le pourcentage d'augmentation A du volume du pied est donné par la relation:

$$A = \frac{V_T}{V_0} \times 100$$

Le pourcentage d'inhibition P de l'œdème est :

$$P = \frac{(V_{Tf} - V_{Tp})}{V_{Tf}} \times 100$$

Avec V_{Tf} = volume de l'œdème chez les témoins, V_{Tp} = le volume de l'œdème chez les animaux traités.

II-3-8-3-Traitement statistique

Pour l'analyse des résultats obtenus, nous avons effectué dans un premier temps, un test A NOVA, pour comparer les valeurs. Dans un second temps, le test "t" de STUDENT-FISCHR avec le logiciel STATISTICA version 5.5. Les différences sont hautement significatives, si $p < 0,05$; elles sont calculées par rapport aux témoins.

II-3-9- Etudes des propriétés antitussives

II-3-9-1-Protocole d'étude

Des lots de 6 animaux chacun sont constitués. Ils sont maintenus à jeun pendant 18 heures mais ils ont de l'eau *ad libitum*.

II-3-9-1-1-Induction de la toux par inhalation de la vapeur de l'acide citrique à 20%

La méthode utilisée est celle de Hosseinzadeh (2006) modifiée. Le jour de l'expérience, chaque animal est placé dans un bocal cylindrique en verre de 20 cm de diamètre et de 32 cm de hauteur. Pour l'administration des extraits, cinq doses de chaque extrait ont été testées (1000, 1500, 2000, 2500 et 3000 mg/kg). Les animaux du lot témoin sont traités à l'eau distillée. Ceux du lot référence sont traités par 10 mg/kg de Néo-Codion. Tous les animaux d'un même lot reçoivent la même dose d'extraits sous un volume constant égal à 4 mL de solution et ce, 30 minutes avant l'induction de la toux.

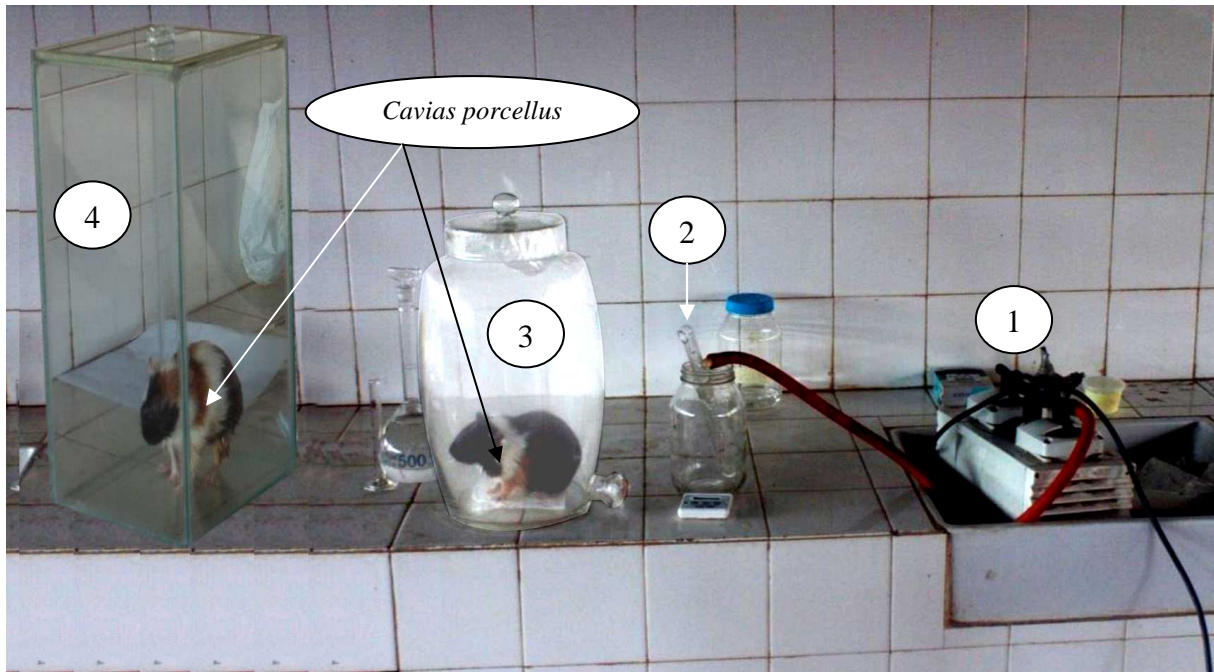
La toux sèche est provoquée par inhalation de la vapeur de 10 mL d'une solution d'acide citrique à 20% vaporisée dans le bocal cylindrique clos, sous une pression de 550 mm Hg à l'aide d'une pompe à air de marque Büchi Vac[®] V-500 pendant 10 min (**figure 18**).

II-3-9-1-2- Enregistrement des contractions des muscles intercostaux

Après l'induction de la toux, les animaux sont déplacés dans une cage en verre (20 x 20 x 40 cm³) et on observe le thorax en comptant le nombre de contractions des muscles intercostaux pendant 10 min.

II-3-9-2-Traitement statistique

Les résultats sont traités par le logiciel SPSS 12.0 for Windows et représentent les moyennes plus ou moins l'erreur standard sur la moyenne ($m \pm E.S.M$). Le test de Student, par rapport au lot témoin, a permis d'évaluer la différence significative au seuil de probabilité $p < 0,05$.



1: pompe à air de marque Büchi Vac® V-500 qui permet de pulvériser la solution d'acide citrique, **2:** pulvérisateur contenant 10 mL d'une solution d'acide citrique à 20% pour induire la toux sèche, **3:** bocal cylindrique clos dans lequel l'animal est placé pour inhaler le gaz d'acide citrique, **4 :** cage en verre (20 x 20 x 40 cm³) pour le décompte des contractions inter-costales.

Figure 18: Photographie du dispositif expérimental d'induction de la toux

II-4- METHODES DE L'ETUDE CLINIQUE

II-4-1- Nature de l'étude

C'est une étude longitudinale comparative et contrôlée de type expérimental, avec traitement préventif réalisé en quatre groupes. Elle vise à vérifier l'effet du mélange aqueux de *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* sur le bronchospasme induit par l'exercice (BIE).

II-4-2- Préparation de l'extrait aqueux

Le décocté du citron est préparé selon la méthode utilisée par le praticien de la médecine traditionnelle (qui a mis la recette à notre disposition). $125 \pm 2,5$ g de feuilles et $290 \pm 2,5$ g de fruits de *Citrus aurantifolia* sont introduits dans 1L d'eau potable. L'ensemble est mis à ébullition pendant trente (30) minutes. Le décocté obtenu est filtré et conservé dans un thermos afin de le garder tiède, le temps que tous les sujets prennent leur dose.

NB : Les différentes quantités de feuilles (125 g), de fruits (290 g) et de graines (125 g) sont des valeurs moyennes obtenues après environ vingt (20) essais par le praticien de la médecine traditionnelle.

II-4-3- Sujets de l'étude

L'échantillon d'étude est constitué des étudiants en Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) de l'INJEPS, pratiquants des sports individuels et collectifs (athlétisme, gymnastique, football, basket-ball, hand-ball et volley-ball) et ayant satisfait à tous les critères de l'expérience. Ils ont au moins 4 heures d'activités physiques par jour, soit 20 heures au moins par semaine durant l'année académique. Ils vivent à l'internat et sont soumis au même régime alimentaire au cours de l'année académique.

II-4-3-1- Critères d'inclusion

Les sujets des deux sexes sont utilisés. Pour être inclus dans l'échantillon d'étude, chaque sujet devrait :

- Etre de sexe masculin ou féminin et volontaire,
- Etre pratiquant dans l'un des sports précités,
- Etre âgé (e) de 18 à 25 ans inclus,

- Donner son consentement écrit (annexe 2) en toute connaissance de cause, pour prendre part à l'étude,
- Avoir connaissance de la notice d'information (annexe 2),
- Etre apparemment sain et n'ayant aucune pathologie respiratoire,
- Avoir des géniteurs non asthmatiques.

II-4-3-2- Critères de non inclusion

Les sujets malades ou qui le seront au cours des 15 jours qui vont précéder le début de l'étude ne seront pas inclus dans l'échantillon d'étude. De même que ceux qui auront des traumatismes de tout genre au cours de l'étude.

II-4-3-3- Critères d'exclusion

Les sujets qui pourront avoir un épisode de fièvre, de diarrhée, de rhume, de toux ou d'asthme et ceux qui n'auront pas respecté les consignes au cours du traitement seront exclus de l'échantillon d'étude.

II-4-3-4- Formation des groupes expérimentaux

Au total, 52 sujets ont respecté tous les critères et sont retenus pour le test. Quatre groupes, contenant chacun de 13 étudiants, ont été formés en fonction de leur pourcentage de diminution du Volume Expiratoire maximal par Seconde (VEMS).

- G1 (groupe témoin recevant de l'eau tiède),
- G2 (groupe avec traitement à l'extrait de *Aframomum melegueta* seul),
- G3 (groupe avec traitement au décocté du *Citrus aurantifolia*) et
- G4 (groupe avec traitement au mélange aqueux de *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia*).

II-4-4- Variables étudiées

Deux variables sont étudiées dans le cadre de cette étude : la variable indépendante et la variable dépendante.

II-4-4-1-Variable indépendante

La variable indépendante dans cette étude est le type de traitement aux extraits :

- traitement à l'extrait aqueux de *Aframomum melegueta* seul (une cuillerée à café (5 g) de *Aframomum melegueta* dans un demi-verre d'eau tiède (100 mL) au groupe G2,
- traitement au décocté aqueux de *Citrus aurantifolia* (un demi-verre (100 mL) du décocté des feuilles et fruits) au groupe G3,
- traitement au mélange aqueux de *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* (une cuillerée à café de *Aframomum melegueta* (5 g) dilué dans un demi-verre du décocté des feuilles et fruits de *Citrus aurantifolia* tiède au groupe G4.
- Le groupe G1 constitue le groupe témoin et recevra 100mL d'eau tiède.

Tous les groupes G1, G2, G3 et G4 vont appliquer leur traitement par jour pendant 14 jours.

Notons que les verres utilisés ne sont pas transparents. Les sujets n'identifient pas ce qu'ils consomment.

II-4-4-2-Variables dépendantes

Il s'agit du VEMS et de la CRP.

- **Le Volume expiratoire maximal par seconde (VEMS)**

C'est le volume maximal soufflé lors de la première seconde de l'expiration forcée. Les valeurs individuelles post exercice du VEMS sont exprimées en pourcentage de variation par rapport aux valeurs de VEMS au repos. Le bronchospasme est observé par la réduction du VEMS. Le diagnostic positif de bronchospasme d'effort est fait sur une diminution du VEMS d'au moins 10%. Le diagnostic négatif est fait sur une chute du VEMS inférieure à 10% (Mannix et al., 1996; Leuppi et al., 1997; Wilber et al., 2000; Rundell et al., 2003; Rundell et al., 2004; Durand et al., 2005).

Calcul du pourcentage de variation du VEMS :

$$\text{Pourcentage de variation du VEMS} = \frac{(\text{VEMS post} - \text{VEMS pré})}{\text{VEMS pré}} \times 100$$

Avec VEMS pré = Volume expiratoire maximal par seconde avant effort, VEMS post = Volume expiratoire maximal par seconde après effort.

- **La C réactive protéin (CRP)**

C'est une protéine du sang, synthétisée par le foie après la pénétration dans le sang d'un antigène. Son apparition dans le plasma (partie liquide du sang) s'effectue immédiatement après introduction d'un antigène dans l'organisme et elle disparaît plus tard lors de la formation d'un anticorps (Volanakis, 2001). C'est un des marqueurs de l'inflammation et sa concentration sanguine s'élève en présence de tout processus inflammatoire dans l'organisme. En dehors de toute inflammation, la valeur de la protéine C réactive est inférieure à 6 mg/L.

II-4-5- Protocole expérimental

II-4-5-1-Procédures

Toutes les mesures anthropométriques ont été faites entre 07 heures et 09 heures du matin. Il s'agit de la taille et de la masse corporelle. Ces mesures nous ont permis de calculer l'indice de masse corporelle.

L'étude a été effectuée en double aveugle, c'est-à-dire que les sujets savaient tous qu'ils consommaient des médicaments, mais ils n'avaient pas connaissance de leur groupe d'appartenance. Les techniciens chargés des analyses sanguines ne connaissent pas non plus les groupes d'appartenance des sujets. Afin d'éviter l'effet des extraits de plantes sur la concentration sanguine de la protéine C réactive (CRP) de début (J0) et dans le souci de ne pas biaiser les différentes valeurs de la protéine C réactive (CRP), le premier prélèvement sanguin pour le dosage de CRP de début est effectué chez tous les sujets de l'étude 24 heures avant le début du traitement.

Au jour J0 tous les sujets participants ont subi le test de provocation bronchique sur tapis roulant au laboratoire. Ils subissent le même test de provocation bronchique, à la fin du traitement par les extraits de plantes (J14), pour comparaison des valeurs (**Figure 19**). Le test sur tapis roulant provoque l'obstruction des voies respiratoires. Les 4 groupes ont appliqué leur traitement journalier pendant 14 jours de J₁ à J₁₄.

Pour garantir une bonne compliance des sujets pour les traitements proposés, il leur a été demandé de consommer leur extrait le matin entre 8 heures et 10 heures.

Les prélèvements, mesures et analyses de sang ont été effectués par les mêmes évaluateurs pour le dosage de la protéine C réactive. Trois heures après la dernière séance de provocation bronchique sur tapis roulant au laboratoire (J₁₄), la protéine C réactive (CRP) a été également dosée. Les troisième, quatrième et cinquième prélèvements ont été effectués respectivement

24, 48 et 72 heures après la dernière séance de test de provocation bronchique pour le dosage de la protéine C réactive. Au total 5 prélèvements ont été effectués chez chaque sujet. Le test de diagnostic du BIE est réalisé le jour J₀ et le quatorzième (J₁₄) jour chez tous les sujets de l'étude (**Figure 19**).

Les sujets n'ont été autorisés à consommer aucun supplément nutritionnel ni à avaler aucun médicament pendant les 15 jours qui ont précédé et succédé à la séance de provocation bronchique. Tous les sujets victimes d'épisode de maladie accompagnée de fièvre, sont systématiquement exclus de l'expérimentation. Les sujets participants ont été soumis au repos sans effort physique, au cours des 72 heures qui ont succédé le dernier prélèvement.

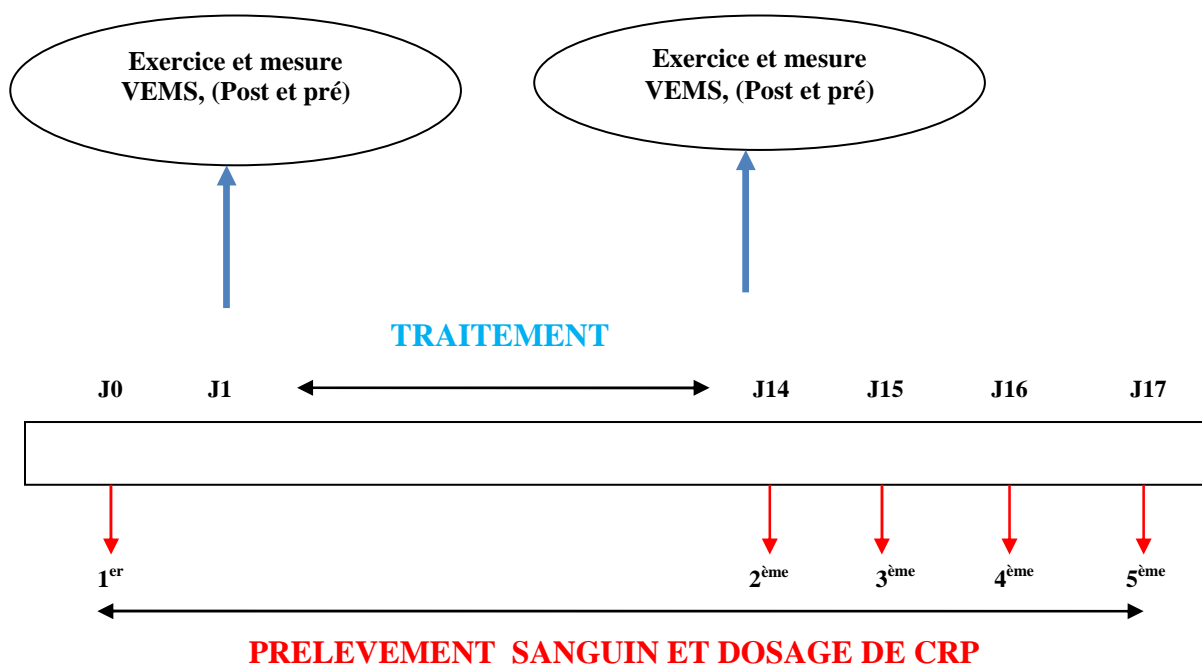


Figure 19: Résumé schématique du protocole expérimental

II-4-5-1-1-Mesures spirométriques de repos

Après avoir pris connaissance de la notice d'information, donné son consentement libre et rempli le questionnaire (annexe 2), les valeurs de la masse corporelle, de la taille, de l'âge ainsi que le sexe du sujet sont enregistrées. Le sujet se familiarise d'abord avec le spiromètre par essais. Des explications lui sont données afin qu'il puisse prendre connaissance des objectifs et du déroulement du test. Les embouts buccaux à usage unique sont utilisés pour observer l'hygiène médicale. Le test de spirométrie forcée est réalisé pour enregistrer les

paramètres ventilatoires de repos. Le sujet assis respire à travers l'embout buccal qu'il met dans la bouche. Il reçoit ensuite pour consigne, de gonfler au maximum ses poumons, puis de vider l'air le plus rapidement possible, de manière continue et complète. Après l'expiration, le sujet reprend sa respiration normalement. La courbe débit/volume s'affiche instantanément sur l'écran de l'appareil. Le test est répété jusqu'à ce que deux courbes reproductibles soient enregistrées en mémoire (**Figure 20**).

Après ces manœuvres, le sujet observe une pause de 10 minutes environ avant le test de provocation bronchique sur tapis.

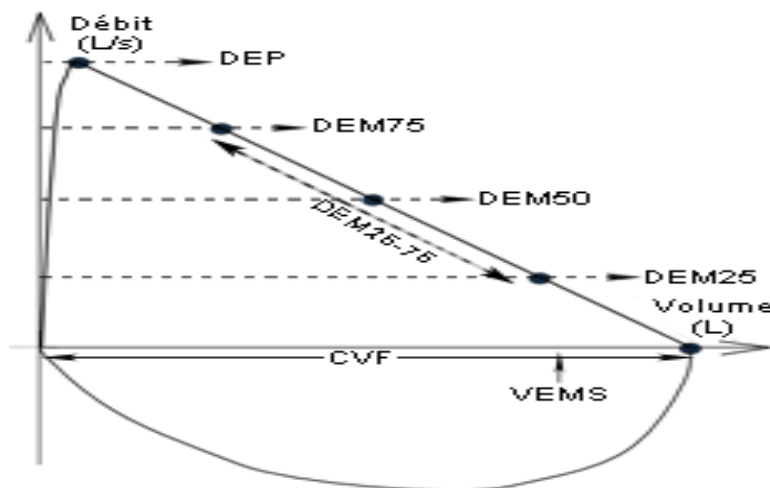


Figure 20: Courbe débit volume lors de la spirométrie

II-4-5-1-2-Test de diagnostic de l'BIE

Le tapis roulant est l'ergomètre choisi car il mobilise plus rapidement un débit ventilatoire élevé. Il s'agit d'obtenir au cours de l'effort continu, 80 à 90% de la fréquence cardiaque théorique et de maintenir cette intensité d'exercice pendant quatre minutes. A cette intensité d'effort, la ventilation maximale cible est obtenue.

Le protocole utilisé est le suivant : un échauffement de trois à quatre minutes pendant lequel on monte rapidement la charge pour atteindre 80 à 90% de la fréquence cardiaque maximale théorique du sujet ($220 - \text{âge} \pm 10$ années). Cette charge est maintenue ensuite constante pendant quatre minutes au moins. La durée totale de l'effort est de huit à dix minutes.

II-4-5-1-3-Mesures spirométriques après effort

A la fin de l'effort, le sujet observe une pause de 5 minutes avant de souffler à nouveau dans l'embout buccal afin d'éviter l'influence de la fatigue des muscles respiratoires sur la qualité des données spirométriques (Anderson et al., 2001).

L'index spirométrique choisi dans l'appréciation de la fonction respiratoire est le Volume Expiratoire Maximum par seconde (VEMS). L'Asthme Induit par l'Exercice est observé sur une diminution d'au moins 10% du VEMS après effort.

II-4-5-1-4-Protocole de dosage de la C-reactive protein (CRP)

Pour le dosage de la CRP, le protocole suivant a été suivi, en utilisant un kit AVITEX CPR de chez Omega avec une méthode semi quantitative de dilutions successives en série géométrique de raison 2.

- 50 µL d'eau physiologique ont été distribuées dans chaque cercle de la plaque qui accompagne le réactif.
- 50 µL du sérum positif ont été ajoutés dans le 1^{er} cercle (dilution au 1/2)
- 50 µL du mélange ont été transféré dans le 2^{ème} cercle (dilution au 1/4)
- Continuer l'opération jusqu'au dernier cercle
- du dernier cercle, 50 µL ont été prélevé et rejetés.

Le dosage a été effectué en distribuant 50µL de réactif dans chaque cercle. Le résultat positif est donné en mg/L et est représenté par le dernier cercle où on note encore une agglutination visible (**Figure 21**).

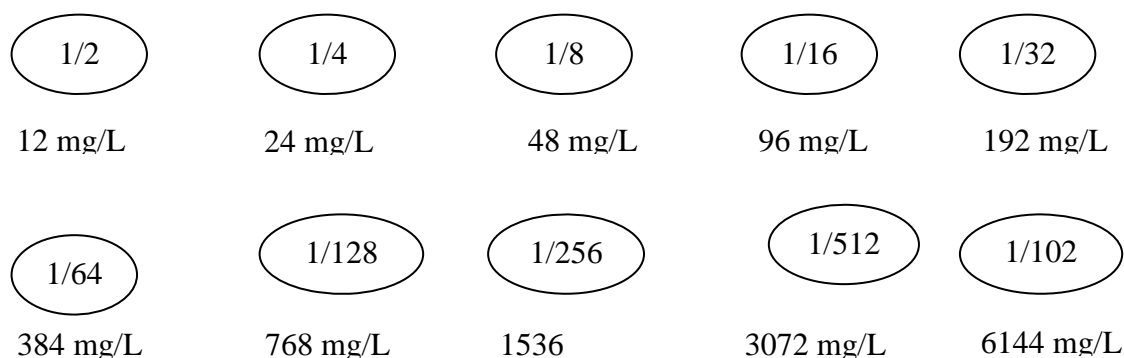


Figure 21: Méthode semi quantitative de dilutions successives en série géométrique de raison 2

II-4-6- CONSIDERATIONS ETHIQUES

Pour la réalisation de ce travail, nous avons obtenu un consentement libre, écrit et éclairé (annexe 2) des sujets participants. Un avis scientifique (annexe 2) a été accordé par le Comité Scientifique Sectoriel de l'INJEPS sur présentation des résultats de toxicité et biologiques de l'extrait.

L'avis éthique favorable, N°002 du 03 Mars 2011, est obtenu après étude du dossier et l'autorisation administrative de recherche, N°4079/MS/DC/SGM/DRS/SA du 12 Juillet 2011 est signée par le Ministère de la Santé du Bénin (annexe 2).

II-4-7- TRAITEMENT STATISTIQUE

Le logiciel Statistica Soft Inc (version 5.5) a été utilisé pour le traitement des données enregistrées. La moyenne (X), l'écart type (s) et l'erreur standard de la moyenne (SEM) ont été calculés pour chaque variable considérée. La comparaison de l'évolution des différents paramètres considérés a été effectuée par le test T de Student sur échantillon indépendant d'une part et en séries appariées d'autre part. Le seuil de significativité des tests statistiques a été fixé à $p < 0,05$.

RESULTATS

I-PARTIE PRECLINIQUE

I-1-ANALYSES PHYTOCHIMIQUES

I-1-1-Rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est de 7,54% pour le mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* et de 3,26% pour *Sterculia setigera*. L'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* présente un meilleur rendement par rapport à celui de *Sterculia setigera*.

I-1-2- Groupes chimiques mis en évidence dans les deux extraits

Les résultats du screening phytochimique sont consignés dans le **tableau III**.

De l'observation de ce tableau, on note que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les anthocyanes et leuco anthocyanes, les mucilages les composés réducteurs, les dérivés quinoniques, de même que des huiles essentielles sont présents dans chacun des extraits.

I-1-3-Extraction des huiles essentielles de *Aframomum melegueta* et de *Citrus aurantifolia* et analyse chromatographique

Les résultats des analyses chromatographiques des huiles essentielles (HE) sont consignés dans le **tableau IV** et illustrés par les **figures 22 (a et b)**.

Les composés identifiés sont respectivement de 94,02% pour l'huile essentielle de *Aframomum melegueta* et de 98,5% pour celle de *Citrus aurantifolia*.

Les composés majoritaires (**Figure 23**) sont :

- pour l'huile essentielle de *Aframomum melegueta*, β -caryophyllène (16,3%), α -caryophyllène (64,2%) et 17a-cyano-17a-hydroxy-prègn-4-èn-3-one (3,45%).
- au niveau de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, β -pinène (8,38%), para cymène (14,23%), limonène (51,37%) et α -terpinéol (6,84%).

Tableau III: Groupes chimiques mis en évidence dans les extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*.

