



**HAL**  
open science

**Toxicité subchronique chez le rat de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. DON)  
T. Durand & Schinz, une plante utilisée dans le  
traitement traditionnel du diabète en Côte d'Ivoire**

Dago Désiré Koudou

► **To cite this version:**

Dago Désiré Koudou. Toxicité subchronique chez le rat de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. DON) T. Durand & Schinz, une plante utilisée dans le traitement traditionnel du diabète en Côte d'Ivoire. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Université Nangui Abrogoua (Côte d'Ivoire); NUMERO D'ORDRE 493, 2019. Français. NNT: . tel-02703666

**HAL Id: tel-02703666**

**<https://riip.hal.science/tel-02703666>**

Submitted on 1 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année Universitaire

2018-2019

RÉPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

*Union-Discipline-Travail*

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche Scientifique



UFR Sciences de la Nature

Laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée

## THÈSE

Pour l'obtention du titre de docteur en Sciences Biologiques de  
l'Université Nangui Abrogoua

Spécialité: Biologie-Santé

Option: Physiologie-Pharmacologie/Toxicologie

Numéro d'ordre

493

## THÈME:

**TOXICITE SUBCHRONIQUE CHEZ LE RAT DE L'EXTRAIT  
D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE *Holarrhena floribunda* (G.  
DON) T. DURAND & SCHINZ, UNE PLANTE UTILISEE DANS LE  
TRAITEMENT TRADITIONNEL DU DIABETE EN CÔTE D'IVOIRE**

Présentée par

**KOUDOU Dago Désiré**

Soutenue publiquement, le mardi 30 avril 2019, devant le Jury composé de :

M. YAO Kouakou, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, **Président**

M. YAPO Angoué Paul, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, **Co-Directeur**

M. DJAMAN A. Joseph, Professeur Titulaire, Université Félix Houphouët Boigny, **Co-Directeur**

M. KONE Mamidou Witabouna, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, **Rapporteur**

M. KOUAKOU Kouakou L., Maître de Conférences, Université Nangui Abrogoua, **Examineur**

M. KRA Adou Koffi M., Maître de Conférences, Université Félix Houphouët Boigny, **Examineur**

Année Universitaire  
2018-2019

RÉPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

*Union-Discipline-Travail*

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique



UFR Sciences de la Nature

Laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée

## THÈSE

Pour l'obtention du titre de docteur en Sciences Biologiques de  
l'Université Nangui Abrogoua

Spécialité : Biologie-Santé

Option : Physiologie-Pharmacologie/Toxicologie

Numéro d'ordre  
493

## THÈME :

**TOXICITE SUBCHRONIQUE CHEZ LE RAT DE L'EXTRAIT  
D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE *Holarrhena floribunda* (G.  
DON) T. DURAND & SCHINZ, UNE PLANTE UTILISEE DANS LE  
TRAITEMENT TRADITIONNEL DU DIABETE EN CÔTE D'IVOIRE**

Présentée par

**KOUDOU Dago Désiré**

Soutenue publiquement, le mardi 30 avril 2019, devant le Jury composé de :

M. YAO Kouakou, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, **Président**

M. YAPO Angoué Paul, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, **Co-Directeur**

M. DJAMAN A. Joseph, Professeur Titulaire, Université Félix Houphouët Boigny, **Co-Directeur**

M. KONE Mamidou Witabouna, Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, **Rapporteur**

M. KOUAKOU Kouakou L., Maître de Conférences, Université Nangui Abrogoua, **Examineur**

M. KRA Adou Koffi M., Maître de Conférences, Université Félix Houphouët Boigny, **Examineur**

# **DEDICACES**

# IN MEMORIUM

Mon père Feu **FREDERIC KOUDOU OBOUTO**

J'aurais tant souhaité que tu sois parmi nous mais le destin en a décidé autrement. Que ton âme repose en paix.

Je dédie ce travail

A ma mère **Léontine GNAHOUA**, qui m'a soutenu durant tout mon parcours scolaire et universitaire. Reçois chère maman toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

A ma tendre et chère Epouse **Nadège GBEULY** pour son soutien, son encouragement, sa patience et son implication personnelle dans la réalisation de ce travail. Puisse cette thèse te combler de joie et d'espoir.

A tous ceux qui m'aiment et désirent mon bonheur

# **REMERCIEMENTS**

Ce travail, réalisé conjointement au Laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'UFR Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua et au Département de Biochimie clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire a été possible grâce aux concours de plusieurs personnes à qui je voudrais adresser mes sincères remerciements.

**A Monsieur YAPO Angoué Paul,**

*Professeur Titulaire de Physiologie et Physiopathologie à l'UFR Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua.*

*Directeur du Laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'UFR Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua, Co-Directeur de Thèse.*

Je vous adresse mes sincères remerciements pour la formation rigoureuse que vous m'avez donné depuis la licence jusqu'à ce jour. Vous m'avez accepté dans votre Laboratoire et m'avez fait l'honneur de co-diriger cette thèse. J'ai patiemment été guidé par vos encouragements, vos orientations et bénéficié de votre constante disponibilité et de votre expérience inestimable. En témoignage de ma profonde gratitude, veuillez trouver ici Monsieur le Professeur l'expression de mes sincères remerciements.

**A Monsieur DJAMAN Allico Joseph,**

*Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie à l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët Boigny.*

*Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan, Chef du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Co-Directeur de Thèse.*

Vous m'avez initié à la recherche et avez accepté d'encadrer l'orientation et la réalisation de ce travail. Vous n'avez managé aucun effort malgré vos multiples occupations pour suivre et contribuer étroitement à l'élaboration définitive de cette thèse. En témoignage de ma profonde reconnaissance, trouvez ici Monsieur le Professeur, l'expression de ma déférente gratitude.

**A Monsieur YAO Kouakou,**

*Professeur Titulaire d'hydrobiologie et aquaculture à l'UFR Sciences de la Nature  
de l'Université Nangui Abrogoua.*

*Directeur du Laboratoire de Biologie et Cytologie Animales de l'UFR Sciences de la Nature  
de l'Université Nangui Abrogoua, Président du jury.*

Je suis très reconnaissant pour l'honneur que vous me faite en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Veuillez recevoir Professeur, mes respectueux hommages.

**A Monsieur KONE Mamidou witabouna,**

*Professeur Titulaire de Biologie Végétale Phytochimie à l'UFR Sciences de la Nature  
de l'Université Nangui Abrogoua, Rapporteur.*

Je suis très honoré pour votre présence dans ce jury de thèse. Vos remarques pertinentes et votre disponibilité ont été un atout majeur dans l'amélioration de ce travail. Veuillez recevoir Professeur, mon infinie reconnaissance.

**A Monsieur KOUAKOU Kouakou Léandre,**

*Maître de Conférences de Physiologie Animale-Pharmacologie à l'UFR Sciences de la Nature  
de l'Université Nangui Abrogoua, Examineur.*

Je voudrais vous dire sincèrement merci pour avoir accepté d'évaluer et juger ce travail. Vos conseils et vos encouragements m'ont été très utiles dans sa réalisation. Veuillez trouver ici, l'expression de mon infinie reconnaissance et de mon profond respect.

**A Monsieur KRA Adou Koffi Mathieu,**

*Maître de Conférences de Biochimie-Microbiologie à l'UFR Biosciences de l'Université Félix  
Houphouët Boigny, Membre du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique Examineur.*

Je vous remercie vivement pour votre participation à ce jury de thèse. Vous avez accepté de consacrer une partie de votre temps à l'amélioration de la qualité de ce travail en tant qu'Examineur. J'en suis très honoré et soyez infiniment remercié.

**A Monsieur D'HORPOCK Ahoua François,**

*Maître de conférences Agrégé de l'Université Félix Houphouët Boigny, Directeur du Service d'Anatomie pathologie du CHU de Treichville.*

Vous avez accepté qu'une partie de ce travail se déroule dans votre laboratoire, Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

**A Madame GAUZE Touao Kah Martine,**

*Chargée de recherche à l'UFR SGE de l'Université Nangui Abrogoua, Directrice du Centre de Recherche en Ecologie (CRE).*

Je vous exprime ma plus sincère reconnaissance pour m'avoir accepté au CRE, où j'ai pu avoir accès à tout le matériel et à la documentation nécessaire et utile pour conduire ce travail.

**A Monsieur KAMAGATE Adama,**

*Maîtres de Conférences de Physiologie : Nutrition/Endocrinologie, Membre du laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'UFR Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua.*

Je vous adresse mes sincères remerciements pour votre disponibilité et pour vos conseils.

**A Monsieur BLEYERE Nahounou Mathieu,**

*Maîtres de Conférences de Physiologie Animale-Physiopathologie/Physiologie de la Nutrition-Hématologie, Membre du laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'UFR Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua.*

Je voudrais vous exprimer toute ma gratitude et mes sincères remerciements pour vos conseils et encouragements.

**Madame KONE Mama,**

*Maîtres de Conférences de Physiologie-Pharmacologie, Membre du laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'UFR Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua.*

Je vous adresse mes sincères remerciements pour vos conseils et encouragements qui m'ont véritablement aidé dans l'élaboration de ce travail.

**A Monsieur KOUYATE Mohamed**

*Maître-Assistant à l'Université Félix Houphouët Boigny, Médecin pathologiste, du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Treichville.*

Votre apport a été remarquable dans l'étude histologique de ce travail. Je vous en remercie infiniment.

**A Mesieurs GNAGORAN Boua Narcisse, N'DIA Kouadio Frédéric, KAMAGATE Soualio, GOZE Nomane Bernard, OUSSOU N'guessan Jean Baptiste,**

*Maître-Assistants, Assistants, Membres du laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'UFR Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua.*

Je vous remercie pour vos conseils et encouragements.

**A Monsieur TRA-BI Irié Otis,**

*Maître-Assistant à la section SVT de l'Ecole Normale Supérieure de Côte d'Ivoire.*

Je vous remercie pour votre grande disponibilité, et surtout pour votre participation active dans la réalisation de ce travail. Merci Docteur pour l'amitié, les conseils, les critiques et les suggestions apportés à ce travail. Voici le fruit de votre labeur.

**A Monsieur M'Boh gervais**

*Maître de recherche en biochimie, membre du département Formation de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.*

Je vous remercie pour votre participation active dans la réalisation de ce travail.

**A tous les chercheurs et techniciens** du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Treichville, du Département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et du Centre de Recherche en Ecologie de Treichville.

Je vous remercie vivement, pour votre franche collaboration et la sympathie dont vous m'avez fait bénéficier durant tout le temps passé avec vous.

**A tous les doctorants** du Laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'Université Nangui Abrogoua : **N'DRI N'guessan Mathieu, N'CHO Patrick Roland, MONNAN Ghislain Victor, KOUAME Djè Kouamé Wencesla, YEBOUA Adjoua Florene et EHILE Ehilé Hervé.**

Je vous remercie pour le soutien que vous m'avez apporté durant la réalisation de ce travail.

**Aux collègues enseignants** des Lycées Municipaux d'Attécoubé et de Rubino.

Je vous remercie pour vos encouragements et votre soutien.

**Aux amis KRA Kouakou Dappah**, enseignant des SVT au Lycée Municipal d'Azaguié et doctorant au Laboratoire de physiologie végétale et **OLUWOLE Josiah** enseignant des Sciences Physiques et Chimie au lycée Municipal de Rubino.

Je vous exprime mes sincères remerciements pour votre bonté et solidarité légendaire.

# **AVANT PROPOS**

Ce travail qui a pour thème : « Toxicité subchronique chez le rat de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand et Schinz, une plante utilisée dans le traitement du diabète en Côte d'Ivoire » a été effectué au Laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) des Sciences de la Nature de l'Université Nangui Abrogoua et à l'Unité de Biochimie clinique de l'Institut Pasteur de Cocody.

Il a été réalisé sous la direction Scientifique de Monsieur YAPO Angoué Paul, Professeur Titulaire de Physiologie et Physiopathologie, et de Monsieur DJAMAN Allico Joseph, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie.

Les plantes utilisées par les populations pour le traitement de certaines pathologies provoquent bien souvent des effets nocifs ou accidents allant jusqu'à la mort. Les causes de ces accidents sont souvent liées à l'absence de données scientifiques fiables relatives aux activités, aux doses exactes et aux effets secondaires liés à l'usage de ces plantes. Cette étude s'inscrit donc dans le cadre de la vérification de l'innocuité de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* afin d'en garantir la biosécurité.

## TABLE DES MATIERES

		Page
	<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>I-</b>	<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	5
1-	<b>Définitions</b> .....	6
1-1-	Biotolérance .....	6
1-2-	Innocuité .....	6
1-3-	Toxicité .....	6
1-3-1-	Toxicité aiguë .....	6
1-3-2-	Toxicité subaiguë .....	7
1-3-3-	Toxicité chronique .....	7
1-4-	Médicaments traditionnels .....	7
1-4-1-	Intérêt de la recherche sur les médicaments traditionnels .....	7
1-4-2-	Limites et risques de l'utilisation des médicaments traditionnels .....	8
<b>2-</b>	<b>Présentation de <i>Holarrhena floribunda</i> (G. Don) T. Durand &amp; Schinz</b>	
	<b>(Apocynaceae)</b> .....	8
2-1-	Systématique .....	8
2-2-	Synonymes et noms vernaculaires .....	8
2-3-	Aire de distribution .....	9
2-4-	Description botanique .....	9
2-5-	Usage traditionnel .....	10
2-5-1-	Usage médicinal .....	10
2-5-1-1-	Racines .....	10
2-5-1-2-	Tiges .....	10
2-5-1-3-	Feuilles .....	12
2-5-2	Autres usages traditionnels non médicaux .....	12
2-6-	Phytochimie .....	12
2-6-1-	Alcaloïdes .....	12
2-6-1-1-	Alcaloïdes des écorces et des graines .....	14
2-6-1-2-	Alcaloïdes des Feuilles .....	14
2-6-2-	Composés phénoliques .....	16

2-6-3-	Terpènes.....	16
2-7-	Etudes pharmacologiques et toxicologiques .....	16
2-7-1-	Activité antibactérienne.....	16
2-7-2-	Activité antipaludique et trypanocide.....	17
2-7-3-	Activités antioxydantes, anticancer, antimutagènes et inhibitrices de la peroxydation lipidique.....	17
2-7-4-	Activité hypoglycémique.....	17
2-7-5	Activité analgésique.....	17
2-7-6-	Toxicité.....	18
3-	<b>Organes cibles</b> .....	18
3-1-	Foie.....	18
3-1-1-	Anatomie du foie.....	18
3-1-2-	Fonctions du foie.....	18
3-1-2-1-	Métabolisme des glucides.....	20
3-1-2-2-	Métabolisme des protéines.....	20
3-1-2-3-	Métabolisme des lipides.....	20
3-1-2-4-	Métabolisme des xénobiotiques et vulnérabilité hépatique.....	21
3-1-3-	Hépatotoxicité liée à la phytothérapie.....	21
3-1-3-1-	Définition.....	21
3-1-3-2-	Dommmages induits au foie par les métabolites des plantes.....	21
3-1-3-3-	Plantes Hépatotoxiques connues.....	21
3-1-3-3-1-	Plantes hépatotoxiques contenant des alcaloïdes.....	23
3-1-3-3-2-	Plantes hépatotoxiques contenant des terpènes.....	24
3-1-3-3-3-	Plantes hépatotoxiques contenant des polyphénols.....	25
3-2-	Reins.....	25
3-2-1-	Anatomie du rein.....	25
3-2-2-	Fonctions du rein.....	25
3-2-2-1-	Filtration glomérulaire.....	27
3-2-2-2-	Réabsorption et sécrétion tubulaire.....	27
3-2-2-3-	Excrétion tubulaire.....	27
3-2-2-4-	Métabolisme des xénobiotiques et vulnérabilité rénale.....	27
3-2-3-	Néphrotoxicité liée à la phytothérapie.....	28
3-2-3-1-	Définition.....	28

3-2-3-2-	Dommmages induits aux reins par les métabolites des plantes.....	28
3-2-3-3-	Plantes médicinales néphrotoxiques connues.....	29
3-3-	<b>Cœur</b> .....	31
3-3-1-	Anatomie du cœur.....	31
3-3-2-	Fonctions du cœur .....	31
3-3-2-1-	Phénomènes électriques de l'activité cardiaque.....	31
3-3-2-2-	Phénomènes mécaniques de l'activité cardiaque.....	33
3-3-3-	Cardiotoxicité liée à la phytothérapie.....	34
3-3-3-1-	Plantes médicinales cardiotoxiques contenant les glycosides cardiaques.....	34
3-3-3-2-	Plantes médicinales cardiotoxiques contenant des alcaloïdes.....	35
4-	<b>Marqueurs biochimiques de la biotolérance</b> .....	36
4-1-	Métabolites .....	37
4-1-1-	Acide urique.....	37
4-1-2-	Albumine.....	37
4-1-3-	Bilirubines.....	37
4-1-4-	Créatinine.....	39
4-1-5-	Glucose.....	40
4-2-	Lipides sériques.....	40
4-2-1-	Triglycérides.....	40
4-2-2-	Cholestérol.....	41
4-3-	Enzymes.....	41
4-3-1-	Transaminases.....	42
4-3-2-	Créatine phosphokinase.....	42
4-3-3-	Lactate déshydrogénase.....	43
4-3-4-	Phosphatases alcalines.....	43
4-4-	Electrolytes.....	43
4-4-1-	Calcium .....	44
4-4-2-	Chlore .....	44
4-4-3-	Potassium .....	44
4-4-4-	Sodium .....	45
II-	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	46
1-	<b>MATERIEL</b> .....	47
1-1-	Matériel végétal.....	47

1-2	Matériel animal.....	47
1-3-	Matériel de laboratoire.....	47
1-3-1-	Appareillage.....	47
1-3-2-	Accessoires de laboratoire.....	47
2-	<b>METHODES</b> .....	48
2-1-	<b>Préparation de l'extrait de plante</b> .....	48
2-1-1-	Récolte, séchage et préparation de la poudre des feuilles de <i>Holarrhena floribunda</i> ...	48
2-1-2-	Préparation de l'extrait d'acétate d'éthyle.....	48
2-2-	<b>Etude de toxicité subchronique</b> .....	48
2-2-1-	Conditionnement des rats .....	50
2-2-2-	Expérimentation .....	50
2-2-3-	<b>Etude biochimique</b> .....	51
2-2-3-1-	Prélèvements sanguins.....	51
2-2-3-2-	<b>Marqueurs spécifiques du foie</b> .....	51
2-2-3-2-1-	Bilirubine directe.....	51
2-2-3-2-2-	Bilirubine totale.....	52
2-2-3-2-3-	Alanine aminotransférase.....	52
2-2-3-2-4-	Aspartate aminotransférase.....	53
2-2-3-2-5-	Phosphatase alcaline.....	54
2-2-3-3-	<b>Marqueurs spécifiques des reins</b> .....	55
2-2-3-3-1-	Acide urique.....	55
2-2-3-3-2-	Créatinine .....	56
2-2-3-4-	<b>Marqueurs du cœur</b> .....	57
2-2-3-4-1-	Triglycérides.....	57
2-2-3-4-2-	Cholestérol total.....	58
2-2-3-4-3-	Cholestérol HDL.....	59
2-2-3-4-4	Cholestérol LDL.....	60
2-2-3-4-5-	Index d'arthérogénicité plasmatique.....	60
2-2-3-4-6-	Créatine phosphokinase.....	60
2-2-3-5-	<b>Marqueurs biochimiques sériques non spécifiques</b> .....	62
2-2-3-5-1-	Albumine .....	62
2-2-3-5-2-	Glucose.....	62
2-2-3-5-3-	Lactate déshydrogénase.....	63

2-2-3-5-4-	Calcium .....	64
2-2-3-5-5-	Sodium, potassium et chlore.....	65
2-2-4-	<b>Etude histologique</b> .....	66
2-2-4-1-	Masses relatives.....	66
2-2-4-2-	Prélèvement des pièces tissulaires et réalisation de coupes d'organes.....	66
2-3-	<b>Analyse statistique</b> .....	67
	<b>RESULTATS</b> .....	68
	<b>CHAPITRE I : EFFETS DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE <i>H. floribunda</i> SUR LE FOIE DES RATS</b> .....	69
1-	<b>Etude biochimique sur le foie des rats</b> .....	69
1-1-	<b>Taux sériques des métabolites</b> .....	69
1-1-1-	Effets chez les rats mâles.....	69
1-1-1-1	Taux sériques de l'albumine.....	69
1-1-1-2-	Taux sériques des bilirubines.....	69
1-1-1-3-	Taux sériques du glucose.....	69
1-1-2-	Effets chez les rates.....	71
1-1-2-1-	Taux sériques de l'albumine.....	71
1-1-2-2-	Taux sériques des bilirubines.....	71
1-1-2-3-	Taux sériques du glucose.....	71
1-2-	<b>Activités enzymatiques sériques</b> .....	73
1-2-1-	Effets chez les rats mâles.....	73
1-2-1-1	Activités sériques des alanines aminotransférases.....	73
1-2-1-2-	Activités sériques des aspartates aminotransférases.....	73
1-2-1-3-	Activités sériques des phosphatases alcalines.....	73
1-2-2-	Effets chez les rates.....	75
1-2-2-1	Activités sériques des alanines aminotransférases.....	75
1-2-2-2	Activités sériques des aspartates aminotransférases.....	75
1-2-2-3-	Activités sériques des phosphatases alcalines.....	75
2	<b>Etude histologique sur le foie des rats</b> .....	77
2-1-	Masses relatives du foie des rats mâles et des rates.....	77
2-2-	Description des coupes de foie des rats mâles.....	77
2-3-	Description des coupes de foie des rates.....	77

	<b>CHAPITRE II: EFFET DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE <i>H. floribunda</i> SUR LES REINS DES RATS.....</b>	<b>81</b>
1-	<b>Etude biochimique sur les reins des rats.....</b>	<b>81</b>
1-1-	<b>Taux sériques des métabolites</b>	<b>81</b>
1-1-1-	<b>Effets chez les rats mâles.....</b>	<b>81</b>
1-1-1-1-	Taux sériques de l'acide urique .....	81
1-1-1-2-	Taux sériques de la créatinine.....	81
1-1-2	<b>Effets chez les rates.....</b>	<b>81</b>
1-1-2-1-	Taux sérique de l'acide urique .....	81
1-1-2-2-	Taux sérique de la créatinine.....	84
1-2-	<b>Taux sériques des électrolytes.....</b>	<b>84</b>
1-2-1-	<b>Effets chez les rats mâles.....</b>	<b>84</b>
1-2-1-1-	Taux sériques du calcium .....	84
1-2-1-2-	Taux sériques du chlore.....	84
1-2-1-3-	Taux sériques du potassium.....	86
1-2-1-4-	Taux sériques du sodium.....	86
1-2-2	<b>Effets chez les rates.....</b>	<b>86</b>
1-2-2-1-	Taux sériques du calcium .....	86
1-2-2-2-	Taux sériques du chlore.....	88
1-2-2-3-	Taux sériques du potassium.....	88
1-2-2-4-	Taux sériques du sodium.....	88
2-	<b>Etude histologique sur les reins de rats.....</b>	<b>88</b>
2-1-	Masse relative de reins des rats mâles et des rates.....	88
2-2-	Description des coupes de reins des rats mâles et des rates.....	88
	<b>CHAPITRE III : EFFET DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE <i>H. floribunda</i> SUR LE COEUR DES RATS.....</b>	<b>93</b>
1-	<b>Etude biochimique sur le coeur des rats.....</b>	<b>93</b>
1-1-	<b>Taux sériques des lipides.....</b>	<b>93</b>
1-1-1	<b>Effets chez les rats mâles.....</b>	<b>93</b>
1-1-1-1-	Taux sériques des triglycérides.....	93
1-1-1-2-	Taux sériques du cholestérol total.....	93
1-1-1-3-	Taux sériques du cholestérol HDL.....	93
1-1-1-4-	Taux sériques du cholestérol LDL.....	95

1-1-1-5-	Index d'athérogenicité plasmatique (IAP).....	95
<b>1-1-2</b>	<b>Effets chez les rates</b> .....	95
1-1-2-1-	Taux sériques des triglycérides.....	95
1-1-2-2-	Taux sériques du cholestérol total.....	95
1-1-2-3	Taux sériques du cholestérol HDL.....	97
1-1-2-4-	Taux sériques du cholestérol LDL.....	97
1-1-2-5-	Index d'athérogenicité plasmatique (IAP).....	97
1-2-	<b>Activités enzymatiques sériques</b> .....	97
1-2-1-	<b>Effets chez les rats mâles</b> .....	97
1-2-1-1-	Activités sériques des créatines phosphokinases.....	99
1-2-1-2-	Activités sériques des lactates déshydrogénases.....	99
1-2-2-	<b>Effets chez les rates</b> .....	99
1-2-2-1-	Activités sériques des créatines phosphokinases.....	99
1-2-2-2-	Activités sériques des lactates déshydrogénases.....	99
2-	<b>Etude histologique sur le cœur des rats</b> .....	101
2-1-	Masse relative de cœur des rats mâles et des rates.....	101
2-2-	Description des coupes de cœur des rats mâles .....	101
2-3-	Description des coupes de cœur des rates.....	101
IV-	<b>DISCUSSION</b> .....	105
V-	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	113
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	115
	<b>ANNEXES</b>	
	<b>PUBLICATIONS</b>	
	<b>RESUME</b>	

## LISTE DES SIGLES D'ABREVIATIONS

<b>Ac</b>	Anticorps
<b>ADP</b>	Adénosine dinucléotide phosphate
<b>AE</b>	Activité enzymatique
<b>Ag :</b>	Antigènes
<b>ALAT :</b>	Alanine Aminotransférase
<b>ARN :</b>	Acide désoxyribose nucléique
<b>ASAT :</b>	Aspartate aminotransférase
<b>ATP :</b>	Adénosine Triphosphate
<b>Cm :</b>	Centimètre
<b>CNF :</b>	Centre National de floristique
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dioxyde de carbone
<b>CoA :</b>	Acétylcoenzyme A
<b>CPK</b>	Créatine phosphokinase
<b>CSP :</b>	Cholangite sclérosante primitive
<b>DL<sub>50</sub> :</b>	Dose Létale 50%
<b>DPD :</b>	Dichlorophényl diazonium
<b>g/jr</b>	Gramme /Jour
<b>G/L :</b>	Gramme /litre
<b>G6P-DH :</b>	Glucose 6 phosphate déshydrogénase
<b><i>H. floribunda</i> :</b>	<i>Holarrhena floribunda</i>
<b>HE:</b>	Hématéine-Eosine
<b>HES:</b>	Hématéine-Eosine-Safran
<b>HIS</b>	Hybridation <i>in situ</i>
<b>IAP</b>	Index d'athérogénicité plasmatique
<b>IFCC</b>	Fédération Internationale de Chimie Clinique
<b>ISE</b>	Electrode sélective d'ions
<b>J<sub>0</sub> :</b>	Jour avant traitement
<b>J<sub>7</sub>-J<sub>90</sub> :</b>	Jours de traitement
<b>J<sub>120</sub></b>	Jour après traitement
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>M ± ESM :</b>	Moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne

<b>mEq/L :</b>	Milliéquivalent/litre
<b>mg/L :</b>	Milligramme/litre
<b>mg/kg</b>	Milligramme/Kilogramme
<b>mm :</b>	Millimètre
<b>mol/L</b>	mole/litre
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>NAD<sup>+</sup> :</b>	Nicotinamide adénosine dinucléotide (oxydé)
<b>NADH :</b>	Nicotinamide adénosine dinucléotide (réduite)
<b>NADP :</b>	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (oxydé)
<b>NADPH :</b>	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (réduite)
<b>NH<sub>3</sub> :</b>	Ammoniac
<b>OCDE :</b>	Organisation de Développement et de Coopération Economique
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PA :</b>	Potentiel d'action
<b>PAL :</b>	Phosphatases alcalines
<b>pH :</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>POD :</b>	Peroxydase
<b>PQQ :</b>	Pyrroloquinoline quinone
<b>RS :</b>	Réticulum sarcoplasmique
<b>RyR</b>	Récepteurs à la ryanodine
<b>STAT R :</b>	Stabilisateur de Réactif
<b>UFR :</b>	Unité de Formation et de Recherche
<b>UI/L :</b>	Unité Internationale/litre
<b>μkat/L:</b>	Microkatal/litre
<b>μL :</b>	Microlitre

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Photographies des différentes parties de <i>Holarrhena floribunda</i> .....	11
Figure 2	Structure de quelques composés chimiques isolés des feuilles et écorces de <i>Holarrhena floribunda</i> .....	15
Figure 3	Photographie de la face pariétale du foie isolé de rat <i>Wistar</i> .....	19
Figure 4	Photographie des reins isolés de rat <i>Wistar</i> albinos.....	26
Figure 5	Photographie de cœur isolé de rat <i>Wistar</i> .....	32
Figure 6	Schéma synoptique de l'obtention de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>Holarrhena floribunda</i> .....	49
Figure 7	Parenchyme hépatique de rats mâles mettant en évidence les espaces portes.....	79
Figure 8	Parenchyme hépatique de rates mettant en évidence les espaces centro- lobulaires.....	80
Figure 9	Portions du cortex rénal des rats mâles montrant les différentes parties du néphron.....	91
Figure 10	Portions du cortex rénal des rates montrant les différentes parties du néphron...	92
Figure 11	Portion de ventricule de cœur de rats mâles montrant l'architecture cellulaire du tissu cardiaque.....	103
Figure 12	Portions d'oreillette de cœur de rates montrant l'organisation cellulaire du tissu cardiaque.....	104

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b>	Composés chimiques de <i>Holarrhena floribunda</i> .....	13
<b>Tableau II</b>	Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.....	22
<b>Tableau III</b>	Référence des valeurs usuelles de quelques paramètres biochimiques sériques chez le rat Wistar âgés de 8 à 32 semaines.....	38
<b>Tableau IV</b>	Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs du foie chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	70
<b>Tableau V</b>	Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs du foie chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	72
<b>Tableau VI</b>	Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du foie chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	74
<b>Tableau VII</b>	Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du foie chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	76
<b>Tableau VIII</b>	Influence de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>H. floribunda</i> sur les masses relatives du foie des rats mâles et des rates.....	78
<b>Tableau IX</b>	Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs des reins chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	82
<b>Tableau X</b>	Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs des reins chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	83
<b>Tableau XI</b>	Valeurs des taux sériques des électrolytes marqueurs des reins chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	85
<b>Tableau XII</b>	Valeurs des taux sérique des électrolytes marqueurs des reins chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	87
<b>Tableau XIII</b>	Influence de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>H. floribunda</i> sur les masses relatives des reins des rats et rates.....	90
<b>Tableau XIV</b>	Valeurs des taux sériques des lipides marqueurs du cœur chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	94
<b>Tableau XV</b>	Valeurs des taux sériques des lipides marqueurs du cœur chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	96
<b>Tableau XVI</b>	Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du cœur chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	98

<b>Tableau XVII</b>	Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du cœur chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages.....	100
<b>Tableau XVIII</b>	Influence de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>H. floribunda</i> sur les masses relatives du cœur des rats et rates.....	102

# **INTRODUCTION**

L'utilisation des plantes médicinales pour se soigner demeure le recours principal pour la grande majorité des populations des pays en développement (**Singh et Kotecha, 2016**). Selon l'UNESCO, ces populations ont recours aux plantes pour satisfaire leurs besoins de soins de santé primaire, en partie pour leur accessibilité mais surtout pour les moyens financiers limités face aux produits pharmaceutiques (**UNESCO, 2010**).

C'est au vu de ce constat que l'OMS a demandé aux gouvernements de revaloriser la médecine traditionnelle afin de satisfaire aux besoins en santé des populations. Cette valorisation vise la mise au point de médicaments traditionnels améliorés et l'intégration de la médecine traditionnelle dans le système de soins et de santé publique (**OMS, 2013**).

Des études ethnobotaniques entreprises il y a quelques années constituent une base dans la réalisation de cette valorisation de la médecine traditionnelle. En Afrique, elles ont permis de répertorier plus de 5000 espèces médicinales (**Kerharo et Adam, 1974; Adjanahoun, 1989**) dont 761 espèces médicamenteuses et 1421 recettes médicamenteuses en Côte d'Ivoire (**Aké-Assi et Guinko, 1991**). Le regain d'intérêt envers la phytothérapie durant ces dernières années a permis d'approfondir l'analyse de son efficacité thérapeutique.

Cependant, l'aspect toxicologique a été délaissé par rapport à l'avancement de la phytothérapie. En effet, des études réalisées sur les traitements traditionnels à base de plantes ont fait état de problème de toxicité ou d'interaction pouvant causer des accidents mortels.

Il a été rapporté à titre d'exemple que *Ephedra sinica*, une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour ses propriétés cardiovasculaires a été interdite en Europe. En effet, *Ephedra sinica* utilisée pour la perte de poids a entraîné de nombreux cas d'accidents cardiovasculaires, d'accidents vasculaires cérébraux et des troubles psychiatriques (**Gagnon et al., 2010**).

De plus, les cas d'intoxications par *Callilepis laureola*, une plante utilisée dans le traitement traditionnel des troubles digestifs et l'infertilité largement répandue en Afrique du Sud, ont été signalés. Cette plante a beaucoup fait parler d'elle en raison du nombre de décès dont elle a été responsable. En effet, elle a été incriminée à la suite de son ingestion, dans la survenue de troubles cardio-vasculaires et d'hépatite avec une nécrose hépatocellulaire majeure lors des autopsies de plus de 1500 personnes décédées dans la province du Kwazulu-Natal (**Peyrin et al., 2004**). En Côte d'Ivoire, l'utilisation traditionnelle de *Momordica charantia* pour le traitement des aménorrhées a entraîné des cas de vomissement, d'évanouissement, d'hyperthermie et d'éruption cutanée (**Dié-kacou et al., 2009**).

La méconnaissance des effets toxiques des plantes sur les organes vitaux comme le foie, et les reins constitue un danger pour les utilisateurs mais aussi un frein à leur utilisation (**Khattabi et al., 2010**).

Dès lors, il paraît opportun d'effectuer des recherches toxicologiques visant à élucider la biosécurité et l'innocuité des plantes, afin de permettre leur usage plus rationnel et rassurant.

C'est pourquoi, le laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'Université Nangui Abrogoua a inscrit dans ses programmes de recherche, l'étude de la biotolérance des plantes médicinales de la flore ivoirienne couramment utilisées par les populations et pour lesquelles les études réalisées ont établi la preuve scientifique de leur efficacité.

La présente étude, qui s'inscrit dans ce programme, a porté sur la biotolérance de *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae), une plante utilisée pour traiter plusieurs pathologies telles la dysenterie, la diarrhée, les coliques, la stérilité et particulièrement le diabète (**Kerharo et Adam, 1974; Aké-Assi et Guinko, 1991; Schmelzer et Gurib, 2006**). Cette plante a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques antérieurs. Des études phytochimiques sur la plante ont conduit à l'isolement de flavonoïdes, de phytohormones et d'alcaloïdes (**Leboeuf et al., 1964; Bennett et Heftmann, 1965; Badmus et al., 2010**).

Au plan pharmacologique, certains chercheurs ont montré l'effet inhibiteur *in vitro* de l'extrait aqueux de *H. floribunda* sur la croissance d'amibes non pathogènes de l'espèce *Amoeba proteus* (**Guissou et al., 1992**); l'inhibition *in vitro* de l'activité de l'alpha amylase par le décocté des feuilles (**Funke et Melzig, 2006**), l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique de l'écorce de tige sur les agents pathogènes du genre *Bacillus* (**Bogne et al., 2012**). D'autres études ont démontré les effets œstrogéniques chez la rate ovariectomisée de l'extrait aqueux des feuilles de *H. floribunda* (**Bayala et al., 2006**) et le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique des feuilles de cette plante (**Badmus et al., 2010**). Au niveau de la toxicité, on note la présence de la connessine, un alcaloïde toxique sur les amibes et très abondant dans les racines mais sous forme de traces dans les feuilles et faiblement toxique chez les animaux (**Olugu et al., 2014**).

Au sein du laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée, les travaux portant sur les extraits d'éthanol, de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* ont indiqué une diminution dose-dépendante significative de la glycémie à jeun et l'hyperglycémie induite par le glucose chez les rats normaux. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle (EAE) s'est révélé plus actif. En outre, chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine, l'administration de l'extrait d'acétate d'éthyle a diminué la glycémie. L'étude

de toxicité aiguë de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H.a floribunda* a révélé une dose létale 50% (DL<sub>50</sub>) supérieure à 6000 mg/kg de poids corporel. L'administration répétée pendant 28 jours de l'extrait AE à la dose de 1000 mg/kg de poids corporel n'a pas engendré de signes de toxicité (Gnangoran, 2012; Kouassi *et al.*, 2017).

Cependant, peu de données sont disponibles sur les risques liés à l'utilisation répétée et prolongée de *H. floribunda*. Les molécules que contient l'extrait AE de *floribunda*, participant aux différentes réactions métaboliques pourraient causer de graves accidents au niveau de l'organisme. Autrement dit, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* en tant que substance exogène avec ses potentialités thérapeutiques ne peut-il pas endommager profondément la structure ou perturber fondamentalement le fonctionnement de certains organes comme les reins le foie et le coeur ?

L'objectif général de cette étude est donc de vérifier l'innocuité de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda*, afin de garantir son utilisation thérapeutique à long terme. Pour atteindre cet objectif général, les objectifs spécifiques suivants ont été définis. Il s'agit de :

- Evaluer les effets de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* sur les fonctions et l'intégrité tissulaire hépatiques des rats *Wistar*.
- Déterminer les effets de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* sur les fonctions et l'intégrité tissulaire rénales des rats *Wistar*.
- Evaluer les effets de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* sur les fonctions et l'intégrité tissulaire cardiaques des rats *Wistar*.

# **I-REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1- Définitions**

### **1-1- Biotolérance**

La biotolérance se définit, dans le contexte actuel des essais *in vivo*, comme l'étude portant sur la variabilité ou non des constantes biologiques chez des sujets traités par un ou plusieurs produits issus des médicaments de synthèse ou des substances naturelles. Elle est une étape importante des tests de toxicologie. Elle permet d'évaluer les effets secondaires sur le plan biologique chez les sujets traités d'une part et d'autre part, de mettre en place une banque de données expérimentales pour les essais *in vivo*. Les données de biotolérance sont par ailleurs indispensables pour constituer une base scientifique et éthique en vue d'une première autorisation d'administration à l'homme (**Claude, 1998**).

### **1-2- Innocuité**

L'innocuité désigne la qualité de ce qui n'est pas nuisible ni nocif pour la santé et la qualité de vie d'une personne. Elle exprime le caractère de ce qui ne fait pas de tort et ne représente aucun danger, ne cause aucun dommage physiologique, ne dégrade pas la santé et la qualité de vie d'un être (**Claude, 1998**).

### **1-3- Toxicité**

La toxicité est le caractère des xénobiotiques ou substances étrangères qui, au contact ou après pénétration dans un organisme, peuvent causer un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire ou organique pouvant conduire à la mort de l'organisme (**Leblanc, 2010**). L'évaluation de la toxicité repose sur l'utilisation des paramètres ou d'indicateurs de toxicité qui peuvent être plus ou moins spécifiques et qui sont associés à des lésions organiques affectant certains tissus et organes. Il existe trois catégories d'essais de toxicité qui diffèrent en fonction de leur durée d'exposition: la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë et la toxicité chronique (**Ecobichon, 1997**).

#### **1-3-1 Toxicité aiguë**

La toxicité aiguë concerne l'ensemble des signes pathologiques qui surviennent après l'administration unique d'une dose sur une période n'excédant pas 24 heures. La toxicité aiguë permet de déterminer la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>), qui est la dose tuant 50 % des animaux testés. La mesure de la DL<sub>50</sub> peut établir un classement de la substance testée. Plus la DL<sub>50</sub> est faible, plus la substance est jugée toxique (**Frank, 1992**).

### **1-3-2 Toxicité subaiguë**

La toxicité subaiguë est l'exposition répétée au xénobiotique, qui ne cause aucune toxicité aigüe évidente, pendant une période de 28 jours. Dans cette épreuve, l'animal d'expérimentation peut être la souris, le rat ou le chien (**Hodgeson, 2010**). La toxicité subaiguë a pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou pathologiques consécutives à l'administration répétée des substances actives examinées. Elle permet d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie (**Manahan, 2002**). Il est utile de choisir la dose la plus élevée de façon à faire apparaître les effets nocifs tandis que les doses inférieures permettent 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 pondérale, de la formule sanguine, de la biochimie clinique et de l'analyse anatomo-histologique (**Ecobichon, 1997**).

### **1-3-3- Toxicité chronique**

La toxicité chronique correspond aux effets d'une administration répétée à long terme et à faibles doses d'un xénobiotique. Ces doses sont insuffisantes pour provoquer un effet immédiat, mais leur administration répétée sur une longue période de temps peut avoir des effets délétères. En expérimentation, les administrations de doses peuvent s'étendre sur une période de 90 jours, on parle de toxicité subchronique ou sur plus de 90 jours (toxicité chronique). Le degré d'intoxication dépend soit du toxique qui s'accumule, soit des effets engendrés qui s'additionnent (**Leblanc, 2010**).

## **1-4- Médicaments traditionnels**

Le terme de médicaments traditionnels se définit comme un ensemble de substances naturelles dont l'utilité thérapeutique a été mentionnée par les tradipraticiens au cours des enquêtes ethnobotaniques. Ces substances naturelles sont pour la plupart composées de molécules simples ou groupes de molécules complexes (**OMS, 2013**).

### **1-4-1- Intérêt de la recherche sur les médicaments traditionnels**

L'intérêt de la recherche sur les médicaments traditionnels est souvent attribuable à l'efficacité, l'accessibilité et l'amplification avérées de ces médicaments. De par ces caractéristiques, les médicaments traditionnels permettent ainsi de répondre aux besoins en soins de santé des populations (**OMS, 2013**).

## 1-4-2- Limites et risques de l'utilisation des médicaments traditionnels

Tout médicament traditionnel, dans les conditions normales de son utilisation, est susceptible de faire produire des effets secondaires. Il peut s'agir de réactions allergiques, de réactions cutanées ou d'atteintes de différents organes tels que le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins, le cœur, le système nerveux central. Dans certaines circonstances, l'usage de plantes peut même être à l'origine d'intoxications (**Laccourreye et al., 2017**). Parfois, ce sont des substances non végétales (métaux lourds), contaminant des plantes ou des produits à base de plantes, qui peuvent présenter un risque pour la santé.

## 2- *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand et Schinz (Apocynaceae)

### 2-1- Systématique

-Embranchement :	Spermaphytes
-Sous embranchement:	Angiospermes
-Classe:	Dicotylédones
-Sous classe:	Asteridae
-Ordre:	Gentianales
-Famille:	Apocynaceae
-Sous famille:	Apocynoideae
-Genre:	<i>Holarrhena</i>
-Espèce:	<i>floribunda</i>

(Schmelzer et Gurib, 2006)

### 2-2- Synonymes et noms vernaculaires

L'appellation *H. floribunda* provient de la combinaison de deux noms (*Holarrhena africana* et *Rondeletia floribunda*). En effet, **De Candolle (1844)** découvrit la première espèce africaine de *Holarrhène* qu'il nomma *Holarrhena africana*. Cependant, quelques années plus tôt, **Don (1834)** avait décrit sous le nom de *Rondeletia floribunda* un arbuste buissonnant originaire de la Sierra Leone. Ainsi, après examen de plusieurs herbiers des deux espèces, **Hooker (1849)** conclut qu'elles étaient identiques et les nomma *H. floribunda* (**Bayala, 2005**). Les anciennes appellations sont souvent rencontrées dans des ouvrages pour désigner *H. floribunda*. Il s'agit notamment de: *Rondeletia floribunda*, *H. africana* A. DC, *Holarrhena wulfsbergii* staff et *Holarrhena ovata* A. DC. L'espèce *H. floribunda* appelée communément *Holarrhena* ou *Holarrhène* ou *Holarrhène* du Sénégal en Afrique francophone ou false rubber tree, conessi bark ou kurchi bark en zone anglophone est désignée selon les groupes ethniques

sous plusieurs noms. Ainsi chez les Wolof, les Casamançais et les Sérère du Sénégal, on l'appelle respectivement: Séoulou, kerko et kéna. Les Malinké du Mali, les Peuhl du Burkina et les Haoussa du Niger la surnomment respectivement: kouna, sana, takari ou indama, bokinmutun (**Schmelzer et Gurib, 2006**). En Côte d'Ivoire, les Agni, les Attié, les Baoulé, les Bété, les Gouro et les Yacouba l'appellent respectivement: cécé, sohoulé ou amaleu, sêbè, sagéi, toro-toro et kouro. Il faut cependant noter que certains de ces noms désignent aussi bien *H. floribunda* que *Funtumia africana*, une autre Apocynaceae dont les feuilles ressemblent à celles de *H. floribunda*.

### 2-3- Aire de distribution

*H. floribunda* est présente du Sénégal au Soudan, et de la Centrafrique en Angola. En Côte d'Ivoire, on trouve *H. floribunda* sur toute l'étendue du territoire, dans les forêts décidues, dans les lieux ouverts en forêt dense, dans la savane boisée et herbeuse (**Kerharo et Adam, 1974; Pousset, 1989; Tamboura et al., 2006**).

### 2-4- Description botanique

La morphologie des plantes dépend des régions et des terrains où elles poussent. Ainsi, dans les zones sahéliennes, les unes sont buissonnantes ou arbustives (**Figure 1A**). Par contre, dans les régions tropicales, ce sont de petits arbres de 10 à 25 mètres de haut au fût élancé de 30 cm de diamètre (**Figure 1B**).

Arbre décidu en saison sèche, *H. floribunda* possède un latex blanc abondant dans toutes ses parties et une écorce presque lisse chez les jeunes arbres.

Les feuilles sont opposées, simples et entières (**Figure 1C**). Elles sont de formes ovales à elliptiques, cunéiformes à arrondies, et sont acuminés à aigus au niveau du limbe. Elles sont membraneuses, pourvues de paires de nervures secondaires très saillantes en dessous et de très courts pétioles de 0,3 à 1 cm insérés sur les rameaux. Les feuilles de *H. floribunda* sont semblables aux feuilles de *Funtumia africana*; mais elles sont moins coriaces et ne portent pas de domaties sur leur face dorsale (**Arbonnier, 2009**).

La floraison qui a lieu en début des grandes saisons de pluies fait apparaître des fleurs blanches, petites, odorantes, bisexuées et régulières. Ces fleurs se regroupent (sur un même plan) sous forme d'inflorescence et forment des corymbes terminaux ou axillaires. Comparées aux fleurs de *Funtumia africana*, les fleurs de *H. floribunda* sont plus petites avec un calice de 3 mm de long composé de cinq sépales recouverts de poils gris denses et une corolle à cinq pétales soudées en tube de 8 à 14 mm. L'androcée est composé de 5 étamines insérées à 2 mm

de la base de la corolle. L'ovaire, supère, ovoïde, constitué de 2 carpelles est surmonté d'un style cylindrique d'environ 2 mm de long terminé par un stigmate ovoïde et acuminé (**Arbonnier, 2009**).

Le fruit est un follicule accouplé, mince et long de 30 à 60 cm, non dilaté dans sa région médiane, à pointe émoussée, de couleur grise pâle à brune foncée, déhiscent à maturité et contenant de nombreuses graines (**Figure 1D**). Les graines fusiformes, étroitement oblongues, de 11 à 16 mm de long sont surmontées de longs poils mesurant 4 à 6 cm groupés en aigrettes soyeuses roussâtres (**Schmelzer et Gurib, 2006**).