Groupes chimiques recherchés	<i>Sterculiasetigera</i>	<i>Aframomum melegueta</i> - <i>Citrus aurantifolia</i>
Alcaloïdes	+	+
Tanins catéchiques	+	-
Tannins galliques	+	+
Flavonoïdes	+	+
Anthocyanes	+	+
Leuco anthocyanes	+	+
Dérivés quinoniques	+	+
Saponosides	-	-
Triterpenoides	+	-
Stéroïdes	-	-
Mucilage	+	+
Composés anthracéniques libres	-	-
Composés réducteurs	+	+
Coumarines	-	-
Cardénolides	-	-
Huiles essentielles	+	+

(+): réaction positive

(-): réaction négative

Tableau IV: Composition chimique des huiles essentielles de *Aframomum melegueta* et de *Citrus aurantifolia*

INDICE KOVATS	DE COMPOSES IDENTIFIES	POURCENTAGE (%)	
		<i>Aframomum melegueta</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>
871	4-Méthyl-2-hexanol	0,27	
939	alpha pinène		1,96
953	alpha fenchène		0,19
954	camphène		0,56
971	linalol oxyde (pyranoïque)		0,22
975	sabinène		0,29
978	béta pinène	0,98	8,38
991	myrcène		0,61
1015	1,4-cinéol		0,93
1025	para cymène		14,23
1026	o-Cymène	0,33	
1029	limonène		51,37
1031	1,8-cinéol		0,67
1044	1-Méthylhexyl acétate	1,76	
1060	gamma terpinène		1,02
1089	terpinolène		0,47
1091	para cyménène		0,46
1097	linalol		0,27
1117	endofenchol		0,51
1123	trans mentha-2,8-dièn-1-ol		0,21
1134	terpinène-1-ol		0,58
1142	trans oxyde de limonène		0,92
1146	cis beta terpinéol		0,54
1169	endobornéol		0,32
1177	terpinène-4-ol		0,90
1183	para cymène-8-ol		0,98
1195	alpha terpinéol		6,84
1217	transcarvéol	0,79	0,25
1269	transascaridol glycol		0,28
1317	menth-1-èn-4,8-diol		0,48
1338	delta élémène		0,28
1349	limonène glycol		0,76
1409	beta-Caryophyllène	16,3	
1419	alpha-Caryophyllène	64,2	
1435	transalpbbergamotène		0,80
1437	γ-élémente	0,48	
1443	(Z,E)-à-Farnésène	0,83	
1504	mentha-1,2,8-triol		0,23
1506	(E,E)-alpha farnésène		0,22
1506	béta bisabolène		1,31
1583	Oxydede caryophyllène	2,02	0,46
-	acide 3-bromo-7-méthyl-1-adamantanoïque	0,45	
-	17a-cyano-17a-hydroxy-prègn-4-èn-3-one,	3,45	
-	Acide (all-Z)-4,7,10,13,16,19-methylester	1,06	
	docosahexaenoïque		
	TOTAL COMPOSES IDENTIFIES	94,02	98,5

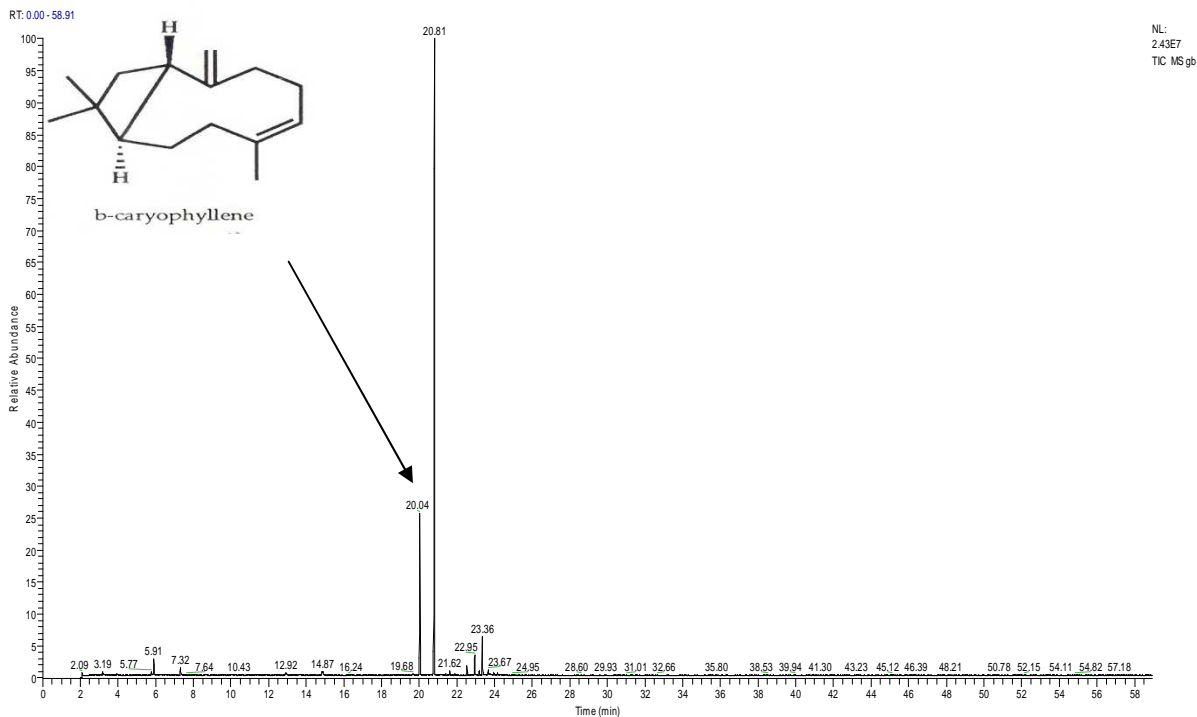


Figure 22a: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Aframomum melegueta*

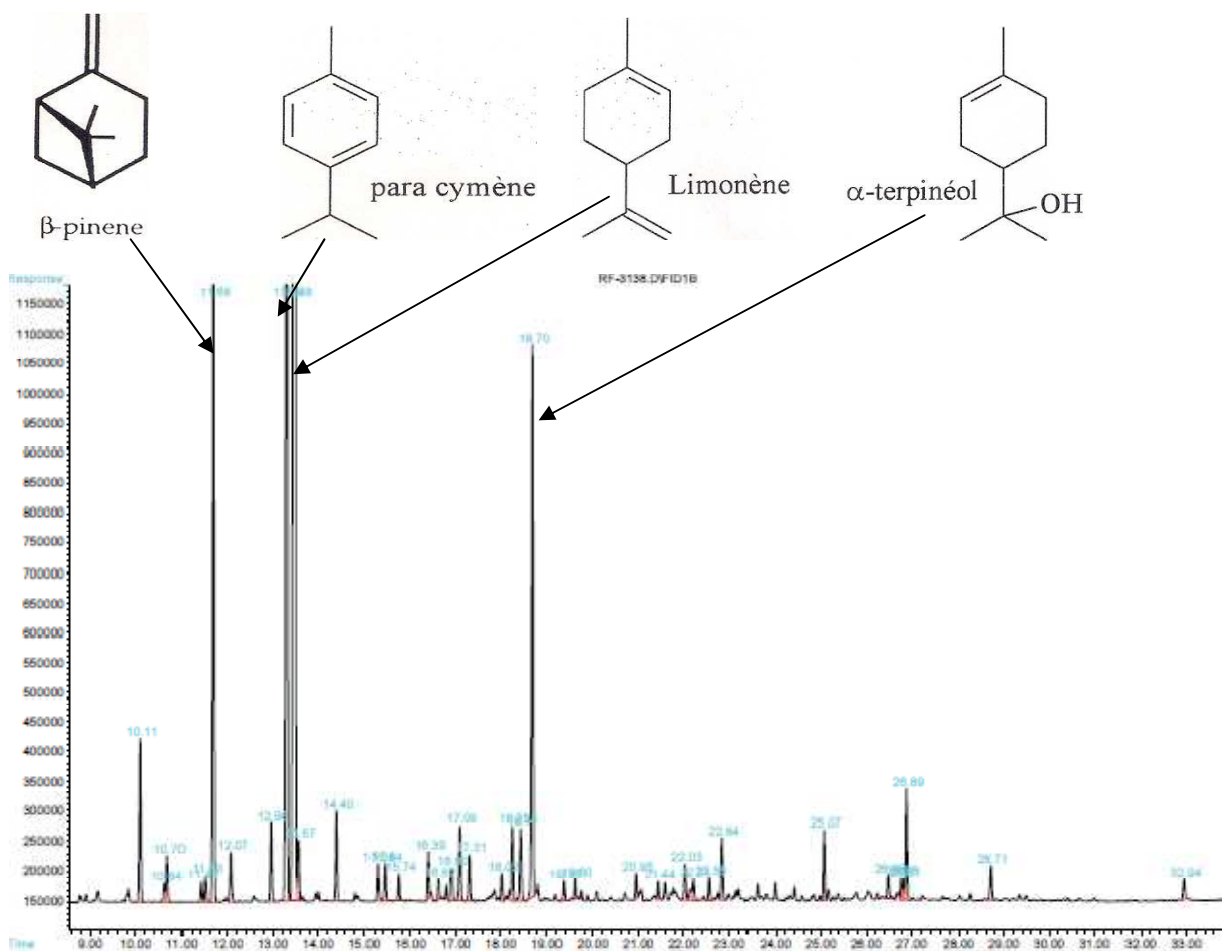
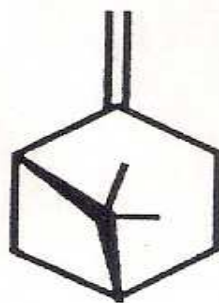
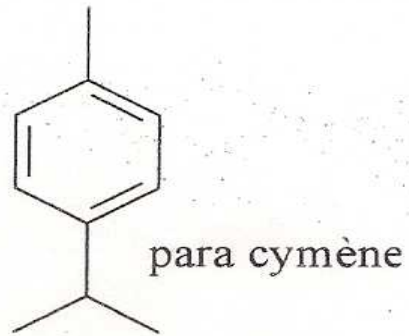
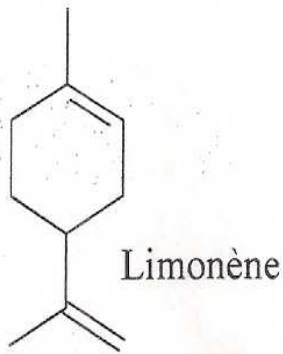
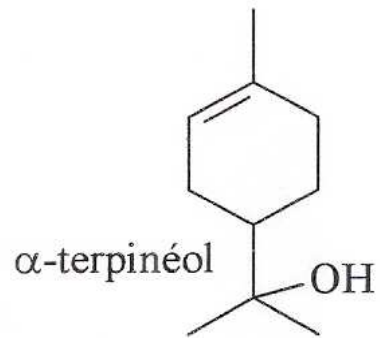
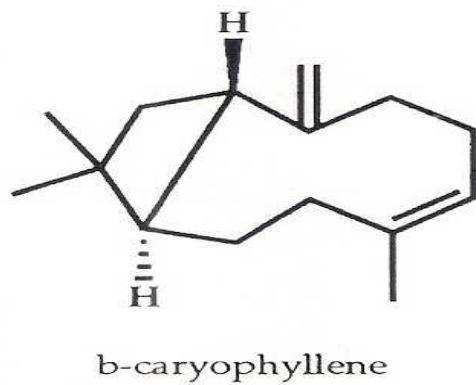


Figure 22b: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*



β -pinene

Figure 23: Structure des composés chimiques majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *Aframomum melegueta* et de *Citrus aurantifolia*

I-2-ETUDE DE LA TOXICITE

I-2-1- Toxicité générale aiguë et toxidrome des extraits aqueux de *sterculia Setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* par voie orale

L'étude de la toxicité aiguë des différents extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* a montré que l'administration des extraits à des doses variant entre 1000 et 3000 mg/kg, de poids corporel des animaux n'a donné lieu à aucune mortalité; aucun symptôme visible d'intoxication n'est aussi observé au sein des différents groupes expérimentaux.

Pour la dose de 3000 mg/kg de poids corporel, on note une torpeur après 15 min avec perte de motricité et d'appétit. Après 30 min, les animaux ont retrouvé leur appétit et leur motricité. La dose minimale létale limite de ces extraits par voie orale est donc supérieure à 3000 mg/kg.

Au bout des 72 heures d'observation, les animaux ayant reçu 3000 mg/kg d'extrait et les animaux des lots témoins ont été anesthésiés et disséqués (**Figure 24a et 24b**). Une observation macroscopique du rein, foie, rate, cœur, estomac et poumons des animaux traités ne révèle aucune anomalie visible comparativement aux témoins.

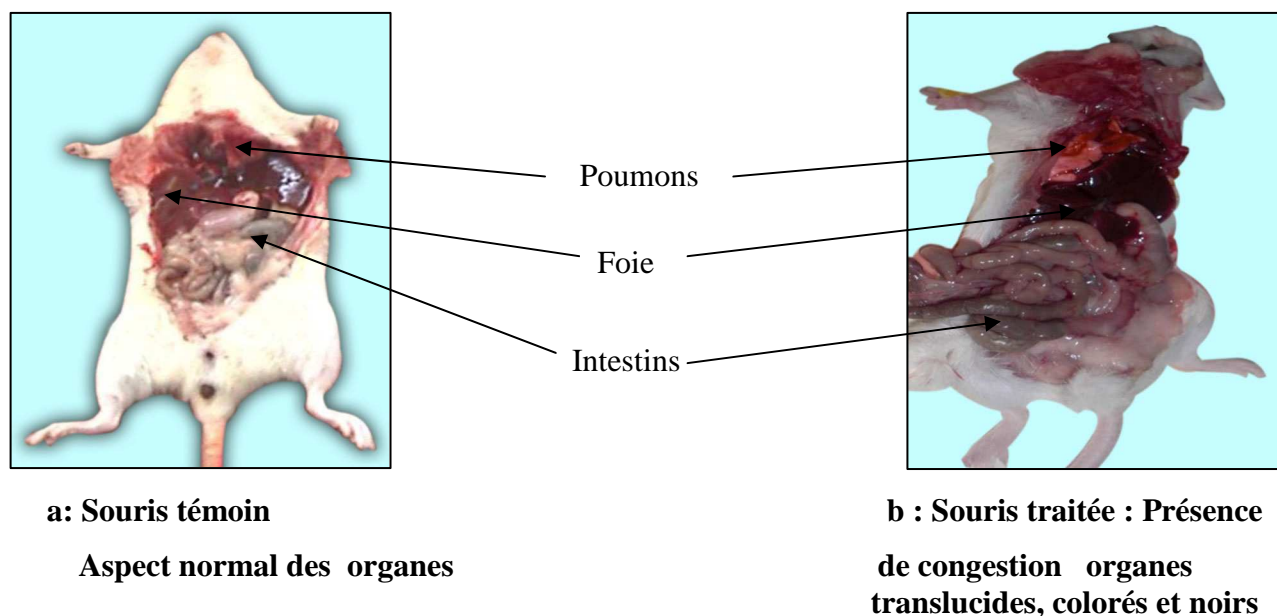


Figure 24 : Souris NMRI disséquée (Echelle 1/12)

I-2-2- Toxicité générale aiguë des extraits aqueux par voie intra péritonéale

I-2-2-1-Extrait aqueux de *Sterculia setigera*

Le tableau V indique les doses de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* et les pourcentages de mortalité.

A la dose de 1000 mg/kg d'extrait aqueux, 100% des souris sont mortes.

Le tracé de la droite du pourcentage de mortalité en fonction des doses de l'extrait utilisé a été réalisé au moyen du logiciel EXCEL 2007 et représenté par la **figure 25**.

Tableau V: Evolution du pourcentage de mortalité en fonction de la dose, 2 heures après administration en i.p. de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* Del.

Lots (n= 5)	Doses (mg/kg)	Nombre de morts	Pourcentage de mort
Lot 0 (Lot témoin)	0	0	0
Lot 1	100	0	0
Lot 2	250	1	20
Lot 3	500	2	40
Lot 4	750	3	60
Lot 5	1000	5	100

Lot 0 = lot témoin ayant reçu de l'eau, Lot 1, Lot 2, Lot 3, Lot 4, Lot 5 sont des lots traités à l'extrait de *Sterculia setigera*.

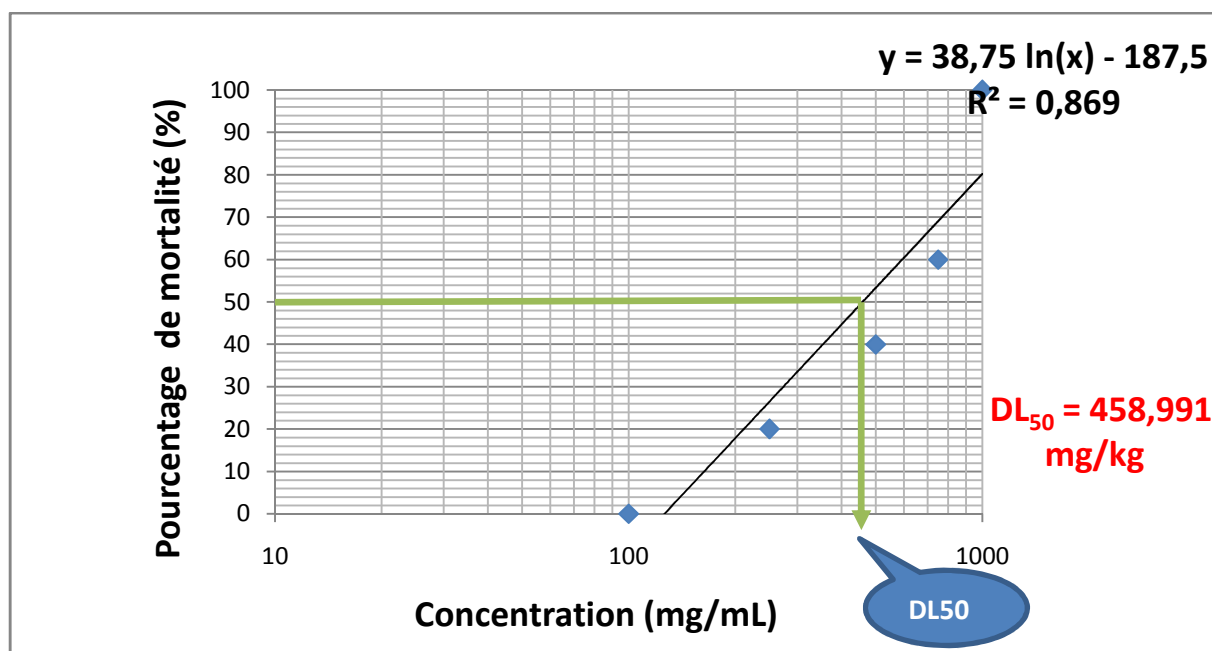


Figure 25: Droite de toxicité générale aiguë de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* Del chez les souris NMRI (voie ip)

Ce tracé permet de déterminer la valeur de la DL₅₀ à partir de l'équation de la droite de meilleur ajustement ($y = 38,75 \ln(x) - 187,5$). Cette valeur est : **DL₅₀ = 458,991 mg/mL**.

L'analyse des résultats au moyen du logiciel PHARM/PCS (Pharmacologic Calculation System) version 4.2, a permis de déterminer la DL₅₀ corrigée et son intervalle de confiance.

Le tableau VI indique les probits (meilleure probabilité des résultats expérimentaux) des pourcentages de mortalité en fonction de la dose.

La limite de confiance de la DL₅₀ est:

$$322,49 \text{ mg/kg} < \text{DL}_{50} < 774,28 \text{ mg/kg}$$

Les valeurs de DL₅₀ obtenues manuellement et celle donnée par le logiciel PCS sont proches.

La détermination de la létalité de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* Del en 72 h donne les valeurs suivantes :

$$\text{DL}_{50}/\text{DL}_1 = 5,23$$

$$\text{DL}_{99}/\text{DL}_{50} = 5,23$$

$$\text{DL}_{99}/\text{DL}_1 = 27,34$$

Les valeurs DL₅₀/DL₁ et DL₉₉/DL₅₀ sont similaires ce qui témoigne de la validité de l'expérimentation.

Tableau VI: Evolution du pourcentage de mortalité corrigé selon le programme informatique PCS et leur probit, deux heures après administration de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* Del

Doses (mg/kg)	Log (doses)	Pourcentage de mortalité	Probit
100	02	1,3	2,77
250	2,40	20	4,16
500	2,70	40	4,75
750	2,88	60	5,25
1000	3	91,6	6,38
DL ₁ = 95,562 mg/kg	1,980	1	2,67
DL ₅ = 155,142 mg/kg	2,190	5	3,35
DL ₁₆ = 246,415 mg/kg	2,391	16	4
DL₅₀ = 499,698 mg/kg	2,698	50	4,99
DL ₈₄ = 1013,32 mg/kg	3,005	84	5,99
DL ₉₅ = 1609,478 mg/kg	3,206	95	6,64
DL ₉₉ = 2612,939 mg/kg	3,417	99	7,33

Probit = 3,238745 x Log (Dose) – 3,749426 DL₅₀ = 499, 70 mg/kg

La comparaison de l'indice de sécurité selon l'OMS (2002) a donné :

IS = DL₉₉/DL₁ = 27,34. IS > 10 ce qui traduit une bonne sécurité d'utilisation de la drogue, la maniabilité n'étant pas difficile en intra-péritonéale.

L'écart type approché **E** de la DL₅₀ est 121,26 mg/kg

d' où **DL₅₀ = 458,991 mg/mL ± 121,26 mg/kg**

I-2-2-2-Extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*

Le **tableau VII** indique les doses de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* et les pourcentages de mortalité.

Tableau VII: Evolution du pourcentage de mortalité en fonction de la dose 2 heures après administration de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *citrus aurantifolia*.

Lots (n= 5)	Doses (mg/kg)	Nombre de morts	Pourcentage de mort
lot 0 (Lot témoin)	0	0	0
Lot 1	1000	0	0
Lot 2	1250	1	20
Lot 3	1500	3	60
Lot 4	1750	3	60
Lot 5	2000	5	100

A la dose de 2000 mg/kg de l'extrait en *i.p.*, 100% des animaux sont morts.

Le tracé du pourcentage de mortalité en fonction des doses de l'extrait utilisé a été réalisé au moyen du logiciel EXCEL 2007 et est représenté par la **figure 26**:

Ce tracé permet de déterminer la valeur de la DL_{50} à partir de l'équation de la droite de meilleur ajustement ($137,9 \ln(x) - 956,9$). Cette valeur est : **$DL_{50} = 1482,277$ mg/kg.**

L'analyse des résultats au moyen du logiciel PHARM/PCS (Pharmacologic Calculation System) version 4.2, a permis de déterminer la DL_{50} et son intervalle de confiance (**tableau VIII**).

La limite de confiance de la DL_{50} est:

$$1290,61 \text{ mg/kg} < DL_{50} < 1744,81 \text{ mg/kg}$$

La valeur de DL_{50} obtenue expérimentalement et celle donnée par le logiciel PCS sont proches.

La détermination de la létalité de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* en 72 h donne les valeurs suivantes :

$$DL_{50}/DL_1 = 1,64$$

$$DL_{99}/DL_{50} = 1,64$$

$$DL_{99}/DL_1 = 2,68$$

Les valeurs DL_{50}/DL_1 et $DL_{99}/DL_{50} = 1,64$ sont similaires ce qui témoigne de la validité de l'expérimentation.

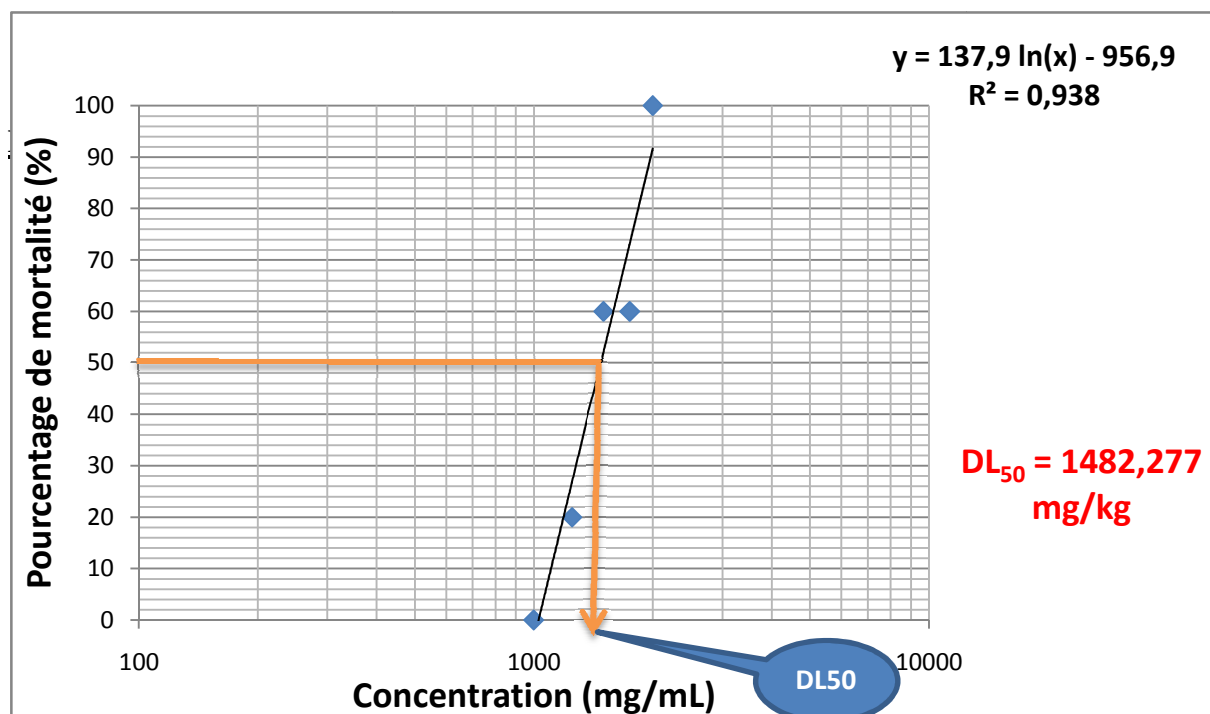


Figure 26: Droite de toxicité générale aiguë de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* chez les souris NMRI (voie ip)

La comparaison de l'indice de sécurité selon l'OMS (2002) a donné :

IS = 2,68. IS < 5 ce qui traduit une mauvaise sécurité d'utilisation de la drogue, la maniabilité étant difficile en intra-péritonéale.

L'écart type approché **E** de la DL_{50} est 116,36 mg/kg

$DL_{50} = 1482,277 \text{ mg/kg} \pm 116,36 \text{ mg/kg}$

La classification sur l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943) des différents extraits étudiés par voie *intra-péritonéale* est donnée par le **tableau IX**:

Tableau VIII: Evolution du pourcentage de mortalité corrigé selon le programme informatique PCS et leur probit deux heures après administration de l'extrait aqueux *Aframomum melegueta - citrus aurantifolia*

Doses (mg/kg)	Log (doses)	Pourcentage mortalité	de Probit
1000	3	2,6	3,06
1250	3,10	20	4,16
1500	3,18	60	5,25
1750	3,24	60	5,25
2000	3,30	94,3	6,58
DL1 = 916,381 mg/kg	2,96	1	2,67
DL5 = 1058,813 mg/kg	3,02	5	3,35
DL16 = 1215,426 mg/kg	3,08	16	4
DL50 = 1500,622 mg/kg	3,17	50	5
DL84 = 1852,739 mg/kg	3,26	84	5,99
DL95 = 2126,785 mg/kg	3,32	95	6,64
DL99 = 2457,348 mg/kg	3,39	99	7,32

Probit = 3,238745 x Log (Dose) – 3,749426
DL50 = 1500,622 mg/kg

Tableau IX: Valeurs des DL₅₀ en 2 h (i.p.), des Indices de Sécurité (IS) et classification sur l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943) des extraits.

Extraits	DL ₅₀ (mg/kg)	Indice de sécurité	de Echelle de toxicité (Hodge et Sterner, 1943 et OMS, 2002)
<i>Aframomum m.-Citrus aurantifolia</i>	1500,622	2,68	Faiblement toxique
<i>Sterculia setigera</i>	499,698	27,34	Moyennement toxique

I-2-2-3- Toxidrome par voie intra-péritonéale des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta*- *Citrus aurantifolia*

Au cours des 72 heures d'observation qui ont suivi l'administration de 1000 mg/kg de *Sterculia setigera* et 2000 mg/kg du mélange *Aframomum melegueta*- *Citrus aurantifolia*, nous avons observé les signes de toxicité suivants au sein des animaux qui ne sont pas morts :

- des troubles respiratoires de type polypnée (suffocation),
- des torsions immédiatement après l'administration des extraits (douleurs),
- une somnolence pendant les premières heures après administration des extraits,
- une baisse de l'activité motrice,
- des convulsions précèdent toujours la mort des animaux.

Nous avons remarqué que les animaux ne mourraient que dans l'intervalle de 2 heures à 24 heures après administration des extraits. Il s'agit d'une toxicité générale aiguë immédiate.

Juste après la mort, une dissection rapide des animaux révèle, par observation macroscopique, sans différence pour les deux extraits, une congestion totale des organes biologiques comparativement à ceux des animaux témoins. Les organes observés sont: l'estomac, le foie, le cœur, la rate, les poumons et le rein (**figure 27 et 28**).

I-2-3- Analyse de la cytotoxicité des différents extraits aqueux

Les résultats à différentes concentrations de la toxicité des extraits sur les larves ont été représentés par les graphes de la **figure 29** et nous ont permis de déterminer la valeur de la CL₅₀ de chaque extrait. La courbe de la toxicité du lot témoin se retrouve confondue à l'axe abscisses (axe des concentrations) du fait qu'il n'y a pas eu de larves mortes dans les tubes témoins.



Estomac témoin



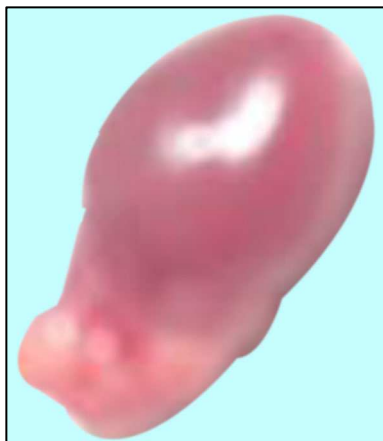
Estomac après traitement colorés, noir



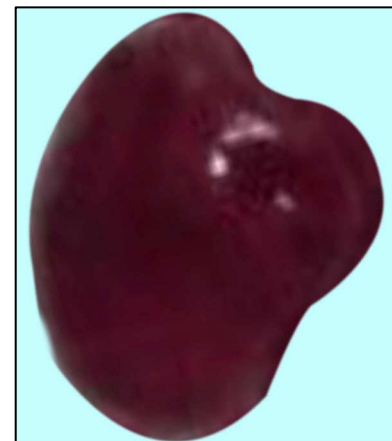
Foie témoin



Foie après traitement, noir



Cœur témoin

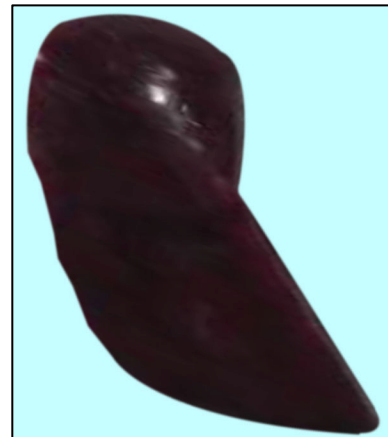


Cœur après traitement, noir et volumineux

Figure 27 : Photos de: estomac, foie et cœur des souris témoins et traitées aux extraits aqueux en i.p. (*Sterculia setigera* à 1000 mg/kg, mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* à 2000 mg/kg) (Echelle 1/12)



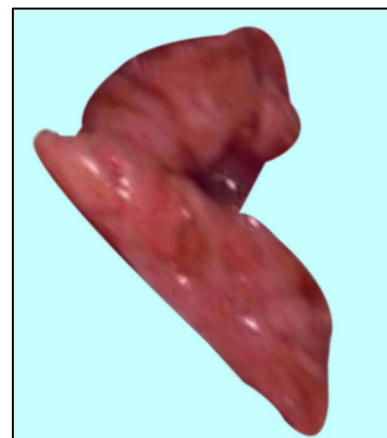
Rate témoin



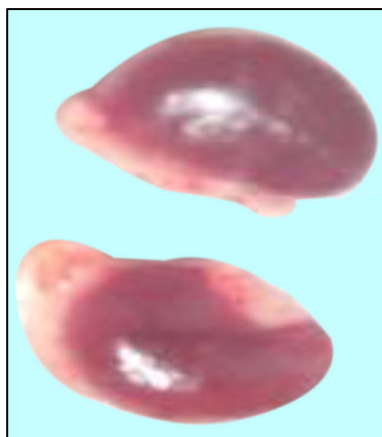
**Rate après
traitement, noir**



Poumons témoins



**Poumons écrasés après
traitement**



Reins témoins



**Reins après traitement
noir**

Figure 28: Photos de : rate, poumons et reins des souris témoins et traitées aux extraits aqueux en i.p. (*Sterculia setigera* à 1000 mg/kg, mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* à 2000 mg/kg) (Echelle 1/12)

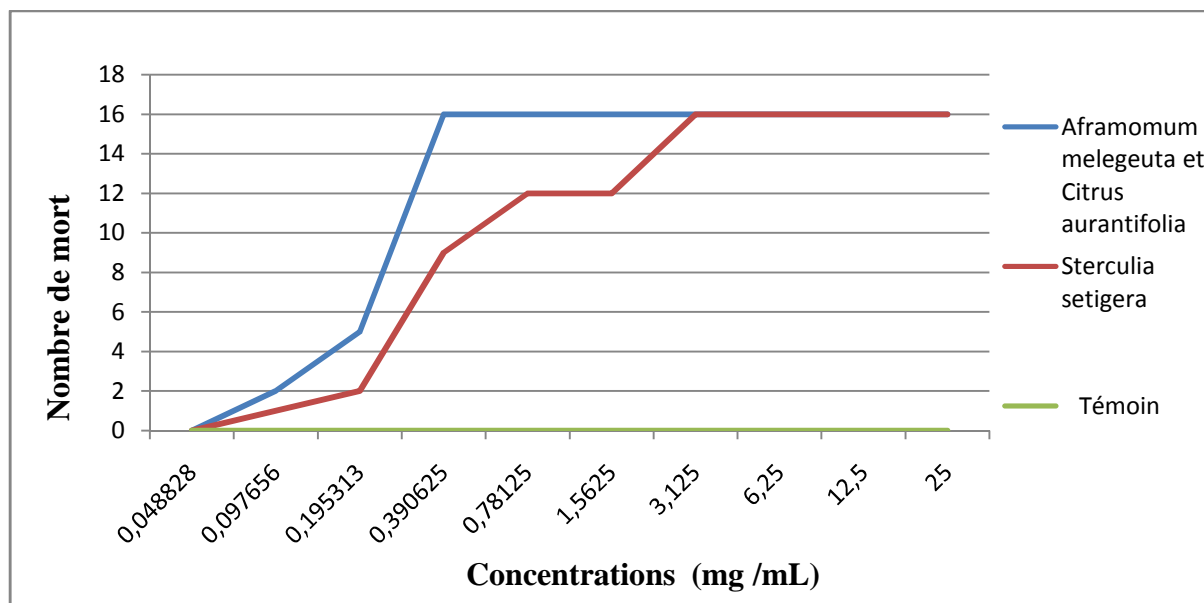


Figure 29 : Graphes comparatifs de la toxicité des extraits sur les larves de crevette saumure (*Artemia salina*)

Les valeurs des CL_{50} des deux extraits sont consignées dans le **tableau X**. Ainsi, nous avons enregistré les CL_{50} de $0,366211 \pm 29.10^{-3}$ mg/mL et de $0,24414 \pm 16.10^{-3}$ mg/mL respectivement pour l'extrait de *Sterculia setigera* et l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegeuta* - *Citrus aurantifolia*.

L'analyse statistique de ces résultats, effectuée par le test de Student en séries non appariées, nous a permis d'observer une différence significative ($p < 0,05$) entre les variables de chaque extrait et la variable du lot témoin.

L'extrait aqueux de *Sterculia setigera* paraît moins toxique pour les larves que celui du mélange *Aframomum melegeuta* - *Citrus aurantifolia*.

Tableau X : Valeurs des CL_{50} des extraits

Extraits	Concentration létale (CL_{50}) mg/mL
<i>Sterculia setigera</i>	0,366
<i>Aframomum melegeuta</i> - <i>Citrus aurantifolia</i>	0,244

I-3-ACTIVITE BRONCHORELAXANTE

I-3-1- Effet de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* sur la contraction à l'acétylcholine

L'étude montre pour les contractions induites à l'acétylcholine ($10^{-5}M$), une amplitude maximale de $4,06 \pm 0,30$ g. L'extrait aqueux total du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* testé, a inhibé, de façon concentration-dépendante, la contraction développée par l'acétylcholine (**figure 30**) avec une concentration efficace 50% (CE_{50}) de $1,80 \pm 0,48$ mg/mL. L'effet maximum (100% de relaxation) est observé avec la concentration de 14 mg/mL d'extrait.

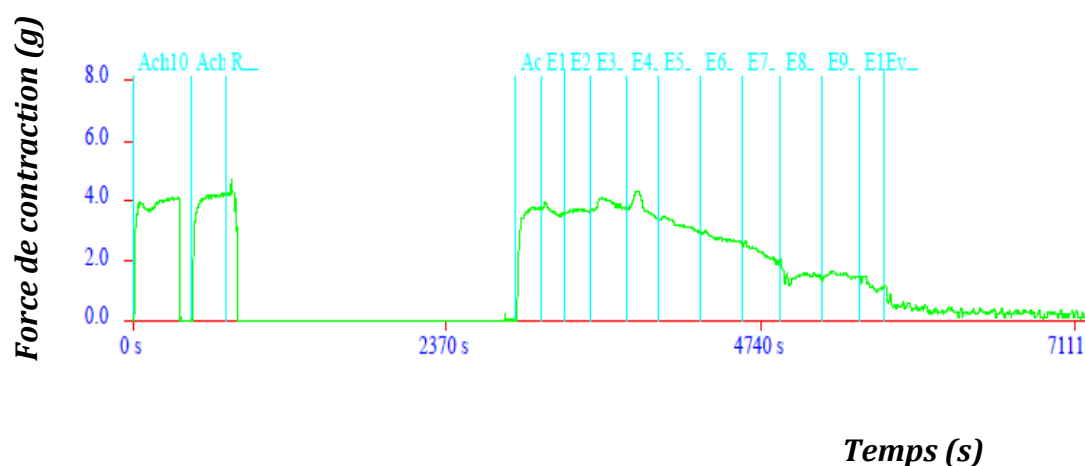


Figure 30: Enregistrement de l'effet du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* sur la contraction à l'acétylcholine ($10^{-5}M$).

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, correspondent respectivement aux concentrations $3 \cdot 10^{-2}$, 10^{-1} , $3 \cdot 10^{-1}$, $6 \cdot 10^{-1}$, 1, 2, 3, 6, 10, 14 mg/mL de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*.

L'administration du propranolol ($10^{-6}M$), induit une légère réduction de l'effet relaxant de l'extrait aqueux total du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* avec un déplacement de la courbe vers la droite. La valeur de CE_{50} passe de 1,80 mg/mL à 2,60 mg/mL respectivement en absence et en présence de propranolol (**Figure 31**).

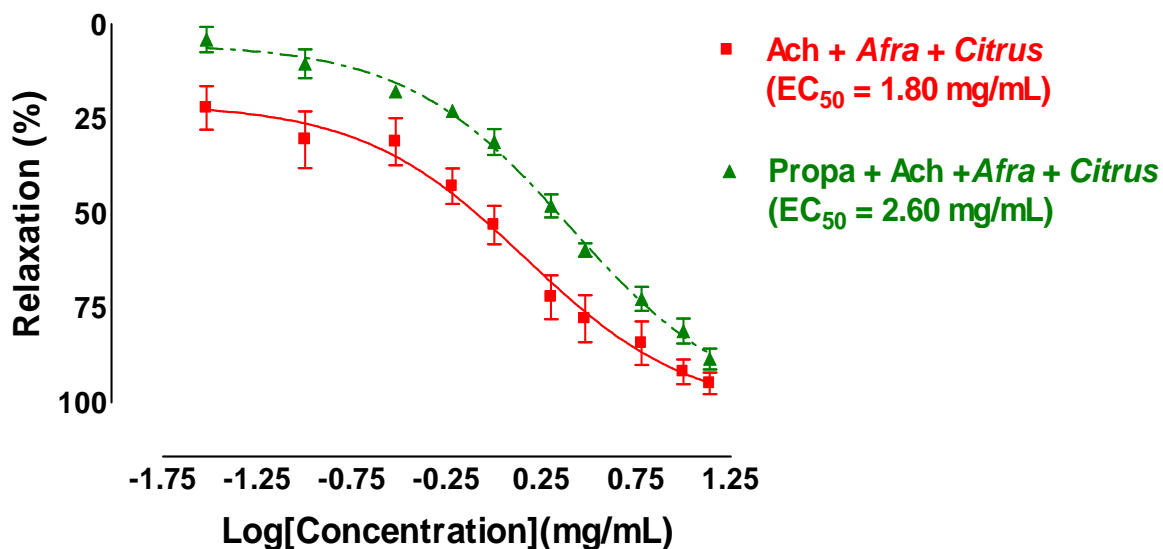


Figure 31 : Effet de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-citrus aurantifolia* sur la contraction induite par l'Acétylcholine 10^{-5} M en absence (carré) et en présence du propranolol 10^{-6} M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type. (n : 5-7)

I-3-2- Effet de l'atropine sur la contraction à l'acétylcholine

Sur les lambeaux de trachée pré contractés à l'acétylcholine, l'addition cumulative d'atropine (10^{-8} à 10^{-7} M), a provoqué une réduction de l'effet contractant à l'acétylcholine. On observe alors une chute du tonus musculaire plus accentuée avec une diminution de 69,5% d'amplitude (figure 32).

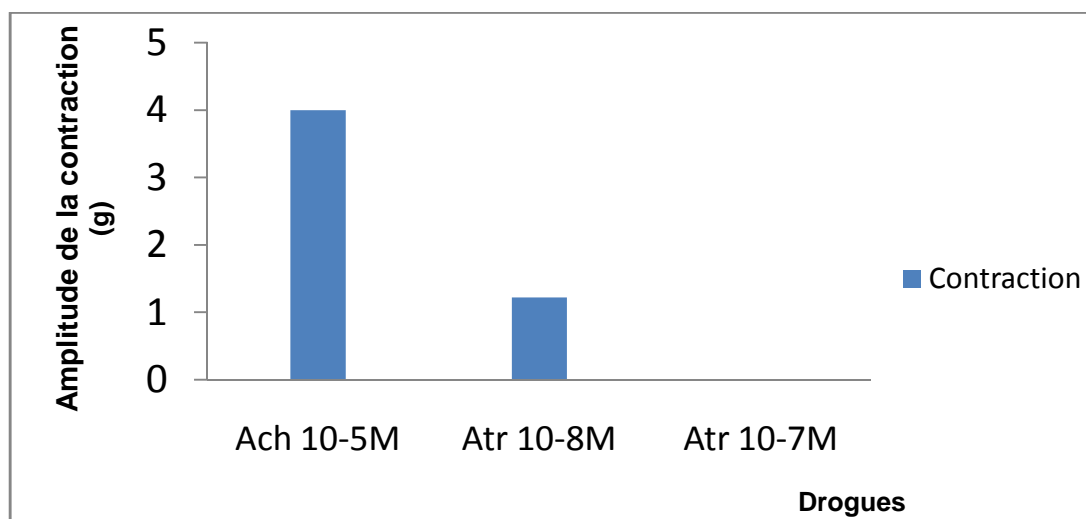


Figure 32: Effet de l'atropine sur la contraction à l'acétylcholine

I-3-3- Effet du mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* sur la contraction au KCl

Le KCl (4.10^{-2} M) a produit une contraction maximale ($4,2 \pm 0,26$ g) sur la trachée. L'extrait aqueux total du mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* a provoqué un relâchement de la trachée. La concentration efficace 50% est de $1,86 \pm 0,6586$ mg/mL. L'effet relaxant de l'extrait sur la contraction au KCl est comparable à son effet sur l'acétylcholine. Il n'y a donc pas de différence significative entre ces deux effets à $p < 0,05$ (Figure 33).

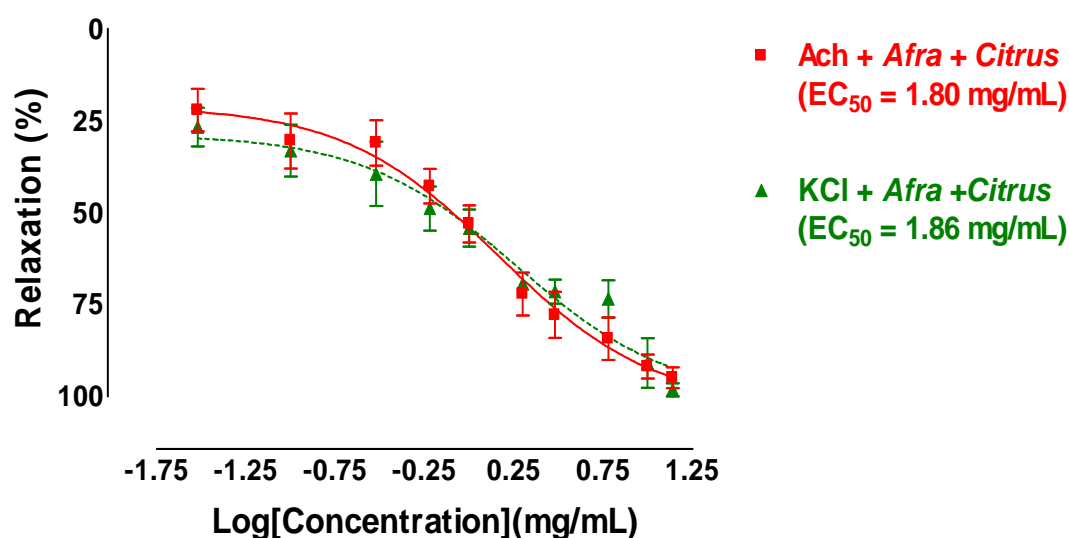


Figure 33 : Effet de l'extrait aqueux total du mélange *Aframomum melegueta* -*citrus aurantifolia* sur la contraction induite par l'Acétylcholine 10^{-5} M (carré) et le KCl 4.10^{-2} M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type. (n:5-7)

I-3-4- Effet de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* sur la contraction à l'acétylcholine en présence du propranolol

L'extrait aqueux de *Sterculia setigera* a inhibé de façon concentration-dépendante, la contraction développée par l'acétylcholine avec une concentration efficace 50% (CE_{50}) de $0,91 \pm 0,48$ mg/mL (figure 34).

Lorsque les récepteurs β -adrénergiques sont bloqués en présence du propranolol (10^{-6} M), le relâchement dû à l'extrait est encore plus significatif ($p = 0,0085$) si l'on compare la valeur de CE_{50} à celle obtenue en présence du propranolol (figure 35).

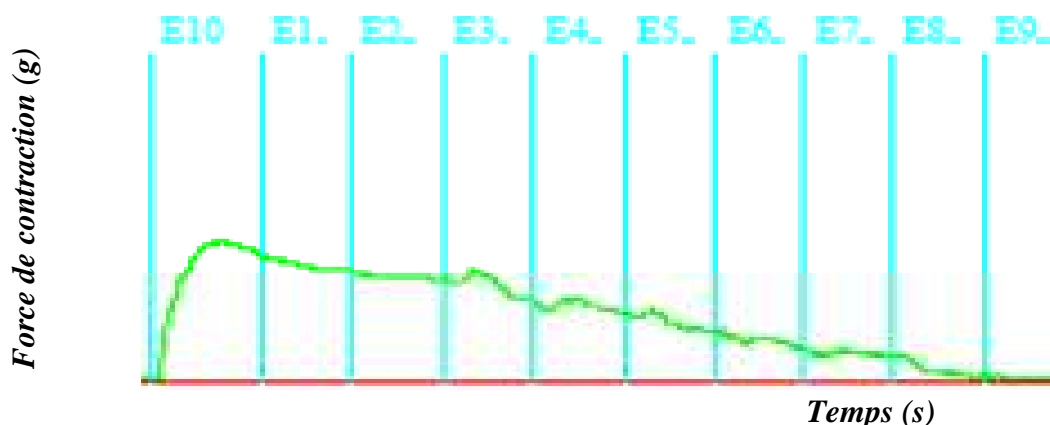


Figure 34 : Enregistrement de l'effet de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* sur la contraction à l'acétylcholine.

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 correspondent respectivement aux concentrations $3 \cdot 10^{-2}$, 10^{-1} , $3 \cdot 10^{-1}$; $6 \cdot 10^{-1}$; 1; 1,5; 2; 3, 6, 10mg/mL de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera*.

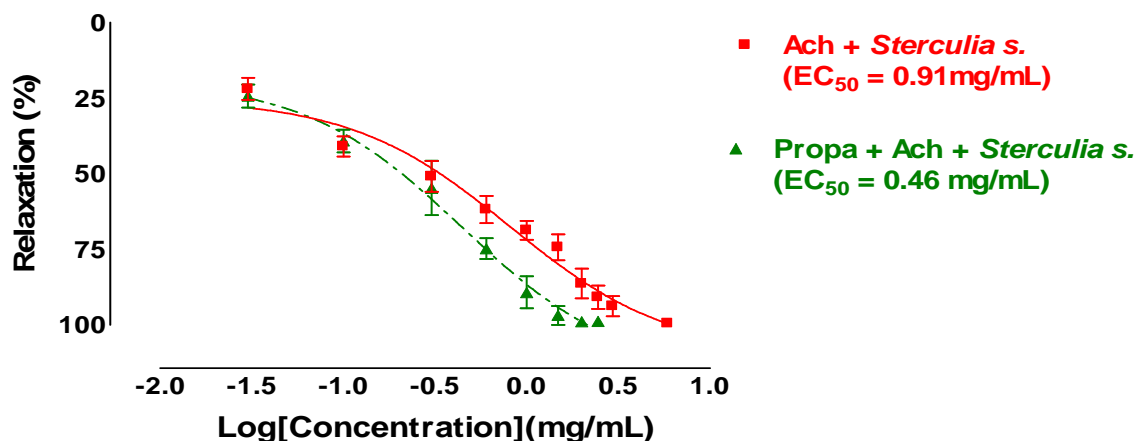


Figure 35 : Effet de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* sur la contraction induite par l'Acétylcholine 10^{-5} M (cercle) et en présence du propranolol 10^{-6} M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type. (n : 5-7)

I-3-5- Effet de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* sur la contraction au KCl

L'extrait aqueux de *Sterculia setigera* à dose cumulative, inhibe les contractions de la trachée dues au KCl. La valeur de la concentration efficace 50% est de $1,39 \pm 0,48$ mg/mL. La comparaison statistique de cette valeur par rapport à celle obtenue dans la contraction induite à l'acétylcholine, montre qu'il y a une différence significative entre l'effet relaxant de l'extrait en présence des deux drogues (KCl et Acétylcholine) avec $p = 0,0009$ (figure 36).

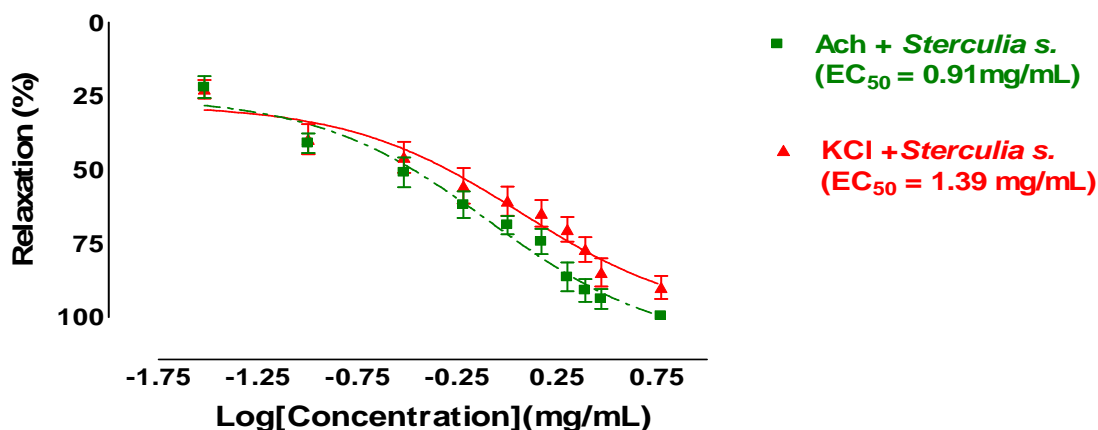
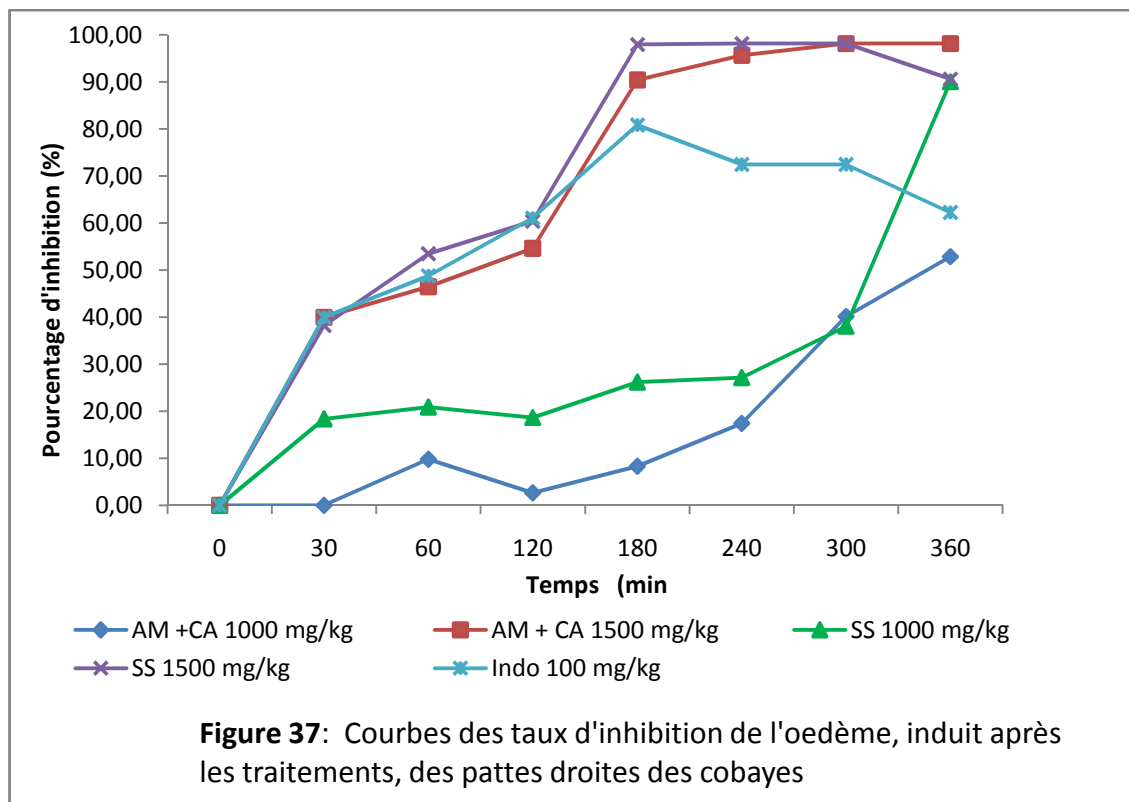


Figure 36: Effet de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera* sur la contraction induite par l'Acétylcholine. 10^{-5} M (carré) et le KCl $4 \cdot 10^{-2}$ M (triangle). Chaque point représente la moyenne et l'écart type (n : 5-7).

I-4- ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

I-4-1- Activité inhibitrice des extraits aqueux sur l'œdème

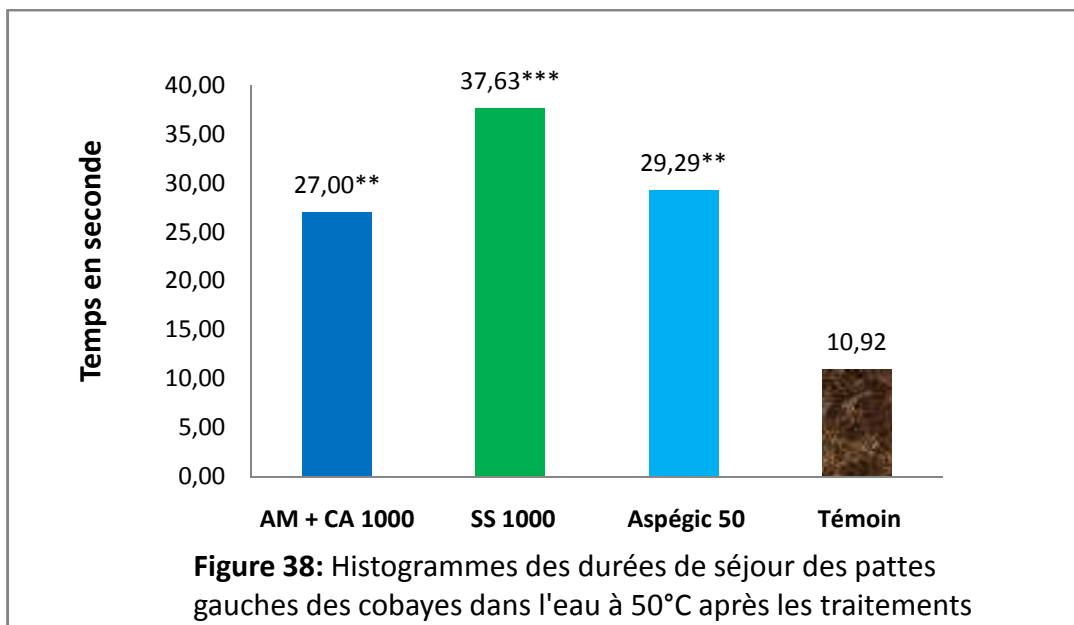
Les deux extraits aqueux sont administrés par voie orale 30 min avant l'injection du formol aux doses de 1000 et 1500 mg/kg. Avant les trois premières heures et à la dose de 1500 mg/kg, les deux extraits ont des taux d'inhibition comparables à celui de l'indométacine (produit de référence). Mais après 3 h, les extraits se révèlent plus efficaces que le produit de référence ($p = 0,0030$), soit $98,00 \pm 0,57\%$; $90,42 \pm 0,22\%$ et $80,83 \pm 0,38\%$ d'inhibition respectivement pour *Sterculia setigera*, *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* et l'indométacine. L'activité anti-inflammatoire montre qu'avec les deux extraits, le pourcentage d'inhibition croît dans le temps et en fonction de la dose avec une meilleure activité pour *Sterculia setigera* (figure 37).