## **2-5- Usage traditionnel**

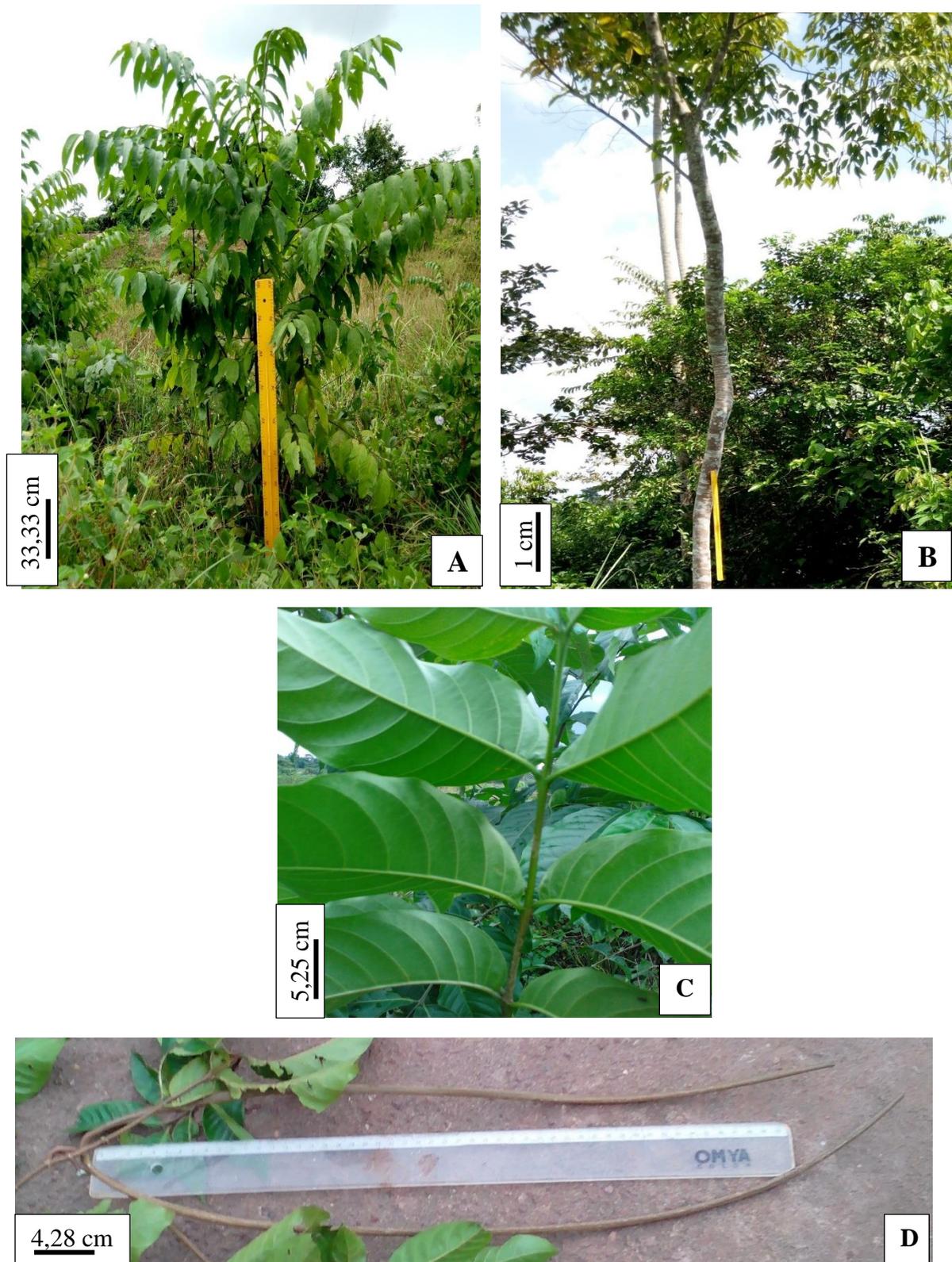
### **2-5-1- Usage médicinal**

#### **2-5-1-1- Racines**

En Afrique de l'ouest, l'écorce de racines s'emploie couramment en décoction ou en macérée dans du vin de palme, pour traiter la dysenterie, la diarrhée, les coliques, la stérilité et pour empêcher les fausses couches. Les mêmes préparations sont utilisées comme diurétiques pour soigner les maladies vénériennes (**Kerharo et Adam, 1974; Schmelzer et Gurib, 2006**).

#### **2-5-1-2- Tige**

Le broyat de l'écorce bu dans du lait, traite la dysenterie et les hémorroïdes. L'écorce de la tige s'emploie couramment en décoction et en macération dans du vin de palme, pour traiter la dysenterie et la diarrhée. Le macéré des écorces, administré par voie orale, est indiqué contre les parasitoses intestinales, la blennorragie et la stérilité (**Kerharo et Adam, 1974; Schmelzer et Gurib, 2006**). En Côte d'Ivoire, la décoction de l'écorce est utilisée par voie anale pour soigner les affections de la peau (**Adjanohoun et Aké-Assi, 1979**). Selon **Sofowora (1982)**, 35 g des écorces de tige bouillies dans un litre d'eau et filtrées, sont utilisées en toilette intime. Ce décocté, utilisé deux fois par jour, est très efficace contre les vaginites à *Trichomonas*. De plus, 250 mL de la même décoction sont utilisés par voie orale matin et soir pour combattre les amibes. Le décocté est couramment utilisé en bain ou par voie orale pour combattre la fièvre, en particulier dans le traitement du paludisme.



**Figure 1** : Photographies des différentes parties de *H. floribunda* (Photo **Koudou, 2013**)

**A** : Aspect en buisson ; **B** : Arbre entier; **C** : Rameau de feuilles; **D** : Fruits (follicules accouplés)

### 2-5-1-3- Feuilles

Les feuilles sont également utilisées pour soigner diverses affections. Le décocté des feuilles est prescrit contre la dysenterie amibienne (Arbonnier, 2009).

Au Sénégal, l'infusion ou le macéré des feuilles est utilisé pour traiter le diabète et l'aménorrhée (Kerharo et Adam, 1974; Schmelzer et Gurib, 2006).

En Côte d'Ivoire, les Attié (groupe ethnique) prescrivent, par voie anale, les feuilles triturées avec celles de *Myrianthus arboreus* et des fruits de piment (*Capsicum frutescens*) pour combattre les douleurs de la hanche. Chez les Bété (groupe ethnique), le décocté des feuilles est reconnu pour ses propriétés anti diarrhéiques. Certains guérisseurs Malinké (groupe ethnique) utilisent l'infusion des feuilles pour lutter contre l'aménorrhée.

Le jus de feuilles, appliqué sur la blessure, cicatrise la plaie. Les feuilles auraient donc des vertus hémostatiques. Les feuilles mélangées à la noix de cola, se consomment pour traiter la blennorragie (Adjanohoun et Aké-Assi, 1979).

### 2-5-2- Autres usages traditionnels non médicinaux

Comme d'autres plantes laticifères, les feuilles de *H. floribunda* sont considérées comme favorisant la sécrétion du lait pour le bétail. Le bois de *H. floribunda* sert en sculpture, ainsi qu'à confectionner des peignes, des manches de hache et petits ustensiles. Au Ghana, on s'en sert pour fabriquer des caisses d'emballage et pour construire des habitations. Au Bénin, le tronc s'utilise dans la construction des greniers à grains, car il se travaille facilement et résiste à *Prostephanus truncatus*, un agent ravageur des grains stockés. En Guinée-Bissau, les poils des graines servent au rembourrage des oreillers. En Côte d'Ivoire, on laisse pousser les arbres dans les cacaoyères pour l'ombre et le combustible qu'ils procurent (Arbonnier, 2009).

## 2-6- Phytochimie

*H. floribunda* contient un grand nombre de composés ou métabolites secondaires (Tableau I). Cette plante est connue pour produire un grand nombre d'alcaloïdes stéroïdiques ; mais elle contient également des substances non alcaloïdes stéroïdiques telle que la triacanthine, des acides phénoliques, des flavonoïdes (kaempférol et quercétine) (Iwu, 2014).

### 2-6-1- Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules organiques dont la base est un cycle azoté. Ils provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques. Ils ont un goût amer et sont très toxiques à forte dose.

**Tableau I : Composés chimiques de *Holarrhena floribunda*. (Visser, 1975)**

Feuilles	Ecorces de tige et racines
Holaphylline	Conessine
Holaphyllamine	Isoconessimine
Holamine	Conessimine
Triacanthine (togholamine)	Conkurchine
chidlovine	
Méthyl-holaphylline	Holarrhénine, holarrhine
Holaphyllinol	Holafrine
Holaphyllidine	Holarrhetine
Dihydroholaphyllamine	Holarrhéline
Prégnénone	Holadiénine
Progestérone	Holaromine
Isoquercitroside	Holaline
	Irehdiamine A
	Lupéol

Les alcaloïdes agissent directement sur les centres nerveux entraînant des effets sur la conscience et la motricité. Au niveau de *H. floribunda*, la concentration la plus élevée d'alcaloïdes se trouve dans l'écorce de la racine avec un taux de 2 à 4% suivie par l'écorce du tronc (1 à 2,5%) puis à l'état de trace dans les feuilles et les fleurs. Toutefois, la variation saisonnière joue un rôle sur le pourcentage d'alcaloïdes présents dans les différentes parties de la plante (**Kerharo et Adam, 1974**).

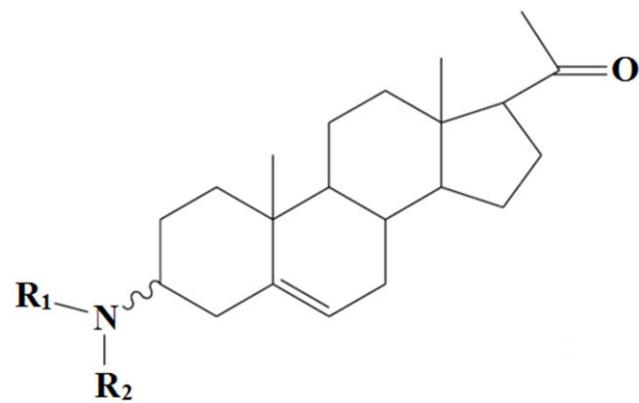
#### **2-6-1-1- Alcaloïdes des écorces et des graines de *Holarrhena floribunda***

La plupart des alcaloïdes des écorces et des graines sont des alcaloïdes stéroïdiques provenant de la conanine et/ou de la conamine. Le principal alcaloïde (50% des alcaloïdes) des écorces et des graines est la conessine. Les dérivés de la conessine sont la norconessine (kurchine), la conessimine, la kurchamine, la conimine, la conamine et l'holarrhénine.

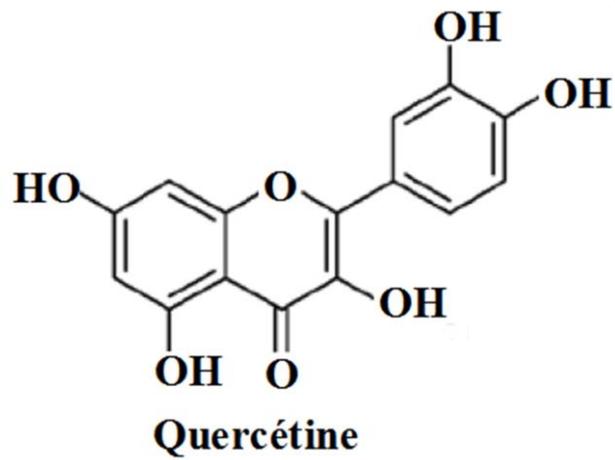
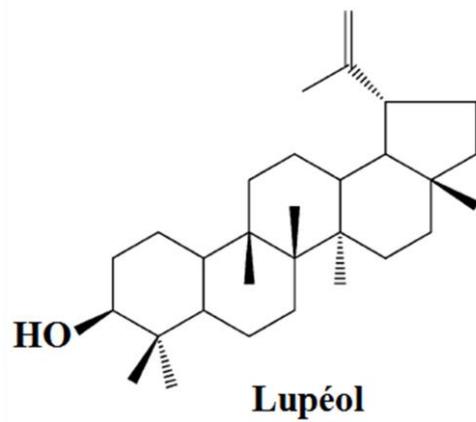
Les premiers travaux d'extraction et d'identification des composés chimiques de *H. floribunda* furent entrepris par **Kiedel (1878)**. Il réussit à extraire de l'écorce du tronc, un alcaloïde qui fût identifié à la conessine par **Polstorff et Schirner (1886)**. Les mêmes alcaloïdes stéroïdiques ont été également extraits par **Kanga et al. (1926)** dans les écorces de *H. antidysenterica* et de *H. congolensis* établissant ainsi l'existence de l'analogie de composition en alcaloïdes stéroïdiques dans les espèces de *Holarrhena*.

#### **2-6-1-2- Alcaloïdes des feuilles de *Holarrhena floribunda***

Les feuilles contiennent surtout des alcaloïdes stéroïdiques dérivés de la prégnane tels que l'holarrhimine, l'holaphyllamine, l'holamine et l'holaphylline (**Leboeuf et al., 1964**) (**Figure 2**) ainsi que des alcaloïdes dérivés de l'adénine comme la triacanthine (**Janot et al., 1950**). Certains dérivés de la prégnane servent de matériau de départ pour réaliser la synthèse partielle de stéroïdes tels que les hormones adrénocorticales (corticostéroïdes) et les hormones sexuelles telles que les œstrogènes, les progestérones et les androgènes. Cette voie a été explorée par **Bennett et Heftmann, (1965)** qui ont réussi à mettre en évidence la biosynthèse de la progestérone à partir de la prégnénolone. Ce résultat fût confirmé par **Leboeuf et al. (1969)** lors de l'étude de la composition chimique des feuilles de *H. floribunda*.



$R_1 = R_2 = H$ ,  holamine  
 $R_1 = R_2 = H$ ,  Holaphyllamine  
 $R_1 = H, R_2 = CH_3$ ,  holaphylline



**Figure 2** : Structures de quelques composés chimiques isolés des feuilles et écorces de *Holarrhena floribunda* (Fotie *et al.*, 2006 ; Yemoa *et al.*, 2015 ; Badmus *et al.*, 2016)

### 2-6-2- Composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent un ou plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes (des lignines, des stilbènes, des flavonoïdes, des phénylpropanoïdes, des anthocyanes et des tannins). Certains phénols ont des fonctions biologiques importantes (défense biochimique contre les microbes), mais ils sont aussi toxiques, voire hautement toxiques pour l'homme. Les feuilles et les écorces de *H. floribunda* contiennent des flavonoïdes et certaines flavones comme le robinoside. En effet, **Paris et Foucaud, (1959)** ont isolé des feuilles de *H. floribunda*, un flavonoïde qu'ils ont identifié comme l'isoquercitroside, confirmé par **Millogo, (1992)**.

De plus, trois flavonoïdes connus, à savoir le Kaemperol-3-*O*-rutinoside, le kaemperol-3-*O*-glucoside et la quercetine-3-*O*-glucoside ont été isolés et identifiés des feuilles de *H. floribunda* par **Badmus et al. (2016) (Figure 2)**.

### 2-6-3- Terpènes

Les terpènes sont des composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène ; ce sont des hydrocarbures ou graisses végétales. Les terpènes sont présents dans les écorces de tige de *H. floribunda*. En effet, **Fotie et al., (2006)** ont isolé des écorces de tige un ester d'acide gras qu'ils ont identifié comme le lupéol (**Figure 2**).

## 2-7- Etudes pharmacologiques et toxicologiques

*H. floribunda* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques antérieurs.

### 2-7-1- Activité antibactérienne

Les extraits aqueux, éthanolique et méthanolique des feuilles et des écorces de *H. floribunda* sont des remèdes avérés contre des bactéries. Le spectre d'action s'étend sur plusieurs germes dont *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *Mycobacterium ulcerans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* et *Klebsiella pneumoniae*. Les tanins présents dans cette plante, semblent être responsables de l'activité antimicrobienne des extraits. Ils présentent un effet additif avec l'ampicilline et un effet synergique en association avec l'oxacilline (**Guissou et al., 1992 ; Chukwurah, 1997 ; Loukaci et al., 2000 ; Fotie et al., 2006 ; Bogne et al., 2012 ; Yemoa et al., 2015 ; Hoekou et al., 2017**)

### 2-7-2- Activité antipaludique et trypanocide

**Fotie et al., (2006)** ont montré que le lupéol et ses dérivés contenus dans les extraits d'écorce de tige de *H. floribunda* ont montré une activité inhibitrice remarquable contre les souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux médicaments à des doses de 1,02 à 18,53 µg / mL lorsqu'ils ont été testés contre deux clones de parasite désignés comme Indochine (W-2) et Sierra Leone (D-6). Les extraits aqueux de feuilles et d'écorces de *H. floribunda* et de leurs fractions alcaloïdes ont montré une activité significative contre les formes sanguines de *Trypanosoma brucei rhodesiense* et aucune cytotoxicité manifeste contre les cellules L-6 selon **Nnadi et al., (2017)**.

### 2-7-3- Activités antioxydantes, anticancer, antimutagènes et inhibitrices de la peroxydation lipidique

Des activités antioxydantes, antimutagènes et inhibitrices de la peroxydation lipidique dans les homogénats du foie, du cerveau et du jaune d'œuf de l'extrait méthanolique dégraissé de *H. floribunda* ont été signalées (**Badmus et al., 2010; Badmus et al., 2013**). Ces mêmes auteurs ont aussi montré que les extraits méthanoliques de feuilles de *H. floribunda* possèdent un potentiel antiprolifératif et d'induction apoptotique contre les cellules du cancer du sein (MCF-7), colorectal (HT-29) et cervical (HeLa) (**Badmus et al., 2015**).

### 2-7-4- Activité hypoglycémique

Les feuilles de *H. floribunda* possèdent une activité hypoglycémique. Cette propriété a été d'abord signalée par **Funke et Melzig (2006)**. Ils ont montré que le décocté des feuilles de cette plante inhibe *in vitro* l'activité de l' $\alpha$ -amylase. Puis, d'autres auteurs ont évalué l'activité hypoglycémiant de l'extrait éthanolique (**Gnangoran et al., 2012**) et de l'extrait d'acétate d'éthyle (**N'guessan et al., 2015**) des feuilles de *H. floribunda* chez des rats normaux et chez des rats rendus diabétiques par injection de la streptozotocine. Ces travaux ont montré une activité hypoglycémique significative similaire à celle du médicament standard Glibenclamide.

### 2-7-5- Activité analgésique

**Aniefiok Udobre et al. (2014)** ont évalué l'activité analgésique de l'extrait méthanolique de racines de *H. floribunda* en utilisant des douleurs induites par la chaleur, des convulsions induites par l'acide acétique et le léchage de pattes postérieures au formol dans des modèles de souris. L'extrait a montré un effet analgésique significatif dans tous les modèles.

### 2-7-6- Toxicité

La toxicité aiguë de différents extraits de *H. floribunda* a fait l'objet de plusieurs travaux. Ainsi, l'extrait méthanolique des écorces de tiges (**Bogne et al., 2012**), l'extrait éthanolique des feuilles (**Gnangoran et al., 2012**), et l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda*. (**Gnangoran., 2012; N'guessan et al., 2015**) n'ont montré aucun effet toxique. Par ailleurs, les différents auteurs ont obtenu des DL<sub>50</sub> supérieures respectivement à 6000 mg/kg et 6500 mg/kg de poids corporel. Les résultats de la toxicité subaiguë n'ont montré aucune variation significative du poids corporel, des effets hématologiques et des paramètres biochimiques étudiés (**Bogne et al., 2012; Gnangoran et al., 2012; Kouassi et al., 2017**).

## 3- Organes cibles

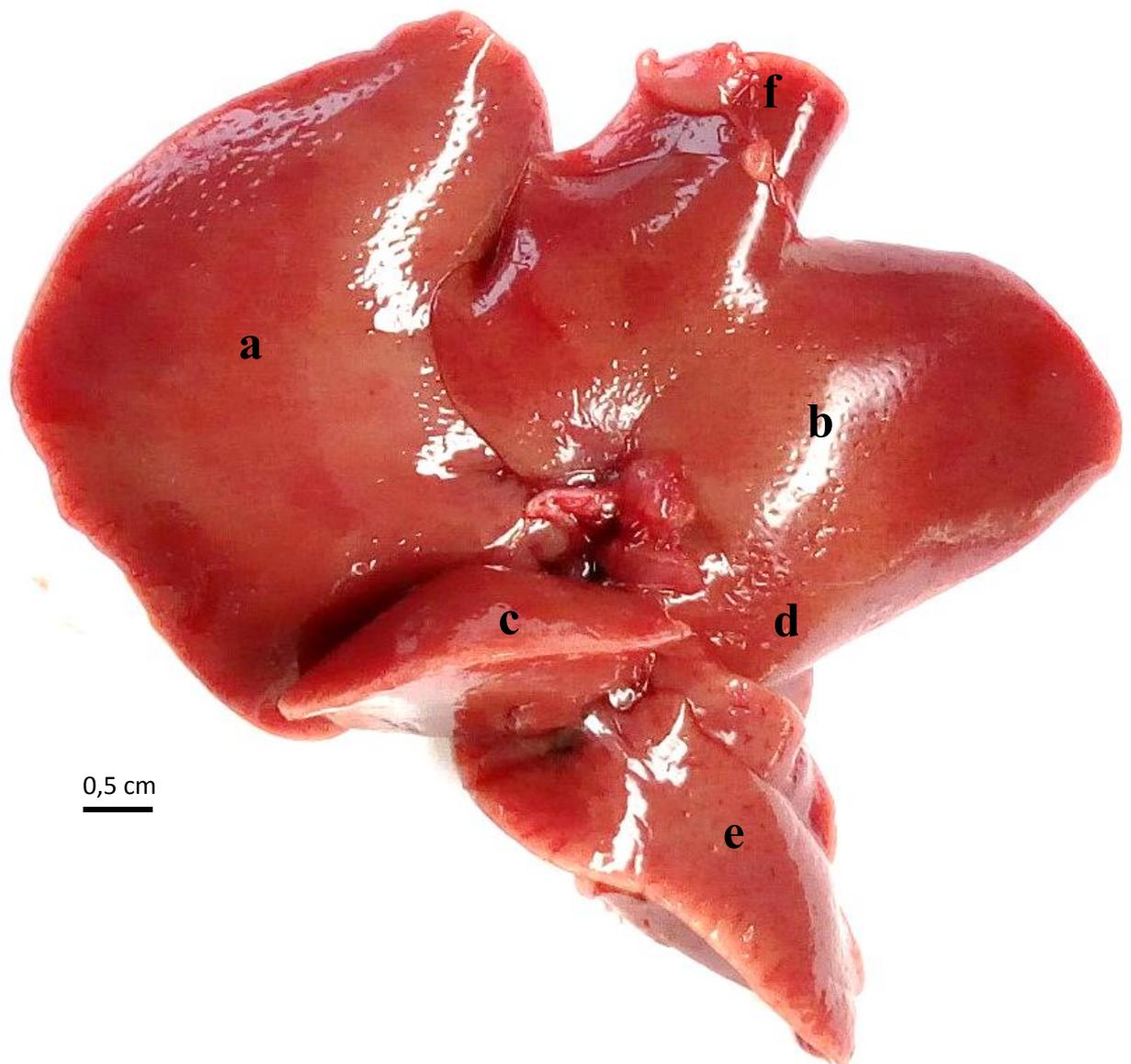
### 3-1- Foie

#### 3-1-1- Anatomie du foie

Le foie est la glande la plus volumineuse de l'organisme. Chez le rat, le foie est fait de six lobes dont un lobe latéral droit, un lobe médian droit, un lobe latéral gauche, un lobe médian gauche, un lobe caudal et un lobe viscéral (**Figure 3**). Chaque lobe est fait de lobules qui sont constitués de travées d'hépatocytes, des canalicules biliaires et de capillaires sinusoides. De par sa position anatomique, le foie a la particularité d'avoir un double apport sanguin par l'artère hépatique et par la veine porte. Ainsi, le sang afférent est riche en nutriments, et en oxygène, nécessaires aux nombreuses activités hépatiques. En pénétrant dans le foie, les ramifications de ces vaisseaux s'associent à une branche de division de l'arbre biliaire et à des vaisseaux lymphatiques pour cheminer dans le parenchyme et constituent les espaces portes. Après ses échanges avec les cellules hépatiques, le drainage du sang veineux se fait par les veines sus-hépatiques (**Bredo et Odo, 2011**).

#### 3-1-2- Fonctions du foie

Le foie est le siège de multiples réactions biochimiques grâce à un équipement enzymatique important qu'il contient. Toute substance qui y transite, voit sa structure modifiée soit dans le sens qui permettrait à l'organisme de l'utiliser immédiatement ou de le stocker, soit dans un autre sens, qui favoriserait son excrétion hors de l'organisme ou son intégration dans des réactions de synthèse d'autres substances (**Waugh et Grant, 2010**).