I-4-2- Activité antalgique des extraits aqueux

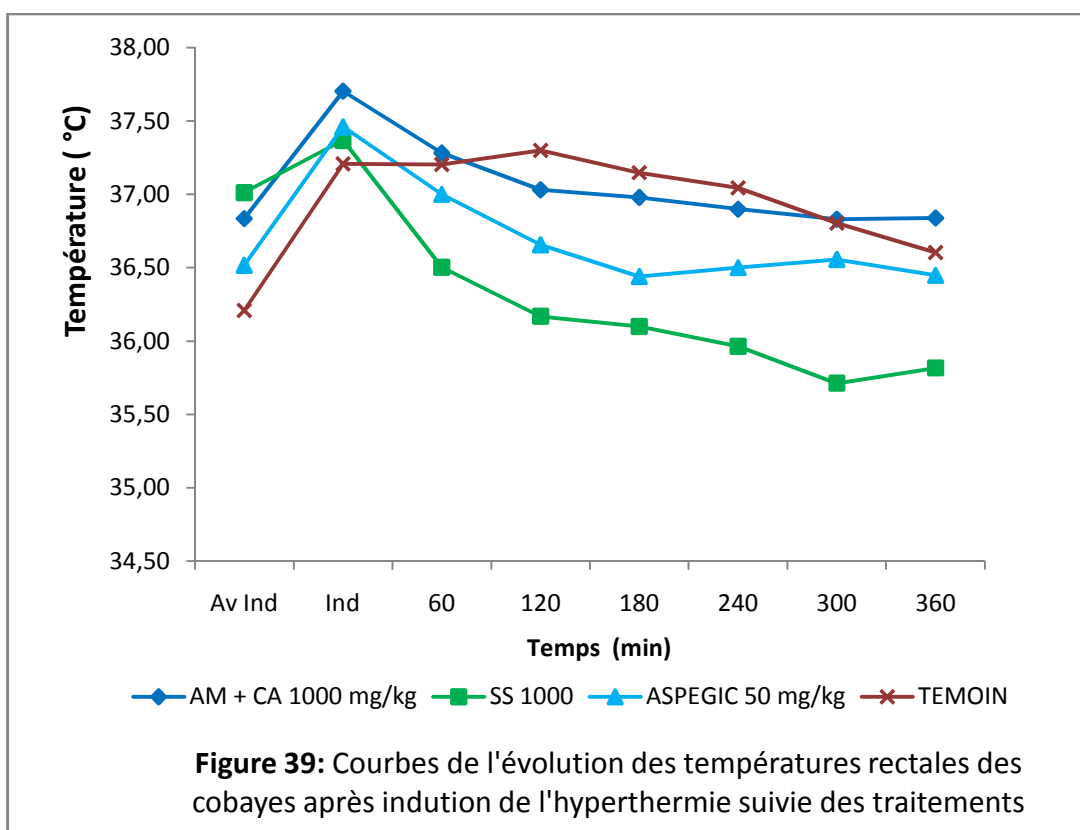
Lorsque les animaux sont protégés, la durée de séjour de leur patte gauche dans l'eau est plus élevée. Les durées de séjour sont respectivement de $37,63 \pm 10,72$, $29,29 \pm 12,15$ et $27,0 \pm 0,30$ sec pour *Sterculia setigera* à la dose de 1000 mg/kg, l'Aspégic (produit de référence) à 50 mg/kg et le mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* à 1000 mg/kg.

Les deux extraits augmentent efficacement le temps de séjour de la patte des animaux dans l'eau à 50° C. *Sterculia setigera* semble être plus efficace que l'Aspégic à 50 mg/kg et le mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* à 1000 mg/kg ($p = 0,0076$) (figure 38).



I-4-3- Activité antipyrétique des extraits aqueux

L'extrait de *Sterculia setigera* à 1000 mg/kg a baissé de façon significative la température induite par la levure de bière comparativement aux témoins (**figure 39**).



I-5- ACTIVITE ANTITUSSIVE

L'étude in vivo de l'effet des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* sur la toux a donné les résultats illustrés par les **figures 40 et 41** (fréquences et taux d'inhibition des contractions intercostales).

De l'observation des histogrammes des **figures 40 et 41**, on note que la référence Néo-Codion[®], à la dose de 10 mg/kg de poids corporel, induit une inhibition très hautement significative de 63% des contractions intercostales par rapport au témoin.

Pour l'extrait de *Sterculia setigera*, c'est à partir de la dose de 1500mg/kg de poids corporel que nous obtenons une inhibition significative de 3,2% des contractions avec $p = 0,0237$. C'est à partir de 1000 mg/kg de poids corporel pour le mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* qu'une inhibition significative des contractions intercostales de 4,62% a été obtenue. A dose égale de 1500 mg/kg, l'extrait du mélange se révèle quatre fois plus efficace que *Sterculia setigera*.

Aux doses de 3000 mg/kg, le mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* semble être plus efficace que le Néo-codion à 10 mg/kg avec un taux d'inhibition de 73,70% contre 63,20%. Par contre *Sterculia setigera* paraît être moins efficace (50,70% contre 63,20%).

L'activité antitussive des deux extraits est dose dépendant et l'extrait du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* est plus actif que celui de *Sterculia setigera*.

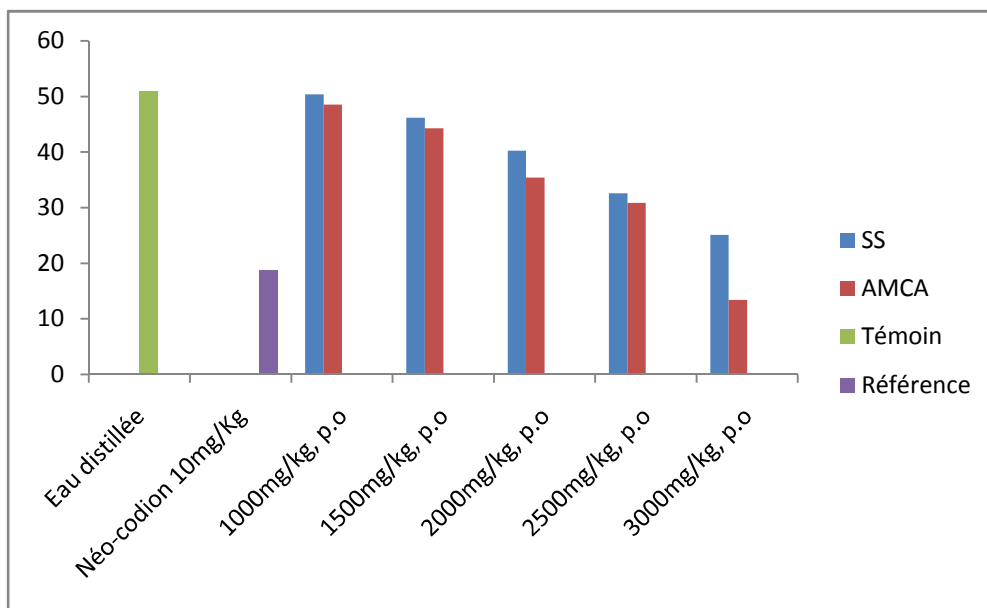


Figure 40 : Histogramme des fréquences des contractions des intercostaux
 SS: *Sterculia setigera*, AMCA: mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* (N= 6).

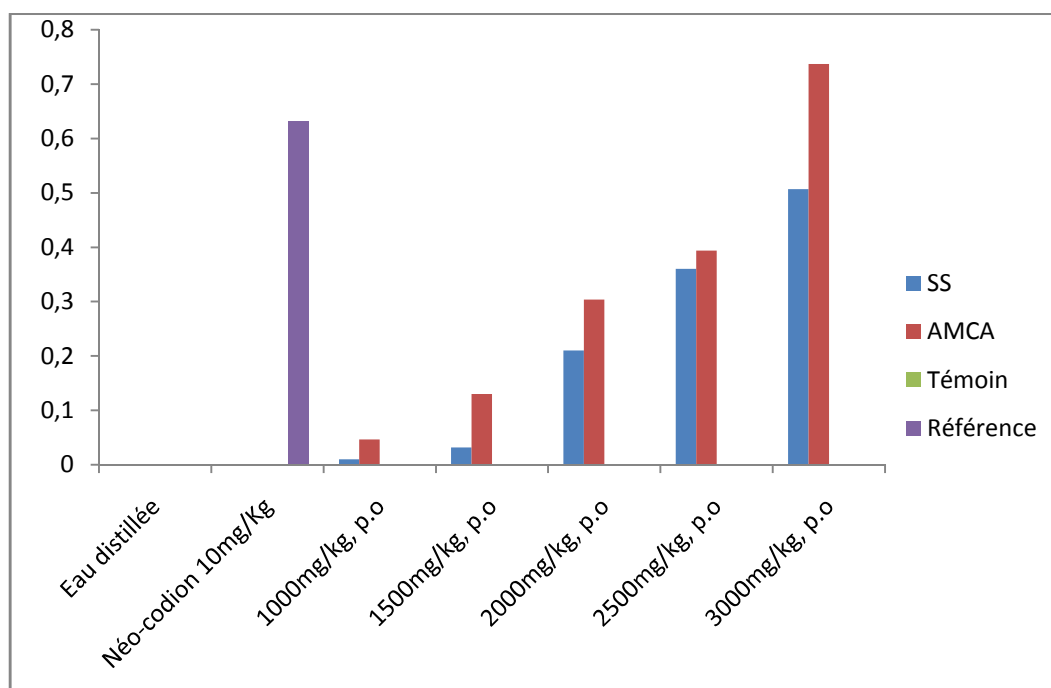


Figure 41 : Histogramme des taux d'inhibition des contractions des intercostaux
 SS: *Sterculia setigera*, AMCA: mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* (N= 6).

II- PARTIE CLINIQUE

II-1- CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES DES SUJETS

Les données relatives aux caractéristiques générales des sujets étudiés par type de traitement sont présentées dans le **tableau XI**.

Tableau XI : Caractéristiques anthropométriques des sujets étudiés selon le type de traitement.

Caractéristiques anthropométriques	GROUPES				$\frac{\sum X_i \pm SEM}{4}$
	G1 (N: 13)	G2 (N: 13)	G3 (N: 13)	G4 (N: 13)	
	X \pm SEM	X \pm SEM	X \pm SEM	X \pm SEM	
Age (ans)	22,27 \pm 1,41	21,57 \pm 1,34	22,56 \pm 1,94	22,06 \pm 1,64	22,12 \pm 1,58
Taille (m)	1,76 \pm 0,06	1,75 \pm 0,07	1,74 \pm 0,07	1,72 \pm 0,05	1,74 \pm 0,06
MC (kg)	69,27 \pm 7,18	71,36 \pm 6,33	72,67 \pm 8,77	72,05 \pm 7,55	71,33 \pm 7,45
IMC (kg/m ²)	22,51 \pm 1,78	23,41 \pm 1,94	22,21 \pm 2,23	23,69 \pm 2,18	23,39 \pm 2,03

G1: témoin ; **G2:** *Aframomum melegueta* seul ; **G3:** *Citrus aurantifolia* seul; **G4:** *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia*; **N:** effectif ; **X:** moyenne; **SEM:** Standard Error of Mean; **MC:** masse corporelle; **IMC :** indice de masse corporelle.

Le tableau XI montre qu'il n'y a pas de différence significative au niveau ni de l'âge, ni de la taille, ni de la masse corporelle et de l'indice de masse corporelle entre les sujets des quatre groupes. Nos quatre groupes sont homogènes.

II-2- PARAMETRES VENTILATOIRES

II-2-1- Evolution du VEMS et du pourcentage de diminution du VEMS au cours de l'expérience

Le tableau XII et la **figure 42** montrent l'évolution du VEMS en fonction du type de traitement. On constate que:

Avant traitement, le VEMS pré-exercice des sujets du groupe 1 ($3,41 \pm 0,18$ L/mim)

est inférieur au VEMS post- exercice ($3,69 \pm 0,42$ L/mim). Par contre, au niveau des sujets ayant reçu le mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* la valeur du VEMS post-exercice ($3,09 \pm 0,53$ L/mim) est inférieure à celle de pré- exercice ($3,84 \pm 0,47$ L/mim). La même observation est faite au niveau du groupe 2 (*Aframomum melegueta*: $3,34 \pm 0,20$ contre $3,55 \pm 0,21$).

Après traitement, le VEMS post-exercice a diminué dans les quatre groupes et ce de façon relativement significative. Ces valeurs sont: G1: $3,58 \pm 0,54$ L/mim; G2: $3,37 \pm 0,33$ L/mim, G3: $3,28 \pm 0,37$ L/mim et G4: $3,46 \pm 0,41$ L/mim contre respectivement G1: $3,77 \pm 0,50$ L/mim; G2: $3,49 \pm 0,35$ L/mim, G3: $3,42 \pm 0,32$ L/mim et G4: $3,72 \pm 0,34$ L/mim pour le pré-exercice.

Tableau XII: Valeur moyenne du VEMS et du pourcentage de diminution au cours du traitement

Paramètres ventilatoires	Eau		<i>A. melegueta</i> seul		<i>Citrus aurantifolia</i>		<i>A. melegueta - C. aurantifolia</i>		
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	
VEMS (L/mim)	Pré	3,41	3,77	3,55	3,49	3,45	3,42	3,84	3,72
		± 0,18	± 0,50	± 0,21	± 0,35	± 0,34	± 0,32	± 0,47	± 0,34
	Post	3,69	3,58	3,34	3,37	3,21	3,28	3,09	3,46
		± 0,42	± 0,54	± 0,20	± 0,33	± 0,36	± 0,37	± 0,53	± 0,41
% diminution VEMS	-9,07	5,17*	6,01	3,31*	6,96	3,09*	19,13	6,89*	
	± 1,42	± 1,44	± 3,20	± 1,08	± 1,56	± 1,45	± 3,93	± 0,12	

G1: témoin ; **G2:** *Aframomum melegueta* seul; **G3:** *Citrus aurantifolia* seul; **G4:** *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*; **SEM:** Standard Error of Mean; **Avant:** avant le traitement; **Après:** après le traitement; **Pré:** Volume Expiratoire Maximal par Seconde avant exercice; **Post:** Volume Expiratoire Maximal par Seconde après exercice; **% de diminution du VEMS :** Pourcentage de diminution du VEMS **avant** le traitement et **après** le traitement; *: valeurs significatives.

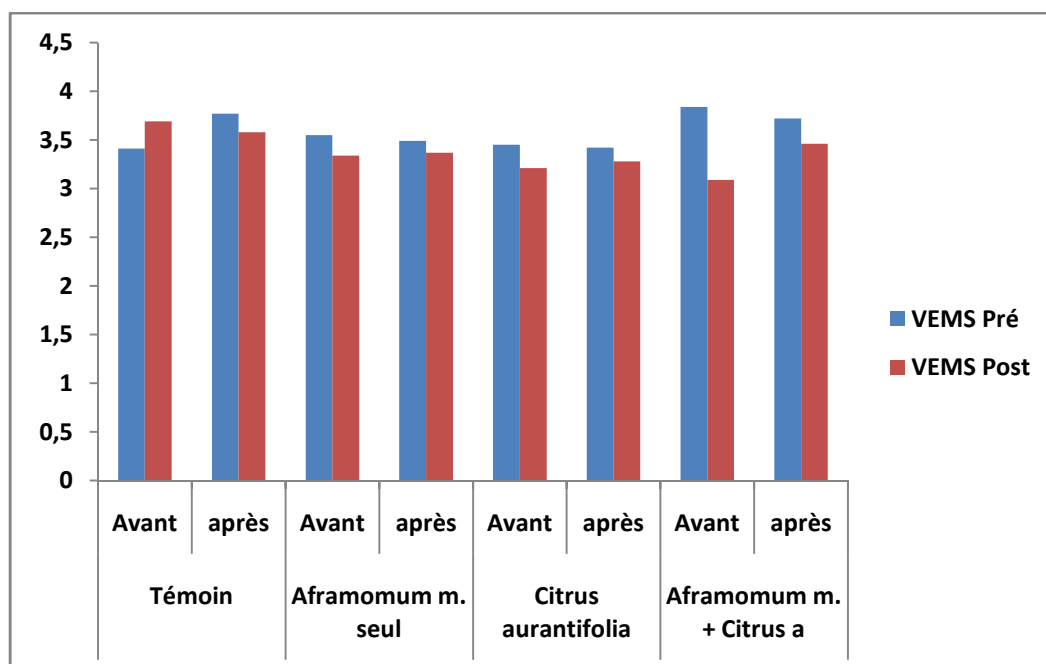


Figure 42: Evolution du VEMS au cours de l'expérience

La figure 43 présente les variations du pourcentage moyen de diminution du VEMS avant et après exercice en fonction du type de traitement.

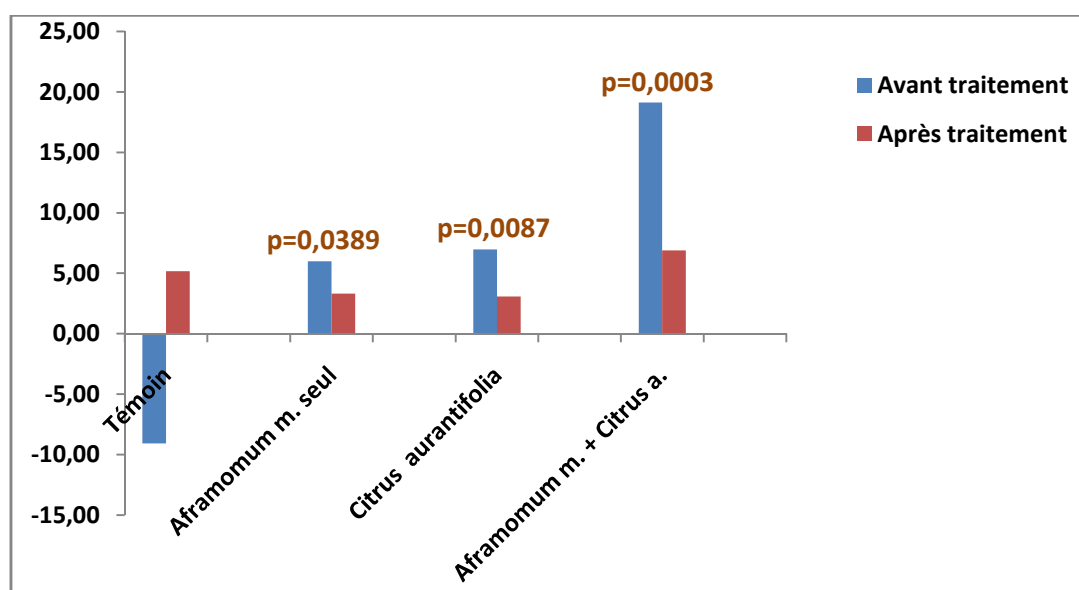


Figure 43: Evolution du pourcentage de diminution du VEMS pendant l'expérience

On observe une différence significative ($p = 0,0389$) entre les valeurs du pourcentage de diminution du VEMS avant et après traitement dans le groupe 2, soit une chute de 44,92%. Au niveau du groupe 3, la chute est environ de 55,60%. Dans le groupe 4, la significativité est très élevée ($p = 0,0003$) entre les valeurs du pourcentage de diminution du VEMS avant

(19,13 ± 3,93 L/mim) et après (6,89 ± 0,12 L/mim) soit une chute de 63,98%. Quant au groupe témoin, le pourcentage de diminution du VEMS est passé d'une valeur négative (-9,07 ± 1,42 L/mim) à une valeur positive (5,17 ± 1,44 L/mim) en dessous de la norme.

II-2-2-Prévalence du BIE

Elle est le rapport du nombre de cas d'un trouble morbide à l'effectif total d'une population, sans distinction entre les cas nouveaux et les cas anciens, à un moment ou pendant une période donnée.

Durant toute la période de notre expérience, nous avons recensé au total vingt quatre (24) sujets prédisposés à un BIE sur un effectif total de cinquante deux (52) soit une prévalence de 46,15%.

II-3- VARIATION DE LA CONCENTRATION SANGUINE DE CRP

La figure 44 présente la variation de la concentration sanguine de CPR en fonction du type de traitement et du temps.

On constate une évolution de la concentration sanguine de CRP au cours du traitement et en fonction du temps. Pendant quatorze jours de traitement (J1 à J14), on note une diminution significative de la CRP surtout dans le G4 ($p = 0,00024$). Après le quatorzième jour (J14), les valeurs de la CRP tendent à augmenter légèrement jusqu'au 17^{ème} jour dans les quatre groupes.

L'analyse de ces résultats montre que l'extrait du mélange aqueux *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* a diminué la concentration sanguine en CRP chez les sujets de l'étude.

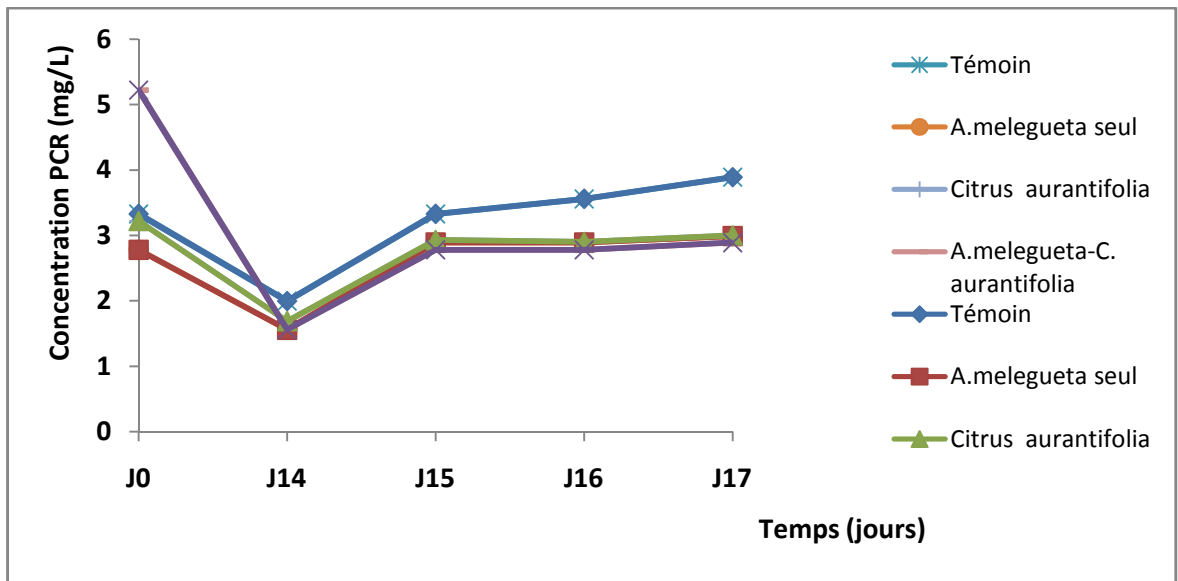


Figure 44: Variation de la concentration sanguine de CRP

DISCUSSION GENERALE

I- ACTIVITES BIOLOGIQUES DES EXTRAITS DE *STERCULIA SETIGERA* ET DU MELANGE *AFRAMOMUM MELEGUETA-CITRUS AURANTIFOLIA*.

Le but de cette partie est d'évaluer la toxicité et les propriétés anti-inflammatoire, antitussive et bronchodilatatrice des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*.

Les rendements de l'extraction de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* sont respectivement de 3,26% et 7,54%. Le mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* présente le meilleur rendement.

Les résultats du screening phytochimique des extraits de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* révèle la présence des alcaloïdes, des tannins, des flavonoïdes, des anthocynes, des leuco-anthocynes, des dérivés quinoniques, des mucilages, des huiles essentielles et des composés réducteurs. De l'analyse phytochimique de ces deux extraits et en nous référant aux propriétés biologiques de ces composés chimiques nous pouvons dire que ces plantes auront des propriétés antitussives, anesthésiques locales, vasoconstricteurs, sympathomimétiques, antiallergiques, anti inflammatoires, émoullientes, adoucissantes, anti oxydantes et antalgiques. Ils diminuent ainsi la perméabilité des capillaires sanguins en renforçant leur résistance (Bruneton, 2009). Fernandez et *al.* (2004) ont révélé dans l'huile essentielle de *Aframomum melegueta*, la présence de: gingerol ($C_{17}H_{26}O_4$), shogaol ($C_{17}H_{24}O_3$), paradol ($C_{17}H_{26}O_3$), gingerdione ($C_{17}H_{24}O_4$), zingerone ($C_{11}H_{14}O_3$), qui sont des substances oxygénées anti-inflammatoires. Selon Ernest et *al.* (2000), ces substances pourraient réduire les nausées dues au transport ou liées à la grossesse et aussi, réduire les migraines. Leurs propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes sont bien connues (Surh, 1999) et leur potentiel anticancéreux est démontré *in vitro* (Aggarwal et Shishodia, 2006; Kim et *al.*, 2005). Nacoulma (1996) a signalé que les flavonoïdes contenus dans les graines de *Aframomum melegueta* réduiraient les hémorragies. Cet auteur indique que les graines sont utilisées contre les maux de ventre du fait des alcaloïdes tropaniques, réputés contre les spasmes gastro-intestinaux. Ces alcaloïdes pyrrolizidiniques exercent un effet ocytocique et sont donc utiles pour faciliter les accouchements (Nacoulma, 1996).

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle extraite des graines de *Aframomum melegueta* révèle comme composés majoritaires le beta-Caryophyllène et le α -Caryophyllène.

Ce sont des composés chimiques à propriétés antiallergique, antispasmodique et antalgique (Roulier, 1996). La différence entre les composés chimiques présentes dans l'huile essentielle des graines de *Aframomum melegueta* étudiée et celle de Fernandez et *al.* (2004) réalisée, montre que les composants aromatiques d'une plante varient en fonction des divers facteurs comme l'ensoleillement, la nature et la composition du sol, la situation géographique (longitude et latitude) et les saisons.

Une même plante issue de deux sites différents peut sécréter des essences dont les différences sont plus ou moins importantes. Ce qui renvoie au terme de chémotype utilisé pour différencier les huiles essentielles extraites (Gbénou, 1999).

Au niveau du *Citrus aurantifolia*, les flavonoïdes sont des antioxydants puissants qui permettent de neutraliser les radicaux libres du corps et, ainsi, prévenir l'apparition des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et de maladies liées au vieillissement (Minato et *al.*, 2003). En effet, certains flavonoïdes contenus dans *Citrus aurantifolia* pouvaient aussi inhiber le développement de cellules cancéreuses au niveau de l'estomac, des poumons et de la bouche (Lam et *al.*, 2000; Miller et *al.*, 1994), et ce, par différents mécanismes (Miller et *al.*, 2004). D'autres types de flavonoïdes se sont avérés efficaces pour diminuer l'incidence de tumeurs du côlon (Tanaka et *al.*, 2000) et pour diminuer le nombre de tumeurs de la bouche (Miller et *al.*, 2004) chez l'animal.

La présence de bêta pinène, para cymène, limonène et le alpha terpinéol dans l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, lui confère des propriétés antifongiques, anti-œdémateuses et anti-inflammatoires (Amvam et *al.*, 2002).

Au regard de ces différentes propriétés, quel risque présente la consommation des deux extraits aqueux étudiés?

Les différents tests de toxicité réalisés ont permis de déterminer la DL₅₀ des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*.

La DL₅₀ obtenue par voie *i.p.* de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* est de 1500,622 mg/kg/PC en 24 heures d'observation. Ce qui indique une toxicité générale aiguë immédiate et permet de classer l'extrait selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943) et celle de l'OMS (2002) comme étant un produit faiblement toxique. La quantité de poudre sèche correspondant pour une utilisation sans danger chez un homme de 70kg (soit 1/100^{ème} de la DL₅₀) serait de 13 923,38 mg (13,92 g).

Au niveau de *Sterculia setigera*, la DL₅₀ en *i.p* est de 499,698 mg/kg/PC et se révèle comme un produit moyennement toxique. Chez un être humain de 70kg, la quantité de poudre sèche correspondant pour une utilisation sans danger (soit 1/100^{ème} de la DL50) serait alors de 10 713,28 mg (10,71 g).

La DL₅₀ très élevée des différents extraits, par voie orale contrairement à celle obtenue par voie intra péritonéale pourrait s'expliquer par la différence des voies d'administration.

En effet, le tube digestif va de la bouche au rectum. Les membranes que le médicament doit franchir sont l'épithélium digestif et l'endothélium vasculaire. Une particularité de l'absorption digestive est le métabolisme. Le médicament absorbé au niveau du tube digestif, passe par le sang pour le foie, atteint le cœur et après passage pulmonaire, se distribue dans l'ensemble de l'organisme. Au niveau de la muqueuse intestinale et du foie, le médicament rencontre des enzymes susceptibles de le transformer en un ou plusieurs métabolites parfois actifs (Yuasa et *al.*, 1998) mais le plus souvent inactifs. C'est le métabolisme de premier passage (First pass metabolism) qui explique la moindre efficacité de certains médicaments, surtout lorsqu'ils sont administrés à doses faibles, car ils sont en grande partie métabolisés avant d'arriver dans le sang. Or, au niveau de la voie intra péritonéale, la vitesse de résorption est rapide et une grande biodisponibilité est offerte à la substance toxique.

Un toxique qui pénètre le corps par la voie *i.p.*, atteint premièrement la circulation sanguine porte hépatique. C'est ce qui explique l'obtention des organes translucides, noirs et colorés après traitement; les troubles respiratoires et les convulsions observés au niveau du toxidrome. L'effet neuro biologique est prédominant au niveau de l'administration en *i.p*. On pourrait expliquer cette congestion par la présence en grande quantité dans les extraits des alcaloïdes, tannins et flavonoïdes qui développent des effets sédatif, anti-calcique, anti-inflammatoire et anti-cholinergique probables (Terao, 2002).

L'indice de sécurité de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* est inférieur à 5 ce qui traduit une mauvaise sécurité d'emploi. Le maniement de cet extrait est donc difficile, car très rapidement on atteint les doses toxiques. Celui de *Sterculia setigera* est supérieur à 10 et indique alors un bon indice. Il est très facile à manier.

L'étude de la toxicité des différents extraits par voie orale a donné une dose minimale toxique supérieure à 3000 mg/kg/PC. Ces extraits sont classés comme pratiquement sans toxicité par voie orale sur l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943) et celle de l'OMS (2002).

L'administration de ces extraits par voie orale est à recommander et justifie ainsi la voie d'utilisation des extraits par les praticiens de la médecine traditionnelle.

Selon José et al. (2002), il existe une corrélation entre cytotoxicité des larves de crevette (*Artemia salina*) et cytotoxicité des cellules humaines pulmonaires. Les larves de crevette saumure sont sensibles aux effets toxiques des extraits. L'extrait du mélange *Aframomum melegeuta-Citrus aurantifolia* est légèrement plus toxique que l'extrait de *Sterculia setigera* avec comme concentration létales (CL₅₀) respectives 0,24 et 0,37 mg/mL. Néanmoins on ne note pas une grande différence entre ces concentrations ($p < 0,05$). Cette toxicité observée au niveau des deux extraits serait due à la présence des alcaloïdes en quantité élevée car, selon Bismuth (2000), les alcaloïdes présentent une certaine toxicité pour les ganglions lymphatiques et pour le cœur à dose élevée. En plus des alcaloïdes, nous retrouvons aussi les anthracéniques libres dans les composés chimiques présents dans l'extrait du mélange *Aframomum melegeuta-Citrus aurantifolia*. Or, les dérivés anthracéniques font partie des composés toxiques des plantes. Nous pouvons donc dire que la légère différence observée au niveau de la toxicité serait due à une différence au niveau de la composition chimique des deux extraits.

Toute fois les doses létales obtenues sur les larves de crevette saumure sont trop faibles pour prédire d'une toxicité chez l'homme.

L'asthme étant caractérisé par une broncho constriction et un phénomène inflammatoire, l'étude des propriétés broncho relaxantes de nos extraits implique la relaxation du muscle lisse bronchique in vitro, et une broncho dilatation in vivo.

L'acétylcholine provoque une excitation de l'anneau de trachée par couplage pharmacomécanique sur les récepteurs muscariniques (Rodger, 1992; Challis et al., 1993; Somlyo et Somlyo, 1994). Il y a donc production de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) (Rasmussen et al., 1990) et mobilisation du Ca²⁺ à partir du réticulum sarcoplasmique. Ce qui provoque la contraction de l'anneau de trachée (augmentation de l'amplitude de contraction).

Les extraits aqueux du mélange de *Sterculia setigera* et *Aframomum melegeuta - Citrus aurantifolia* ont exercé une action inhibitrice sur la contraction de la trachée par l'acétylcholine. Cette action serait en partie due à une stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques, observé par l'antagonisme partielle au propranolol (Walle, 1974).

En effet, le blocage des récepteurs β_2 -adrénergiques par le propranolol (10⁻⁶M) provoque un déplacement de la courbe concentration réponse à l'extrait *Aframomum melegeuta - Citrus aurantifolia*, vers la droite. Il y a une modification significative de la concentration efficace 50% comparativement au contrôle. L'extrait aqueux de *Sterculia setigera* s'est révélé deux fois plus puissant (EC₅₀ = 0,91 ± 0,34 mg/kg) que celui du mélange *Aframomum melegeuta - Citrus aurantifolia* (EC₅₀ = 1,80 ± 0,48 mg/kg).

En présence de l'extrait aqueux de *Sterculia setigera*, le relâchement est plus rapide ($0,46 \pm 0,11$ mg/kg) et il n'y a pas de déplacement à droite de la courbe concentration réponse.

L'antagonisme physiologique entre la relaxation induite par la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques et la contraction due à la stimulation des récepteurs muscariniques a été bien démontré sur le tissu bronchique du rat. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Nelson (1995). La stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques provoque la libération de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMP_c : $C_{10}H_{14}N_5O_7P$) qui diminue la concentration des ions Ca^{2+} intracellulaires et provoque la bronchodilatation. Les β_2 -mimétiques peuvent également exercer leur action bronchodilatatrice de manière indirecte en diminuant d'une part, le tonus parasympathique au niveau des ganglions sympathiques ou des terminaisons nerveuses parasympathiques et d'autre part, en inhibant les mécanismes biochimiques de la réponse contractile du muscle lisse à des agonistes comme l'acétylcholine, l'histamine, la bradykinine et les leucotriènes, exerçant ainsi un effet bronchoprotecteur.

L'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* a agit très faiblement sur les récepteurs β adrénergiques contrairement à celui de *Sterculia setigera*. Il se révèle donc comme antagoniste pharmacologique fonctionnel et son action est comparable à celle du salbutamol.

Le KCl ($4.10^{-2}M$) induit une dépolarisation des cellules musculaires lisses et cette dépolarisation conduit à une ouverture des canaux voltages dépendants avec entrée de calcium et la régulation de la contractilité du muscle lisse bronchique (Nelson *et al.*, 1990). Les deux extraits aqueux ont réduit de façon dose dépendante, l'effet du KCl. Ce qui montre que les extraits n'ont pas seulement une activité anti-cholinergique mais aussi ont agit sur la mobilisation du calcium intracellulaire. Nos résultats sont comparables à ceux de Ouédraogo (2009), qui a démontré que l'effet relaxant de *Calotropis procera* sur la trachée isolée de lapin implique une interaction avec le calcium intracellulaire.

En présence de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta - Citrus aurantifolia*, l'analyse statistique des résultats obtenus a indiqué qu'il n'existe pas une différence significative entre l'effet de l'extrait face au KCl et l'acétylcholine ($p < 0,05$). Avec *Sterculia setigera* la différence est significative et $p = 0,0009$.

L'effet relaxant obtenu serait alors dû à la présence dans les extraits des alcaloïdes qui sont anti cholinergiques sur le système nerveux autonome (Bruneton, 2009; Peter *et al.*, 1999), des flavonoïdes qui réduisent la survenue des spasmes dans l'asthme (Kenkt *et al.*, 2002), des tanins et des huiles essentielles à propriétés pharmacologiques multiples.

L'atropine a été utilisée comme référence pour confirmer son activité anti cholinergique (Arunlakshan, 1959).

En somme, nous dirons que les β_2 -stimulants adrénérgiques, bronchodilatateurs de référence, représentent avec les anti-inflammatoires, les bases du traitement de l'asthme (Nelson et al., 1995). Les progrès en pharmacologie moléculaire permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces molécules et la régulation de leurs effets.

En nous basant sur les propriétés révélées (non toxique, anti-inflammatoires, antitussives et broncho relaxantes) par les extraits de notre étude, nous sommes amenés à dire qu'ils pourraient être utilisés dans le traitement de l'asthme.

L'inflammation est un phénomène réactionnel mis en œuvre par l'organisme chaque fois que l'intégrité de ses constantes morphologiques et biologiques est menacée (Singla et al., 1990). Elle n'est donc pas synonyme d'infection, mais l'infection peut être une cause de l'inflammation (Rousselet et al., 2005 ; Abena et al., 2007).

L'injection de formol aux animaux provoque une inflammation locale causée par une lésion tissulaire qui résulte de l'action des prostaglandines et de l'histamine produites. Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause d'un œdème localisé, qui à son tour comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Devulder et al., 2002 ; Rousselet et al., 2005).

La protection des animaux par les extraits diminue l'œdème de façon significative ($P < 0,05$). Nos résultats sont semblables à ceux de Kou et al. (2006) qui ont observé une diminution significative du taux de leucocytes et de prostaglandines produits après l'administration orale de l'extrait aqueux de *Polygala japonica* chez les rats Sprague Drawley. La diminution de l'œdème et l'augmentation du seuil douloureux au bain-marie s'expliquent par un probable blocage de l'excitation des terminaisons nerveuses afférentes nociceptives par les tannins, les flavonoïdes et les leuco anthocyanes contenus dans ces extraits (Ghedira, 2005). Une probable inhibition de la synthèse des prostaglandines (inhibition de la PLA2 ou de la cyclo oxygénase) pourrait tout aussi bien expliquer l'effet de ces extraits. Ces résultats sont comparables à ceux de Okoli et al. (2007), qui ont évalué par des tests in vitro, l'effet anti-inflammatoire de *Aframomum melegueta* sur les rats. Mais l'effet diminue dans le temps. Ce qui s'explique par la résorption de certains composants de ces extraits ou leur élimination par l'urine (propriétés diurétiques des flavonoïdes) ou les selles (Khalil et al., 2006).

Les résultats du test antipyrétique montrent que les tannins, les flavonoïdes et les leucoanthocyanes présents dans les extraits inhibent la biosynthèse des prostaglandines (Kiuchi et al., 1992) comme le font les salicylés et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) contre l'inflammation (Umukoro et al., 2008; Singla et al., 1990).

Par ailleurs, signalons que l'effet anti-inflammatoire des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* est plus élevé que celui de la référence (Indométacine). Ces extraits contiennent donc des substances inhibitrices de la prostaglandine en quantité élevée. L'effet anti-inflammatoire de *Aframomum melegueta* serait alors potentialisé en présence du *Citrus aurantifolia* très riche en flavonoïdes (Minato et al., 2003) et en huile essentielle.

Un asthmatique en crise présente des difficultés à inspirer et à expirer l'air contenu dans ses poumons. Une toux et un sifflement caractéristiques accompagnent cette gêne et témoignent du rétrécissement de ses bronches (Karila et al., 2001). L'identification de l'activité antitussive des extraits aqueux étudiés est réalisée par le traitement de la toux sèche induite par inhalation de la vapeur d'acide citrique.

Après inhalation de la vapeur d'acide citrique, une toux sèche s'est installée car les contractions des muscles intercostaux sont devenues plus intenses qu'avant l'inhalation. Ces contractions musculaires sont probablement dues à l'irritation des RARS (Rapidly Adapting Receptors ou récepteurs irritants) (Widdicombe, 1989). Cette irritation serait due à la libération de l'histamine et à la formation d'autres médiateurs (Yu et al., 1999; Widdicombe, 1989). L'histamine provoque la broncho constriction, la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité capillaire (Sudo, 2000).

L'administration *per os* du Néo-Codion[®] et des extraits a provoqué de façon significative la diminution des fréquences des contractions des intercostales induites par la vapeur de l'acide citrique. Ceci par comparaison à l'histogramme des fréquences des contractions des animaux du lot témoin qui n'ont reçu que de l'eau distillée. Ce qui nous amène à dire que ces extraits contiennent des substances chimiques qui ont inhibé les médiateurs qui agissent sur le processus de déclenchement de la toux au niveau du centre nerveux. Le taux d'inhibition des fréquences des contractions par les extraits du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* est plus élevé que celui des extraits de *Sterculia setigera*. Cela montre que les extraits du mélange ont été plus efficaces contre la toux que ceux de *Sterculia setigera*. D'un point de vue de la phytochimie, la différence d'activité antitussive des deux extraits ne peut s'expliquer que par la présence des alcaloïdes, des tanins des anthocyanes, des coumarines et

des flavonoïdes en quantité plus importante dans le mélange.

Etant donné que la codéine (alcaloïde et dérivé morphinique) permet un traitement concomitant antalgique et antitussif et est métabolisée partiellement en morphine et dihydrocodéine (Dudgéon et Roenthal, 1996), on pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle les récepteurs des dérivés de la morphine (Kotzer et *al.*, 1999) peuvent être mis en jeu dans l'activité inhibitrice de ces deux extraits qui contiennent des alcaloïdes. Ces alcaloïdes pourraient avoir une structure proche de celles de la codéine ($C_{18}H_{21}NO_3$).

Nos résultats sont semblables à ceux de Hosseinzadeh et Ghenaati (2006) qui ont étudié les propriétés antitussives des extraits aqueux et éthanolique de *Crocus sativus* qui contiennent des alcaloïdes. Ces auteurs ont constaté une réduction significative du nombre de contractions intercostales. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé des extraits aqueux uniquement *per os*, mode d'utilisation des tradipraticiens de santé, parce que nous sommes dans le cadre de la validation de cette méthode d'utilisation pratique de la population. Par ailleurs, les doses des extraits dans notre étude (1000-3000 mg/kg) paraissent élevées mais n'atteignent pas la DL_{50} orale. Cela peut s'expliquer par le fait qu'en *per os*, les extraits subirait l'action des enzymes digestifs et l'effet de premier passage (Yuasa et *al.*, 1998), ce qui diminuerait la biodisponibilité des composants actifs.

Les tests précliniques effectués en ce qui concerne la toxicité de ces extraits, leurs propriétés anti-inflammatoire, antitussive, anti spasmolytique ont donné de résultats intéressants et ont montré que ces extraits, selon la norme OMS (2002), sont sans innocuité et peuvent, par conséquent faire l'objet de tests cliniques.

II-EFFET DE L'EXTRAIT AQUEUX DU MELANGE *AFRAMOMUM MELEGUETA-CITRUS AURANTIFOLIA* SUR LE BRONCHOSPASME INDUIT PAR L'EXERCICE CHEZ LES ETUDIANTS DE L'INJEPS (BIE)

Il a été étudié l'effet de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* sur le Bronchospasme Induit par Effort (BIE) chez 52 étudiants sportifs au moyen d'un interrogatoire couplé à un test d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire (EFR) sur tapis roulant, au repos et après exercice.

En ce qui concerne l'indice de masse corporelle, les moyennes sont: G1 ($22,51 \pm 1,78$) ; G2 ($23,41 \pm 1,94$) ; G3 ($22,21 \pm 2,23$) ; G4 ($23,69 \pm 2,18$) au niveau des sujets des quatre groupes. Ces valeurs indiquent, suivant la norme de classification de l'obésité, que nos sujets ne sont pas obèses, car la valeur normale pour un être humain est comprise entre 18,5 et 25 ($18,5 \leq IMC \leq 25$) (Delpeuch et Marie, 1997). Il n'y a donc pas de différence significative entre les indices de masse corporelle de nos sujets.

Afin d'éviter l'influence de l'âge sur la qualité des bronches de nos sujets, nous avons recherché une homogénéité dans l'échantillon d'étude par rapport à ce facteur. Car Selon **Ben Saad et al. (2006)**, les sujets âgés ont une tendance obstructive sans composante restrictive et une diminution de la force des muscles inspiratoires. L'âge moyen de nos sportifs est: G1 ($22,27 \pm 1,41$ ans) ; G2 ($21,57 \pm 1,34$ ans) ; G3 ($22,56 \pm 1,94$ ans) ; G4 ($22,06 \pm 1,64$) et la moyenne obtenue est de $22,12 \pm 1,58$ ans. Aucun des sujets enquêtés n'a présenté une obstruction à la spirométrie de base, de même aucun d'eux n'avait un asthme évolutif.

Cette recherche a montré une prévalence de 46,15% dans un échantillon d'étude composé de 52 sujets. L'analyse de cette prévalence montre qu'elle est élevée par rapport à celle obtenue dans d'autres études. Terblanche *et al.* (1990) ont mis en évidence une prévalence de 4,05% chez des jeunes sud africains de 6 à 20 ans, après une course libre de 6 minutes. Les études de Ouattara *et al.* (2004) sur 21 handballeuses de niveau international âgées de 19 à 33 ans, avait révélé une prévalence de 14%. Celle de Messan *et al.* (2008) a montré une prévalence de 35% chez des basketteurs béninois dont l'âge moyen était de 19 ans, après un test d'effort de course libre réalisé sur terrain. En 2009, les études de Médjigbodo sur la prévalence du bronchospasme induit par l'exercice chez des étudiants de l'INJEPS, après un test d'effort de 6 minutes sur terrain, a donné une prévalence de 19%. Weiler *et al.* (1998), ont montré que les athlètes qui s'entraînent plus de 20h/semaine présenteraient un risque, 1,9 fois supérieur à ceux qui s'entraînent moins de 10h/semaines. Ceci pourrait expliquer la différence avec nos

enquêtés qui s'entraînaient en moyenne 20 h/semaine (4 heures en moyenne d'activités physiques par jour).

En effet, les athlètes endurants sont ceux qui développent les hauts débits ventilatoires, ce qui entraîne une sollicitation accrue des voies aériennes au processus de réchauffement et d'humidification de l'air (Lockhart et *al.*, 1994). Les déperditions hydrique et thermique des zones distales du poumon qui s'en suivent seront à l'origine de désordres inflammatoires qui expliquerait la survenue de l'asthme. Autrement dit, le temps passé à l'entraînement influe sur le développement des troubles respiratoires (Anderson et Holzer, 2000).

Du point de vue critères de diagnostic du BIE, la chute du pourcentage de diminution du VEMS est fixée au moins à 10% dans toutes les études citées ci dessus. A part l'étude de Terblanche *et al.* (1990), toutes les autres études ont été réalisées dans le même climat (chaud et humide).

Toute fois, signalons aussi que le test spécifique de provocation bronchique n'est pas le même. La technique d'induction du BIE dans notre étude est différente de celle utilisée dans les études ci-dessus citées et pourrait expliquer la valeur élevée de prévalence observée. En effet, le tapis roulant mobilise plus rapidement un débit ventilatoire élevé. Il s'agit d'obtenir 80 à 90% de la fréquence cardiaque maximale ou de la VO₂ max théorique et de maintenir cette intensité d'exercice pendant quatre minutes. A cette intensité d'effort, la ventilation maximale cible est obtenue (Rundell et *al.*, 2000). L'environnement et l'alimentation aussi pourraient être des facteurs influençant la survenue du BIE car tous nos sujets étaient soumis à la même alimentation.

Le Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) a été le paramètre utilisé pour affirmer l'apparition du BIE.

Le test d'effort consiste à étudier la réponse bronchique du sujet lors de la réalisation d'un exercice, soit au laboratoire, soit sur le terrain, afin de tenter de reproduire un bronchospasme et de poser ainsi le diagnostic spécifique du BIE. Selon les recommandations de l'ATS/ERS (American Thoracic Society/European Respiratory Society), un test d'effort est considéré positif lorsqu'il existe une chute du VEMS d'au moins 10% à 15% par rapport à la valeur de base après un exercice physique réalisé à un niveau ventilatoire élevé. Ce critère de chute du VEMS a été la base de la composition de nos différents groupes d'études.

L'analyse des pourcentages de diminution du VEMS montre qu'il y a une différence significative entre les valeurs avant et après traitement au sein de chaque groupe. La diminution du pourcentage de VEMS est très significative dans le groupe 4 ayant reçu le

mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*, comparativement aux autres groupes.

Le test sur tapis roulant a entraîné une contraction bronchique par hyperventilation (Lumme et al., 2003), ce qui a provoqué une réduction du volume expiratoire maximal par seconde après effort et une augmentation de leur pourcentage de diminution de VEMS au-delà de 10%.

Lorsque les sujets sont traités par le mélange aqueux, le pourcentage de diminution de VEMS chute de 63,98%. Ce résultat confirme alors les propriétés anti-inflammatoires, broncho relaxantes et antitussives révélées par les résultats précliniques sur l'extrait. De plus, les composés chimiques présents tels que alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, mucilages... dans le mélange, confèrent à l'extrait des propriétés anti-œdémateux, anti-inflammatoires, émoullientes, anti oxydantes, analgésiques, anti-cholinergiques et de diminution de la perméabilité des capillaires sanguins. Ces résultats sont semblables à ceux de Kenkt et al. (2002) qui suggèrent la consommation de certains antioxydants tels que les flavonoïdes dans le traitement et la réduction de la survenue de l'asthme. L'effet du mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* serait donc comparable à celui du salbutamol (β_2 mimétique) à propriétés bronchodilatatrice (Boulet et al., 1989).

L'extrait aqueux de *Aframomum melegueta* et celui de *Citrus aurantifolia* ont aussi réduit la survenue du BIE chez les sportifs, mais leur effet est peu remarquable par rapport à celui du mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*. Ceci indique donc que, *Citrus aurantifolia*, compte tenu de sa composition chimique et de ses propriétés pharmacobiologiques aurait potentialisé l'effet de *Aframomum melegueta*.

L'analyse de la C-reactive protein (CRP) est effectuée généralement pour détecter l'existence d'une inflammation dans le corps.

Au niveau hépatique, les cytokines modifient l'expression des protéines de la phase aiguë: C-reactive protein, sérum amyloïde A (SAA), haptoglobine, orosomucoïde, fibrinogène (Gabay et al., 1999). Parmi ces protéines, la C-reactive protein (CRP) est actuellement reconnue comme le marqueur de choix de la réponse inflammatoire. La meilleure connaissance de ses fonctions fait de plus en plus considérer la CRP comme un acteur clé de l'immunité innée et un protagoniste de l'athérogenèse accélérée (Dupuy et al., 2003). C'est un marqueur dont la concentration augmente avec le degré de l'inflammation.

L'inflammation est alors le dénominateur commun de l'hyper réactivité bronchique (HRB) et relève aussi de la réduction du calibre des voies aériennes, de l'hypertrophie et de l'hyperplasie des fibres musculaires lisses, et de lésions de la barrière épithéliale (Molliex, 2004).

La concentration dans le plasma (partie liquide du sang) de la C-reactive protein (CRP) s'élève immédiatement après introduction d'un antigène dans l'organisme et elle disparaît plus tard lors de la formation d'un anticorps (Volanakis, 2001).

La C-reactive protein (CRP) a diminué dans le sang après quatorze (14) jours de traitement au niveau de tous les sujets quel que soit le groupe d'appartenance.

Cette diminution est hautement significative dans le groupe 4 (G4) où les sujets ont reçu le mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*. Ce qui serait dû aux tanins, alcaloïdes, flavonoïdes, mucilages, anthocyanes et huiles essentielles à propriétés anti-inflammatoires révélés par les résultats précliniques.

L'obstruction bronchique occasionnée par le BIE chez les sujets de l'étude serait due à une réduction de la lumière des bronches (Gaillard, 2004) par formation de l'œdème. Selon Dupuy et al. (2003), lors d'une réponse inflammatoire, le temps de sécrétion de la CRP peut être réduit de 18 heures à 75 minutes par diminution de l'affinité vis-à-vis des estérases (enzymes opérant l'hydrolyse des esters). Ainsi, le principal déterminant du taux plasmatique de la CRP est la vitesse de synthèse, qui dépend du nombre d'hépatocytes recrutés et donc du taux circulant de cytokines (médiateurs de l'inflammation).

L'inflammation bronchique occasionnée par le test de provocation bronchique est alors responsable de l'élévation de la CRP à J₀ (1^{er} jour de provocation bronchique). Après 14 jours de traitement, on constate une diminution de la valeur de CRP, ce qui confirme les différentes propriétés révélées par les travaux de l'étude préclinique sur l'extrait.

Le mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* a donc bloqué l'action des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, les cytokines, les leucotriènes....

Au delà du quatorzième jour, la légère augmentation de la concentration sanguine en CRP (**Figure 44**) s'explique par le fait que les sujets de l'étude sont en pleine activité physique, surtout qu'il s'agit d'une population de sportifs. Néanmoins, la valeur de la CRP, 72 heures après le traitement, est inférieure à la valeur initiale à J₀, surtout dans le groupe 4 (groupe plus prédisposé au BIE) comparativement aux autres groupes.

Ces différents résultats confirment l'efficacité du mélange aqueux de *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* dans le traitement traditionnel de l'asthme.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Notre travail a porté d'une part, sur l'étude des activités biologiques ainsi que la toxicité aiguë des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*, et d'autre part, sur l'évaluation de l'effet antiasthmatique de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* sur une population de sportifs de l'INJEPS.

Le screening phytochimique des différents extraits aqueux étudiés révèle la présence des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des mucilages, des composés réducteurs et des dérivés quinoniques, des anthocyanes, des leuco anthocyanes et des huiles essentielles. Dans l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* nous avons la présence des antracénosides.

De la détermination des rendements d'extraction des deux extraits, il ressort que l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* donne le meilleur rendement comparativement à celui de *Sterculia setigera*.

Par ailleurs la détermination de la dose létale 50% par voie i.p. des extraits permet de classer l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* comme faiblement toxique et celui de *Sterculia setigera* comme moyennement toxique. En administration orale, les deux extraits sont pratiquement sans toxicité. La quantité de poudre sèche tolérable pour un homme de 70 kg est de 13,92 g pour le mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* et de 10,71 g pour *Sterculia setigera*. Les deux extraits aqueux étudiés présentent aussi des propriétés antitussives et anti-inflammatoires.

In vitro les extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* ont manifesté une activité broncho relaxante dose dépendante sur les anneaux de trachée de rat. L'activité broncho relaxante observée après contraction au KCl, prouve que les extraits étudiés ont agité sur la mobilisation des ions Ca^{2+} intracellulaires.

La présence des composés chimiques dans ces extraits justifie cette activité broncho relaxante car ils sont doués de propriétés anti-oxydantes, antitussives antispasmodiques, de protections vasculaires et anti-inflammatoires.

Au regard des différents effets *in vivo* et *in vitro* des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*, ils semblent être tolérables pour une utilisation thérapeutique et justifient leur utilisation traditionnelle dans le traitement de l'asthme et de la toux au Bénin.

Les résultats de l'étude clinique ont montré une prévalence d'hyperréactivité bronchique de 46,15% chez des sportifs en formation à l'Institut National de la Jeunesse de l'Education Physique et du Sport (INJEPS) du Bénin et pratiquant des sports collectifs et individuels (hand, basket, volley, foot, gymnastique, athlétisme et judo). Ce taux élevé de la prévalence s'explique d'une part, par la charge hebdomadaire de travail auquel sont soumis les sujets (20 heures au moins d'activités physiques par semaine), et d'autre part, par le matériel de diagnostique utilisé (tapis) dans le cadre de notre étude.

Selon les recommandations de l'ATS/ERS, pour diagnostiquer le BIE, un test d'effort est considéré positif, lorsqu'il existe une chute du Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) de 10% à 15% par rapport à la valeur de base après un exercice physique réalisé à un niveau ventilatoire élevé d'au moins 20 fois le VEMS de repos. Notre étude a pris en compte ces recommandations et la chute du pourcentage de diminution du VEMS est d'au moins 10%.

Les résultats de l'étude clinique ont montré que le BIE existe bel et bien chez le sportif béninois avec une prévalence tout aussi importante que dans les pays développés. Il s'agit là, d'un domaine pour lequel, les pays à climat chaud et humide doivent investiguer afin de formuler aux sportifs, des recommandations de bonnes pratiques et de prise en charge pharmacologique.

Le traitement de l'AIE chez des sportifs par le mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* s'est révélé efficace.

Ce mélange aqueux, a non seulement amélioré le pourcentage de diminution du VEMS, mais il a aussi réduit la concentration sanguine en C-reactive protein (CRP) des sujets de l'étude.

Ces résultats confirment alors ceux de l'étude préclinique qui ont prouvé l'activité antispasmodique, anti-inflammatoire, anti-cholinergique et broncho relaxante de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*.

Le mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* révèle donc une activité bêtamimétique et présente une action similaire au salbutamol.

L'accessibilité très facile de ce produit, permet de conseiller et de vulgariser son usage dans le traitement de l'asthme et plus particulièrement l'Asthme induit par l'effort ou le Bronchospasme induit par l'effort.

La pleine possession de ce produit à coût moins élevé permettra alors de redonner aux sujets asthmatiques ou prédisposés à l'asthme d'effort, la possibilité de pratiquer leur discipline sportive sans gêne respiratoire.