**Figure 3:** Photographie de la face pariétale du foie isolé de rat isolé de rat *Wistar* (Photo: **Koudou, 2014**)  
**a** = lobe latéral droit; **b** = lobe latéral gauche; **c** = lobe médian droit; **d** = lobe médian gauche; **e** = lobe caudal; **f** = vaisseau sanguin

### **3-1-2-1 Métabolisme des glucides**

Le foie est un organe important dans le stockage du glucose sous forme de glycogène. Cette réaction, nommée glycogénèse est stimulée par l'insuline pancréatique et permet de stocker le glucose jusqu'à la prochaine prise alimentaire. Lorsque la glycémie est trop basse, afin de pallier le manque glucidique, le foie fournit du glucose à partir des stocks de glycogène grâce à l'action du glucagon. Cette réaction permet ainsi aux autres organes de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Si les stocks de glycogène viennent à manquer, alors le foie produit du glucose à partir d'acides aminés et des carbohydrates. Les actions combinées de l'insuline (hormone anabolique) et des hormones cataboliques (glucagon, l'adrénaline, les glucocorticoïdes) permettent de maintenir une glycémie correcte et appropriée à l'effort fourni par l'organisme (**Waugh et Grant, 2010**)

### **3-1-2-2- Métabolisme des protéines**

Les transaminases hépatiques sont capables de catalyser des réactions de transamination qui vont entraîner le transfert des groupements amines des acides aminés sur des acides cétoniques ou des aldéhydes. Cette réaction permet la dégradation des protéines et la synthèse de glucose à partir de substances non glucidiques. La réaction de désamination, quant à elle, correspond à la perte d'une fonction amine d'un acide aminé sans transfert et a pour conséquence la libération d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Cette réaction est catalysée par la glutamate déshydrogénase. L'ammoniac produit par cette réaction est néfaste et est rapidement transformé en urée dans les hépatocytes afin d'être excrété par les reins. Le foie synthétise également des acides aminés non essentiels, la plupart des protéines plasmatiques comme l'albumine et l'alpha-féto-protéine, des facteurs de coagulation et des immunoglobulines (**Meyer et Meyer, 2012**)

### **3-1-2-3- Métabolisme des lipides**

Le foie joue un rôle fondamental dans l'homéostasie des triglycérides et du cholestérol. D'abord, il reçoit et emmagasine les lipides alimentaires qui lui parviennent sous forme de chylomicrons. Ensuite, il synthétise la grande majorité du cholestérol, les phospholipides et les acides gras à partir d'acétylcoenzyme A (CoA): c'est la lipogénèse. Les produits synthétisés sont soit stockés, soit exportés vers les autres organes. Pour faciliter le transport de ces lipides, le foie synthétise des lipoprotéines VLDL, LDL et HDL. A travers la  $\beta$ -oxydation, il dégrade les acides gras en corps cétonique. Enfin, il transforme le cholestérol en acides biliaires ou en hormones stéroïdiennes (**Waugh et Grant, 2010**).

### **3-1-2-4- Métabolisme des xénobiotiques et vulnérabilité hépatique**

Le foie est le principal organe responsable du métabolisme ou de la biotransformation d'une pléthore de xénobiotiques. Lorsque les xénobiotiques sont transmis au foie par la veine porte, il fournit une barrière efficace qui empêche ces derniers d'entrer dans la circulation systémique. Le foie traite ces produits chimiques, grâce à des enzymes métabolisantes comme les cytochromes P450 et d'autres enzymes (**Brewer et Chen, 2017**) (**Tableau II**). Le traitement des xénobiotiques se déroule en deux phases: l'étape de la fonctionnalité et l'étape de la conjugaison. La biotransformation des xénobiotiques a pour but d'augmenter la solubilité ou la polarité des xénobiotiques afin de faciliter leur élimination dans la bile ou dans l'urine. Cependant, dans certains cas, des réactions de la phase I convertissent certains xénobiotiques inactifs ou moins actifs à des composés toxiques biologiquement très actifs ou génèrent des espèces réactifs oxygénées (ERO) (**Coby et al., 2017**). Ces transformations font donc du foie, un organe potentiellement vulnérable et prédisposé aux attaques des xénobiotiques.

### **3-1-3- Hépatotoxicité liée à la phytothérapie**

#### **3-1-3-1- Définition**

L'hépatotoxicité se caractérise par une altération de l'intégrité tissulaire hépatique ou par une perturbation de la fonction hépatique causée par une exposition soit à des xénobiotiques soit à certains composés des plantes médicinales (**Stickel et al., 2005**).

#### **3-1-3-2- Dommages induits au foie par les métabolites des plantes**

Les différents composés toxiques contenus dans les extraits de plantes peuvent conduire à la déplétion du glutathion (GSH) et agir sur les macromolécules comme l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides. Ces différentes actions peuvent induire des dommages cellulaires et la mort des hépatocytes. Les différents composés toxiques activent aussi les cytokines qui provoquent des lésions hépatiques, attaquent les organites cellulaires et conduisent à l'apoptose ou à la mort cellulaire autophagique (**Wiedenfeld, 2011**).

#### **3-1-3-3- Plantes hépatotoxiques connues**

L'hépatotoxicité liée à la phytothérapie est due à des métabolites secondaires que contiennent les plantes médicinales. Les composés chimiques les plus incriminés sont: les alcaloïdes à pyrrolizidine, les polyphénols et les terpènes. Quelques exemples de plantes médicinales dont l'hépatotoxicité a été documentée sont cités ici.

**Tableau II : Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques**  
(Staack et Hopfgartner, 2007)

<b>Oxygénases et oxydases</b>	<b>Hydrolases</b>
Cytochrome P450	Estérases
Flavo-mono-oxygénases	Amidases
Péroxydases	Dipeptidases
Monoamines oxydases	Epoxydes hydrolases
Alcool déshydrogénases	$\gamma$ - Glutamyl transpeptidases
Aldéhyde déshydrogénase	Cystéine conjuguée $\beta$ -lyases
Aldéhyde oxydases	
Aldo-céto réductases	
Quinone réductases	<b>Enzymes piègeurs des radicaux libres</b>
Xanthine déshydrogénases	Glutathion S-transférases
	Sulfotransférases
<b>Enzymes de conjugaison</b>	Acétyltransférases
Superoxydes dismutases	UDP-glucuronyltransférases
Catalases	Méthyltransférases
Glutathion peroxydases	Acyl-CoA glycine synthétases

### 3-1-3-3-1- Plantes hépatotoxiques contenant des alcaloïdes

- Genres *Heliotropium*, *Symphytum* (*Boraginaceae*), *Senecio* (*Asteraceae*) et *Crotalaria* (*Fabaceae*)

L'hépatotoxicité des alcaloïdes de la pyrrolizidine présents dans plus de 350 espèces végétales est connue depuis longtemps. Les principaux genres incriminés sont *Heliotropium*, *Senecio*, *Crotalaria* et *Symphytum* (Gaillard *et al.*, 2001).

L'empoisonnement à la pyrrolizidine est endémique en Amérique centrale, en Australie et en Afrique où les alcaloïdes toxiques sont ingérés sous forme d'infusions, de décoctions ou même de lavements (Wiedenfeld, 2011). Une intoxication endémique a également été notée en Inde et en Afghanistan, résultant d'une contamination de farines par des plantes contenant ces alcaloïdes toxiques (Kakar *et al.*, 2010) Quelques rares cas d'atteintes hépatiques ont aussi été observés après contamination de lait de vache ou de miel par les alcaloïdes pyrrolizidiniques. Il y a quelques années, des cas d'hépatites ont été observés dans les pays occidentaux chez des patients utilisant des plantes contenant ces alcaloïdes sous forme d'infusions, de capsules ou de compléments alimentaires (Bensaude *et al.*, 1998).

La principale lésion induite par les alcaloïdes de la pyrrolizidine est la maladie veino-occlusive. La symptomatologie peut être aiguë, se caractérisant par une douleur abdominale brutale, une ascite, une hépatomégalie et une augmentation marquée des transaminases. La biopsie hépatique à ce stade montre une nécrose centro-lobulaire hémorragique sans inflammation, liée à une atteinte aiguë des veines centro-lobulaires. Lorsque les lésions restent limitées, l'évolution se fait vers une guérison complète. A l'inverse, lorsqu'elles sont étendues, on peut observer une insuffisance hépato-cellulaire pouvant être mortelle. L'évolution peut se faire de façon plus insidieuse et aboutir à une hépatopathie chronique simulant une cirrhose.

La toxicité des alcaloïdes de la pyrrolizidine est reproductible et est dose-dépendante chez l'animal. Elle est liée à la transformation d'alcaloïdes insaturés en métabolites réactifs toxiques, probablement des dérivés -4 pyrroliques et N-oxides. Les métabolites sont formés par la famille 3A des cytochromes P 450 (CYP 3A) dans les hépatocytes et les cellules endothéliales.

Les dérivés pyrroliques exercent leur toxicité en altérant la structure et la fonction des protéines et des acides nucléiques avec lesquels ils interagissent, mais en se liant de façon covalente à l'actine des cellules endothéliales sinusoidales. Il en résulte une atteinte vasculaire prédominante, secondairement responsable de la nécrose hépatocytaire (Yang *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2017; Xiaojing *et al.*, 2017). Ce mécanisme pourrait expliquer l'histoire naturelle des lésions hépatiques observées chez l'homme.

### 3-1-3-3-2- Plantes hépatotoxiques contenant des terpènes

#### ➤ *Atractylis gummifera* L. ou *Carlina gummifera* (Asteraceae)

*Atractylis gummifera* L. ou le chardon à glu est utilisé en fumigation contre le rhume, les vertiges et céphalées, en infusion contre les hémorragies et ses propriétés anti-pyrétiques, diurétiques, abortives, purgatives et émétiques (Mouhib et Omari, 1988; Bellakhdar, 1997).

La toxicité hépatique de *Atractylis gummifera* est bien connue dans les pays méditerranéens. Son intoxication est saisonnière et survient surtout au printemps. Elle se manifeste par des douleurs abdominales et des vomissements (Hami *et al.*, 2011; Ahid *et al.*, 2012). Des études histopathologiques ont mis en évidence une hépatite fulminante avec nécrose hépatocellulaire majeure, une hépatite aiguë associant à la fois une stéatose micro vésiculaire (Lemaigre *et al.*, 1975). Il peut s'y associer une hypoglycémie, une insuffisance rénale, des troubles neuro-végétatifs.

La toxicité du chardon à glu est liée à deux substances, l'atractylate de potassium et la gummiférine. Ce sont des hétérosides de nature diterpénique dérivés du kaurène (Gaillard *et al.*, 2001). Ces métabolites sont capables d'inhiber la phosphorylation oxydative mitochondriale et le cycle de Krebs (Stedman, 2002).

#### ➤ *Teucrium chamaedrys* (Lamiaceae)

*Teucrium chamaedrys* ou la germandrée petit-chêne est utilisée depuis longtemps comme antipyrétique sédatif des douleurs abdominales ainsi que pour des propriétés diurétiques, cholérétiques et cicatrisantes (Jaradat *et al.*, 2016). Des cas d'hépatites aiguës cytolytiques, d'hépatites fulminantes et de cholangite ont été collectés dans les centres de pharmacovigilance en Europe principalement chez les femmes de la quarantaine (Larrey *et al.*, 1992).

Le mécanisme de l'hépatotoxicité de la germandrée a été reproduit de façon dose-dépendante chez la souris. La toxicité de cette plante est liée à la présence de diterpénoïdes transformés par des cytochromes P-450, en particulier ceux de la famille 3A en des métabolites réactifs. Les métabolites toxiques formés déplètent le glutathion et altèrent le cyto-squelette et la membrane cellulaire. De plus, les lésions pourraient aussi faire intervenir des phénomènes d'apoptose (Peyrin *et al.*, 2004).

### 3-1-3-3-3- Plantes hépatotoxiques contenant des polyphénols

#### ➤ *Camellia sinensis* (Theaceae)

*Camellia sinensis* ou le thé vert fournit une des boissons les plus consommées dans le monde. Au plan thérapeutique, diverses propriétés ont été attribuées au thé vert, parmi lesquelles une activité anti-oxydante en piégeant les radicaux libres et en inhibant la peroxydation lipidique (Chen *et al.*, 2017), un effet hypocholestérolémiant par inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol exogène (Takechi *et al.*, 2018), une réduction du niveau de la pression. Commercialement, on distingue le thé vert (séché rapidement), le thé noir (fermenté puis séché) et le thé Oolong (demi-fermenté) indiqué dans le traitement des asthénies fonctionnelles, des états fébriles et grippaux. Un extrait hydro-alcoolique de thé vert commercialisé sous les noms de Exolise et de Mincifit Exo-L a été responsable de 13 cas d'atteintes hépatiques entre 1999 et 2003 en Europe (Seddik *et al.*, 2001). Une hépatite mixte (cytolytique et cholestatique) a été observée chez 10 des 13 malades. Les biopsies hépatiques effectuées avaient montré une stéatose, une discrète nécrose hépatocytaire et une portite.

Les mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité du thé vert ne sont à ce jour pas connus, mais le mode d'extraction des préparations commerciales pourrait indiquer une piste de toxicité. En effet, les différents extraits alcooliques des thés sont plus riches en gallate d'épigallocatechol (GEPC) que les extraits aqueux. Ce composé phénolique contenu dans les feuilles pourrait être incriminé dans la survenue des hépatites.

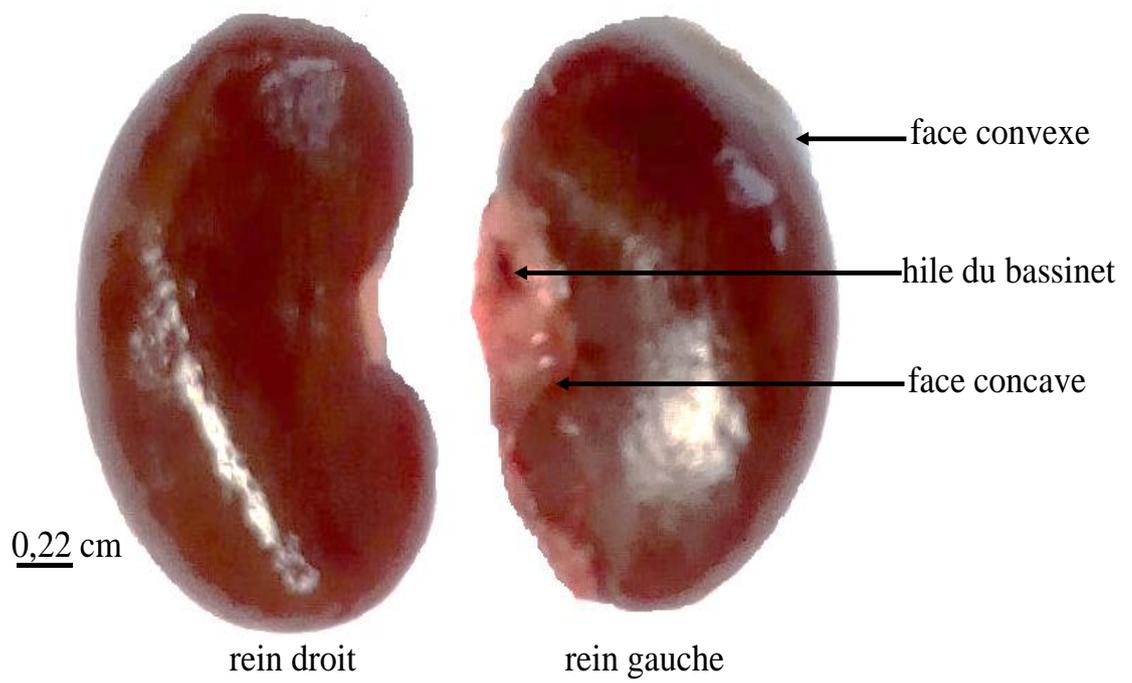
## 3-2- Reins

### 3-2-1- Anatomie du rein

Les reins sont des organes pairs, de couleur marron, en forme de haricot (**Figure 4**). Ils sont constitués de plusieurs milliers de néphrons qui représentent les unités structurales et fonctionnelles du rein. Chaque néphron est composé d'un corpuscule rénal et des tubules rénaux (Waugh et Grant, 2010).

### 3-2-2- Fonctions du rein

Organe plurifonctionnel, le rein joue un rôle central dans l'élimination des déchets de l'organisme et des xénobiotiques ainsi que dans le maintien du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme.



**Figure 4:** Photographie des reins isolés de rat Wistar albinos (Photo **Koudou, 2014**)

Cette homéostasie est assurée par la filtration glomérulaire et les modifications tubulaires (réabsorption, sécrétion et excrétion). Ces différentes fonctions traduisent la capacité du rein à s'adapter à une situation physiologique ou pathologique donnée (**Leriverend *et al.*, 2016**).

### **3-2-2-1- Filtration glomérulaire**

L'urine dite primitive se forme dans le glomérule par un mécanisme d'ultrafiltration : l'eau, les électrolytes, les substances dissoutes de faible taille et de poids peu élevé passent à travers la paroi glomérulaire et s'écoulent dans le tube. Les substances de poids moléculaire élevé comme les protéines et les éléments du sang de taille élevée comme les globules rouges ne passent pas à travers la paroi du glomérule. Cette urine primitive sera ensuite transformée tout le long de son cheminement à travers les différents segments du néphron (**Waugh et Grant, 2010**).

### **3-2-2-2- Réabsorption et sécrétion tubulaire**

La formation de l'urine résulte de la succession de phénomènes d'échanges au contact d'épithéliums spécialisés. L'urine primitive s'écoule de la capsule de Bowman vers le tube proximal. Une grande partie du liquide ainsi que certains solutés sont retirés de l'urine primitive pour les renvoyer dans le milieu intérieur (sang): c'est la réabsorption. En parallèle avec la réabsorption tubulaire, la sécrétion tubulaire permet le passage de molécules du sang des capillaires péri-tubulaires vers le filtrat à travers les cellules du tubule. Elle permet d'éliminer dans l'urine des substances indésirables ou en excès qui ont été insuffisamment filtrées au niveau du glomérule. Ces échanges sont des processus sélectifs contrôlés par des mécanismes de transport à la fois passif et actif (**Waugh et Grant, 2010**).

### **3-2-2-3- Excrétion tubulaire**

Les substances indésirables filtrées dans le glomérule, puis épurées grâce à un mécanisme de sécrétion active du sang des capillaires péri tubulaires, sont éliminées dans l'urine hors de l'organisme : c'est l'excrétion rénale (**Waugh et Grant, 2010**).

### **3-2-2-4- Métabolisme des xénobiotiques et vulnérabilité rénale**

Les reins jouent un rôle actif dans le métabolisme des xénobiotiques et sont capables de conduire des réactions métaboliques de phase I et de phase II importantes (**Philips *et al.*, 2014**). En fait, les systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des médicaments rénaux sont qualitativement similaires à ceux trouvés dans le foie et d'autres tissus extrarénaux.

Ces réactions concourent à la biotransformation des xénobiotiques. La différence importante entre les reins et les organes impliqués dans le métabolisme est l'hétérogénéité de répartition des systèmes enzymatiques dans les populations des cellules des néphrons (**Ekor, 2014**).

Le cytochrome P450, par exemple, se trouve exclusivement dans le cortex rénal tandis que la prostaglandine synthétase, qui catalyse l'oxydation de plusieurs médicaments et xénobiotiques, se trouve dans la médulla. On note que la facilité d'élimination des xénobiotiques dépend en grande partie de leur solubilité dans l'eau. En général, le composé parent ou le métabolite de phase I est lié par covalence à une molécule endogène comme l'acide glucuronique, le glutathion (GSH), l'acide aminé et le sulfate. L'addition de cette fraction facilite l'excrétion de ces molécules du corps (**Albertolle et al., 2018**). Toutefois, l'existence du haut niveau de perfusion et d'un grand nombre de sites d'interaction et de capture, la disponibilité de transporteurs spécifiques et finalement de la grande capacité de métabolisme des reins, font de ces organes, des sites potentiellement vulnérables et prédisposés à produire des espèces réactives et toxiques. La voie de conjugaison du glutathion (GSH) et la bioactivation de la cystéine conjuguée sont les principales voies métaboliques rénales qui contribuent à la toxicité xénobiotique (**Gillery et al., 2015**).

### **3-2-3- Néphrotoxicité liée à la phytothérapie**

#### **3-2-3-1- Définition**

La néphrotoxicité peut être définie de façon très large comme l'ensemble des altérations structurales ou fonctionnelles rénales, induites directement ou indirectement par des composés chimiques ou leurs métabolites (**Zimmer et al., 2013**). Les lésions rénales induites peuvent être réversibles ou définitives et intéresser toutes les zones du néphron.

#### **3-2-3-2- Dommages induits aux reins par les métabolites des plantes**

Les humains rencontrent fréquemment une grande variété de composés toxiques dont beaucoup sont contenus dans les extraits de plantes prescrits aux populations sous forme de médicaments. Parmi les composés thérapeutiques ayant un potentiel néphrotoxique connu, on note les alcaloïdes, les tanins, les terpènes, les saponines et les glycosides cardiaques. Plusieurs de ces composés sont des néphrotoxiques très puissants et sont capables de favoriser une lésion rénale même avec une exposition brève ou faible.

La première étape du développement de la néphrotoxicité nécessite une exposition adéquate au composé responsable. Les dommages vont des légères altérations responsables de

dysfonctionnements mineurs de la fonction rénale jusqu'à la mort cellulaire conduisant à l'insuffisance rénale (**Ekor, 2014**).

Au plan histologique, on observe des nécroses des cellules épithéliales, des vacuolisations épithéliales et des dilatations des tubules. Divers mécanismes ont été incriminés pour la néphrotoxicité des métabolites des plantes médicinales. Il s'agit entre autres, de la toxicité directe de certains composés, de la phospholipidose due à l'inhibition des enzymes responsables du métabolisme des phospholipides, des lésions de membranes cellulaires induisant la détérioration structurale et fonctionnelle des reins. Il en est de même de l'inhibition de  $\text{Na}^+ / \text{k}^+$  ATPase dans les cellules de tubule rénal ou encore de l'augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (**Balakumar et al., 2008**).

D'autres mécanismes comme la lipo-péroxydation, l'activation et l'augmentation de la concentration du système rénine-angiotensine dans l'endothélium altèrent la fonction glomérulaire. Également, l'altération des enzymes lysosomales, l'inhibition de la phosphorylation et l'altération de la production de l'énergie cellulaire contribuent au dysfonctionnement de la filtration glomérulaire. L'apoptose des cellules mésangiales conduit également à une baisse de la fonction de filtration glomérulaire (**Devarajan, 2006**).

### **3-2-3-3- Plantes médicinales néphrotoxiques connues**

L'insuffisance rénale est une cause fréquente de morbidité et de mortalité dans le monde. L'utilisation de remèdes traditionnels à base de plantes néphrotoxiques reste une cause majeure de cette pathologie (**Luyckx et Naicker, 2008; Kristanc et Kreft, 2016; Brown, 2017**). Les médicaments à base de plantes et les produits naturels apparentés sont une source importante de substances potentiellement néphrotoxiques et un grand nombre d'entre eux ont longtemps été reconnus capables de provoquer une insuffisance rénale. Des composés directement néphrotoxiques qui peuvent provoquer des anomalies électrolytiques et prédisposer à la formation de pierres d'oxalate ont été incriminés (**Singh et Prakash, 2011**).

#### **➤ *Alstonia boonei* (Apocynaceae)**

*Alstonia boonei*, un grand arbre à feuilles persistantes, est réparti dans les tropiques et les forêts tropicales de l'Afrique de l'Ouest et du Centre (**Abel et Busia, 2005; Iwu, 2014**). L'écorce de tige est largement utilisée à diverses fins médicinales (**Madhiri et Vijayalakshmi, 2018**) et a été inscrite dans la pharmacopée africaine comme médicament antipaludéen. C'est l'une des 10 plantes médicinales couramment utilisées dans le sud-ouest du Nigeria. Malgré les

nombreux bénéfiques, la consommation chronique de *Alstonia boonei* s'est révélée capable de provoquer une néphrotoxicité (Oze *et al.*, 2007; Awodele *et al.*, 2010; Nkono *et al.*, 2015).

➤ *Callilepis laureola* (Asteraceae)

*Callilepis laureola* (Impila) est une plante dérivée des racines tubéreuses de *Callilepis laureola*. En Afrique du Sud, il est utilisé comme un remède traditionnel pour induire la fertilité et corriger l'impuissance (Iwu, 2014).

Les rapports d'intoxication mortelle résultant de l'utilisation de cette plante sont bien documentés dans la littérature (Luyckx *et al.*, 2005; Baudoux et Nortier, 2017). Il possède une toxicité rénale marquée et il est considéré comme l'une des causes les plus fréquentes d'insuffisance rénale aiguë dans la population noire d'Afrique du Sud.