PERSPECTIVES

Les principaux résultats de notre étude permettent d'envisager les perspectives suivantes :

- approfondir l'étude sur le rôle de l'épithélium de la trachée dans les effets broncho-relaxants des extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*,
- étendre l'étude sur les effets cardiaques (cœur *in situ* et/ou cœur isolé) et rénaux afin approfondir l'étude vasculaire des deux extraits,
- étudier la toxicité chronique des deux extraits,
- rechercher des fractionnements de chaque extrait pour évoluer vers la relation substance chimique/effet sur le muscle lisse bronchique,
- étudier l'effet du mélange aqueux de *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* sur la récupération post-effort des sportifs,
- identifier la famille chimique la plus active du mélange aqueux *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* et le (s) principe (s) actif (s) par des tests bio guidés,
- formuler un phytomédicament ou Médicament Traditionnel Amélioré (MTA) à base du mélange aqueux *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*,
- faire l'étude clinique sur l'extrait de *Sterculia setigera*.

REFERENCES

- 1- **Abena A.A., Kibori D.P., Bioka D., (1995).** Propriétés antalgiques et antipyrétiques de l'huile essentielle de *Agératum conyzoides*. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, VIII éd, 67-72.
- 2- **Abena A.A., Ouamba J.M., Keita A., (1997).** Activité anti-inflammatoire analgésique et antipyrétique de l'huile essentielle de *Agératum conyzoides*. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, IX éd, 48-55.
- 3- **Abena A.A., Gbenou J.D., Yayi E., Moudachirou M., Ongoka R.P., Ouamba J.M., Silou T., (2007).** Comparative chemical and analgesic properties of essential oils of *Cymbopogon nardus* (L) Rendle of Benin and Congo. *African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4 (3) 267-272.
- 4- **Adams R.P. (2001).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry. *Allured: Carol Stream, USA*. 345-349.
- 5- **Adjanohoun E.J., de Souza S., (2002).** La santé par les plantes : 100 plantes médicinales utiles du Bénin. *Guide de phytothérapie*, 4: 45-56.
- 6- **Adjanohoun E.V., Adjakidje M.R.A., Ahyi K., Akpagana P., Chibon A., El - Hadji J., Eyme Garba M., Gassita J.N., Gbeassor M., Goudote E.S., Guinko K.K., Hodouto P., Houngnon A., Keita Y., Keoula W., Kluga P., Ocloo I., Lo K.M. Siamevi, K.K., (1986).** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. Agence de coopération culturelle et technique, (A.C.C.T.), Paris. A partir de la banque de données PHARMEL 2 (réf. HP 10, HN 16), 470-540.
- 7- **Adjanohoun E-J, Akyi A.M., Aké Assi L., Baniakina J., Chibon J., Cusset G., Doulou V., Enzanza A., Eymé J., Gondoté E., Kéita A., Mbemba C., Mollet J., (1988).** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Congo, A.C.C.T. Ed., Paris, 478-567.
- 8- **Adoukonou J.L., Ableto M., (2007).** Contribution à l'étude des propriétés anti-inflammatoires d'extrait de *Cissus quadrangularis* chez le rat *Wistar*. Mémoire de Diplôme d'Ingénieur des Travaux. EPAC, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 1-109.
- 9- **Advenier C., Naline E., Drapeau G., Regoli D. (1987).** Modifications pathologiques dans l'asthme. *La Lettre du Pharmacologue*, 7(2): 24-28.
- 10- **Aggarwal B.B., Shishodia S., (2006).** Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 71(10): 1397-1421.
- 11- **Ahlquist R.P. (1948).** A study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 153: 586-600.

- 12- **Akasaka K.Y., Konno S., Ono Mue C., Abe C., (1975).** Electromyographic study of bronchial smooth muscle in bronchial asthma. *Tohoku J., Exp. Med.* 117: 55- 59.
- 13- **Alexandre B., Luc F., Ingrid S., Zeelenberg, Stephanie H., Sebastian A., (2007).** In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *The Journal of Experimental Medicine*, 35-40.
- 14- **Amvam Z.P.H., Menut C., Bessière J.M., (2002).** Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de *Citrus* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. *Fruits*, 57(2): 95-104.
- 15- **Anderson S.D., Holzer K., (2001).** Exercise-induced asthma: is it the right diagnosis in elite Athletes. *J. allergy Clin. Immunol*, 106: 419-428.
- 16- **Arunlakshana O., Schild H.O., (1959).** Some quantitative uses of drugs antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 14: 48-58.
- 17- **Bai T.R., (1991).** Abnormalities in airway smooth muscle in Edtal asthma. A comparison between trachea and bronchus. *Am. Rev. Respir. Dis*, 143: 441- 443.
- 18- **Bakhoun C., Samba A., Ndiaye S., Ndour B., (2001).** *Sterculia setigera* Del.: effet sur les cultures. *Annals of forest science*, 58 (2): 207-215.
- 19- **Barahona M.W., Sanchez-Fortun S., (1999).** Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Env. Pollut.*, 104:469-476.
- 20- **Barnes P.J., (1986).** Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev. Respir. Dis.*, 134 (6):1289-1314.
- 21- **Barnes P.J., (1992).** Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev.*, 72: 699-729.
- 22- **Baron C.B., Pornpeo J., Blaclaman D., Coburn R.F., (1993).** Common phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate pools are involved in carbachol and serotonin activation of tracheal smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266: 8-15.
- 23- **Bhatt K.R., Mehta R.K., Shrivastana P.N., (1977).** A simple method of recording anti-inflammatory effects on rat paw oedema. *Indian. Journal of Physiology and Pharmacology*, 21: 399-400.
- 24- **Beasley R., Crane J., Lai C.K., (2000).** Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin. Immunol.*, 105: 466-472.
- 25- **Ben Saad H., Tffihha M., Harrab I., Tabka Z., Guenard H., Hayot M., Zbidi A., (2006).** Facteurs influençant les variables ventilatoires des Tunisiennes âgées de 45 ans

- et plus: Influence de la parité, de l'activité sportive, des données anthropométriques et socioéconomiques. *Revue des Maladies Respiratoires*, 23(4): 324-338.
- 26- **Berger P., Marthan R., Tunon de Lara J.M., (2002).** Physiopathologie de la cellule musculaire lisse dans l'inflammation bronchique. *Revue des Maladies Respiratoires*, 19 (6):778-794.
- 27- **Bismuth C., Baud F., Conso F., Dally S., Frejaville J., (2000).** Toxicologie clinique. 5ème Éd, *Médecine-Sciences – Flammarion*, 356-467.
- 28- **Blackman J.G., Mccaig D.J., (1983).** Studies on an isolated innervated preparation of guinea-pig trachea Univ. *Otago, medical school British journal of pharmacology*, 80 (4): 703-710.
- 29- **Blostein-Fujii A., Di-Silvestro R.A., (1999).** Short term citrus flavonoid supplementation of type II diabetic women: no effect on lipoprotein oxidation tendencies. *Free. Radic. Res.*, 30: 315-320.
- 30- **Bok S.H., Lee S.H., (1999).** Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.*, 129:1182-1185.
- 31- **Borgeat P., Hamberg M., Samuelsson B., (1976).** Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J. Biol. Chem.*, 251: 7816-7820.
- 32- **Boskabady M.H., Saadatinejad M., (2003).** Hyperréactivité bronchique aux bêta2-mimétiques (salbutamol) dans l'asthme. *J. Asthma*, 40 (8): 917-925.
- 33- **Boulet L. P., Becker A., Berube D., Beveridge R., Ernst P., (1999).** Summary of the recommendations of the Canadian Consensus Conference on Asthma. *Canadian Asthma Consensus Group*, 1-14.
- 34- **Bruneton J., (2009).** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, 1167-1245.*
- 35- **Burgel P.R., (2002).** Les éosinophiles humains induisent la synthèse de mucine dans l'épithélium respiratoire par activation du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor), *Revue des Maladies Respiratoires*, 19 (6) :536-541.
- 36- **Carfagna L., Bouali O., Galinier P., Vaysse P., Moscovici J., Guitard J., Chaynes P., (2009).** Retrotracheal left pulmonary artery. *Case report with an embryologic and anatomic update.* 93: 30-34.

- 37- **Cari A., Lee H.K., Sanders K.M., (1996).** Regulation of ion channels in smooth muscle by calcium. *Am. J. Physiol.*, 271: 12- 34.
- 38- **Carillo S., (2004).** Histologie de l'appareil respiratoire: voies aériennes profondes, appareil broncho-pulmonaire. *Cardiologie et pneumologie* module 2, Paris France, 1-30.
- 39- **Carstairs J.R. Nimmo A.J., Barnes P.J. (1985).** Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132: 541-547.
- 40- **Chailis J.R., Adams D.A., Mistry R., Boyle J.P., (1993).** Second messenger and ionic modulation of agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 1138- 1145.
- 41- **Chand N., Duane Sofia R., (1995).** Airways smooth muscle: neurotransmitters, amines, lipid mediators and signal transduction. *Birkhäuser Verlag*, 131-155.
- 42- **Claude P., (1988).** Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. Dans: Giroud J. P. Ed. Pharmacologie clinique / bases de la thérapeutique. 2ème édition. Paris, Expansion scientifique française, 3-14.
- 43- **Coburn R.F., (1979).** Electromechanical coupling in canine trachealis muscle: acetylcholine contractions. *Am. J. Physiol.*, 236: 177- 184.
- 44- **Coburn R.F., Baron C-B., (1990).** Coupling mechanisms in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 258: 119- 133.
- 45- **Commodaro A., Gonçalves P., Schatzmann J.P., Genre J., Arslanian C., Sanches L., Muccioli C., Rizzo , Belfort L.V., Rubens J., (2010).** IL-10 and TGF-immunoregulatory cytokines rather than natural regulatory T cells are associated with the resolution phase of Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*, (Print), 31-37.
- 46- **Connell R., Berhane K., Gilliland F., London S.J., Islam T., Gauderman W.J., Milam J., Richardson J., (2002).** Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. Lancet contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm. Pharmacol.*, 3: 47-51.
- 47- **Cuthbert N.J., Gardiner K., Nash, Poll C.T., (1994).** Roles of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am. J. Physiol.*, 266: 620- 627.
- 48- **Daniel E. E., (1988).** Ultrastructure of airway smooth muscle. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 263: 179-203.

- 49- **Daniel E.E., Berezin V.P., Wang M., (1991).** Structure and function of airway smooth muscle. *Allergy*, 629–649.
- 50- **Daniel E.E., Kannan M., Davis C., Posey-Daniel V., (1986).** Ultrastructural studies on the neuromuscular control of human tracheal and bronchial muscle. *Respir. Physiol.*, 63: 109-128.
- 51- **Delpuech F. et Marie B., (1997).** Obésité et développement des pays du sud, *Med Trop.* 57: 380 - 388.
- 52- **de Souza S., (1985).** Les ordres des angiospermes, 3è édition 31- 47.
- 53- **Descotes J., (1992).** Les urgences en Toxicologie – Paris, Maloine, 561:13-26.
- 54- **Descotes J., (1985).** La DL50 en 1984. *Lyon Pharmaceutique*, 36 (4):189-191.
- 55- **Devulder P.Y., Hatron E., Hachulla, (2002).** Physiologie de l'inflammation. Edition Cedex Paris 15 p.
- 56- **Dudgéon D.J., Roenthal S., (1996).** *Management of dyspnea and cough in patients with cancer, Pain pallot Care*, 10: 157-171.
- 57- **Dupuy A.-M., Terrier N., Sénécal L., Morena M., Leray H., Canaud B., Cristol J.-P., (2003).** La CRP est-elle plus qu'un marqueur de l'inflammation? *Néphrologie*, 24 (7): 337-341.
- 58- **Durand F., Kippelen P., Ceugniet F., Gomez V.R., Desnot P., Poulain M., Prefaut C., (2005).** Undiagnosed exercise-induced bronchoconstriction in ski-mountaineers. *Int. J. Sports Med.*, 26 (3): 233-237.
- 59- **Enhorning G., Hohlfeld J., Krug N., Lema G., Welliver R.C., (2000).** Surfactant function affected by airway inflammation and cooling: possible impact on exercise-induced asthma. *Eur. Respir. J.*, 15: 532-538.
- 60- **Ernest E., Pittler M.H., (2000).** Efficacy of ginger for nausea and vomiting: a systematic review of randomized clinical trials. *British Journal of Anaesthesia*, 84 (3): 367-371.
- 61- **Fernandez X., Pintaric C., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A.M., Morello A., Pellerin P., (2004).** Etude de la composition chimique de l'absolue et de l'extrait au CO₂ supercritique de maniguette (*Aframomum melegueta*). *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 97 (964): 65-74.
- 62- **Gabay C., Kushner I., (1999).** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 340: 448-454.
- 63- **Gabella G., (1987).** Innervation of airway smooth muscle: fine structure. *Ann. Rev. Physiol.*, 49: 583-594.

- 64- **Gabella G., (1990).** Intramural neurons in the urinary bladder of the guinea-pig. *Cell and Tissue Research* 261: 231-237.
- 65- **Gaillard F., (2004).** Asthme induit par l'exercice [http:// www.plgSports.be/ upload/ infonews/ asthma induit par l'exercice](http://www.plgSports.be/upload/infonews/asthma_induit_par_l'exercice), consulté le 11-05-2010 à 16h 30min.
- 66- **Gauvreau G.M., Ronnen G.M., Watson R.M., O'Byrne P.M., (2000).** Exercise-induced bronchoconstriction does not cause eosinophilic airway inflammation or airway hyperresponsiveness in subjects with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 162: 1302-1307.
- 67- **Gbénou J. D., (1999).** Huiles essentielles de quelques plantes aromatiques des genres Eucalyptus et Melaleuca (Myrtacées) et Chenopodium (Chenopodiacées) du Bénin : Variation inter et intra spécifique et pharmacodynamiques. *Thèse de doctorat en chimie organique des substances naturelles*. N°DSM/CM/99/05/01, Cotonou, Bénin, 167-187.
- 68- **Gerthoffer W.T., (1991).** Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 261: 15-28.
- 69- **Gharagozloo M., Doroudchi M., Ghaderi A., (2002).** Effects of *Citrus aurantifolia* concentrated extract on the spontaneous proliferation of MDA-MB-453 and RPMI-8866 tumor cell lines. *Phytomedicine*, 9: 475-477
- 70- **Ghedira K., (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutiques. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- 71- **Gilbert S., Prelaud P., Guaguere E., (1999).** L'atopie féline. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.*, (34): 15-31.
- 72- **Gina (2004).** Global Initiative for Asthma. The global burden of asthma report. *J. Immunol*, 130 (1): 45-125.
- 73- **Gizycki M.J., Adelroth E., Rogers A.V., O'Byrne P.M., Jeffery P.K., (1997).** Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 16: 664-673.
- 74- **Godard P., Chanez J., Bousquet P., Dermoly J-I., Pujel F., Michel., (1996).** Abrégés d'asthmologie. Edition Masson, Paris. *Physiopathologie*, 25-65.
- 75- **Govindachari T.R., Suresh G., (2000).** Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia*, 71: 317-320.
- 76- **Guedje N.M. (1996).** Évaluation écologique de quelques produits Forestiers non-ligneux (PFNL) de la région de Bipindi – Akom II : abondance, distribution et impact des récoltes sur les peuplements. Rapport d'étude. Université de Yaoundé I – Programme Tropenbos Cameroun. Kribi, 40 p.

- 77- **Guillaume C., (2006).** Les cytokines, messagers chimiques du système immunitaire. (I). *Spectro Sciences*, 23-27.
- 78- **Haby M.M., Peat J.K., Mellis C.M., Anderson S.D., Woolcock A.J., (1995).** An exercise challenge for epidemiological studies of childhood asthma: validity and repeatability. *Eur. Respir. J.*, 8 (5): 729-736.
- 79- **Halliwell R.E., (1997).** Efficacy of Hypo sensitization in Feline Allergic Diseases Based: Upon Results of in vitro Testing for Allergen-Specific Immunoglobulin. *E. J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, (33): 282-288.
- 80- **Harwig J., Scott P., (1971).** Artémias *Artemia salina*: larves en Système de dépistage des toxines fongiques. *Appl. Microbiol.*, 21: 102-109.
- 81- **Harwig J., Scott P., (1997).** Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl. Microbiol.*, 21: 1011-1016.
- 82- **Hodge H.C., Sterner J.H., (1943).** Determination of substance acute toxicity by LD50. *American Industrial Hygien Association*; 10: 93-101.
- 83- **Hosseinzadeh H., Ghenaati J., (2006).** Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia*, 77: 446-448.
- 84- **Houghton P.J., Amala R., (1998).** Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. 1^{ère} édition, CHAPMAN and HALL. 230-237.
- 85- **Huet S., (1993).** Allergologie thérapeutique de l'asthme. Edition De Boeck Université 151-167.
- 86- **Hutchinson W.L., Noble E.G., Hawkins P.N., Pepys M.B. (1994).** The pentraxins, C-reactive protein and serum amyloid P component are cleared and catabolized by hepatocytes in vivo. *J. Clin. Invest*, 94:1390-1396.
- 87- **Hurtel J-M., (2008).** L'asthme et son traitement par les médicaments de synthèse, les plantes médicinales et les huiles essentielles dans phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles, site: www.phytomania.com consulté le 10-06-2010 à 22h.
- 88- **Ibekwe H.A. and Orok E.E. (2010).** Proximate Composition of *Aframomum melegueta* Seeds, *Garcinia kola* Seeds and Growth Performance of Broiler Chicks Treated with Powders from this. *International Journal of Poultry Science*, 9 (12): 1152-1155.

- 89- **Igwe S.A., Emeruwa I.C., Modie J.A., (1999).** Ocular toxicity of *Aframomum melegueta* (alligator pepper) on healthy Igbos of Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 65 (3): 203-206.
- 90- **Ilic N., Schmidt B.M., Poulev A., Raskin I., (2010).** Toxicological evaluation of Grains of Paradise (*Aframomum melegueta*) [Roscoe] K. Schum. *Journal of Ethnopharmacol.* 127 (2): 352-356.
- 91- **Jaci V., (2004).** Décès liés à l'asthme au cours d'activités sportives : Rétrospective sur 7 ans. 113 (2): 264-267.
- 92- **Jaki B., Orjala J., Bürji H.R., Sticher O., (1999).** Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brinr Shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharm. Biol.*, 37: 138-143.
- 93- **Janssen L. J., Sims S. M., (1992).** Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J. Physiol.. (Lond)*. 453: 197- 218.
- 94- **Janssen L. J., Sims S. M., (1993).** Histamine activates Cl^- and K^+ currents in guinea-pig tracheal myocytes: convergence with muscarinic signaling pathway. *J. Physiol, (Lond)*, 465: 661- 677.
- 95- **Jennings W., ShibamotoT., (1980).** Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. *Academic press*, New-York, 472-483.
- 96- **John F., B., (1983).** Inhibition of antigen and calcium ionophore A23187 induced contractions of guinea pig airways by isoprenaline and forskolin *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 61(6): 581-589.
- 97- **Johnson J.D., Snyder C.H., (1995).** Calcium regulation of smooth muscle contractile proteins. *Raven Press, Ltd.*, New York. 30: 153- 174.
- 98- **José Luis C., Zaira L., Hernandez I., Pilar P., Maria D., Garcia G., (2002).** A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2: 17-35.
- 99- **Kajita J., Yamaguchi H., (1993).** Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 264: 496-503.
- 100- **Kamikawa Y., (1994).** Neurogenic control of airway smooth muscle function. *J. Pharmacol. Toxic. Meth.*, 31: 207- 213.
- 101- **Kamtchouing P., Mbongue G.Y., Dimo T., Watcho P., Jatsa H.B., Sokeng S.D., (2002).** Effects of *Aframomum melegueta* and Piper of guineense on sexual behaviour of male rats. *Behav. Pharmacol.*, 13 (3): 243-247.

- 102- **Karila C., de Blic J., Waernessyckle S., Benoist M.R., Scheinmann P., (2001).** Cardiopulmonary exercise testing in children. An individualized protocol for workload increase. *Chest*, 120: 81-87.
- 103- **Karlsson J.A., Finney M.J.B., Persson C.G.A., Post C., (1984).** Substance P antagonists and the role of tachykinines in non-cholinergic bronchoconstriction. *Life Sci.* 35: 2681-2691.
- 104- **Kawaii S., Tomono Y., (1999).** Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 896-899.
- 105- **Kawashima K., Fujii T., (2000).** Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology et therapeutics*, 29-48.
- 106- **Kenkt P., Kumpulainen J., Järvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A., Hakulinen T., Aromaa A., (2002).** Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 560-568.
- 107- **Khalil N.M., Sperotto J.S., Manfron M.P., (2006).** Brasil. Anti inflammatory activity and acute toxicity of *Dodonaea viscosa*. *Fitoterapia, the journal for the study of medicinal plants*, 77 (6): 478-480.
- 108- **Kiuchi F., Iwakami S., Shibuya M., Hanaoka A., Sankawa U., (1992).** Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40: 387–391.
- 109- **Kim E.C., Min J.K., (2005).** [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 335 (2): 300-308.
- 110- **Kips J.C., Tavernier J., Pauwels R.A., (1992).** Tumor necrosis factor causes bronchial hyper responsiveness in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145: 332-336.
- 111- **Kippelen P., Friemel F., Godard P., (2003).** L'asthme chez l'athlète. *Rev. Mal. Respir.*, 20: 385-397.
- 112- **Kirkpatrick C.T., (1975).** Excitation and contraction in bovine tracheal smooth muscle. *J. Physiol, (Lond).*, 244: 263- 281.
- 113- **Kivity S., Argaman A., Onn A., Shwartz Y., Man A., Greif J., Fireman E., (2000).** Eosinophil influx into the airways in patients with exercise-induced asthma. *Respir. Med.*, 94: 1200-1205.
- 114- **Kiyabou G.M., (2002).** Les eucalyptus du Congo: Variation inter et intra spécifique de la composition de leurs huiles essentielles. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 158-169.

- 115- **Kotzer C.J., Had D.W., Dondjo G., Petrillo P., Underwood D.C., (1999).** Antitussive activity of Opioid receptor stimulation in guinea pigs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*, 292: 803-809.
- 116- **Kou J., Si M., Dai G., Lin Y., Zhu D., (2006).** Anti-inflammatory activity of *Polygala japonica* extract. *Fitotherapie*, 77: 411-415.
- 117- **Kouloumenta V., Hatziefthimiou A., Paraskeva E., Gourgoulialis K., Molyvdas P. A., (2006).** Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 149: 1083–1091.
- 118- **Lam L.K.T., Hasegawa S., (2000).** Limonin and nomilin inhibitory effects on chemical-induced tumorigenesis. *Functional Chemicals in Agriculture and Foods*, 185-200.
- 119- **Lapointe G., (2004).** Notions de toxicologie. *Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec. 2^{ème} édition*, 8-11.
- 120- **Lammers J.W., Minette P., Cusker M., Barnes P.J., (1989).** The role of pirenzepine-sensitive (M1) muscarinic receptors in vagally mediated bronchoconstriction in humans. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139: 446-449.
- 121- **Lands A.M., Arnold A., Mc-Auliff J.P., Ludicna F.P, Frown G. (1967).** Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214: 597-598.
- 122- **Latha U., Rajesh M.G., (2007).** Activités antimicrobiennes et la toxicité de l'extrait brut de *Psophocarpus tetragonolobus*. *Journal. traditionnel, Complémentaires et Médecines alternatives. J. Trad. CAM*, 4: 59 – 63.
- 123- **Leuppi J.D., Kuhn M., Comminot C., Reinhart W.H., (1997).** High prevalence of bronchial hyper responsiveness and asthma in ice hockey players. *Eur Respir. J.*, 12 (1): 13-16.
- 124- **Lichfield J.F., Wilcoxon F.A., (1949).** A simplified method of evaluation doses effects experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 95:113- 118.
- 125- **Lockhart A., Malo J. L., (1994).** Hyperréactivité bronchique: définition(s) et historique. *Revue des maladies respiratoires*. 11 (2): 85-92.
- 126- **Loenders B., Rampart M., Arnold G. H., (1992).** Selective M3 muscarinic receptor antagonists inhibit smooth muscle contraction in rabbit trachea without increasing the release of acetylcholine. *Journal of pharmacology and experimental therapeutic*, 263 (2): 45-52.

- 127- **Lumme A., Haahtela T., Ounap J., Ryttila P., Obase Y., Helenius M., Remes V., Helenius I., (2003).** Airway inflammation, bronchial hyper responsiveness and asthma in elite ice hockey players. *Eur. Respir. J.*, 22 (1): 113-117.
- 128- **Makker H.K., Holgate S.T., (1997).** Pathophysiology: role of mediators in exercise-induced asthma. *Allergic and Respiratory Disease in Sports Medicine*, 115-131.
- 129- **Mannix E.T., Farber M.O., Palange P., Galasetti P., Manfredi F., (1996).** Exercise-induced asthma in figure skaters. *Chest*, 109: 312-315.
- 130- **Mark G.H., Scott, A.B., Stefano M., (2004).** G protein coupled receptor endocytosis: a common theme with variations. *Med. Sci.*, 20 (1): 78–83.
- 131- **Marthan R., Savineau J. P., (1997).** Physiologie cellulaire et pharmacologie moléculaire du muscle lisse des voies aériennes. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie clinique*. 37 (4): 479-486.
- 132- **Marthan R., Crevel H., Guénard H., Savineau J.P., (1992).** Responsiveness to histamine in human sensitized airway smooth muscle. *Respir. Physiol.*, 90: 239-250.
- 133- **Martin J.G., Duguet A., Eidelman G.H., (2000).** The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyper responsiveness in disease. *Eur. Respir. J.*, 16: 349-354.
- 134- **Martinez M., Del Ramo J., Torreblanca A., Diaz-Mayans J., (1998).** Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia*. *Partenogenetica Aquaculture*, 172: 315-325.
- 135- **Maus A.D, Pereira E.F, Karachunski P.I, Horton R.M, Navaneetham D., Macklin K., Cortes W.S., Albuquerque E.X., Conti-Fine B.M., (1998).** Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 54: 779-788.
- 136- **Mclaughlin J.L., Chang C.J., Smith D.L., (1991).** Bench top “bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. *Natural Products Chemistry*, 383-409.
- 137- **Medelli J., Lounana L., Messan F., Menuet J.J., Petitjean M., (2006).** Testing of pulmonary function in a professional cycling team. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 46 (2): 298-306.
- 138- **Médjigbodo E., (2009).** Prévalence du bronchospasme induit par l'exercice chez des étudiants de l'INJEPS. Mémoire de maîtrise en STAPS (INJEPS/UAC Bénin). 52p.
- 139- **Messan F., Lounana J., Medelli J., (2008).** Bronchospasme induit par l'exercice en climat chaud et humide au Bénin. *Médecine tropicale*, 68 (5): 39-59.

- 140- **Mètodakou A., (2008).** Evaluation de la Capacité Vitale Forcée de 156 écoliers béninois exposés à la pollution automobile dans la ville de Cotonou. Mémoire de Maîtrise en STAPS (INJEPS/UAC Bénin), 82p.
- 141- **Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Mclaughlin J.L., Brine Shrimp, (1982).** A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J. Med.*, 42: 1-15.
- 142- **Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Mclaughlin J.L., (1982).** Brine crevette: un essai biologique général commode pour les constituants actifs de plantes. *Planta Medica.*, 45: 31-34.
- 143- **Michael A.S., Thompson C.G., Abramovitz M., (1956).** *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science*, 123: 467-505.
- 144- **Migliore L., Civitareale C., Brambilla G. D.I., Delupis G.D., (1997).** La toxicité aigue de plusieurs aspects importants des antibiotiques agricoles face aux larves d'*Artemia*. *Wat. Res.*, 31: 1801-1806.
- 145- **Miller E.G., Gonzales-Sanders A.P., (1994).** *Citrus limonoids* as inhibitors of oral carcinogenesis. *Food Technol.*, 48:110-114.
- 146- **Miller E.G., Porter J.L., Melnick A., Minaev N.G., Mironov C., (2004).** Further studies on the anticancer activity of citrus limonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4908-4912.
- 147- **Miller L.C., Tainter M.L., (1944).** Estimation of DL50 and its error by log-probit grap paper. *Pro. Soc. Biol. Exp. Med.* 2944: 261-264.
- 148- **Minato K., Miyake Y., Fukumoto S., Yamamoto K., Kato Y., Shimomura Y., Osawa T., (2003).** Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci.*, 72:1609-1616.
- 149- **Moise N.S., (1981).** Feline Bronchial Asthma: Pathogenesis, Pathophysiology, Diagnostics and Therapeutic Considerations. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, (3): 1091-1102.
- 150- **Molliex S., (2004).** Hyper-réactivité bronchique : Conférences d'actualisation. *Rev. Mal. Respir.*, 81-90.
- 151- **Nacoulma-Ouédraogo O., (1996).** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du Plateau central, Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Université de Ouagadougou, (Burkina-Faso), 267-378.
- 152- **Nelson H.S., (1995).** β -adrenergic bronchodilators. *New Engl. J. Med.*, 333: 499-505.

- 153- **Nelson M.T., Patlask J.B., Worley J.F., Standen N.B., (1990).** Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.*, 259 (28), 3-18.
- 154- **Ng'ang'a L.W., Odhiambo J.A., Omwega M.J., Gicheha C.M., Becklake M.R., Menzies R., Mohammed N., Macklem P.T., (1997).** Exercise-induced bronchospasm: a pilot survey in Nairobi school children. *East. Afr. Med. J.*, 74 (11): 694-698.
- 155- **Nystad W., Harris J., Borgen J.S., (2000).** Asthma and wheezing among Norwegian elite athletes. *Med, Sci, Sports, Exerc.*, (32): 266-270.
- 156- **Ogata S., Miyake Y., (2000).** Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 1075-1078.
- 157- **Okoli O.C., Akah P. A., Nwafor S.V., Ihemelandu U.U., Amadife C., (2007).** Anti-inflammatory activity of seed extracts of *Aframomum melegueta*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants.* 13: 11-21.
- 158- **OMS (2002).** Médecine traditionnelle : Rapport du secrétariat. Conseil exécutif. Cent onzième session. Point 5.7 de l'ordre du jour provisoire. EB111/9 du 12 décembre 2002, 28p.
- 159- **Ouatara S., Sery J., Kéita M., Touré M., Sirasy E.A., Tuo N., (2004).** Bronchospasme induit par l'exercice chez les handballeuses vivant en climat tropical humide. *RMR*, 21 (1): 30p.
- 160- **Ouedraogo G., (2009).** Etude de la toxicité générale aigue et respiratoire d'extraits de *Calotropis procera* Ait. (*Asclepiadaceae*), plante médicinale du Burkina-faso. Mémoire de DEA en Toxicologie Appliquée, Université de Ouagadougou 104 p.
- 161- **Ouedraogo M., Ouedraogo S., Traore A., Lompo M., Some N., Sawadogo L. Guissou I. P., (2005).** Propriétés bronchodilatatrices de l'extrait aqueux total de *Tapinanthus dodoneifolus* (DC. Danser) sur la trachée isolée de rat. *Ethnopharmacologia*, 35: 44-49.
- 162- **Pauli G., (2010).** Immunothérapie spécifique: mécanismes et conséquences thérapeutiques futures. **Revue de Respir**, 28: 229-232.
- 163- **Pelka M., Danzl C., Distler W., Petschelt A., (2000).** A new screening test toxicity testing of dental materials. *J. Dent.*, 28: 341-345.
- 164- **Perdrix A., Maître A., (2001).** Guide pratique d'exploration fonctionnelle respiratoire. Ed. Masson (2nd édition), Paris, 180 p.

- 165- **Peter H. R., Ray F.E., Susan E.E., (2003).** Biologie végétale: traduction de la 6^{ème} *Pharmacol Ther*, 86: 29-48.
- 166- **Pinet C., Tessonier F., Guignon I., Orehek J., (2002).** L'obstruction bronchique des asthmatiques sous-estimée par les médecins généralistes. *La presse médicale*, 31 (19): 880-884.
- 167- **Potter E.K., (1988).** Neuropeptide Y as an autonomic neurotransmitter. *Pharmacol Ther.*, 37: 251-273.
- 168- **Postma D.S., Bleecker E.R., Amelung P.J., Holroyd K.J., Xu J., Panhuysen C.I.M., Meyers D.A., Levitt R.C., (1995).** Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyper responsiveness coinherited with a major gene for atopy. *New Engl. J. Med.*, (333): 894-900.
- 169- **Préfaut C., (1985).** Exploration de la fonction ventilatoire. *Pneumologie*, 35 (17): 941-953.
- 170- **Prieur D.J., Young D.M., Davis R.D., Coney., Homan E.R., Dixon R.L., Guarino A.M., (1983).** Procedures of preclinical toxicologic evaluation of cancer chemotherapeutic agents: protocols of the laboratory: VI Mousse LD50 study. *Cancer chemother*, 3 (4): 8p.
- 171- **Racke K., Matthiesen S., (2004).** The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 17: 181-198.
- 172- **Rasmussen F., Lambrechtsen J., Siersted H.C., (1999).** Is low physical fitness a risk factor for the development of asthma. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 159: 324-367.
- 173- **Rasmussen H., Kelly G., Douglas J. S., (1990).** Interactions between Ca²⁺ and AMP_C messenger system in regulation of airway smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol. Respir. Dis*, 258:279- 288.
- 174- **Richardson J.B., (1982).** The innervation of the lung. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.*, 117:13-31.
- 175- **Richardson J.B., (1981).** Non adrenergic inhibitory innervation of the lung. *Lung*. 159: 315-322.
- 176- **Rodger I. W., (1992).** Airway smooth muscle. *British Medical Bulletin*. 48: 97- 107.
- 177- **Rodger I. W., (1993).** Airway smooth muscle: Signal transduction and contractile mechanism. *Kay. Acad. Press Ltd*, 243- 257.
- 178- **Rodolfo H., Cara W., Juliana A.D., Dan A., Mingfu W., James E., Simon L., (2008).** Chemistry, Quality, and Functional Properties of Grains of Paradise

- (*Aframomum melegueta*), a Rediscovered Spice. American Chemical Society, ACS Symposium Series, 987 (6): 100–113.
- 179- **Roffel A.F., Elzinga C.R., Zaagsma J., (1990).** Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm. Pharmacol.*, 3: 47-51.
- 180- **Roulier G., (1996).** Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences des plantes. *Collection médicale et paramédicale*, Edition Dangles, 278 : 50-65.
- 181- **Rousselet M.C., Vignaud J.M., Hofman P., Chatelet F.P., (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire. Paris Maloine, 320-331.
- 182- **Ruckebusch Y., (1981).** Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales, 2^e Edit. Maloine, S. A. Paris, 185-196.
- 183- **Rundell K.W., Spiering B.A., Evans T.M., Baumann J.M., (2004).** Baseline lung function, exercise-induced bronchoconstriction, and asthma-like symptoms in elite women ice hockey players. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 36 (3): 405-410.
- 184- **Rundell K.W., Im J., Mayers L.B., Wilber R.L., Szmedra L., Schmitz H.R., (2001).** Self-reported symptoms and exercise-induced asthma in the elite athlete. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 33 (2): 208-213.
- 185- **Rundell K.W., Spiering B.A., Judelson D.A., Wilson M.H., (2003).** Bronchoconstriction during cross-country skiing: is there really or refractory period. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 35 (1):18-26.
- 186- **Rundell K.W., Wilber R.L., Szmedra L., Jenkinson D.M., Mayers L.B., Im J., (2000).** Exercise induced asthma screening of elite athletes: field versus laboratory exercise challenge. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 32 (2): 309-316.
- 187- **Schramm Craig M., (2000).** β -adrenergic relaxation of rabbit tracheal smooth muscle: a receptor deficit improves with corticosteroid administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 292: 280-287.
- 188- **Sekhon H.S., Jia Y., Raab R., Kuryatov A., Pankow J.F., Whitsett J.A, Lindstrom J., Spindel E.R., (1999).** Prenatal nicotine increases pulmonary α -nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J.Clin. Invest.*, 103: 637-647.
- 189- **Singla A.K., Pathak K., (1990).** Tropical anti-inflammatory effects of *Euphorbia prostrata* on carrageenan-induced footpad oedema in mice. *Journal of Ethno. pharmacology*, 29: 291-294.

- 190- **Sleet R.B., Brendel K., (1983).** Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia naupli* for use in developmental toxicology. *Ecotoxicol. Env. Safety.*, 7:435-446.
- 191- **Small R. W., (1988).** Foster. Electrophysiology of the airway smooth muscle cell. *Academic Press*, 35- 56.
- 192- **Small R. W., (1994).** Foster. Electrophysiology of calcium channels in airway smooth muscle. *Academic Press*, 137- 161.
- 193- **Solis P.N., Wright C.W., Anderson M.M., Gupta M.P., Phillipson J.D., (1999).** A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant. Med.*, 59: 250-252.
- 194- **Somlyo A.P., Somlyo A.V, (1994).** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372: 231- 236.
- 195- **Stull J.T., Tmey M.G., Tang D.C., Word R.A., Karnrn K.E., (1993).** Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca^{2+} desensitization. *Mol. Cell. Biochem.*, 127-128: 229-237.
- 196- **Sudo, T., Fumiaki H., and Takashi N., (2000).** Responses of trachea bronchial receptors to inhaled furosemide in anesthetized rats. *American Journal of Respiration and Critical Care Medicine*, 162: 971 – 975.
- 197- **Surh Y., (1999).** Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.*, 16; 428 (1-2):305-27.
- 198- **Tallarida R.J., Murray R.B., (1987).** Pharmacological Calculation System based «Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs». 2nd Edn. *Springer-Verlag*, 178-189.
- 199- **Tanaka T., Kohno H., Tsukio Y., Honjo, S., Tanino M., Miyake M., Wada K., (2000).** Citrus limonoids obacunone and limonin inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Biofactors.*, 13:213-218.
- 200- **Terao I., (2002).** Effets d'une dose faible journalière de théophylline à libération prolongée sur l'inflammation et l'hyperréactivité bronchiques chez des patients asthmatiques. *Alerugi.*, 51 (4): 364-370.
- 201- **Terblanche E., Stewart R.I., (1990).** The prevalence of exercise-induced bronchoconstriction in Cape Town school children. *S Afr. Med. J.*, 15; 78 (12): 744-747.
- 202- **Thomas P.S., Yates D.H., Barnes P.J., (1995).** Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 152: 76-80.

- 203- **Tiffeneau R., Pinelli A., (1948).** Régulation bronchique de la ventilation pulmonaire. *J. Fr. Méd. Chir. Thorac.*, 2: 221-244.
- 204- **Trevan J.W., (1927).** The error of determination of toxicity. *Proc. Royal. Soc.* (101 B): 483-514.
- 205- **Umukoro S., Ashorobi R. B., (2008).** Further pharmacological studies on aqueous seed extract of *Aframomum melegueta* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3): 489-493.
- 206- **Umukoro S., Ashorobi R.B., (2007).** Further pharmacological studies on aqueous seed extract of *Aframomum melegueta* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109 (3): 501-504.
- 207- **Umukoro S., Ashorobi R.B., (2006).** Further studies on the antinociceptive action of aqueous seed extract of *Aframomum melegueta*. *J. of Ethnopharmacology*, 3: 34-38.
- 208- **Umukoro S., Ashorobi R. B., (2005).** Effect of *Aframomum melegueta*. Seed Extract on Castor Oil–Induced Diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 43 (4): 330-333.
- 209- **Umukoro S., Ashorobi R.B, (2003).** Pharmacological Evaluation of the Antidiarrhoeal Activity of *Aframomum melegueta* Seed Extract. *West Afr. J. Pharmacol. Drug Res.*, 19 (1&2): 51-54.
- 210- **Van Koppen C.J., Kaiser B., (2003).** Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.*, 98: 197-220.
- 211- **Vanhaecke P., Persoone G., Claus C., Sorgeloos P., (1981).** Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia naupli*. *Ecotoxicol. Env. Safety*, 5:382-387.
- 212- **Vigushin D.M., Pepys M.B., Hawkins P.N., (1993).** Metabolic and scintigraphic studies of radioionated human C-reactive protein in health and disease. *J. Clin. Invest.*, 90:1351-1357.
- 213- **Volanakis J.E., (2001).** Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol. Immunology*, 38:189–197.
- 214- **Walker, H. (1999).** Pharmacologie intégrée: traduction de la 1ère édition anglaise. De Boeck université- Paris VI, 295-315.
- 215- **Walle T., (1974).** GLC determination of propranolol, other β -blocking drugs, and metabolites in biological fluids and tissues. *J. Pharm. Sci.*, 63: 1885-1891.
- 216- **Weiler J.M., Layton T., Hunt M., (1998).** Asthma in United States Olympic athletes who participated in the 1996 Summer Games. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 102 (5):722-726.

- 217- **Weiler J.M., Ryan E.J., (2000).** Asthma in United States olympic athletes who participated in the olympic winter games. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 106: 267-271.
- 218- **Weiler, J.M., (1996).** Exercice-induced asthma: a practical guide to definitions, diagnosis, prevalence and treatment. *Allergy Asthma Proc*, 17 (6): 315-325.
- 219- **West J.B., (2003).** La physiologie respiratoire. Ed Maloine (6ème édition), Paris, 111-178.
- 220- **Widdicombe J.G., (1963).** Regulation of trachea bronchial smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 43:1-37.
- 221- **Widdicombe J.G., (1989).** Nervous receptor in the trachea bronchial tree. *Program. of Brain Research.*, 67: 49-64.
- 222- **Wilber R.L., Rundell K.W., Szmedra L., Jenkinson D.M., Im J., Drake S.D., (2000).** Incidence of exercise-induced bronchospasm in Olympic winter sport athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32 (4): 732-737.
- 223- **Williams R., Herrup K., (2001).** "The Control of Neuron Number." Originally published in *The Annual Review of Neuroscience*, (11): 423-453.
- 224- **Word R.A., (1995).** Myosin phosphorylation and the control of myometrial contraction/relaxation. *Semin. Perinatol.*, 19: 3-14.
- 225- **Yang Z.J., Biggs D.F., (1991).** Muscarinic receptors and parasympathetic neurotransmission in guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, 193: 301-308.
- 226- **Yu J., Wang L., Walzem R.L., Rosemary L., Edward G., Miller, Leonard M., Pike, Bhimanagouda S., (2005).** Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 2009-2014.
- 227- **Yu J., Zhang J.F., Robertts A.M., Collins L.C., Flether E.C., (1999).** Pulmonary rapidly adapting receptor stimulation does not increase airway resistance in anesthetized rabbit. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160: 906-912.
- 228- **Yuasa H., Jian G.U., Hayashi Y., Watanabe J., (1998).** First-pass metabolism of 5-fluorouracil in rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 50 (9): 1019-1025.
- 229- **Zohoun Th. et Flénon J., (1997).** La médecine traditionnelle et la pharmacopée africaines peuvent-elles constituer une alternative de soins face aux coûts prohibitifs actuels de la médecine moderne? *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 9: 3-16.

ANNEXES

ANNEXE 1:

- Réactif Carr-Price (trichlorure d'antimoine SbCl_3)
- Solution d'anhydride acétique
- Réactif de Shibatat (**Annexe**)
- Solution d'ammoniaque 25%
- Solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré
- Solution de méthanol 95%
- Solution d'éthanol 99%
- Carbonate de calcium anhydre
- Pastilles de soude
- Solution d'acide 3,5-dinitrobenzoïque 1%
- Hydroxyde de sodium (NaOH) anhydre
- Solution d' α -naphtol 1%
- Trichlorure de fer (FeCl_3)
- Solution de Liqueur de Fehling (I+II)
- Acide gallique
- Quercétine
- Réactif du NEU (Diphénylborinate 1% dans du méthanol + Polyéthylène glycol 4000 à 5% dans l'éthanol).

REACTIF DE MAYER

- 1,35 g de chlorure de mercure + 60 mL d'eau distillée + 5 g d'iodure de potassium dans 10mL d'eau distillée + Eau distillée qsp (1000 mL).

COMPOSITION POUR LA PREPARATION DU REACTIF DE DRAGENDORF

- **Etape1** : Dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth basique dans 50 mL d'une solution constituée de 40 mL d'eau et 10 mL d'acide acétique.
- **Etape2** : Dissoudre 8 g de KI dans 20 mL d'eau distillée.
- **Etape3** : Mélanger les deux solutions et bien homogénéiser.

SOLUTION DE KREBS (composition pour 1L).

La solution de Krebs utilisée est composée de: NaCl, 6,9g; NaHCO₃, 2,02g; KCl (LABOSI P 1295 1 kg Lot 083151) (0,35g); KH₂PO₄, (0,16g); MgSO₄, (0,30g); CaCl₂, (0,37g); D-Glucose, (0,6g) dans 1L d'eau distillée

PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU SCREENING PHYTOCHIMIQUE SELON HOUGHTON ET AMALA (1998)

1) Recherche des alcaloïdes

Elle s'est faite grâce à deux tests :

a. Test général en milieu acide.

On mélange 5 g de la poudre à 25 mL d'acide chlorhydrique dilué à 5 %. Le mélange est macéré pendant 24 heures. On recueille 1 mL du filtrat auquel on ajoute 5 gouttes de réactif de MAYER. En cas de présence d'alcaloïdes, on observe un précipité jaune ou louche dans le tube.

b. Extraction des alcaloïdes

On met 5 g de poudre dans 5 mL d'ammoniaque dilué au demi. A ce mélange, on ajoute 25 ml d'éther chloroformique et on laisse macérer pendant 24 heures dans un flacon bouché. Le filtrat est séché sur du sulfate sodique anhydre et ensuite épuisé avec 5 mL d'acide chlorhydrique à 5 % deux fois de suite. Au filtrat épuisé, on ajoute 5 gouttes de réactif de MAYER. En cas de présence d'alcaloïde, le filtrat précipite ou devient dans le tube.

2) Recherche des composés polyphénoliques.

Dans un erlenmeyer, on met 5 g de poudre auxquels on ajoute 100 mL d'eau bouillante. Le mélange infusé est laissé 15 minutes sous agitation continue, puis filtré. Ce filtrat réparti en 2 portions servira aux recherches ci-après :

a) Recherche des tanins

A la première portion du filtrat, nous ajoutons quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 %. L'observation d'une coloration bleu-foncée, verte ou noire indique la présence des tanins.

- **Recherche des tanins catéchiques**

A 30 mL de la seconde portion, nous ajoutons 15 mL de réactif de STIASNY et chauffons le mélange au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité rose indique la présence des tanins catéchiques.

- **Recherche des tanins galliques**

Après récupération du filtrat, celui-ci a été saturé d'acétate sodique additionné de quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 %. Une teinte bleue ou noire indique la présence de tanins galliques.

b) Recherche de flavonoïdes

A 5 mL de la deuxième portion, nous ajoutons 5 mL d'alcool chlorhydrique (réactif de SHINODA) et une pincée de poudre de magnésium: c'est la réaction de la cyanidine, dite réaction de SHINODA. L'apparition d'une coloration orangée (flavones), rouge (flavonols) ou violette (flavonones) indique la présence de flavonoïdes.

c) Recherche des anthocyanes

Nous additionnons quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 5 % à 1 mL de la deuxième portion. Ce mélange est ensuite alcalinisé par ajout de quelques gouttes d'ammoniaque dilué au demi. Une coloration rouge qui s'accroît et vire au bleu-violet ou verdâtre indique la présence d'anthocyanes.

d) Recherche de leuco-anthocyane

A 5 mL de la deuxième portion, nous ajoutons 5 ml du réactif de SHINODA. Le mélange est ensuite chauffé pendant 15 minutes au bain marie à 90°C. L'observation d'une coloration rouge cerise ou violacée indique la présence de leuco-anthocyane.

3) Recherche des dérivés quinoniques

Dans un erlenmeyer, nous mélangeons 2 mL d'HCl à 5 % et 2 g de poudre. A ce mélange, nous ajoutons 20 mL de chloroforme et nous laissons en agitation continue pendant 24 heures. Après macération, nous ajoutons 5 ml d'ammoniaque au mélange précédent : c'est la réaction de BORN-TRAGER. Une coloration rose ou rouge violacée indique une réaction positive.

4) Recherche des saponosides

Ils sont mis en évidence par l'indice de mousse qui est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue qui, dans des conditions déterminées, donne une mousse persistante.

Le décocté de 1 g de poudre est préparé pendant 30 minutes dans 100 mL d'eau distillée avec une ébullition modérée. Le filtrat refroidi puis ajusté à 100 mL est réparti dans 10 tubes à essais (hauteur 16 cm x 16 cm de diamètre) en série arithmétique de raison 1/10 ème de concentration du décocté (successivement 1, 2, 3..., 10 mL de décocté; ajuster le volume de chaque tube à 10 mL avec de l'eau distillée). Après 30 agitations dans le sens de la longueur pendant 15 secondes (deux agitations par seconde, après l'avoir bouché avec le pouce), le tube est laissé au repos pendant 15 minutes. La hauteur de la mousse est mesurée. Si elle est ≥ 1 cm dans l'un des tubes, la dilution dans ce tube est l'indice de mousse cherché. Sinon, l'indice est inférieur à 100 (négligeable).

5) Recherche de triterpénoïdes et de stéroïdes y compris les cardénolides

Pour cette recherche, nous ajoutons à 1 g de poudre 10 mL d'alcool éthylique à 70°C et nous agitons pendant 30 min. A ce mélange, nous ajoutons 10 ml d'eau distillée puis 2 mL d'acétate de plomb à 10 % à volume égal V/V. Après 15 minutes de repos, nous ajoutons au filtrat 2 mL de solution aqueuse de phosphate disodique à 10 %. Après 15 minutes de repos, le filtrat est recueilli dans une ampoule à décanter et extrait à trois reprises avec 5 mL de

chloroforme (CHCl₃). Les solutions chloroformiques sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre puis divisées en trois portions et évaporées à siccité (bain de sable).

a) Recherche de triterpénoïdes

La première portion est solubilisée par quelques gouttes d'acide acétique. Au mélange obtenu, nous ajoutons 3 mL d'un mélange d'anhydride acétique-acide sulfurique. Une coloration violette, bleue ou verte indique la présence de triterpénoïdes.

b) Recherche de stéroïdes

A la deuxième portion, nous ajoutons 2 gouttes d'une solution alcoolique à 2% d'acide dinitrobenzoïque et 2 gouttes d'hydroxyde de sodium à 1N. L'apparition d'une coloration rouge pourpre ou rouge au vin indique la présence de stéroïdes. C'est la réaction de KEDDE (également pour les cardénolides)

c) Recherche de cardénolides

Réaction de RAYMOND pour les cardénolides : elle consiste à ajouter à troisième portion successivement 2 gouttes d'une solution alcoolique à 1 % de métadinitronenzène et 2 gouttes de NaOH à 20 %. Une coloration bleue indique une réaction positive.

6) Recherche de dérivés cyanogéniques

A 15 mL d'eau distillée on ajoute 2 g de la poudre puis bouché immédiatement et laissé en macération pendant 1 heure. Le col de l'erenmeyer est recouvert de papier imbibé d'acide picrique et on chauffe pendant quelques minutes. L'apparition d'une coloration marron indique le dégagement de HCN.

7) Recherche des mucilages

Nous avons introduit 1 mL de décocté à 10 % dans un tube à essai et ajouté 5 mL d'alcool absolu. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage après une dizaine de minutes.

8) Recherche de coumarines

a) A 20 mL d'éther on ajoute 1 g de poudre puis boucher immédiatement dans un petit erlenmeyer et laisser en macération pendant 24 heures. Le filtrat a été ajusté à 20 mL avec l'éther. 5 mL de filtrat ont été évaporés dans une capsule à l'air libre. Au résidu obtenu, nous avons ajouté 2 mL d'eau chaude et partagé la solution dans deux tubes à essai. Dans l'un des tubes, nous avons ajouté 0,5 mL d'ammoniaque à 25 %. Le second tube représente le témoin. Nous observons la fluorescence des deux tubes à essai sous UV à 365 nm. Une fluorescence intense dans le tube test indique la présence de coumarines.

ou

b) 10 g de poudres sont mis dans un erlen de 500 mL. On y verse 180 mL d'éthanol et 20 mL d'eau distillée. On met l'erlen sous agitation magnétique pendant une nuit. Après filtration, la solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à siccité. L'extrait hydro-éthanolique concentré est traité, dans une capsule de porcelaine, avec une goutte de solution saturée de chlorhydrate d'hydroxylamine 10% et une goutte de solution alcoolisée de KOH (7, 5% de KOH dans l'éthanol). Ce mélange est chauffé pendant 2 min. Après refroidissement, on ajoute une petite quantité d'HCl 0,5N et de FeCl₃ 1%. Un test positif consiste en une coloration violette.

9) Recherche des composés réducteurs

Le décocté à 10 % est obtenu par ébullition modérée pendant 3 minutes d'un mélange de 50 mL d'eau distillée et de 5 g de poudre.

Après refroidissement, le filtrat a été ajusté à 50 mL avec de l'eau distillée. 5 mL de filtrat sont introduits dans un tube à essai. Après le chauffage au bain-marie à 90°C pendant quelques minutes, on ajoute 1 mL de réactif de Fehling (liqueur de Fehling A + liqueur de Fehling B à volume égal). On réchauffe le filtrat quelques minutes après. L'observation d'un précipité rouge vif indique la présence de composés réducteurs.

10) Recherche des dérivés anthracéniques

a) Anthracéniques libres

A 1 g de poudre, on ajoute 10 mL de chloroforme et on chauffe prudemment pendant 3 minutes au bain-marie. Après filtration à chaud, le mélange est complété à 10 mL avec le chloroforme. 1 mL de l'extrait chloroformique est additionné de 1 mL d'ammoniaque dilué à 1/2 puis agité. L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence d'anthracéniques libres.

b) Anthracéniques combinés

- O-hétérosides

A une partie du résidu épuisé par le chloroforme, on ajoute 10 mL d'eau distillée et 1 mL d'acide chlorhydrique concentré. Le tube à essai maintenu au bain marie bouillant pendant 15 min est ensuite refroidi sous un courant d'eau. L'hydrolysate est obtenu après filtration et ajustement à 10 mL. On prélève 5 mL de l'hydrolysate qu'on agite avec 5 mL de chloroforme. La phase organique soutirée est introduite dans un tube à essai et additionnée de 1 mL d'ammoniaque dilué au 1/2 puis agité (on garde la phase aqueuse). La présence d'anthracénique est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

Si la réaction est négative ou faiblement positive, on recherche les O-hétérosides à génines réduites. Pour ce faire on prélève 5 mL d'hydrolysate qu'on additionne de 3 à 4 gouttes de FeCl₃ (chlorure ferrique) à 10 %. Le mélange chauffé au bain-marie pendant 5 min est ensuite refroidi sous courant d'eau puis agité avec 5 mL de chloroforme. A la phase chloroformique soutirée et introduite dans un tube à essai, on ajoute 1 mL d'ammoniaque au 1/2 puis on agite. Une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence des O-hétérosides à génines réduites.

- C-hétérosides

A la phase aqueuse conservée plus haut, on ajoute 1 mL de FeCl₃ à 10 %. Le mélange est porté à ébullition au bain-marie bouillant pendant 30 min puis refroidi. Après agitation avec 5 min de chloroforme, la phase chloroformique est soutirée et recueillie dans un tube à essai. On y ajoute 1 mL d'ammoniaque dilué à 1/2 et on agite. Une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence de génines de C-hétérosides.

ANNEXE 2

Questionnaire

Dans le cadre de la réalisation d'une étude sur l'effet de l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*, nous sollicitons cher étudiant, votre bonne foi au remplissage de cette fiche, en vue d'une expérimentation. Merci pour votre franche collaboration.

1. Nom.....
2. Prénom(S).....
3. Date et Lieu de Naissance.....
4. Sexe.....
5. Taille.....
6. Masse corporelle.....

COCHEZ D'UNE CROIX, LA CASE QUI CORRESPOND A VOTRE REPONSE

7. Avez-vous des parents asthmatiques? Oui Non
8. Si oui, Père Mère
9. Etes-vous asthmatique ou avez-vous des troubles respiratoires ?
Oui Non
10. Si oui, année de survenance
11. Quelle activité physique pratiquez-vous?
12. Combien d'heures d'activité physique pratiquez-vous par semaine?

NOTICE D'INFORMATION

Dans le cadre de ses travaux de recherche en Pharmacologie/Physiologie de l'Effort, Judith AHOUNOU, étudiante en thèse de doctorat à la FAST, mène ses recherches sur «EFFET DE L'EXTRAIT AQUEUX DU MELANGE *AFRAMOMUM MELEGUETA-CITRUS AURANTIFOLIA* SUR L'ASTHME INDUIT PAR L'EXERCICE CHEZ LES ETUDIANTS DE L'INJEPS ». Cette étude vise à mettre en valeur nos ressources naturelles et promouvoir leur utilisation dans la prise en charge des sportifs confrontés aux problèmes ventilatoires.