Les changements histopathologiques associés à l'insuffisance rénale aiguë néphrotoxique impilamédiatisé comprennent la nécrose du tubule contourné proximal et de l'anse de Henle et cet effet toxique est supposé être médié par l'atractyloside ou le carboxyatractyloside. Le mécanisme de toxicité implique l'inhibition du transport de l'ADP à travers la membrane mitochondriale et la synthèse de l'ATP, conduisant finalement à la mort cellulaire par privation d'énergie (Ekor, 2014).

➤ *Aloe capensis* (Aloeaceae)

*Aloe capensis* (aloès du Cap) est utilisé comme laxatif. La plante contient des aloïnes et des aloïnosides, qui ont été rapportés pour provoquer une néphrite parenchymateuse et, si elle est administrée par voie intraveineuse, peut entraîner une hypotension. La dose létale pour les adultes est estimée entre 8 et 20 g de matériel végétal. Gold (1980) est allé jusqu'à affirmer que «la plupart des cas d'insuffisance rénale aiguë en Afrique du Sud sont dus à des remèdes à base d'aloès ou d'extrait d'aloès». Les symptômes initiaux de l'intoxication à l'aloès comprennent l'inflammation de tractus gastro-intestinal avec saignement et diarrhée et perte de liquide et d'électrolytes. De nombreux cas d'intoxication mortelle résultant de l'utilisation du jus d'aloès comme médicament ont été signalés au Zimbabwe. Les espèces d'Aloe responsables comprennent *A. chabaudii*, *A. excelsa*, *A. greebheadii* et *A. globuligemma*. Dans tous les cas, l'autopsie a révélé une gastro-entérite hémorragique et une néphrite parenchymateuse, ce qui suggère que la pathologie rénale peut être secondaire à la déshydratation (Steenkamp et Stewart, 2005; Baudoux et Nortier, 2017). Un cas d'insuffisance rénale aiguë après l'ingestion d'un remède à base de plantes contenant de l'aloès du Cap comme traitement de la constipation a été observé (Luyckx *et al.*, 2002). Les produits comme le chromone C-glucoside et un dérivé

r-coumaroyl, qui sont structurellement apparentés à l'aloésine et à l'aloésine A, respectivement ont été détectés dans les préparations d'aloès (**Kumar et Yadav, 2014; Wang et al., 2017**). Ces produits toxiques se seraient formés par dégradation oxydative pendant la préparation du remède ou pendant le stockage.

### **3-3- Cœur**

#### **3-3-1- Anatomie du cœur**

Le cœur est un muscle creux dont la fonction de pompe permet la circulation du sang dans tout l'organisme. Il est divisé en deux parties: le cœur droit et le cœur gauche séparés par le septum cardiaque. Chaque partie comprend une oreillette et un ventricule (**Figure 5**). Le cœur gauche reçoit le sang provenant des poumons par les veines pulmonaires et l'irrigue ensuite dans l'ensemble de l'organisme via l'artère aorte. Le cœur droit quant à lui, reçoit le sang provenant de la circulation générale par les veines caves supérieure et inférieure et l'éjecte dans les poumons via l'artère pulmonaire afin qu'il soit réoxygéné (**Waugh et Grant, 2010**).

#### **3-3-2- Fonctions du cœur**

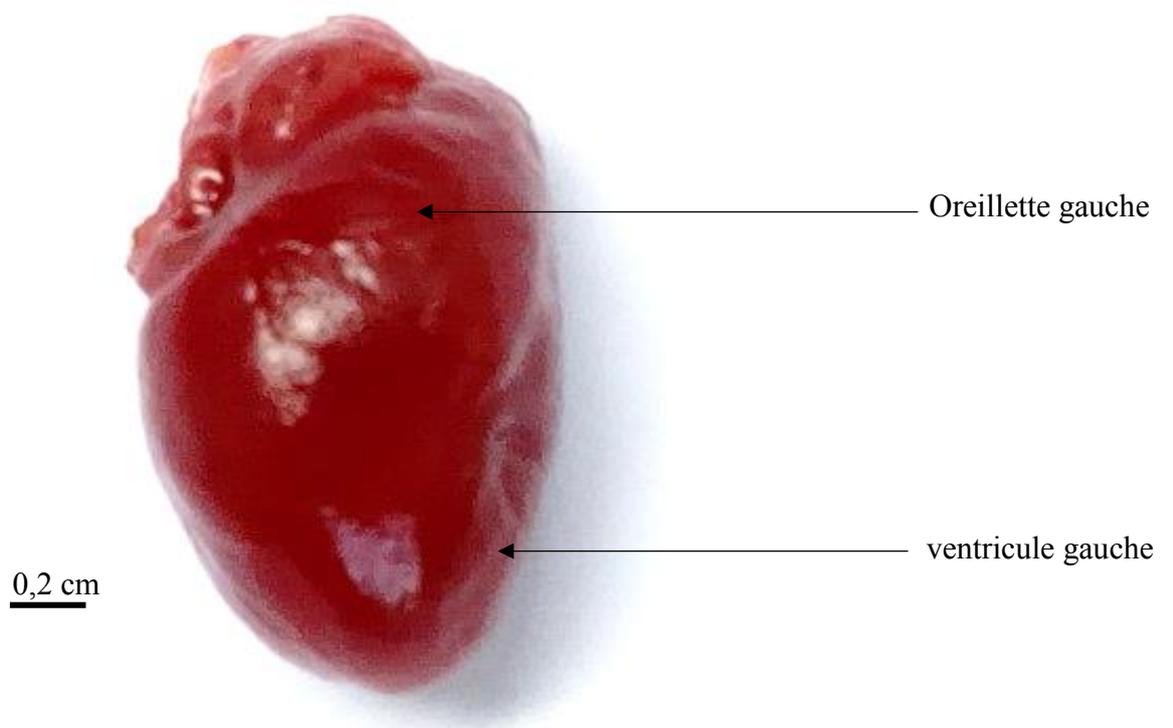
Le rôle du cœur est d'assurer la circulation sanguine dans l'organisme. Son fonctionnement est cyclique. Il se compose de phénomènes électriques et mécaniques.

##### **3-3-2-1- Phénomènes électriques de l'activité cardiaque**

Les phénomènes électriques de l'activité cardiaque se composent de l'automatisme, de l'excitation et de la conduction.

L'automatisme est l'aptitude des cellules du tissu nodal à s'auto-exciter; c'est-à-dire leur capacité à générer périodiquement un potentiel d'action (PA) en dehors de toute stimulation extérieure.

Ces cellules présentent des dépolarisations membranaires spontanées (potentiel de repos instable) qui amènent le potentiel de membrane à un seuil qui déclenche l'apparition d'un potentiel d'action (PA).



**Figure 5** : Photographie de cœur isolé de rat wistar (**Koudou, 2014**)

Cette particularité unique que possèdent ces cellules est due à leurs propriétés membranaires. La dépolarisation rapide dans le nœud sinusal dépend des canaux calciques alors que dans les cellules de Purkinje, ce sont les canaux sodiques qui jouent ce rôle. L'automatisme cellulaire peut être influencé par les modulateurs des courants potassiques, sodiques et calciques.

L'excitabilité est la capacité d'une cellule myocardique à produire ou à générer un potentiel d'action en réponse à une stimulation par un courant de dépolarisation. Elle dépend des courants ioniques sodiques dans les oreillettes, les ventricules et le système His-Purkinje et des courants calciques dans les nœuds sinusaux et auriculoventriculaires (**Waugh et Grant, 2010**).

La conductibilité est la capacité des cellules de Purkinje à propager l'onde de stimulation née au niveau des cellules nodales dans le myocarde auriculaire et ventriculaire. Elle s'explique par l'existence de potentiel de repos instable dans ces cellules qui est lié aux variations progressives des perméabilités ioniques notamment sodique et potassique (**Waugh et Grant, 2010**).

### **3-3-2-2- Phénomènes mécaniques de l'activité cardiaque**

Le fonctionnement cardiaque est cyclique. Ce cycle est composé d'une période de contraction et d'une période de repos. La période de contraction ou systole est la période au cours de laquelle les deux ventricules se contractent simultanément pour éjecter le sang dans l'aorte et dans l'artère pulmonaire. La période de relaxation ou diastole est la période au cours de laquelle les deux ventricules se relâchent pour pouvoir se remplir à nouveau du sang qui provient des oreillettes.

Le mécanisme de la contraction se déroule en deux phases que sont l'induction de la contraction et la contraction des myofibrilles. L'induction de la contraction consiste en la libération du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique par une entrée du calcium dans la cellule. En effet, à chaque battement, la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes active les canaux calciques de type L situés sur de longues invaginations appelées tubules T, ce qui permet l'entrée du calcium. Les récepteurs à la ryanodine (RyR) des réticulums sarcoplasmiques en contact avec les tubules T sont par la suite excités par du calcium entrant. Cette excitation entraîne une sortie massive du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique (RS) par un mécanisme appelé "calcium induced-calcium release" (**Waugh et Grant, 2010**). La contraction des myofibrilles consiste au raccourcissement des sarcomères des fibres musculaires.

En effet, les sarcomères qui représentent les unités de base contractiles des myofibrilles sont composés d'un faisceau de myofilaments. Il existe notamment deux types de filaments permettant la contraction des fibres musculaires: les filaments fins constitués d'actine, et les filaments épais essentiellement constitués de myosine. Chaque sarcomère est constitué de filaments fins et de filaments épais et est relié à l'autre par un complexe protéique appelé disque Z. Au repos, lorsque la concentration intracellulaire en calcium est faible, le complexe de protéines régulatrices « tropomyosine-troponine » s'intercale entre les sites actifs de liaison myosine/actine. Lors du "calcium induced-calcium release", le calcium libéré se fixe sur la troponine C, ce qui libère sur l'actine, le site réservé à la tête de la myosine. Ainsi, des liaisons actine-myosine appelées ponts d'union se forment en présence d'ATP. Pour chaque pont, la tête de myosine pivote et entraîne dans son mouvement le filament d'actine et raccourcit ainsi le sarcomère. Le raccourcissement des sarcomères est alors responsable de la contraction cardiaque (**Waugh et Grant, 2010**).

### **3-3-3- Cardiotoxicité liée à la phytothérapie**

En zones tropicales et intertropicales où il n'existe pas ou peu de centres anti poisons, la fréquence des intoxications par des plantes médicinales est mal connue. Cependant, certaines plantes ont été incriminées dans la survenue des intoxications cardiaques (**Aubry, 2012**).

#### **3-3-3-1- Plantes médicinales cardiotoxiques contenant des glycosides cardiaques**

Les glycosides cardiaques, qui sont hautement toxiques et qui se trouvent dans un certain nombre de plantes, sont habituellement des composés phytochimiques constitués d'un aglycone (structurellement apparenté aux hormones stéroïdiennes) lié à une ou plusieurs molécules de sucre. Les aglycones des glycosides cardiaques peuvent être divisés en deux groupes chimiques que sont: les cardénolides et les bufadienolides. Le premier groupe est le plus impliqué dans la cardioactivité. Les effets des glucosides cardiotoniques résultent essentiellement de l'inhibition de la pompe Na/K-ATPase qui entraîne une hyperkaliémie et une élévation de la concentration de sodium à l'intérieur de la cellule. Cette augmentation de sodium entraîne à son tour une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, soit en inhibant l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> lorsqu'il fait entrer le sodium (trois ions Na<sup>+</sup>) et sortir le calcium (un ion Ca<sup>2+</sup>), soit encore en l'activant lorsqu'il fonctionne dans le sens inverse, en faisant entrer le calcium et sortir le sodium. Cet échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> est particulièrement actif au niveau du myocarde (**Lapostolle, 2013**). De nombreuses plantes contenant des glycosides cardiaques ont toujours été connues pour être toxiques pour les animaux et les humains.

➤ ***Digitalis purpurea* (Scrophulariaceae)**

La référence des intoxications par les plantes est celle induite par les plantes contenant des hétérosides cardiotoniques. La plus connue étant *Digitalis purpurea*, couramment appelée la digitaline pourpré, plante de la famille des Scrophulariaceae. La partie toxique est la feuille et la substance toxique est la digitoxine appartenant à la famille des hétérosides cardiotoxiques. La digitoxine agit en inhibant la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase membranaire. Son intoxication entraîne essentiellement des troubles cardiaques tels que les effets inotropes positifs, chronotropes et dromotropes négatifs (**Flesch, 2012**)

➤ ***Nerium oleander* (Apocynaceae)**

*Nerium oleander* ou laurier rose est une plante décorative et utilisée à des fins curatives, notamment pour le traitement de l'insuffisance cardiaque, de la lèpre, du paludisme et des maladies vénériennes. Pour autant, il s'agit d'une plante toxique (**Fieni et Arcade, 2017**). La toxicité du laurier rose est liée à des hétérosides cardiotoniques. La principale molécule est l'oléandrine, mais le laurier rose contient aussi de la nériine et de la digitoxigénine. Ces hétérosides cardiotoniques du laurier rose agissent de manière similaire aux digitaliques. Ils inhibent la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, induisant une augmentation intracellulaire du calcium et une hyperkaliémie (**Lapostolle, 2013**). L'intoxication au laurier rose se manifeste principalement par des manifestations cardiaques avec des anomalies comme la bradycardie, le bloc de conduction et le trouble du rythme ventriculaire. Les intoxications sont le plus souvent accidentelles et concernent les enfants et les animaux (**Page et Murtaugh, 2015; Butler et al., 2016; Gopalakrishnan et al., 2017**).

### 3-3-3-2- Plantes médicinales cardiotoxiques contenant des alcaloïdes

➤ **Genre *Datura***

*Datura stramonium*, *Datura metel*, *Datura inoxia*, *Datura seratocaula*, *Datura aurea*, *Datura candida*, *Datura dolichocarpa*, et *Datura sanguinea* sont utilisés pour leurs propriétés psychotropes et hallucinogènes. Ces plantes contiennent des alcaloïdes (hyoscyamine, scopolamine, atropine) qui sont souvent utilisés comme médicament, poison ou antidote. Des empoisonnements d'êtres humains par des plantes contenant des alcaloïdes tropaniques tels que l'atropine et la scopolamine peuvent se produire par des surdoses involontaires (**Adamse et al., 2014**). Ces alcaloïdes sont des anticholinergiques. Ils induisent un rythme cardiaque plus rapide que la normale (une tachycardie).

➤ ***Atropa belladonna* (Solanaceae)**

*Atropa belladonna* est originaire d'Afrique du Nord et d'autres parties du monde. Les alcaloïdes du tropane de *belladonna* étaient utilisés comme poisons, et les premiers humains fabriquaient des flèches empoisonnées à partir de la plante. Il a également une longue histoire d'utilisation en tant que médicament et cosmétique (**Schmeller 1998**). L'intoxication mortelle à *Atropa belladonna* a été rarement rapportée chez les enfants et les adultes dans la littérature. La tachycardie, un dysfonctionnement du cœur, est l'un des symptômes signalés (**Çaksen et al., 2003**).

➤ **Genre *Aconitum* (Ranunculaceae)**

*Aconitum anthora*, *Aconitum ferox*, *Aconitum lycoctonum*, *Aconitum napellus*, ou aconits sont des espèces de plantes vivaces herbacées à souche tubéreuse qui mesurent 60 à 120 cm, et dont les feuilles d'un vert sombre sont palmées avec des divisions lobées. Malgré la toxicité bien connue et la faible marge de sécurité, les tubercules aconitiques et leurs produits transformés restent populaires dans les médicaments orientaux ou homéopathiques pour le traitement des rhumatismes, des névralgies et des affections cardiaques.

Des empoisonnements graves et des décès dus à l'ingestion de plantes médicinales contenant de l'aconitine ont été signalés dans les régions tempérées de l'hémisphère nord (**Wu et al., 2018**). Les symptômes d'intoxication incluent une faiblesse généralisée à déclenchement rapide, une gêne thoracique, une hypotension et des arythmies. En cas d'intoxication sévère, survient une tachycardie ventriculaire potentiellement mortelle, si elle n'est pas traitée (**Tak et al., 2016**). La toxicité des aconits est liée aux alcaloïdes C19-norditerpénoïdes comme l'aconitine, la désoxyaconitine, la mesaconitine, l'hypaconitine et la yunaconitine (**Lai et al., 2006**).

#### **4- Marqueurs biochimiques de la biotolérance**

Les marqueurs biologiques sont des caractéristiques mesurées de façon objective et évaluées comme des indicateurs, soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique (**Strimbu et Tavel, 2010**). Ils sont de plus en plus utilisés lors de la phase clinique du développement d'une nouvelle substance naturelle, pharmaceutique ou biologique. Les marqueurs biologiques les plus accessibles et les plus connus sont sans doute les paramètres physiologiques, biochimiques ou moléculaires qui peuvent être détectés dans un tissu ou un fluide biologique. Ils se répartissent en plusieurs groupes selon leurs fonctions (**Tableau III**).

## **4-1- Métabolites**

### **4-1-1- Acide urique**

L'acide urique est un déchet issu de la dégradation de molécules azotées, appelées purines. Ces dernières sont essentielles au renouvellement de l'ADN et de l'ARN des cellules mortes. Le dosage de l'acide urique est prescrit d'une part en cas de goutte, responsable de certaines pathologies telle que l'hypertension, le diabète de type 2, et les maladies cardiovasculaires (**Richette *et al.*, 2014**) et d'autre part en cas de dysfonctionnements rénaux tels que la lithiase rénale (calculs uriques dans les tubules) et la néphropathie urique (dépôt d'acide urique dans les pyramides). Le taux d'acide urique peut augmenter par la consommation d'aliments riches en purine ou en fructose (**Kanbay *et al.*, 2016**).

### **4-1-2- Albumine**

L'albumine est la protéine la plus abondante (60 %) dans le sang. Elle est fabriquée par les hépatocytes, mais peut aussi provenir de l'alimentation (le blanc d'œuf ou le lait). Sa fonction principale est le maintien de la pression osmotique entre les espaces vasculaires et extravasculaires. L'albumine est considérée comme la principale protéine de transport dans le sang. Elle transporte des substances endogènes et exogènes qui sont de petites tailles et qui, seules seraient éliminées par les reins, dont : les acides gras, les ions métalliques, les acides aminés, les médicaments, la bilirubine et les hormones.

Le dosage de l'albumine sanguine est prescrit pour dépister une maladie hépatique ou rénale. Il sert aussi à vérifier la quantité de protéines et du calcium dans le sang. Une augmentation du taux d'albumine est rencontrée uniquement dans le cas de la déshydratation aiguë. Une baisse du taux d'albumine est rencontrée dans le cas de défaut de synthèse liée à la malnutrition, à l'élimination excessive due à une protéinurie ou une combinaison des deux rencontrée dans les maladies hépatiques (**Caraceni *et al.*, 2013**).

### **4-1-3- Bilirubines**

La bilirubine est un pigment non soluble dans l'eau, issue de la destruction des érythrocytes arrivés au terme de leur vie dans le système réticulo-endothélial. La partie hémique de l'hémoglobine et des autres protéines présentant un hème est séparée, métabolisée en bilirubine et complexé à la sérum albumine puis transportée vers le foie.

**Tableau III : Référence des valeurs usuelles de quelques paramètres biochimiques sériques chez le rat Wistar âgé de 8 à 32 semaines (Giknis et Clifford, 2008)**

Groupes	Paramètres	Unités	Valeurs usuelles
<b>Enzymes</b>	Alanine aminotransférase (ALAT)	UI / L	15 – 90
	Aspartate aminotransférase (ASAT)	UI / L	39-150
	Phosphatase alcaline (PAL)	UI / L	100– 600
	Lactase déshydrogénase (LDH)	UI / L	150-600
	Créatine phosphokinase (CPK)	UI / L	200-900
<b>Métabolites</b>	Glucose	g / L	0,50 – 1,35
	Bilirubine Totale	mg / L	9 – 18
	Bilirubine conjuguée	mg / L	2-6
	Créatinine	mg / L	2 – 8
	Albumine	g / L	35 – 48
<b>Lipides</b>	Cholestérol total	g / L	0,4 – 1,3
	Cholestérol HDL	g / L	0,1-0,3
	Triglycérides	g / L	0,20- 1,14
<b>Electrolytes</b>	Ca <sup>2+</sup>	mg / L	55 – 135
	K <sup>+</sup>	mEq / L	4,3 – 5,6
	Na <sup>+</sup>	mEq / L	135-155
	Cl <sup>-</sup>	mg / L	95-115

Au niveau hépatique, la bilirubine est conjuguée à l'acide glucuronique et devient soluble dans l'eau. Ceci permet son transport par le canal biliaire et son élimination via le tractus digestif. Lorsque le processus hémolytique produit plus rapidement de la bilirubine que le foie ne peut en métaboliser ou dans le cas d'altération du mécanisme de conjugaison, on assiste à une augmentation du taux de bilirubine non conjuguée circulant encore appelée bilirubine indirecte (**Sticova et Jirsa, 2013**). Une obstruction du canal biliaire ou une altération de la structure hépatocellulaire entraîne à la fois une augmentation des taux de bilirubine directe ou conjuguée et de bilirubine non conjuguée dans la circulation. L'ensemble de ces deux fractions de bilirubine constitue la bilirubine totale. Le dosage de la bilirubine sanguine est prescrit pour dépister les affections hépatobiliaires ou les syndromes hémolytiques caractérisés par une destruction anormale des globules rouges.

#### **4-1-4- Créatinine**

La créatinine est issue de la dégradation de la créatine, elle-même synthétisée par le foie et stockée dans les muscles où elle joue un rôle important dans la production d'énergie. Sous sa forme phosphorylée (créatine-phosphate ou phosphagène), la créatine est une source de régénération rapide de l'ATP indispensable pour la contraction musculaire (**d'Ythurbide et Hertig, 2012**). La créatinine formée, est transportée par le sang, filtrée par les reins et est éliminée dans les urines. Elle est considérée depuis longtemps comme le meilleur marqueur endogène de la filtration glomérulaire (**Serrano et al., 2015**). Une faible quantité est sécrétée par les tubules dans l'urine et une autre quantité négligeable est réabsorbée. La créatinine est donc considérée comme une forme d'élimination de la créatine. Chez un sujet donné, elle est éliminée en quantité relativement constante, à raison de 1 à 4 g/jour, en relation avec la masse totale de muscles. Le taux de créatinine est constant chez un individu et peut varier aussi dans certaines situations de dysfonctionnement métabolique. Ce taux peut varier aussi dans les conditions normales après une alimentation riche en protéines. Les augmentations de la créatininémie sont observées au cours d'une insuffisance rénale, dans les dystrophies musculaires paralytiques, les anémies, les leucémies, l'hyperthyroïdisme alors que les diminutions sont notées dans les glomérulonéphrites, les insuffisances cardiaques congestives, les nécroses tubulaires aiguës (**Gowda et al., 2010**).

#### 4-1-5- Glucose

Le glucose est le composé biochimique le plus abondant et le plus répandu parmi les oses. Il est retrouvé à l'état libre dans les liquides biologiques des végétaux et des mammifères tel que le sang (glycémie).

Chez l'homme, il représente la quasi-totalité des sucres réducteurs du sang. Le métabolisme du glucose permet la mise en réserve de l'énergie sous forme d'ATP, indispensable à l'organisme. Le glucose constitue également l'élément de soutien participant à la structure du tissu conjonctif. Le glucose sanguin chez l'homme a deux sources:

-l'apport exogène (alimentation) peut être utilisé pour les besoins énergétiques au cours de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Il peut être également stocké sous forme de glycogène qui est une réserve énergétique localisée au niveau des cellules du foie et des muscles au cours de la néoglucogenèse ou de la glycogenèse;

-l'apport endogène provient de la glycogénolyse, la néoglucogenèse et la lipogenèse (**Stark et Kibbey, 2014**). Les variations pathologiques se manifestent par les hyperglycémies pouvant aboutir au diabète sucré provoquée par un manque et/ou la résistance à l'action d'insuline (**OMS, 2016**) ou par des hypoglycémies. Toutefois, la baisse profonde de la glycémie ne s'observera qu'au cours des grandes destructions du foie.