Les tests précliniques effectués sur l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* en ce qui concerne la toxicité, les propriétés anti-inflammatoire, antitussive, anti asthmatique ont donné de bons résultats et ont montré que ces extraits, selon la norme OMS (2002), sont sans innocuité.

Cette étude est dirigée par les Professeurs Joachim D. GBENOU, Maître de Conférences en Chimie Organique et Chimie des Substances Naturelles à la FAST et Pierre H. DANSOU, Professeur Titulaire en Physiologie de l'Effort à l'INJEPS.

Cette étude comporte deux phases:

- **Première phase:** Prise de mesures anthropométriques (taille, poids âge).
- **Deuxième phase:**
 - Détermination de la prévalence de l'AIE au sein de la population d'étude
 - Prélèvement sanguin et mesure des paramètres spirométriques avant et après l'effort physique.
 - Traitement des sujets prédisposés à l'AIE pendant 14 jours avec l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*
 - Mesures des paramètres spirométriques avant et après l'effort physique.

Deux groupes d'étudiants seront constitués :

- Le premier groupe d'étudiants recevra pendant 14 jours de l'eau. C'est le groupe témoin.
- Le deuxième groupe d'étudiants recevra pendant 14 jours le mélange aqueux *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*.

Selon le praticien de la médecine traditionnelle, la prise du produit n'a aucun effet adverse.

Néanmoins au cours de l'étude et lors de la prise du produit, l'étudiant va identifier et signaler les effets adverses éventuels qu'il aurait constatés.

L'effort physique se déroulera sur un tapis roulant et durera 8 à 10 minutes. Pendant les 4 premières minutes, l'effort sera d'intensité constante.

Une surveillance médicale est faite par un médecin pneumologue praticien d'exploration fonctionnelle de l'Unité d'Enseignement et de Recherche en Pneumo-Phtisiologie, Faculté des Sciences de la santé de Cotonou, afin de traiter des obstructions bronchiques spontanées qui pourraient éventuellement survenir chez certains sujets au cours du test.

Durant toute l'expérimentation, votre surveillance médicale est assurée par le l'infirmier de l'INJEPS et le médecin pneumologue praticien associé.

Les prélèvements et les analyses seront effectués par un personnel qualifié du laboratoire du Centre Hospitalier Départemental de l'Ouémé/Plateau (CHD-O/P) et habitué à de telles opérations. La mesure des paramètres ventilatoires sera réalisée par le même médecin pneumologue.

Votre refus de participer à l'étude, n'a aucun effet sur votre qualité d'étudiant. Vous êtes libre d'interrompre votre participation à l'étude quand vous le désirez.

Au terme de cette étude, les résultats obtenus vous seront communiqués dès que possible et leur utilisation conservera un caractère anonyme et confidentiel.

Cette étude vous permettra de connaître vos capacités respiratoires au cours de l'effort ainsi que votre prédisposition à l'asthme induit par effort (AIE). Par ailleurs, elle vous permettra de connaître l'efficacité de certaines plantes médicinales en matière de traitement de l'asthme.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT LIBRE ET ECLAIRE

Vous êtes invité à prendre part à une étude portant sur «EFFET DE L'EXTRAIT AQUEUX DU MELANGE *AFRAMOMUM MELEGUETA-CITRUS AURANTIFOLIA* SUR L'ASTHME INDUIT PAR L'EXERCICE CHEZ LES ETUDIANTS DE L'INJEPS ». L'objectif recherché par cette étude est d'évaluer l'efficacité du mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia* sur l'Asthme induit par l'Effort (AIE).

Les tests précliniques effectués sur les animaux de laboratoire en ce qui concerne la toxicité de ces extraits, leurs propriétés anti-inflammatoire, antitussive, anti spasmolytique ont donné de bons résultats et ont montré que ces extraits, selon la norme OMS (2002), sont sans innocuité et peuvent, par conséquent faire l'objet de tests cliniques.

Les mesures, les prélèvements et les analyses seront effectués avec des spécialistes. Votre qualité d'étudiant à participer ou non à l'étude, n'a aucun impact sur la relation étudiant-enseignant qui doit normalement prévaloir.

Seuls les sujets prédisposés à l'AIE, après le diagnostique seront traités au mélange *Aframomum melegueta-Citrus aurantifolia*.

Après avoir pris connaissance de la notice d'information, vous êtes libre de participer ou d'interrompre votre participation à l'étude quand vous le désirez.

Nous vous garantissons la ferme confidentialité des résultats.

Vous avez pris connaissance de ce qui précède et perçu l'importance de notre étude, vous êtes priés d'exprimer votre consentement en connaissance de cause quant à votre participation, en inscrivant la mention « lu et approuvé » sur les pointillés et en apposant votre signature.

.....
.....
.....
Date.....

Nom, Prénoms et signature.....

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

Institut National de la Jeunesse,
de l'Education Physique et du Sport
(INJEPS)



République du Bénin

FRATERNITE - JUSTICE TRAVAIL

Porto-Novo, le 04 - 01 - 2011

AVIS SCIENTIFIQUE DU COMITE SCIENTIFIQUE SECTORIEL
EN SCIENCES ET TECHNIQUES DES ACTIVITES PHYSIQUES ET SPORTIVES
SUR LE PROTOCOLE DE RECHERCHE DE MADAME AHOUNOU JUDITH.

Madame **AHOUNOU Judith** étudiante en troisième année prépare une thèse de Doctorat intitulée:

Traitement de l'Asthme Induit par l'Effort (AIE) par Les extraits aqueux de *Sterculia setigera* et du mélange *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia*.

Dans le cadre de la partie clinique de son travail portant sur l'évaluation de l'activité de ces extraits sur les sportifs, elle a présenté un protocole de recherche de l'étude, les résumés des résultats des tests de toxicologie, de pharmacologie et de biologie réalisés sur ces extraits ainsi que le formulaire de consentement libre et éclairé des sportifs pour participer à ce test.

Les tests précliniques effectués sur les animaux de laboratoire en ce qui concerne la toxicité de ces extraits, leurs propriétés anti-inflammatoire, antitussive, anti spasmolytique ont donné de bons résultats et ont montré que ces extraits, selon la norme OMS, sont sans innocuité et peuvent, par conséquent faire l'objet de tests cliniques.

La problématique est bien libellée et la justification est clairement effectuée. Les objectifs sont précis et bien définis. Les hypothèses à vérifier, afin d'atteindre les objectifs fixés, sont émises avec clarté et sans ambiguïté.

La méthodologie expérimentale à suivre pour la réalisation des tests cliniques respecte les normes en la matière avec de bons critères de sélection et d'échantillonnage.

Les mesures, les prélèvements et les analyses qui seront effectués avec des spécialistes d'une part et la nature de l'équipement à utiliser d'autre part, témoignent du prix et du sérieux qu'attache Madame AHOUNOU Judith à sa recherche.

De plus, la cible de la recherche est sans confusion. Car l'asthme est aujourd'hui un problème de santé publique. Les facteurs de risques sont nombreux et l'activité physique en est un.

L'asthme Induit par l'Effort constitue actuellement un problème très préoccupant et un facteur limitant de la performance sportive.

Par ailleurs, les références bibliographiques présentées permettent de conclure que Madame AHOUNOU Judith maîtrise le domaine dans lequel elle s'investit et que l'asthme en milieu sportif n'est pas seulement spécifique au climat froid et sec, il existe aussi en climat tropical.

La mise au point des Médicaments Traditionnels Améliorés efficaces permettra de soulager les athlètes concernés car l'accès aux médicaments modernes dans ce domaine devient de plus en plus difficile.

Cette recherche se révèle être très originale et pertinente et s'inscrit alors dans le cadre de la promotion et la valorisation de nos ressources naturelles d'origine végétale.

En conséquence, nous émettons un avis favorable pour que cette étude soit réalisée.

Le Secrétaire Permanent

du Comité Scientifique STAPS



Professeur AKPLOGAN Barnabé

REPUBLIQUE DU BENIN

MINISTERE DE LA SANTE

DIRECTION DE LA FORMATION ET DE LA RECHERCHE EN SANTE

COMITE NATIONAL PROVISoire D'ETHIQUE
DE LA RECHERCHE EN SANTE

N° d'enregistrement : IRB00006860

**AVIS ETHIQUE
FAVORABLE
N° 002 du 03 mars 2011**

LA PRESIDENTE

A

Madame AHOUNOU Judith

COTONOU

N° 084/MS/DC/SGM/DFRS/CNPERS/SA

Madame

Suite à votre requête au sujet du protocole de recherche intitulé « **Effet de l'extrait aqueux du mélange *afmomum melegueta-citrus aurantifolia* sur l'asthme induit par l'exercice chez les étudiants de l'INJEPS** », lors de sa session du jeudi 03 mars 2011 :

- en présence des membres ci après :
- 1) OGOUYEMI HOUNTO Aurore
 - 2) PADONOU Mousbaye
 - 3) AYEMONNA HOUNGAN Claire
 - 4) LIGALI Isiaka
 - 5) ZOMONTO Gbodja
 - 6) GANGBO Flore

le Comité National Provisoire d'Ethique de la Recherche en Santé (CNPERS) a :

- vérifié la complétude des documents qui lui ont été transmis ;
- examiné le protocole dont le but est d'évaluer l'effet préventif de l'AMCA sur la crise de l'AIE, l'hypothèse étant d'empêcher les malades d'AIE de faire de crise en cas d'épreuve d'effort.
- validé globalement les aspects scientifiques étudiés par les experts sollicités ;
- évalué les aspects éthiques centrés sur les bénéfices attendus pour la santé des sujets et la qualité des informations transmises en vue de l'obtention d'un consentement libre et éclairé,
- **émis son avis éthique favorable assorti des recommandations suivantes (voir encadré)**

RECOMMANDATIONS

LE CNPERS DEMANDE AU MEDECIN IMPLIQUE DANS LA RECHERCHE D'ASSUMER LES TACHES DECRITES DANS LES CONDITIONS CI-DESSOUS :

- ◆ **TACHES** : Le médecin est tenu de :
 - 1) **soumettre au CNPERS** tout événement indésirable grave
 - ayant un lien possible avec la médication à l'étude;
 - survenu dans le cadre de la recherche -ci et impliquant des participants recrutés.L'information doit être transmise, même si elle est incomplète,
 - 2) **soumettre au CNPERS** le registre/fiche devant permettre de collecter les informations sur les effets secondaires éventuels signalés par les participants, en y mentionnant en particulier :
 - la personne responsable de l'administration du produit aux étudiants ;
 - le moment de survenue ;
 - le nombre de fois que ce(s)t effet(s) a(ont) été signalé(s) ;
 - la conduite tenue,
- **clairement dire, si selon lui** :
 - il existe ou non un lien potentiel de l'événement indésirable grave avec le projet de recherche;
 - s'il s'avère ou non nécessaire de modifier le formulaire de consentement qui a été validé par le CNPERS;
 - s'il s'avère ou non nécessaire d'effectuer un suivi particulier auprès du sujet recruté.
- ◆ **DUREE ET RYTHME DES TACHES**
 - tous les mois et à la date du 15 de chaque mois
 - à partir de l'approbation de cette étude
 - pendant toute la durée de l'étude et trois mois après la fin signalée de l'étude
- ◆ **MODALITES DE TRANSMISSION DES TACHES**

Rapport écrit adressé à la Présidente du CNPERS sous pli fermé, dactylographié, police calibri, taille 14 points, interligne 1.

Cet avis éthique favorable conditionnelle est accordé sous réserve de l'autorisation administrative.

Cet avis éthique favorable conditionnelle est valable pour une durée d'un an à compter de sa date de signature.

Par ailleurs, le CNPERS vous demande de :

- 1) l'informer de toute nouvelle information/ modification, qui surviendraient à une date ultérieure à cette approbation-ci et qui impliqueraient des changements

2

Avis N°002 du 03 mars 2011

Comité National Provisoire de l'Éthique de la Recherche en Santé

site web : www.ethique-sante.org

téléphone : 21 00 60 00

courriel : contact@ethique-sante.org

dans le choix des sujets, dans la manière d'obtenir leur consentement, dans les risques encourus ou tout évènement indésirable survenant dans le cadre du déroulement de cette recherche. Le CNPERS doit, en effet, dans ces cas, ré-évaluer et donner une nouvelle approbation avant l'entrée en vigueur desdites modifications.

- 2) **utiliser les documents qu'il a validés ;**
- 3) **conserver dans vos dossiers**, la version originale des formulaires de consentement signés par le sujet et lui en remettre une copie ;
- 4) lui adresser un rapport **au terme de la validité de cet avis.**

Tout en vous souhaitant pleins succès pour la réalisation de votre recherche, le CNPERS vous remercie pour la confiance à lui, accordée.

Cotonou, le 28 juin 2011



La Présidente

Professeur agrégé Flore GANGBO

3

Avis N°002 du 03 mars 2011
Comité National Provisoire de l'Ethique de la Recherche en Santé
site web : www.ethique-sante.org téléphone : 21 00 60 00 courriel : contact@ethique-sante.org

ANNEXES 3

Tableau V: Toxicité larvaire des extraits : nombre de larves mortes

Extraits	Concentrations (mg / mL)									
	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781	0,39	0,195	0,097	0,048
<i>Aframomum melegueta</i> - <i>Citrus aurantifolia</i>	16	16	16	16	16	16	16	5	2	0
<i>Sterculia setigera</i>	16	16	16	16	12	12	9	2	1	0
Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau VI: Volume de l'œdème (mL)

TRAITEMENT	TEMPS (min)							
	0	30	60	120	180	240	300	360
AM+CA 1000 mg/kg	0,00 ± 0,00	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,45 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,25 ± 0,00	0,20 ± 0,00
AM+CA 1500 mg/kg	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,04	0,37 ± 0,00	0,28 ± 0,04	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,00
SS 1000 mg/kg	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,16	0,35 ± 0,20	0,44 ± 0,27	0,41 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,30 ± 0,00	0,05 ± 0,04
SS 1500 mg/kg	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,24 ± 0,11	0,01 ± 0,07	0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,07	0,05 ± 0,04
Indo 100 mg/kg	0,00 ± 0,00	0,35 ± 0,11	0,40 ± 0,07	0,46 ± 0,11	0,40 ± 0,07	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,04
Témoin (Eau physiologique)	0,00 ± 0,00	0,46 ± 0,18	0,51 ± 0,14	0,61 ± 0,14	0,50 ± 0,00	0,55 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,56 ± 0,11

AM+CA : Extrait du mélange de *Aframomum melegueta* + *Citrus aurantifolia*

SS : *Sterculia setigera*, Indo : Indométacine

Tableau VIII: Durée de séjour de la patte gauche des cochons d'inde dans eau à 50°C.

TRAITEMENTS	TEMPS (sec)
AM + CA 1000 mg/kg	27,20 ± 0,71
SS 1000 mg/kg	37,63 ± 10,72
ASPEGIC 50 mg/kg	29,29 ± 12,15
TEMOIN (Eau physiologique)	10,92 ± 1,43

AM+CA : Extrait du mélange de *Aframomum melegueta* + *Citrus aurantifolia*

SS : *Sterculia setigera*,

Tableau IX: Evolution de la température

TRAITEMEN T	Avant Induction	24 h après Inducti on	TEMPS (min)					
			60	120	180	240	300	360
AM + CA 1000 mg/kg	36,84 ± 0,23	37,70 ± 0,07	37,28 ± 0,26	37,03 ± 0,29	37,08 ± 0,26	37,04 ± 0,23	36,83 ± 0,29	36,84 ± 0,16
SS 1000 mg/kg	37,01 ± 0,20	37,37 ± 0,29	36,50 ± 0,07	36,17 ± 0,29	36,10 ± 0,00	35,96 ± 0,23	35,71 ± 0,20	35,82 ± 0,26
Aspégic50 mg/kg	36,52 ± 0,26	37,46 ± 0,16	37,00 ± 0,00	36,66 ± 0,10	36,44 ± 0,16	36,50 ± 0,00	36,56 ± 0,10	36,45 ± 0,03
TEMOIN(Eau physiologique)	36,21 ± 0,13	37,21 ± 0,13	37,20 ± 0,06	37,30 ± 0,03	37,15 ± 0,33	37,04 ± 0,10	36,80 ± 0,06	36,60 ± 0,06

AM+CA : Extrait du mélange de *Aframomum melegueta* + *Citrus aurantifolia*

SS : *Sterculia setigera*,

Tableau XI: Effet antitussif des extraits aqueux de *Sterculia setigera* Delile (Sterculiaceae) et du mélange *Aframomum melegueta* K. Schum. (Zingiberaceae)+ *Citrus aurantifolia* Swingle (Rutaceae)

Substance utilisée	Dose administrée (mg/kg, p.o)	Fréquence des contractions par minute	Taux d'inhibition
Témoin	-	50,92± 0,32*	-
Référence	100	18,71± 0,37*	63,2%
SS 1000	1000	50,95± 0,64*	0,1%
SS 1500	1500	50,08 ± 0,17*	1,6%
SS 2000	2000	45,55 ± 0,32*	10,5%
SS 2500	2500	41,75 ± 0,42*	25,2%
SS 3000	3000	38,08 ± 0,16*	8,8%
AM+CA: 1000	1000	50,53 ± 0,31*	0,8%
AM+CA: 1500	1500	47,60 ± 0,36*	6,5%
AM+CA: 2000	2000	43,17 ± 0,31*	15,2%
AM+CA: 2500	2500	40,87 ± 0,35*	19,7%
AM+CA: 3000	3000	31,53 ± 0,17*	38,1%
AM+CA: 3000	3000	51,47 ± 0,19*	1,1%

AM+CA : Extrait du mélange de *Aframomum melegueta*- *Citrus aurantifolia*

SS : *Sterculia setigera*,

Tableau XII: Valeurs de la concentration sanguine de CRP en fonction du temps et du traitement

TRAITEMENT	J₀	J₁₄	J₁₅	J₁₆	J₁₇
	CRP (mg/L)				
Témoin (N: 13)	3,33 ± 1,22	2,00 ± 0,87	3,33 ± 0,87	3,56 ± 0,73	3,89 ± 1,05
<i>A.melegueta</i> seul (N: 13)	2,78 ± 0,44	1,56* ± 0,53	2,89 ± 0,78	2,89 ± 0,78	2,99 ± 1,50
<i>Citrus aurantifolia</i> (N: 13)	3,22 ± 7,07	1,69* ± 0,66	2,93 ± 0,56	2,9 ± 0,17	3,00 ± 1,15
<i>A.melegueta-C. aurantifolia</i> (N: 13)	5,22 ± 7,07	1,56* ± 0,73	2,78* ± 0,97	2,78* ± 0,97	2,89* ± 1,05

TABLE DES MATIERES

DEDICACES ET REMERCIEMENTS	i
INTRODUCTION	1
GENERALITES	7
I- RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA RESPIRATION	8
I-1- LA MECANIQUE VENTILATOIRE	8
I-1-1-L'inspiration	9
I-1-2-L'expiration	9
I-2- LA REGULATION DE LA VENTILATION PULMONAIRE	11
I-3- L'EXPLORATION FONCTIONNELLE RESPIRATOIRE	12
I-3-1- Mesure des volumes pulmonaire	12
I-3-2- Mesure des débits pulmonaires	13
II- ASTHME ET BRONCHOSPASME INDUIT PAR EFFORT	13
II-1-DEFINITIONS	13
II-1-1- Asthme	13
II-1-2- Asthme induit par exercice	14
II-1-3- Bronchospasme induit par l'exercice	14
II-2- CAUSES	14
II-2-1- L'intensité de l'effort	14
II-2-2- Le nombre et la taille des bronches déshydratées	15
II-2-3- La durée de l'exercice	15
II-2-4- La respiration buccale	15
II-2-5- Les caractéristiques de l'air inspiré	15
II-3- HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE	15
II-4 - INFLAMMATION BRONCHIQUE	16
II-5- EPITHELIUM BRONCHIQUE	18
III- PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AIE	20
III-1- THEORIE DE LA PERTE D'EAU	20
III-2- THEORIE DU REFROIDISSEMENT ET DU RECHAUFFEMENT DES VOIES AERIENNES	22
III-2- 1-Ventilation d'allergènes	22
III-2- 2-Rappels sur l'innervation des voies aériennes	23
III-2- 2-1- <i>Le système parasympathique</i>	24
III-2- 2-2- <i>Le système sympathique</i>	25
III-2- 2-3- <i>Le système non adrénérgique non cholinérgique</i>	26
IV- STRUCTURE DES MUSCLES LISSES DES VOIES RESPIRATOIRES	28
IV-1- COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DES MUSCLES LISSES DES VOIES RESPIRATOIRES	29
IV-2- LES RECEPTEURS MUSCARINIQUES COUPLES AUX PROTEINES G	29
V- EVALUATION DU AIE	31

VI- PRISE EN CHARGE PHARMACOLOGIQUE DE L'AIE	31
VII- QUELQUES SUBSTANCES D'ORIGINE NATURELLE DANS LA PRISE EN CHARGE DE L'ASTHME	32
VII- 1- LES ALCALOÏDES	32
VII-2- LES TANINS	33
VII-3- LES FLAVONOÏDES	34
VII-4- LES MUCILAGES	35
VII-5- LES HUILES ESSENTIELLES	35
VIII- PLANTES DE L'ETUDE	36
VIII-1- <i>AFRAMOMUM MELEGUETA</i> (ROSCOE) (K. SCHUM)	36
VIII-1-1- Aspects botaniques	36
VIII-1-2- Répartition géographique	37
VIII-1-3-Forme d'utilisation en thérapeutique traditionnelle: aspect pharmacochimique	37
VIII-2- <i>CITRUS AURANTIFOLIA</i> (CHRISTM. ET PANZER) SWINGLE	39
VIII-2-1- Aspects botaniques	39
VIII-2-2- Répartition géographique	40
VIII-2-3-Forme d'utilisation en thérapeutique traditionnelle: aspect pharmacochimique	40
VIII-3- <i>STERCULIA SETIGERA</i> DELILE	43
VIII-3-1- Aspects botaniques	43
VIII-3-2- Répartition géographique	43
VIII-3-3-Forme d'utilisation en thérapeutique traditionnelle: aspect pharmacochimique	43
IX- DONNEES SUR LA TOXICITE	44
IX-1- CONCEPTS DE LA TOXICOLOGIE	44
IX-1-1 Notion de la toxicologie	44
IX-1-2- Notion de poison ou toxique	44
IX-1-3- Classification des effets toxiques	44
IX-2- LA TOXICITE AIGUE D'UNE DROGUE	45
IX-3- LA TOXICITE PAR ADMINISTRATION REITEREE: TOXICITE SUBAIGUË, SUB-CHRONIQUE ET TOXICITE CHRONIQUE	45
IX-4- TEST DE CYTOTOXICITE	46
MATERIELS ET METHODES	49

I- CADRE DE L'ETUDE	48
II- MATERIEL ET METHODES D'ETUDE	48
II-1- MATERIEL DE L'ETUDE PRECLINIQUE	48
II-1-1- Matériel végétal	48
II-1-2-Matériel d'étude phytochimique	49
II-1-2-1- Matériel d'extraction et de caractérisation	
II-1-3- Matériel d'extraction et d'analyse des huiles essentielles	49
II-1-4 - Matériel d'étude de la toxicité	49
II-1-5- Matériel d'étude des propriétés broncho relaxantes	50
II-1-6 - Matériel d'étude des propriétés anti-inflammatoires	50
II-1-7- Matériel d'étude des propriétés antitussives	52
II-2- MATERIEL DE L'ETUDE CLINIQUE	53
II-3- METHODES DE L'ETUDE PRECLINIQUE	55
II-3-1- La préparation des extraits aqueux	55
II-3-2- Screening phytochimique	55
II-3-3- Extraction des huiles essentielles	56
II-3-5-Etude de la toxicité générale aiguë	57
II-3-6-Etude de la cytotoxicité	61
II-3-7- Etudes des propriétés broncho relaxantes	63
II-3-8- Etudes des propriétés anti-inflammatoires	65
II-3-9- ETUDES DES PROPRIETES ANTITUSSIVES	68
II-4- METHODES DE L'ETUDE CLINIQUE	70
II-4-3- Sujets de l'étude	70
II-4-4- Variables étudiées	71
II-4-5- Protocole expérimental	73

II-4-6- CONSIDERATIONS ETHIQUES	77
II-4-7- TRAITEMENT STATISTIQUE	77
RESULTATS	78
1-PARTIE PRECLINIQUE	79
II-1-ANALYSES PHYTOCHIMIQUES	79
I-2-ETUDE DE LA TOXICITE	84
I-2-3- Analyse de la cytotoxicité des différents extraits aqueux	91
I-3-ACTIVITE BRONCHORELAXANTE	95
I-4- ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE	99
I-5- ACTIVITE ANTITUSSIVE	102
II- PARTIE CLINIQUE	104
II-1- CARACTERISTIQUES ANTHROPOMETRIQUES DES SUJETS	104
II-2- PARAMETRES VENTILATOIRES	104
II-3- VARIATION DE LA CONCENTRATION SANGUINE DE CRP	107
DISCUSSION	109
I- ACTIVITES BIOLOGIQUES DES EXTRAITS DE <i>STERCULIA SETIGERA</i> ET DU MELANGE <i>AFRAMOMUM MELEGUETA-CITRUS AURANTIFOLIA</i> .	110
II-EFFET DE L'EXTRAIT AQUEUX DU MELANGE <i>AFRAMOMUM</i> <i>MELEGUETA-CITRUS AURANTIFOLIA</i> SUR LE BRONCHOSPASME INDUIT PAR L'EXERCICE CHEZ LES ETUDIANTS DE L'INJEPS (BIE)	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	123
REFERENCES	127
ANNEXES	147
TABLE DES MATIERES	174

RESUME

Sterculia setigera, *Aframomum melegueta* et *Citrus aurantifolia* sont des plantes couramment utilisées dans la médecine traditionnelle africaine dans le traitement de plusieurs affections, dont la toux et l'asthme.

L'objectif du présent travail est d'évaluer la toxicité des extraits aqueux de ces plantes et leurs effets sur l'asthme et ses symptômes.

L'analyse phytochimique des extraits de ces plantes révèle la présence des alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, anthocyanes, leuco-anthocyanes, mucilages, composés réducteurs et des huiles essentielles. La détermination de la dose létale 50% par voie intra-péritonéale des extraits permet de classer l'extrait aqueux du mélange *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* comme faiblement toxique et celui de *Sterculia setigera* comme moyennement toxique. En administration orale, les deux extraits sont pratiquement sans toxicité. Par ailleurs, ces deux extraits ont des propriétés anti-inflammatoires, antitussives et broncho relaxantes à des doses variées.

En application clinique sur le bronchospasme Induit à l'Effort (BIE) chez des sportifs, le mélange aqueux *Aframomum melegueta*-*Citrus aurantifolia* a amélioré le pourcentage de diminution du Volume Expiratoire Maximum par Seconde (VEMS) et a fait baisser la concentration de la C-reactive protein (CRP) chez tous les sujets de façon significative.

Ce mélange peut donc être conseillé dans le traitement de l'asthme d'effort.

Mots clés :

Aframomum melegueta-*Citrus aurantifolia*, *Sterculia setigera*, extrait, symptômes asthmatiques, toxicité.

ABSTRACT

Sterculia setigera, *Aframomum melegueta* and *Citrus aurantifolia* are commonly used medicinal plants against various affections including cough and asthma in African traditional medicine.

The present work was undertaken with the ultimate objective to evaluate the effect of aqueous extracts of these plants on asthma and asthma related symptoms, as well as the toxicity profile of the extracts.

The phytochemical analysis revealed the presence of alkaloids, tanins, flavonoids, anthocyanins, leuco-anthocyanins, mucilages, reducing compounds and essential oils. The determination of lethal dose 50% in intra-peritoneal classified the *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* aqueous extract mixture as slightly toxic and that of *Sterculia setigera* as fairly toxic. However, the two extracts are practically with no toxicity in oral administration. These extracts have been found to have anti-inflammatory, antitussives and spasmolytic properties at various doses.

In clinical application on exercise (BIE) induced bronchospasm, the *Aframomum melegueta* - *Citrus aurantifolia* aqueous extract mixture improved the reduction percentage of Maximum Expiratory Volume per second (MEVS) and significantly decreased the concentration of C-reactive protein (CRP).

This mixture can be used in the treatment of asthma induced by physical exercise.

Key words:

Aframomum melegueta-*Citrus aurantifolia*, *Sterculia setigera*, symptoms of asthma, toxicity.