#### 4-2- Lipides sériques

##### 4-2-1- Triglycérides

Les triglycérides (TG) sont des esters d'acides gras et d'un alcool, le glycérol. Les TG sériques proviennent d'une part, des chylomicrons issus de la digestion et d'autre part, d'une synthèse hépatique. En dépit de leur origine, l'incorporation des triglycérides dans les lipoprotéines est réalisée par le foie (**Andreelli et Jacquier, 2006**). Les triglycérides, constituants les plus abondants du tissu adipeux, sont une réserve d'énergie pour l'organisme. Les variations physiologiques des triglycérides sont observées après un repas riche en lipides. Les variations pathologiques sont caractérisées par les dyslipidémies dues à une augmentation de la synthèse hépatique des VLDL et à un ralentissement de leur catabolisme (**Vergès, 2017**). Le dosage des triglycérides est prescrit dans le cadre d'un bilan lipidique utilisé pour évaluer le risque de développer une maladie cardiaque. En effet, une hypertriglycéridémie favorise la formation de plaques d'athérome qui augmentent les risques cardiovasculaires et thrombotiques (formation de caillots), surtout en présence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypertension, la sédentarité ou l'obésité.

#### **4-2-2- Cholestérol**

Le cholestérol est un des constituants des lipides sanguins. Il fait partie des substances fondamentales de l'organisme humain et est un composant de tous les tissus humains. Le cholestérol joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. Il a deux origines:

- une origine exogène par l'intermédiaire des aliments tels que la viande, le foie, les produits laitiers, le jaune d'œuf;

- une origine endogène par la synthèse hépatique et par l'intestin, les corticosurrénales, les gonades et la peau.

Le cholestérol est présent dans le sang sous deux formes : le cholestérol libre et le cholestérol estérifié retrouvé dans le plasma après une estérification dans le foie. Etant un composé hydrophobe, son transport est assuré par des lipoprotéines de faible densité (LDL) et par les lipoprotéines de haute densité (HDL). Le cholestérol joue de multiples fonctions chez l'homme. Outre son rôle structural de la membrane cellulaire, il est aussi le précurseur de la vitamine D et des hormones stéroïdes surrénaliennes et gonadiques. Enfin, il participe à la constitution de la bile. Les variations physiologiques sont observées dans les hypocholestérolémies ou les hypercholestérolémies pouvant provoquer la survenue des événements cardio-neuro-vasculaires (**Hansel et Giral, 2015**). Le LDL-cholestérol est la fraction la plus athérogène du cholestérol : en excès, il tend à s'accumuler dans la paroi artérielle et à favoriser le développement de la plaque d'athérome. Le passage du sang est perturbé, ce qui augmente le risque d'hypertension artérielle. La rupture d'une plaque d'athérome peut également conduire à un infarctus du myocarde, à un accident vasculaire cérébral (AVC) ou à une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI).

A l'inverse, le HDL-cholestérol récupère l'excès de cholestérol libre des tissus périphériques, permet son estérification en partie par la lécithine cholestérol-acyl-transférase (LCAT) et l'échange contre des triglycérides des LDL. Il ramène au foie les triglycérides des LDL et l'autre partie du cholestérol libre. Au niveau du foie le cholestérol libre peut alors être éliminé dans la bile ou servir à la synthèse des acides biliaires. Le HDL-cholestérol, est donc antiathérogène puisqu'il épure l'excès de cholestérol. Cette fraction du cholestérol est associée à une diminution du risque vasculaire lorsqu'elle est élevée, mais à une augmentation de ce risque quand elle est trop faible (**Vergès, 2017**).

#### **4-3- Enzymes**

L'évaluation quantitative de certaines enzymes dans le sérum a pris, depuis quelques années, une importance considérable en médecine humaine. On s'y intéresse dans tous les syndromes cardiaques, hépatiques, pancréatiques, prostatiques, dans les anémies, les leucoses,

les atteintes musculaires et les tumeurs. Il existe normalement dans le sérum d'un sujet sain des enzymes à des taux relativement constants. Leur répartition quantitative et qualitative au sein des cellules, des tissus et des organes varie considérablement. Mais, dès qu'un organe ou un tissu est lésé sous une influence quelconque telles les inflammations, les infections, les anoxies locales, les nécroses, les intoxications, les enzymes solubles présentes dans les cellules de ce tissu ou de cet organe, franchissent les limites cellulaires, passent dans les liquides interstitiels puis dans le sérum. Il en résulte une augmentation du taux des enzymes sériques dont la quantité est en première approximation proportionnelle à la masse de cellules détruites et leur nature reflète l'équipement enzymatique de l'organe ou du tissu lésé. Les enzymes solubles dans le cytoplasme sont libérées plus facilement que celles des organites subcellulaires.

L'intérêt diagnostique d'une telle étude est qu'elle permet la connaissance de l'organe ou du tissu lésé et peut même fournir des indications sur l'étendue et la gravité des lésions (dégâts) et sur leur évolution. Il faut cependant noter que certaines enzymes peuvent diffuser hors de la cellule, alors que les signes de nécrose sont minimes, ce qui fait de la sémiologie enzymatique, une sémiologie très fine. L'élévation du taux sérique des enzymes n'est jamais un processus définitif. Les enzymes sont progressivement catabolisées et éliminées (**Valdiguie et al., 2000; Kaneko et al., 2008**).

#### **4-3-1- Transaminases**

Les transaminases sont des enzymes cytosoliques qui assurent le transfert de groupements aminés à partir de l'alanine (ALAT) et de l'acide aspartique (ASAT), pour former les acides pyruvique et oxaloacétique. Les transaminases sont les enzymes les plus spécifiques de la cytolysse hépatique. L'alanine aminotransférase (ALAT) ou Transaminase glutamo-pyruvique (TGP) est présente essentiellement dans les hépatocytes, et accessoirement dans les muscles et le rein. L'aspartate aminotransférase (ASAT), ou « sérum glutamo-oxaloacétique transférase (SGOT)» a une distribution beaucoup plus large, dans le foie mais aussi dans le cœur, les reins, les muscles squelettiques et le cerveau (**Hall et Cash, 2012; Hall et al., 2017**). Un dosage des transaminases est prescrit en cas de suspicion de lésion cellulaire hépatique, cardiaque, rénale ou musculaire.

#### **4-3-2- Créatine phosphokinase**

La Créatine Phosphokinase (CPK) est présente dans les muscles squelettiques, cardiaques mais aussi en faible proportion dans le cerveau, les reins, les poumons, l'estomac et le corps thyroïdien. Elle catalyse le transfert d'un phosphate de l'ATP sur la créatine.

L'organisme utilise ensuite la phosphocréatine formée pour fournir de l'énergie aux cellules. Une élévation de l'activité de la CPK est observée dans les cas d'atteintes cardiaques, musculaires, cérébrale, les électrochocs, l'alcoolisme, le coma prolongé (**Grados et Schleinitz, 2017**).

#### **4-3-3- Lactate déshydrogénase**

La Lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate. En anaérobie, elle hydrolyse le glucose en lactate. Les variations pathologiques se manifestent par des augmentations observées dans les atteintes cardiaques, les atteintes hépatiques, les anémies, les atteintes musculaires, les atteintes pulmonaires, les atteintes rénales, les atteintes pancréatiques au cours de la production des cellules sanguines (**Adeva et al., 2014**).

#### **4-3-4- Phosphatases alcalines**

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des hydrolases qui clivent une liaison phosphoester en libérant un groupe hydroxyle et un phosphate. Les PAL est présentent dans tous les tissus de l'organisme, mais sont particulièrement concentrées dans le foie, les voies biliaires, le rein, les os et le placenta. Les PAL sont liées aux membranes cellulaires. Elles sont impliquées dans le transport de métabolites à travers les membranes. Dans l'intestin, elles contrôlent l'homéostasie et la flore intestinale. Dans le foie, elles permettent la formation de bile en contrôlant la fonction biliaire (**Poupon, 2015**). Les augmentations pathologiques des PAL sont observées dans les atteintes osseuses, rénales, hépatiques, les voies ou canalicules biliaires et les infections extra hépatiques. Leurs diminutions, quant à elles, sont le reflet des anémies, des défaillances nutritionnelles, des expositions aux irradiations et médicaments (**Poupon, 2015**).

#### **4-4- Electrolytes**

Les électrolytes sont des ions en solution dans presque tous les liquides de l'organisme. Ils jouent un rôle dans la plupart des fonctions métaboliques de l'organisme. Le sodium, le potassium, le calcium et le chlore comptent parmi les ions physiologiques les plus importants et sont les électrolytes les plus souvent mesurés. Leur apport est essentiellement alimentaire. Ils sont absorbés par le tractus gastro-intestinal et excrétés par voie rénale (**Port, 2015**).

#### **4-4-1- Calcium**

Le calcium est le minéral le plus abondant dans l'organisme. Il est présent à 99 % dans les os, principalement sous forme d'hydroxyapatite. Le calcium résiduel se situe au niveau des différents tissus et des fluides extracellulaires où il joue un rôle fondamental dans de nombreux processus vitaux. En ce qui concerne les fonctions extra-squelettiques, le calcium intervient dans la coagulation sanguine, dans la conduction neuromusculaire, dans l'excitabilité des muscles squelettique et cardiaque. Il intervient également dans l'activation enzymatique et dans le maintien de l'intégrité et de la perméabilité de la membrane cellulaire. Les taux sériques de calcium, et par conséquent la quantité de calcium présente dans l'organisme, sont contrôlés par l'hormone parathyroïdienne (PTH), la calcitonine et la vitamine D. Le déséquilibre d'un de ces modulateurs conduit à une altération des taux calciques dans le sérum et l'organisme. Une augmentation des taux de PTH ou de vitamine D dans le sérum sont généralement associés à une hypercalcémie (**Burtis *et al.*, 2006**).

#### **4-4-2- Chlore**

Le chlore est le principal anion extracellulaire. Le rôle essentiel du chlore est de maintenir l'électroneutralité. Il sert à réguler la distribution des fluides extracellulaires. La diminution des taux de chlore est liée à une réduction de l'apport de chlore dans l'alimentation, des vomissements répétés, une baisse de la réabsorption rénale, ainsi que certaines formes d'acidose et d'alcalose. Les taux de chlore augmentent en cas de déshydratation, d'insuffisance rénale, d'apport de chlore élevé par l'alimentation ou par voie parentérale et d'intoxication par les salicylés (**Port, 2015**).

#### **4-4-3- Potassium**

Le potassium est le principal cation intracellulaire. Il joue un rôle essentiel dans l'activité neuromusculaire. La baisse du taux de potassium est liée à une réduction de l'apport potassique dans l'alimentation ou une déplétion potassique due à des vomissements répétés, des diarrhées ou une augmentation de l'excrétion rénale. L'augmentation du taux de potassium peut être due à une déshydratation, à un choc, à de graves brûlures, à une acidocétose diabétique ou à une rétention de potassium par les reins (**Gumz *et al.*, 2015**).

#### **4-4-4- Sodium**

Le sodium est le principal cation du milieu extracellulaire et sa fonction est d'y maintenir la distribution de l'eau et la pression osmotique. La baisse du taux de sodium est parfois provoquée par des vomissements prolongés ou des diarrhées, une baisse de la réabsorption rénale ou une rétention excessive de liquide. L'augmentation du taux de sodium est généralement due à une perte de liquide excessive, la consommation excessive de sel ou une augmentation de la réabsorption rénale (**Port, 2015**).

## **II-MATERIEL ET METHODES**

## **1- MATERIEL**

### **1-1- Matériel végétal**

Le matériel végétal est constitué des feuilles de *H. floribunda* de la famille des Apocynaceae. La plante a été identifiée au spécimen UCJ002027 du 06/12/1978 de *H. floribunda* du Centre National de floristique (CNF) de l'Université Félix Houphouët Boigny d'Abidjan.

### **1-2- Matériel animal**

Le matériel animal est constitué de 60 rats mâles et femelles, de l'espèce *Rattus norvegicus*, de souche *Wistar*, âgés de six à huit semaines et pesant entre 90 et 127 g.

### **1-3- Matériel de laboratoire**

#### **1-3-1- Appareillage**

Plusieurs appareils ont été utilisés pour la réalisation de cette étude. Il s'agit entre autres, d'un broyeur de marque Retsch® type SM100 GmbH (Allemagne), d'une balance électrique Sartorius® (Allemagne), d'un agitateur magnétique US152D de marque Stuart® (France), d'un évaporateur rotatif R-III-Buchi® BUC-1103011V0 (France), d'une étuve JP-Selecta®, Digiheat-TFT (Espagne), d'un congélateur de marque Liebherr premium (Allemagne). Une centrifugeuse Jouan® DR4i (Allemagne), un automate de type Cobas C311 (Allemagne), un analyseur AVL 9180 (Allemagne), un microtome rotatif de marque Shandon®, AS 325, une plaque métallique réfrigérée Axel Johnson Labssystem® ont été également utilisés. Un bac à paraffine Axel Johnson Labssystem®, un microscope optique binoculaire de marque Motic® (Chine), surmonté d'un appareil photographique de marque AmScope®, FMA050 ont servi dans cette étude.

#### **1-3-2- Accessoires de laboratoire**

Le petit matériel est constitué de coton hydrophile, de papier filtre, d'une ampoule à décanter, d'une sonde de gavage, de tubes secs, de glucomètre de marque Accu-Chek Active (Roche Diagnostique), des bandelettes pour glucomètre, des micropipettes, des portoirs, etc...

## 2- METHODES

### 2-1- Préparation de l'extrait de plante

#### 2-1-1- Récolte, séchage et préparation de la poudre des feuilles de *Holarrhena floribunda*

La récolte des feuilles de *Holarrhena floribunda* a été effectuée entre juin et novembre 2013 à Rubino dans le département d'Agboville, situé au Sud- Est de la Côte d'Ivoire. Les feuilles ont été triées, lavées et séchées au laboratoire, à l'abri du soleil et à température ambiante ( $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ ) pendant deux semaines. Elles ont ensuite été réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur de marque Resth®.

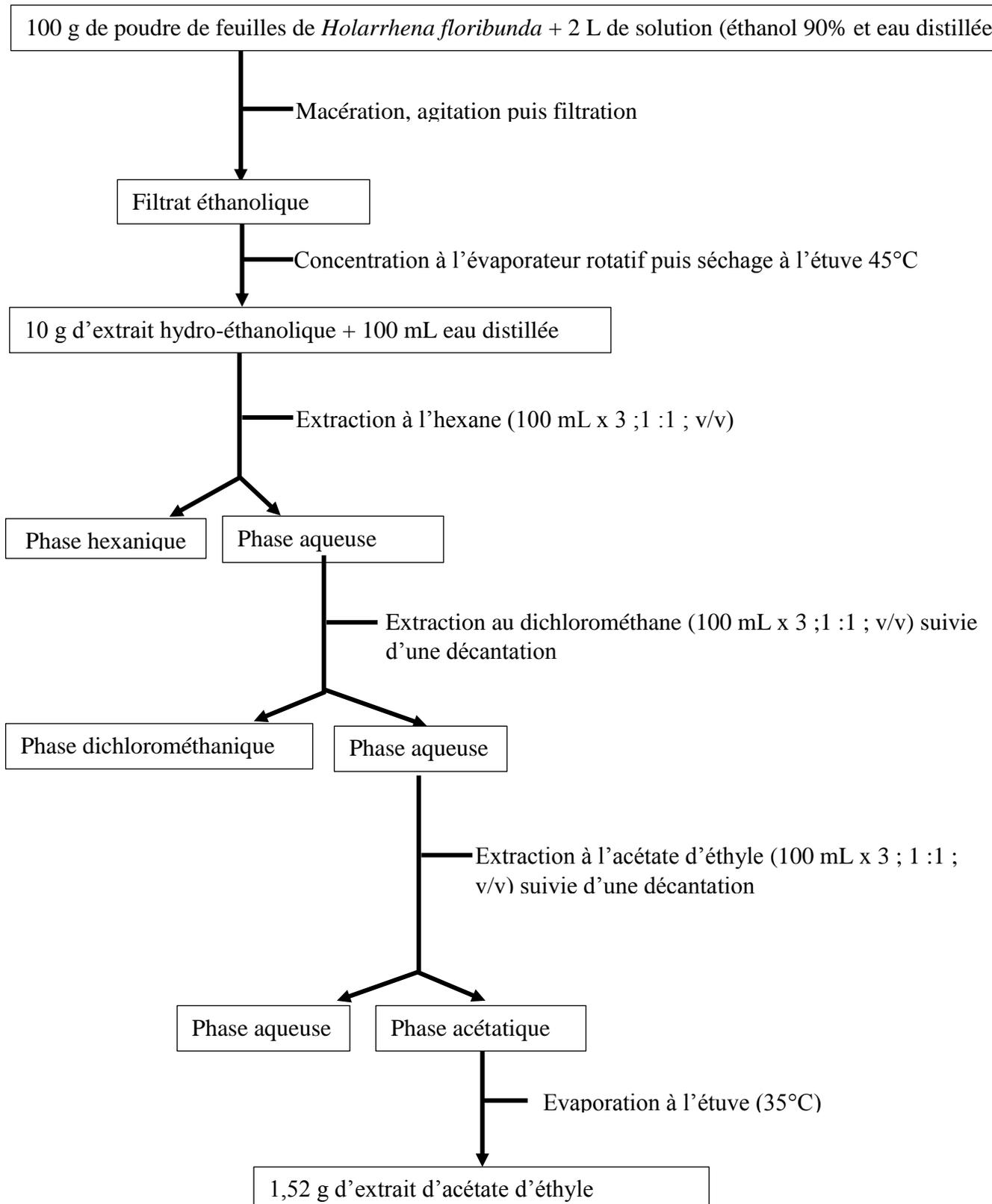
#### 2-1-2- Préparation de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda*

La préparation de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* a été obtenue selon la méthode décrite par **Gnangoran (2012)**. Elle a consisté à dissoudre Cent (100) grammes de poudre des feuilles de *H. floribunda* dans 2 L d'un mélange (éthanol 96 % et eau distillée dans les proportions (80 :20 ; v/v). La solution de mélange de 76,8 % d'éthanol obtenue a été macéré sous agitation magnétique pendant 48 heures. Le macéré a été filtré sur du coton hydrophile puis sur du papier Wattman numéro 1. Le filtrat a été évaporé à  $45^{\circ}\text{C}$  sous vide avec un évaporateur rotatif (Bucchi) pendant 30 minutes puis séché à l'étuve à  $45^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures.

Dix (10) gramme de la nouvelle poudre (extrait éthanolique) ont été introduits dans 100 mL d'eau distillée. La solution aqueuse obtenue a été d'abord mélangée avec 3 x 100 mL d'hexane (1:1) sous agitation magnétique pendant 30 minutes. Après homogénéisation, le mélange obtenu a été décanté dans une ampoule et la phase hexanique a été séparée de la phase aqueuse. La phase aqueuse a été reprise successivement, selon la même opération, par le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. La phase acétatique a été évaporée et séchée à l'étuve à  $35^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. La poudre obtenue a constitué l'extrait d'acétate d'éthyle (**Figure 6**).

### 2-2- Etude de toxicité subchronique

L'étude de la toxicité subchronique a été conduite suivant le protocole la ligne directrice 408 de l'Organisation pour Coopération et du Développement Economique (**OCDE, 1998**).



**Figure 6** : Schéma synoptique de l'obtention de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* (Gnangoran, 2012)

### 2-2-1- Conditionnement des rats

Les rats Wistar ont été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Physiologie, Pharmacologie et Pharmacopée de l'Université Nangui Abrogoua (UNA). Dès leur sevrage et sexage, ils ont été placés dans des cages dont le fond était tapissé de copeaux, renouvelés tous les trois jours. Ils ont été acclimatés à la température ambiante et soumis à une alternance naturelle de jour et de nuit correspondant à 12 heures de jour et 12 heures de nuit avant toute expérimentation. Ils ont eu un libre accès à l'eau et aux granulés fabriqués par la société IVOGRAIN®. Le protocole expérimental et les procédures de manipulation animale ont été menés selon les bonnes pratiques de laboratoire (OCDE, 1998).

### 2-2-2- Expérimentation

A l'âge de 6 à 8 semaines, 60 d'entre eux ont été individuellement marqués à l'aide d'un marqueur indélébile. Ces marquages ont été renouvelés chaque semaine par mesure de précaution. Les rats ont été répartis de manière homogène dans deux groupes :

-le groupe de l'étude principale : dans ce groupe, 40 rats ont été répartis de manière homogène en lots témoin et lot expérimental composés chacun de 10 rats mâles et de 10 femelles. Les rats du lot témoin ont reçu quotidiennement par gavage de l'eau distillée à raison de 2 mL /100 g. pendant 90 jours. Ceux du lot expérimental, ont reçu quotidiennement par gavage la dose de 1000 mg/kg de poids corporel de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* à raison de 2 mL /100 g pendant 90 jours.

-le groupe de l'étude de la réversibilité : dans ce groupe, 20 rats ont été répartis de manière homogène en lots témoin et lot expérimental composés chacun de 5 rats mâles et de 5 femelles. Les rats du lot témoin ont reçu quotidiennement par gavage de l'eau distillée à raison de 2 mL /100 g. pendant 90 jours. Ceux du lot expérimental, ont reçu quotidiennement par gavage la dose de 1000 mg/kg de poids corporel de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* à raison de 2 mL /100 g pendant 90 jours.

La seule dose de 1000 mg/kg de pc a été choisie en rapport avec les travaux antérieurs effectués par **Gnangoran (2012)**; **N'guessan et al. (2015)**; **Kouassi et al. (2017)** sur la toxicité aiguë et la toxicité subaiguë.

## 2-2-3- Etude biochimique

### 2-2-3-1- Prélèvements sanguins

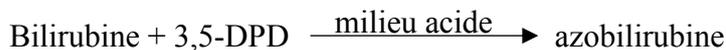
Un à deux millilitres de sang ont été prélevés avec des bouts de pipettes pasteurs au niveau du sinus retro- orbital chez ces rats préalablement anesthésiés avec de l'éther. Le sang a été prélevé dans des tubes secs aux temps J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub>, J<sub>21</sub>, J<sub>28</sub>, J<sub>60</sub>, et J<sub>90</sub> (étude principale) et aux temps J<sub>0</sub> et J<sub>120</sub> (étude de la réversibilité). Le sang prélevé a été centrifugé à 3000 tours/min pendant 5 minutes. Le sérum obtenu a été utilisé pour la détermination des activités enzymatiques, des concentrations des différents métabolites biochimiques et des électrolytes.

### 2-2-3-2- Marqueurs spécifiques du foie

#### 2-2-3-2-1- Bilirubine directe

➤ Principe

La bilirubine directe (ou bilirubine conjuguée) réagit directement avec le sel de dichloro-3,5 phényldiazonium (3,5-DPD) dans un tampon acide pour former l'azobilirubine de couleur rouge. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en bilirubine directe et mesurée par photométrie (**Malloy et Evelyn, 1937**).



➤ Protocole expérimental

Dans un volume de 144 µL de milieu réactionnel composé de 120 µL du réactif R<sub>1</sub> et 24 µL du réactif R<sub>2</sub> préchauffé pendant 2 à 3 minutes à 37°C, ont été ajoutés 6,7 µL de produit à doser constituant ainsi un milieu réactionnel total de 150,7 µL. Après une agitation automatique et une incubation à la température ambiante pendant 5 minutes, les absorbances A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> de chaque tube ont été lues à 546 nm. Une solution de bilirubine directe de concentration connue a été utilisée comme étalon. Les compositions des réactifs R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> se trouvent dans le tableau I de l'annexe.

➤ Expression des résultats

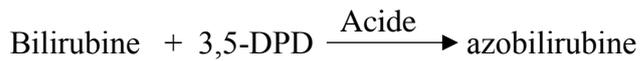
La concentration de la bilirubine directe se calcule comme suit :

Concentration de bilirubine directe (en mg/dL) =	$\frac{(A_2 - A_1) \text{ échantillon}}{(A_2 - A_1) \text{ étalon}} \times 0,64$
Concentration de l'étalon = 0,64 mg/dL.	

### 2-2-3-2-2- Bilirubine totale

➤ Principe

En présence d'un agent solubilisant adapté, la bilirubine totale (bilirubine conjuguée et bilirubine non conjuguée) est couplée au sel de 3,5-dichlorophényl diazonium dans un milieu fortement acide (**Wahlefeld, 1972**).



L'intensité de la coloration rouge développée est directement proportionnelle à la concentration en bilirubine totale et est mesurée par photométrie.

➤ Protocole expérimental

Dans un volume de 144 µL de milieu réactionnel composé de 120 µL du réactif R<sub>3</sub> et de 24 µL du réactif R<sub>4</sub> préchauffé pendant 2 à 3 min à 37°C ont été ajoutés 2 µL de produit à doser constituant ainsi un milieu réactionnel total de 146 µL. Après une agitation automatique et une incubation à la température ambiante pendant 5 minutes, les absorbances A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> de chaque tube ont été lues à 546 nm au spectrophotomètre (intégré). Une solution de bilirubine totale de concentration connue a été utilisée comme étalon. Les compositions des réactifs R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> se trouvent dans le tableau II de l'annexe.

➤ Expression des résultats

La concentration de la bilirubine totale se calcule comme suit :

Concentration de bilirubine total (mg/dL) =	$\frac{(A_2 - A_1) \text{ échantillon}}{(A_2 - A_1) \text{ étalon}}$	X 2,21
Concentration de l'étalon =	2,21 mg/dL	

### 2-2-3-2-3- Alanine aminotransférase

➤ Principe

Les Alanines aminotransférases (ALAT) présentes, dans l'échantillon transfèrent le groupement amine de l'alanine vers l'acide α-céto glutarique et forment l'acide pyruvique et l'acide glutamique. Le pyruvate provenant de l'acide pyruvique formé, est réduit par le NADH, dans une réaction catalysée par les lactates déshydrogénases (LDH), pour former du lactate et du NAD<sup>+</sup>. Cette réaction est suivie à 340 nm en mesurant la diminution de l'absorbance de

l'oxydation de NADH en NAD<sup>+</sup>, qui est proportionnelle à l'activité des ALAT de l'échantillon (Bergmeyer et al., 1986).



➤ Protocole expérimental

Dans un volume de 113 µL de milieu réactionnel composé de 59 µL du réactif R<sub>5</sub> dilué dans 10 µL d'eau distillée, de 18 µL du réactif R<sub>6</sub>, de 17 µL du réactif R<sub>7</sub> dilué dans 9 µL d'eau distillée préchauffé pendant 2 à 3 min à 37°C ont été ajoutés 11 µL de produit à doser (contrôle ou échantillon) préalablement dilué dans 8 µL d'eau distillée, constituant ainsi un milieu réactionnel total de 132 µL à pH 7,8. Après agitation, les densités optiques (DO) obtenues toutes les minutes pendant 4 minutes au spectrophotomètre intégré à la longueur d'onde égale 340 nm, ont permis de déterminer l'activité enzymatique sérique des ALAT. Les compositions des réactifs R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> se trouvent dans le tableau III de l'annexe.

➤ Expression des résultats

L'activité enzymatique des ALAT exprimée à partir de la valeur du facteur des ALAT (F<sub>ALAT</sub> = 1745) et celle de l'onde λ égale 340 nm est :

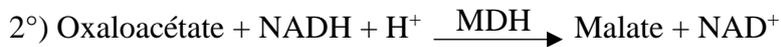
$\text{Activité enzymatique des ALAT (UI/L)} = \frac{\Delta \text{DO}}{\Delta t} \times 1745$ <p>ΔDO : variation de la densité optique</p> <p>Δt : variation du temps</p> <p>Facteur de ALAT = 1745</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### 2-2-3-2-4- Aspartate aminotransférase

➤ Principe

Les Aspartates aminotransférases (ASAT) présentes dans l'échantillon, transfèrent le groupement amine de l'acide-aspartique vers l'acide α-ceto glutarique et forment l'acide oxaloacétique et l'acide-glutamique. L'oxaloacétate formé est réduit par le NADH, dans une réaction catalysée par les malates déshydrogénases (MDH), pour former du malate et du NAD<sup>+</sup>. Cette réaction a été suivie à 340 nm en mesurant la diminution de l'absorbance de l'oxydation

de NADH en NAD<sup>+</sup> qui est proportionnelle à l'activité des ASAT de l'échantillon (**Bergmeyer et al., 1986**).



➤ Protocole expérimental

Dans un volume de 128 µL de milieu réactionnel contenant 40 µL du réactif R<sub>8</sub> dilué dans 51 µL d'eau distillée et 17 µL du réactif R<sub>9</sub> dilué dans 20 µL d'eau distillée, préchauffé pendant 2 à 3 min à 37°C, 9 µL de produit à doser ont été ajoutés constituant ainsi un milieu réactionnel total de 137 µL à pH 7,8. Après agitation, les densités optiques (DO) obtenues toutes les minutes pendant 4 minutes au spectrophotomètre à la longueur d'onde égale 340 nm, ont permis de déterminer l'activité enzymatique sérique des ASAT. Les compositions des réactifs R<sub>8</sub> et R<sub>9</sub> se trouvent dans le tableau IV de l'annexe.

➤ Expression des résultats

L'activité enzymatique des ASAT exprimée à partir de la valeur du facteur des ASAT (F<sub>ASAT</sub> = 1745) et celle de l'onde égale 340 nm est :

$$\text{Activité enzymatique des ASAT (UI/L)} = \frac{\Delta \text{DO}}{\Delta t} \times 1745$$

ΔDO : variation de la densité optique

Δt : variation du temps

Facteur de ASAT = 1745

### 2-2-3-2-5- Phosphatase alcaline

➤ Principe

Il s'agit d'un test colorimétrique. En présence d'ions magnésium et zinc, le p-nitrophénylphosphate (p-NPP) est scindé par les phosphatases alcalines (PAL) en p-nitrophénol et phosphate (**Tietz et al., 1983**). La quantité de p-nitrophénol libérée est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance.



➤ Protocole expérimental

Dans un milieu réactionnel de 138  $\mu\text{L}$  composé de 75  $\mu\text{L}$  du réactif  $R_{10}$  dilué dans 25  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et de 17  $\mu\text{L}$  du réactif  $R_{11}$  dilué dans 21  $\mu\text{L}$  d'eau distillée, porté à 37°C pendant 2 à 3 minutes, 2,8  $\mu\text{L}$  de produit à doser (contrôle et échantillon) ont été ajoutés. Après agitation, les densités optiques (DO) obtenues toutes les minutes pendant 4 minutes au spectrophotomètre intégré à la longueur d'onde égale 405 nm, ont permis de déterminer l'activité enzymatique sérique. Les compositions des réactifs  $R_{10}$  et  $R_{11}$  se trouvent dans le tableau V de l'annexe.

➤ Expression des résultats

L'activité enzymatique des PAL exprimée à partir de la valeur du facteur des PAL ( $F_{\text{PAL}} = 3660$ ) et celle de l'onde égale 405 nm est :

$$\text{L'activité enzymatique des PAL (UI/L)} = \frac{\Delta\text{DO}}{\Delta t} \times 3660$$

$\Delta\text{DO}$  : variation de la densité optique

$\Delta t$  : variation du temps

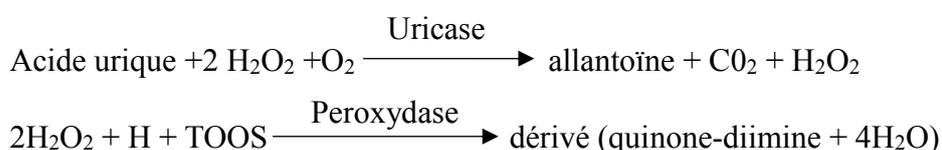
Facteur de PAL = 3660

### 2-2-3-3- Marqueurs spécifiques des reins

#### 2-2-3-3-1- Acide urique

➤ Principe

Il s'agit d'un test colorimétrique enzymatique. L'acide urique est oxydé, en présence de l'uricase, en allantoïne et en eau oxygénée. Le peroxyde d'hydrogène, sous l'action de la peroxydase oxyde l' amino 4-phénazone (TOOS) pour former un dérivé coloré, la quinone-diimine (**Kageyama, 1971**). L'intensité de la couleur de la quinone-diimine formée est directement proportionnelle à la concentration d'acide urique et est mesurée avec l'augmentation de l'absorbance à une longueur d'onde de 510 nm.



➤ Protocole expérimental

Dans un volume de 111 µL de milieu réactionnel composé de 72 µL du réactif R<sub>12</sub> dilué dans 25 µL d'eau distillée, et 14 µL du réactif R<sub>13</sub> dilué dans 20 µL d'eau distillée préchauffé pendant 2 à 3 min à 37°C, 3 µL de produit à doser ont été ajoutés. Après une agitation et une incubation automatique à température ambiante pendant 5 minutes, les absorbances de chaque tube (étalon et échantillon) ont été lues à 546 nm. Les compositions des réactifs R<sub>12</sub> et R<sub>13</sub> se trouvent dans le tableau VI de l'annexe.

➤ Expression des résultats

La concentration de l'acide urique a été calculée comme suit :

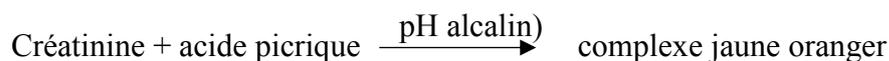
$$\text{Concentration de l'acide urique en mg/dL} = \frac{\text{Absorbance (échantillon)}}{\text{Absorbance (étalon)}} \times 50$$

Concentration étalon d'acide urique = 50 mg/L.

### 2-2-3-3-2- Créatinine

➤ Principe

Le dosage de la créatinine consiste en un test colorimétrique cinétique qui se fonde sur la méthode de **Jaffé (1886)** améliorée par **Fabiny et Ertingshausen (1971)**. En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe jaune orangé. La vitesse de formation de la coloration est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon.



➤ Protocole expérimental

Dans un volume de 137 µL de milieu réactionnel composé de 13 µl de tampon alcalin du réactif R<sub>14</sub> dilué dans 77 µl d'eau distillée, et de 17µL du réactif R<sub>15</sub> dilué dans 30 µL d'eau distillée incubé pendant 2 minutes à 37°C, ont été ajoutés 10 µL de produit à doser (étalon ou échantillon). Ce mélange a ainsi constitué un milieu réactionnel total de 147,5 µL. Le mélange a été agité, et après 30 et 90 seconde, les absorbances respectives A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> de chaque tube ont été obtenues à partir de la densité optique au spectrophotomètre intégré à la longueur d'onde égale à 505 nm. Les compositions des réactifs R<sub>14</sub> et R<sub>15</sub> se trouvent dans le tableau VII de l'annexe.

➤ Expression des résultats

L'automate calcule et affiche la concentration en créatinine selon la formule suivante :

$$\text{Concentration de la créatinine en mg/dL} = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{échantillon}}}{(A_2 - A_1)_{\text{étalon}}} \times 20$$

Concentration étalon de la créatinine = 20 mg/dL

## 2-2-3-4- Marqueurs du cœur

### 2-2-3-4-1- Triglycérides

➤ Principe

Le principe repose sur les travaux de **Bucolo et David (1973)** et fait appel pour l'hydrolyse rapide et complète des triglycérides en glycérol et acides gras, à une lipoprotéine-lipase de microorganismes; le glycérol formé est ensuite transformé en glycérol-3-phosphate, puis oxydé en dihydroxyacétone-phosphate avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec l' amino-4 phénazone et le chloro-4 phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge. L'intensité de la coloration rouge développée est directement proportionnelle à la concentration en triglycérides et est mesurée par photométrie.



➤ Protocole expérimental

A un volume de 2µL de produit à doser (étalon ou échantillon), est ajouté un milieu réactionnel composé de 120 µL du réactif R<sub>16</sub> dilué dans 28 µL d'eau distillée. Après agitation et incubation automatique à la température ambiante pendant 2 minutes, les absorbances (Abs) de l'échantillon a été mesurées au spectrophotomètre à une longueur d'onde égale 505 nm en

comparaison avec l'étalon (ou blanc réactif). La composition du réactif R<sub>16</sub> se trouve dans le tableau VIII de l'annexe.

➤ Expression des résultats

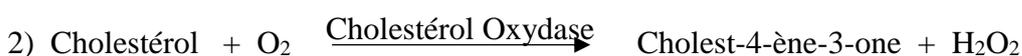
La concentration de triglycérides a été calculée comme suit :

$\text{Concentration de triglycérides (mmol/L)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times 2,28$ $\text{Concentration étalon de triglycérides} = 2,28 \text{ mmol/L}$
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 2-2-3-4-2- Cholestérol total

➤ Principe

Le principe est basé sur une méthode colorimétrique enzymatique. Le cholestérol total sanguin se présente sous deux formes, à savoir la forme libre et la forme estérifiée. Sous l'action de la cholestérol-estérase, les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol libre et en acides gras. Dans une réaction ultérieure, catalysée par la cholestérol oxydase, le cholestérol libre est transformé, en présence d'oxygène, en cholest-4-ène-3-one avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec le phénol et l' amino-4 phénazone pour former un dérivé coloré rouge, la quinone-imine (**Abell et al., 1958; Allain et al., 1974**).



➤ Protocole expérimental

Dans un milieu réactionnel composé de 47 µL du réactif R<sub>17</sub> et dilué dans 93 µL d'eau distillée, ont été ajoutés 2µL de produit à doser (étalon et échantillon). Après agitation et incubation automatique à une température comprise entre 16°C et 25°C pendant 5 minutes, la densité optique mesurée permet d'obtenir l'absorbance (Abs) du produit à doser en comparaison avec l'étalon (blanc réactif) au spectrophotomètre intégré à la longueur d'onde λ égale 505 nm. La composition du réactif R<sub>17</sub> se trouve dans le tableau IX de l'annexe.

➤ Expression des résultats

La concentration du cholestérol total se calcule comme suit :

$$\text{Concentration du cholestérol total (mmol/L)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times 1,293$$

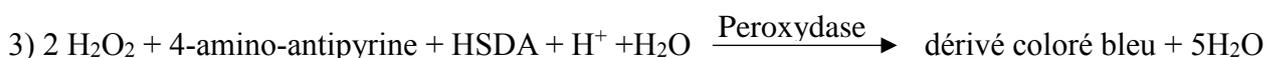
$$\text{Concentration étalon du cholestérol total} = 1,293 \text{ mmol/L}$$

### 2-2-3-4-3- Cholestérol HDL

➤ Principe

Le principe est basé sur la méthode directe de dosage du cholestérol HDL qui repose sur l'utilisation du sulfate de dextran et des enzymes modifiées par le polyéthylène glycol (PEG). En présence d'ion magnésium, le sulfate de dextran forme de manière sélective des complexes hydrosolubles avec les différentes fractions lipoprotéiques que sont les LDL, les VLDL et les chylomicrons. Ces complexes sont résistants vis-à-vis d'enzymes modifiées par le PEG.

La concentration en cholestérol HDL est par la suite déterminée par voie enzymatique à l'aide de cholestérol estérase et de cholestérol oxydase modifiées par PEG (**Sugiuchi *et al.*, 1995**). Sous l'action de la cholestérol estérase, les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol libre et en acides gras. Dans une seconde réaction catalysée par la cholestérol oxydase modifiée par le PEG, le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en  $\Delta^4$ -cholesténone avec formation d'eau oxygénée. Enfin en présence des peroxydases, l'eau oxygénée formée réagit avec la 4-amino-antipyrine et du sodium N-(hydroxy-2 sulfo-3 propyl) diméthoxy-3,5 aniline (HSDA) avec formation d'un dérivé coloré bleu-violet. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol et mesurée par photométrie.



➤ Protocole expérimental

Dans un milieu réactionnel composé de 150 µL de du réactif R<sub>18</sub> et de 50 µL du réactif R<sub>19</sub>, ont été ajoutés 2,5µL de produit à doser (étalon et échantillon). Après agitation et incubation automatique à une température comprise entre 16°C et 25°C pendant 5 minutes, la lecture de la densité optique à la longueur d'onde égale 600 nm permet d'obtenir l'absorbance (Abs) du produit à doser en comparaison avec l'étalon (blanc réactif. Les compositions des réactifs R<sub>18</sub> et R<sub>19</sub> se trouvent dans le tableau X de l'annexe.

➤ Expression des résultats

La concentration du cholestérol HDL se calcule comme suit :

$$\text{Concentration du cholestérol HDL (mmol/L)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times 0,517$$

$$\text{Concentration étalon du cholestérol HDL} = 0,517 \text{ mmol/L}$$

#### 2-2-3-4-4- Cholestérol LDL

Le taux du cholestérol LDL a été calculé selon la formule de **Friedewald *et al.*, (1972)**.

$$\text{LDL (mmol/L)} = \text{Chol Total} - \text{HDL} - \frac{\text{TG}}{2.17}$$

#### 2-2-3-4-5- Indice d'athérogénicité plasmatique

L'indice d'athérogénicité plasmatique (IAP) a été calculé selon la formule de **Dobiášová et Frohlich (2001)**.

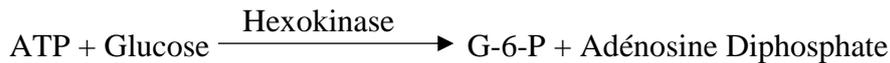
$$\text{Indice d'athérogénicité plasmatique (IAP)} = \text{Log} \frac{\text{TG}}{\text{HDL-c}}$$

#### 2-2-3-4-6- Créatine phosphokinase

➤ Principe

Le dosage de l'activité a été fait selon la méthode enzymatique. La Créatine phosphokinase (CPK) catalyse le transfert d'un groupe phosphate fortement énergétique provenant de la créatine phosphate sur l'ADP. L'ATP produite dans cette réaction est utilisée

ultérieurement pour phosphoryler le glucose afin d'obtenir du glucose-6-phosphate (G-6-P) en présence d'hexokinase. Le G-6-P est ensuite oxydé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) avec réduction concomitante du NADP en NADPH (**Hørder et al., 1991**). L'absorbance du NADPH formé a été mesurée à 340 nm et est proportionnelle à l'activité de la CPK de l'échantillon.



➤ Protocole expérimental

A un milieu réactionnel composé de 100 µL du réactif R<sub>20</sub> et de 20 µL du réactif R<sub>21</sub>, ont été ajoutés 5 µL du produit à doser pour obtenir en définitif un volume réactionnel total de 125 µL. Après agitation, les densités optiques (DO) obtenues toutes les minutes pendant 4 minutes ont été déterminées au spectrophotomètre à une longueur d'onde égale à 340 nm (**Hørder et al., 1991**). Les compositions des réactifs R<sub>20</sub> et R<sub>21</sub> se trouvent dans le tableau XI de l'annexe.

➤ Expression des résultats

L'activité enzymatique des CPK a été obtenue selon l'expression suivante :

$$\text{Activité enzymatique de la CPK (UI/L)} = \frac{\Delta \text{DO}}{\Delta t} \times 8095$$

ΔDO : variation de la densité optique

Δt : variation du temps

Facteur de CPK = 8095

## 2-2-3-5- Marqueurs biochimiques sériques non spécifiques

### 2-2-3-5-1- Albumine

#### ➤ Principe

Il s'agit d'un test turbidimétrique sur particules de latex. L'albumine contenue dans l'échantillon à doser s'agglutine sur les particules de latex recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-albumine lors de la phase d'incubation. Un complexe antigène-anticorps se forme. La formation du complexe antigène-anticorps mesurée à 570 nm et est proportionnelle à la concentration en albumine contenue dans l'échantillon (**Burtis *et al.*, 2006**).

#### ➤ Protocole expérimental

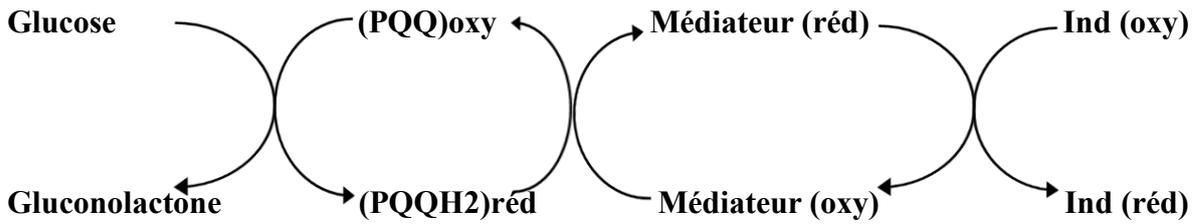
Dans un volume de 188  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel composé de 82  $\mu\text{L}$  du réactif R<sub>22</sub> dilué dans 48  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et de 28  $\mu\text{L}$  du réactif R<sub>23</sub> dilué dans 30  $\mu\text{L}$  d'eau distillée préchauffé pendant 2 à 3 min à 37°C, 2,5  $\mu\text{L}$  de produit à doser préalablement dilué dans 30  $\mu\text{L}$  d'eau distillée ont été ajoutés, constituant ainsi un milieu réactionnel total de 220,5  $\mu\text{L}$  à pH 7,8. Le degré de turbidité engendré par les agrégats, après agitation et incubation pendant 5 minutes a été déterminé à une longueur d'onde égale 570 nm (**Bergstrom *et al.*, 1981**). Les compositions des réactifs R<sub>22</sub> et R<sub>23</sub> se trouvent dans le tableau XII de l'annexe.

### 2-2-3-5-2- Glucose

La glycémie a été déterminée selon la méthode enzymatique à partir du sang total. Elle a été mesurée à l'aide d'un glucomètre de marque Accu-Chek Active de Roche Diagnostique. Cette méthode est basée sur un principe qui se déroule en trois phases :

#### ➤ Principe

La glucose déshydrogénase pyrroloquinoline quinone oxyde le  $\beta$  D-glucose du sang en gluconolactone, tandis que le coenzyme pyrroloquinoline quinone est réduit en PQQH<sub>2</sub>. L'enzyme transfère ensuite les équivalents de réduction de la PQQH<sub>2</sub> sur la forme oxydée du médiateur qui est le chlorure de bis ou quinone imine. La forme réduite du médiateur, réduit à son tour l'indicateur, acide 2,3- phosphomolybdique en un composé de couleur bleue (**Hönes *et al.*, 2008**).



➤ Protocole expérimental

Une bandelette contenant des réactifs déshydratés a été introduite dans le glucomètre. Une goutte de sang a été ensuite déposée dans la zone réactive de la bandelette. L'application de la goutte déclenche une réaction qui provoque un changement de couleur de la zone, initialement de coloration jaune. L'intensité de la coloration a été mesurée par réflectométrie sur la face intérieure de la bandelette. Le lecteur a ensuite calculé la valeur de la glycémie correspondante à la coloration obtenue. Les valeurs de glycémie obtenues ont été exprimées en mg/dL.

### 2-2-3-5-3- Lactate déshydrogénase

➤ Principe

La Lactate déshydrogénase (LDH) oxyde la L-lactate en pyruvate en réduisant le  $\text{NAD}^+$  par le transfert de proton ( $\text{H}^+$ ) en NADH. La vitesse de formation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de la LDH. Elle est déterminée par photométrie en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 340 nm (**Bais et Philcox, 1994**).



➤ Protocole expérimental

Dans un volume de 120  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel composé de 100  $\mu\text{L}$  du réactif  $\text{R}_{24}$  et de 20  $\mu\text{L}$  du réactif  $\text{R}_{25}$  préchauffé pendant 2 à 3 min à 37°C ont été ajoutés 2,8  $\mu\text{L}$  de produit à doser (contrôle ou échantillon), constituant ainsi un milieu réactionnel total de 122,8  $\mu\text{L}$ . Après agitation, les densités optiques (DO) qui ont été mesurées à l'aide de l'absorbance au spectrophotomètre intégré à la longueur d'onde égale 340 nm, ont permis de déterminer l'activité enzymatique sérique des LDH. Les compositions des réactifs  $\text{R}_{24}$  et  $\text{R}_{25}$  se trouvent dans le tableau XIII de l'annexe.

➤ Expression des résultats

L'activité enzymatique des LDH qui s'exprime à partir de la valeur du facteur des LDH ( $F_{LDH} = 9682$ ) et celle de l'onde égale 340 nm est :

$$\text{Activité enzymatique des LDH (UI/L)} = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times 9682$$

$\Delta DO$  : variation de la densité optique

$\Delta t$  : variation du temps

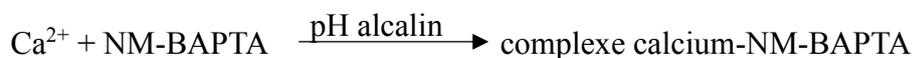
Facteur de LDH = 9682

#### 2-2-3-5-4- Calcium

Le dosage de l'ion calcium a été fait sur un automate de type Cobas C311 selon la méthode colorimétrique.

➤ Principe

Les ions calcium réagissent avec le 5 nitro-5'-méthyl-BAPTA (NM-BAPTA) en milieu alcalin pour former un complexe. Dans un second temps, ce complexe réagit en présence de l'EDTA.



L'intensité de coloration en calcium est mesurée en photométrie (**Burtis *et al.*, 2006**).

➤ Protocole expérimental

Le milieu réactionnel composé de 20  $\mu\text{L}$  du réactif  $R_{26}$  dilué dans 160  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et de 20  $\mu\text{L}$  du réactif  $R_{27}$  a été porté à 37°C pendant deux minutes. A ce milieu 3  $\mu\text{L}$  du sérum à doser ont été ajoutés. Après 5 minutes de dosage, les densités optiques (DO) ont été déterminées à la longueur d'onde égale 340 nm. Les compositions des réactifs  $R_{26}$  et  $R_{27}$  se trouvent dans le tableau XIV de l'annexe.

➤ Expression des résultats

$$\text{Concentration du calcium (mg/dL)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times 10$$

Concentration étalon = 10 mg/dL

### 2-2-3-5-5- Sodium, potassium et chlore

La méthode d'électrode sélective d'ions (ISE) sur l'analyseur AVL 9180 a été utilisée pour déterminer la quantité des ions sodium, potassium et chlore dans le sérum.

#### ➤ Principe

Une électrode sélective d'ions (ISE) utilise les propriétés spécifiques du matériau d'une membrane pour créer un potentiel électrique. Ce potentiel électrique ou force électromotrice permet de déterminer la concentration d'ions en solution. L'électrode possède une membrane sélective en contact avec la solution à analyser et une solution de remplissage interne. Cette solution de remplissage interne contient l'analyte à une concentration constante. Du fait de la nature particulière de la membrane, les ions du test se répartissent de part et d'autre de celle-ci. La différence entre la concentration de l'ion testé dans la solution analysée et celle de la solution interne, détermine la force électromotrice de la membrane (**Pioda *et al.*, 1969; Hartman *et al.*, 1978; Shono *et al.*, 1982**).

La force électromotrice de la membrane pour un ion spécifique en solution se développe selon l'équation de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \times \ln \left( \frac{f \times C_t}{f \times C_i} \right)$$

Avec :

E = FEM de l'électrode  
E<sub>0</sub> = FEM du standard  
R = constante  
T = température  
n = charge de l'ion

F = constante de Faraday (96,496)  
ln = logarithme naturel (base e)  
f = coefficient d'activité  
C<sub>t</sub> = concentration de l'ion dans la solution test  
C<sub>i</sub> = concentration de l'ion dans la solution interne

La concentration de l'ion testé est donc déterminée au moyen d'une courbe de calibrage qui est définie par deux points de calibrage de solutions standard avec des concentrations connues en ions de façon précise (calibrage en deux points) et au moyen de la force électromotrice mesurée et du standard A (calibrage en un point).

#### ➤ Protocole expérimental

Le dosage des ions chlore, potassium et sodium a été réalisé avec l'analyseur d'électrolytes® 9180. Pour ce faire, Le réactif R<sub>28</sub> contenu dans un flacon est directement relié à l'électrode de

référence. Cette solution permet à l'électrode de référence de garder un potentiel hautement stabilisé, nécessaire pour chaque détermination d'électrolytes. 100 µL de sérum (la solution à analyser) ont été. L'analyseur à l'aide l'aiguille d'aspiration prélève 100 µL de sérum qui constitue la solution à analyser au niveau de la deuxième électrode. Après fermeture de la porte, les résultats de la solution à analyser ont été affichés et imprimés. La composition du réactif R<sub>28</sub> se trouve dans le tableau XV de l'annexe.

#### 2-2-4- Etude histologique

Pendant toute la durée de l'étude, tous les animaux ont été quotidiennement observés et ont été individuellement pesés chaque semaine.

##### 2-2-4-1- Masses relatives

Les rats préalablement anesthésiés avec de l'éther ont été euthanasiés au 90<sup>ème</sup> jour (pour l'étude principale) et au 120<sup>ème</sup> jour (l'étude de la réversibilité). Le foies, les reins et le cœur de tous les rats euthanasiés ont été prélevés et pesés frais afin de déterminer leurs masses relatives en utilisant le rapport suivant (**Yakubu et Akanji, 2011**).

$$\text{Masse relative (\%)} = \frac{\text{Masse absolue de l'organe (g)}}{\text{Masse corporelle de l'animale le jour du sacrifice (g)}} \times 100$$

##### 2-2-4-2- Prélèvement des pièces tissulaires et réalisation de coupes d'organes

Les différents organes (foie, reins et cœur) ont été conservés dans du formol à 10% dès leur prélèvement selon le protocole indiqué par le principe de **Martoja et Martoja-Pierson (1967)**. Cette technique permet d'immobiliser les tissus dans un état aussi proche que possible que celui chez le vivant.

Pour obtenir des coupes fines, la méthode utilisée a été celle de l'inclusion à la paraffine (**Hould, 1984**). En effet, le but de l'imprégnation est le remplacement de l'eau des cellules et des tissus par la substance neutre qui durcit les prélèvements. La paraffine n'étant pas miscible à l'eau il est nécessaire de passer par différentes étapes qui utilisent les propriétés de miscibilité des solvants entre eux. La fixation, la déshydratation et l'éclaircissement s'effectuent dans un automate Technicon<sup>®</sup> dans lequel séjournent les pièces tissulaires dans une série de réactifs pour leur donner une résistance mécanique.

C'est ainsi que à l'aide d'une lame de bistouri, des coupes longitudinales ont été effectuées sur les organes retirés du formol, pour en prélever des pièces tissulaires. Ces pièces ont été déposées dans des cassettes perforées étiquetées immergées dans du formol 10% pendant 15 min. Ensuite ces pièces ont été imbibées dans deux bains d'éthanol de 80%, 90% et deux autres bains d'éthanol 100% pendant une heure pour chaque bain. Après la déshydratation, l'éthanol a été remplacé par le toluène qui est un solvant de la paraffine. Les pièces ont été trempées dans deux bains de toluène pendant une heure pour chaque bain. Le toluène a été progressivement remplacé par la paraffine afin d'augmenter la rigidité du tissu et obtenir des coupes minces. Les pièces contenues dans les cassettes ont été incluses dans deux bains de paraffine à 60°C dans un appareil Tissue Tek<sup>®</sup> pendant une heure par bain. Afin de faciliter la coupe, le tissu imprégné a été inclus dans un bloc de paraffine. Les moules contenant les tissus imprégnés ont été remplis de paraffine liquide puis refroidis sur une plaque métallique réfrigérée. Au bout de 15 minutes environ, les blocs ainsi constitués se sont complètement durcis et ont été séparés des moules.

Des coupes de 3 à 5 µm réalisées au microtome de type Shandon<sup>®</sup> ont été étalées sur les lames en verre identifiées puis séchées à l'étuve à 37° C durant une heure. Les coupes ont d'abord été déparaffinées dans trois bains de toluène, ensuite réhydratées dans trois bains d'éthanol à degré décroissant (100°, 90°, 70°) enfin rincées avec de l'eau de robinet. Ces coupes ont été traitées à l'hémalum (colorant nucléaire) durant 5 minutes et rincées à l'eau avant de passer dans l'éosine (colorant cytoplasmique) pendant 3 minutes. Après séchage, les coupes ont été observées au microscope optique binoculaire de marque Motic<sup>®</sup> et les photographies ont été prises avec le photomicroscope de marque AmScope<sup>®</sup>, FMA050.

### **2-3- Analyses statistiques**

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne ( $M \pm ESM$ ). L'analyse de variance à mesures répétées avec le modèle mixte suivie d'une comparaison de moyenne par la méthode de Sidak a été utilisée pour comparer les lots expérimentaux et les lots témoins en fonction du temps. Toutes ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel Graph Pad prisme Version 7.0. Dans la présentation des résultats, les astérisques (\*, \*\*, \*\*\*) indiquent des significativités par rapport au témoin.

## **RESULTATS**

## **CHAPITRE I : EFFET DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE *H. floribunda* SUR LE FOIE DES RATS**

### **1- Etude biochimique sur le foie des rats**

#### **1-1- Taux sériques des métabolites**

##### **1-1-1- Effets chez les rats mâles**

Le Tableau IV présente les taux sériques des métabolites du foie des rats avant, pendant et après arrêt des gavages.

##### **1-1-1-1- Taux sériques de l'albumine**

Les valeurs moyennes des taux sériques de l'albumine des rats mâles du lot expérimental ne sont pas significativement différentes de celles des rats du lot témoin. Ces valeurs moyennes varient entre  $34,180 \pm 0,91$  g/L et  $39,290 \pm 1,28$  g/L dans le lot expérimental et entre  $32,4 \pm 1,39$  g/L et  $36,880 \pm 0,96$  g/L dans le lot témoin.

##### **1-1-1-2- Taux sériques des bilirubines**

Durant toute la période d'expérimentation, aucune modification significative des valeurs moyennes des taux des bilirubines directes et des bilirubines totales des rats du lot expérimental par rapport à celles des rats du lot témoin. Les valeurs moyennes des taux de la bilirubine directe ont varié entre  $0,290 \pm 0,02$  mg/dL et  $0,323 \pm 0,02$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $0,261 \pm 0,03$  mg/dL et  $0,290 \pm 0,03$  mg/dL dans le lot expérimental. Celles de la bilirubine totale ont varié entre  $0,802 \pm 0,05$  mg/dL et  $1,136 \pm 0,09$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $0,955 \pm 0,11$  mg/dL et  $1,184 \pm 0,18$  mg/dL dans le lot expérimental.

##### **1-1-1-3- Taux sériques du glucose.**

Les valeurs moyennes de la glycémie enregistrées chez les rats du lot expérimental sont plus faibles que celles du lot témoin. Cette diminution de la glycémie est significative ( $p < 0,05$ ) au temps  $J_7$  ( $97,700 \pm 1,51$  mg/dL contre  $111,700 \pm 3,47$  mg/dL), soit une réduction de 12,53% et au temps  $J_{60}$  ( $99,500 \pm 5,07$  mg/dL contre  $112,500 \pm 2,64$  mg/dL), soit une réduction de 11,55%. Les valeurs moyennes de la glycémie des rats ont varié de  $106,100 \pm 5,11$  mg/dL à  $113,300 \pm 5,37$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $96,900 \pm 3,72$  mg/dL et  $111,800 \pm 3,54$  mg/dL dans le lot expérimental.

**Tableau IV : Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs du foie chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant			Pendant				Après
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
ALB g/L	Tém	31,75 ± 0,69	34,44 ± 1,20	32,38 ± 1,35	34,14 ± 1,00	35,24 ± 0,71	34,96 ± 1,18	36,88 ± 0,96	32,4 ± 1,39
	Exp	33,27 ± 0,86	35,03 ± 1,52	36,1 ± 0,96	36,87 ± 1,62	39,29 ± 1,28	34,18 ± 0,91	36,07 ± 0,88	36,18 ± 1,16
BIL D mg/dL	Tém	0,303 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,297 ± 0,02	0,323 ± 0,02	0,292 ± 0,03	0,311 ± 0,02	0,301 ± 0,03	0,302 ± 0,03
	Exp	0,30 ± 0,04	0,283 ± 0,02	0,278 ± 0,03	0,281 ± 0,03	0,273 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,263 ± 0,03	0,261 ± 0,03
BIL T mg/dL	Tém	0,86 ± 0,04	1,134 ± 0,09	0,853 ± 0,06	1,136 ± 0,09	0,955 ± 0,11	0,974 ± 0,11	0,956 ± 0,11	0,802 ± 0,05
	Exp	0,90 ± 0,02	0,955 ± 0,11	0,98 ± 0,10	0,955 ± 0,11	1,183 ± 0,18	1,141 ± 0,18	1,184 ± 0,18	0,970 ± 0,10
GLU mg/dL	Tém	107,40 ± 3,40	111,7 ± 3,47	113,3 ± 5,37	106,3 ± 5,17	106,1 ± 5,11	112,5 ± 2,64	119,4 ±5,96	115,8 ± 5,05
	Exp	110,10 ± 4,42	<b>97,7 ±</b> <b>1,51 (*)</b>	107,1 ± 3,70	96,9 ± 3,72	107,1 ± 2,19	<b>99,50 ±</b> <b>5,07 (*)</b>	111,8 ± 3,54	108,6 ± 3,59

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05; (\*\*) = p < 0,01; (\*\*\*) = p < 0,001 Para = Paramètres; ABL = albumine; BIL D = bilirubine directe; BIL T = bilirubine totale; GLU = glucose; Tém = témoin ; Exp = expérimental.

### **1-1-2 Effets chez les rates**

Le Tableau V présente les taux sériques des métabolites du foie des rates avant, pendant et après arrêt des gavages.

#### **1-1-2-1- Taux sériques de l'albumine**

Les valeurs moyennes des taux sériques de l'albumine des rates du lot expérimental ne sont pas significativement différentes de celles des rates du lot témoin. Ces valeurs moyennes varient entre  $33,210 \pm 0,80$  g/L et  $37,790 \pm 1,83$  g/L dans le lot témoin et entre  $33,85 \pm 1,68$  g/L et  $38,500 \pm 1,17$  g/L dans le lot expérimental.

#### **1-1-2-2- Taux sériques des bilirubines**

Aucune modification significative des valeurs moyennes des taux des bilirubines directes et des bilirubines totales des rates du lot expérimental par rapport à celles des rates du lot témoin n'a été observée. Les valeurs moyennes des taux de la bilirubine directe ont varié entre  $0,254 \pm 0,02$  mg/dL et  $0,272 \pm 0,03$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $0,233 \pm 0,03$  mg/dL et  $0,302 \pm 0,03$  mg/dL dans le lot expérimental. Celles de la bilirubine totale ont varié entre  $1,09 \pm 0,12$  mg/dL et  $1,232 \pm 0,14$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $1,178 \pm 0,16$  mg/dL et  $1,326 \pm 0,13$  mg/dL dans le lot expérimental.

#### **1-1-2-3- Taux sériques du glucose**

Les valeurs moyennes de la glycémie enregistrées chez les rates du lot expérimental sont plus faibles que celles du lot témoin. Cette diminution de la glycémie est significative ( $p < 0,05$ ) aux temps J<sub>7</sub> ( $99,300 \pm 2,03$  mg/dL contre  $114,100 \pm 4,92$  mg/dL, soit une réduction de 12,97%); J<sub>28</sub> ( $100,000 \pm 2,91$  mg/dL contre  $121,400 \pm 4,61$  mg/dL, soit une réduction de 17,62%) et J<sub>60</sub> ( $94,900 \pm 1,76$  contre  $114,700 \pm 3,61$ , soit une réduction de 17,26%). Les valeurs moyennes de la glycémie des rates ont varié de  $105,900 \pm 3,58$  mg/dL à  $117,800 \pm 4,10$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $94,900 \pm 1,76$  mg/dL et  $112,4 \pm 2,75$  mg/dL dans le lot expérimental.

**Tableau V : Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs du foie chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
ALB g/L	Tém	34,68 ± 0,69	35,41 ± 1,11	35,96 ± 1,11	37,79 ± 1,83	37,2 ± 1,02	36,88 ± 1,05	33,21 ± 0,8	36,71 ± 1,01
	Exp	33,62 ± 0,71	36,73 ± 1,25	35,88 ± 1,59	36,8 ± 0,96	35,77 ± 1,40	38,5 ± 1,17	34,22 ± 0,61	33,85 ± 1,68
BIL D mg/dL	Tém	0,24 ± 0,03	0,263 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,03
	Exp	0,26 ± 0,02	0,233 ± 0,03	0,248 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,276 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,30 ± 0,03
BIL T mg/dL	Tém	1,22 ± 0,11	1,094 ± 0,15	1,137 ± 0,15	1,10 ± 0,14	1,145 ± 0,12	1,14 ± 0,11	1,23 ± 0,14	1,09 ± 0,12
	Exp	1,25 ± 0,14	1,213 ± 0,13	1,301 ± 0,14	1,14 ± 0,12	1,280 ± 0,12	1,18 ± 0,10	1,32 ± 0,13	1,17 ± 0,16
GLU mg/dL	Tém	114,2 ± 5,74	114,1 ± 4,92	117,8 ± 4,1	113,9 ± 3,5	121,4 ± 4,61	114,7 ± 3,61	105,9 ± 3,58	114,2 ± 2,76
	Exp	111,70 ± 4,92	<b>99,3 ±</b> <b>2,03 (*)</b>	105,1 ± 3,12	102,3 ± 3,15	<b>100, ±</b> <b>2,9 (**)</b>	<b>94,9 ±</b> <b>1,7(**)</b>	102,5 ± 4,12	112,4 ± 2,75

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05 ; (\*\*) = p < 0,01 ; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; ABL = albumine ; BIL D = bilirubine directe ; BIL T = bilirubine totale ; GLU = glucose ; Tém = témoin ; Exp = expérimental.

## **1-2- Activités enzymatiques sériques**

### **1-2-1- Effets chez les rats mâles**

Le Tableau VI présente les valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du foie des rats avant, pendant et après arrêt des gavages.

#### **1-2-1-1- Activités sériques des alanines aminotransférases**

Les valeurs moyennes des activités sériques des alanines aminotransférases (ALAT) des rats mâles du lot expérimental comparées à celles des rats du lot témoin n'ont pas été significativement modifiées durant l'administration de l'extrait. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $29,300 \pm 2,69$  UI/L et  $36,500 \pm 5,48$  UI/L dans le lot témoin et entre  $23,79 \pm 3,39$  UI/L et  $31,660 \pm 2,80$  UI/L dans le lot expérimental.

#### **1-2-1-2- Activités sériques des aspartates aminotransférases**

Les valeurs moyennes des activités sériques des aspartates aminotransférases (ASAT) observées chez les rats mâles du lot expérimental n'ont pas été significativement ( $p > 0,05$ ) modifiées comparées à celles des activités sériques des ASAT des rats du lot témoin. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $43,400 \pm 2,09$  UI/L et  $56,300 \pm 4,27$  UI/L dans le lot témoin et entre  $42,200 \pm 6,04$  (UI/L) et  $59,300 \pm 3,16$  UI/L dans le lot expérimental.

#### **1-2-1-3- Activités sériques des phosphatases alcalines**

Les valeurs moyennes des activités sériques des phosphatases alcalines (PAL) des rats du lot expérimental ont été significativement augmentées de manière transitoire au temps J<sub>21</sub> ( $454,700 \pm 8,45$  contre  $388,700 \pm 21,26$  soit de 16,98% par rapport à celles des rats du lot témoin. Aucune autre modification significative ( $p > 0,05$ ) durant les autres jours d'étude n'a été observée. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $226,30 \pm 14,36$  UI/L et  $434,700 \pm 12,16$  UI/L dans le lot témoin et entre  $208,70 \pm 15,76$  UI/L et  $454,700 \pm 8,45$  UI/L dans le lot expérimental.

**Tableau VI : Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du foie chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
ALAT	Tém	27,93 ± 29,3	± 36,5	± 36,1	± 29,8	± 26,9	± 27,2	± 26,9	±
		3,10	2,69	5,48	1,16	3,08	3,71	1,97	3,67
UI/L	Exp	30,23 ± 31,6	± 29,1	± 34,7	± 31,4	± 24,6	± 28,2	± 23,7	±
		2,70	2,80	2,23	3,25	3,01	3,26	2,20	3,39
ASAT	Tém	43,90 ± 46,3	± 53,2	± 51,3	± 43,4	± 47,8	± 56,3	± 44,8	±
		4,44	3,1	3,53	6,54	2,09	5,87	4,27	4,94
UI/L	Exp	4580 ± 42,2	± 56,2	± 49,6	± 59,3	± 43,1	± 48,4	± 55,3	
		5,07	6,04	3,55	4,62	3,16	4,98	4,19	±4,13
PAL	Tém	428,6 ± 406,3	± 434,7	± 388,7	± 407,2	± 337,5	± 293,1	± 226,3	±
		15,25	20,94	12,16	21,26	13,90	14,88	18,05	14,36
UI/L	Exp	436,90 ± 10,27	± 13,66	± 20,94	± <b>454,7</b>	± 434,7	± 369,1	± 305,1	± 208,7
					<b>8,45(*)</b>	12,16	6,90	18,15	15,76

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05 ; (\*\*) = p < 0,01 ; (\*\*\*) = p < 0,001.

Para = Paramètres ; ALAT = Alanine aminotransférase ; ASAT = Aspartate aminotransférase ; PAL = Phosphatase alcaline ; Tém = témoin ; Exp = expérimental.

### **1-2-2- Effets chez les rates**

Le Tableau VII présente les valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du foie des rates avant, pendant et après arrêt des gavages.

#### **1-2-2-1- Activités sériques des alanines aminotransférases**

Les valeurs moyennes des activités des alanines aminotransférases (ALAT) des rates du lot expérimental, comparées à celles des rates du lot témoin ne présentent pas de différence significative ( $p > 0,05$ ). Ces valeurs moyennes ont varié entre  $20,100 \pm 3,02$  UI/L et  $27,49 \pm 1,02$  UI/L dans le lot témoin et entre  $20,800 \pm 2,65$  UI/L et  $26,82 \pm 2,13$  UI/L dans le lot expérimental.

#### **1-2-2-2- Activités sériques de l'aspartates aminotransférases**

Une hausse significative ( $p < 0,05$ ) transitoire des valeurs moyennes des activités sériques des aspartates aminotransférases (ASAT) chez les rates du lot expérimental par rapport au témoin ( $50,700 \pm 1,42$  contre  $39,600 \pm 1,55$  de 28,03%) a été observée à J<sub>28</sub>. Aucune autre modification significative ( $p > 0,05$ ) durant les autres jours d'étude n'a été observée. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $39,600 \pm 1,55$  UI/L et  $40,600 \pm 2,29$  UI/L dans le lot témoin et entre  $41,40 \pm 1,97$  UI/L et  $50,700 \pm 1,42$  UI/L dans le lot expérimental (Tableau VII).

#### **1-2-2-3- Activités sériques des phosphatases alcalines**

Les valeurs moyennes des activités sériques des phosphatases alcalines (PAL) chez les rates du lot expérimental n'ont pas été significativement ( $p > 0,05$ ) modifiées par rapport à celles des rats du lot témoin. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $209,9 \pm 9,86$  UI/L et  $404,900 \pm 7,95$  UI/L dans le lot témoin et entre  $214,200 \pm 2,76$  UI/L et  $404,900 \pm 7,95$  UI/L dans le lot expérimental.

**Tableau VII : Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du foie chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
ALAT	Tém	18,6 ±	24,9 ±	25,1 ±	20,1 ±	26 ±	23,1 ±	20,3 ±	27,5
		2,84	2,29	2,46	3,02	1,67	3,47	3,84	±1,02
UI/L	Exp	23,11 ±	23,7 ±	20,8 ±	22,9 ±	25,5 ±	22,7 ±	25,1 ±	26,8 ±
		2,85	3,06	2,65	2,61	3,07	3,72	2,45	2,13
ASAT	Tém	39 ±	40,1 ±	40,5 ±	39,7 ±	39,6 ±	40,3 ±	40,6 ±	39,8 ±
		4,41	1,82	2,66	4,05	1,55	3,91	2,29	3,06
UI/L	Exp	39,9 ±	42,1 ±	41,9 ±	41,8 ±	50,7 ±	41,6 ±	41,8 ±	41,4 ±
		2,21	2,90	3,99	2,18	1,42 (*)	2,71	1,32	1,97
PAL	Tém	388,8 ±	404,9	363,2 ±	397,4 ±	343,6 ±	257 ±	218,2 ±	209,9
		13,96	± 7,95	14,94	26,61	19,46	12,06	4,02	±9,86
UI/L	Exp	383,9 ±	386, ±	404,9 ±	363,2 ±	347,2 ±	261,8 ±	214,2 ±	252,5±
		13,44	14,01	7,95	14,94	15,66	12,69	2,76	19,30

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05; (\*\*) = p < 0,01; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; ALAT = Alanine aminotransférase ; ASAT = Aspartate aminotransférase

PAL = Phosphatase alcaline ; Tém = témoin ; Exp = expérimental.

## **2- Etude histologique sur le foie des rats**

### **2-1- Masses relatives de foie des rats mâles et des rates**

Les valeurs moyennes des masses relatives de foie des rats mâles et des rates des lots expérimentaux ne sont pas significativement ( $p>0,05$ ) différentes de celles des rats et rates des lots témoins correspondants aux différentes dates de pesée (**Tableau VIII**).

### **2-2- Description des coupes de foie des rats mâles**

L'observation au microscope des différentes coupes de foie aussi bien des rats du lot témoin que des rats du lot expérimental montre des espaces portes, contenant chacun une branche de la veine porte, de l'artère hépatique et un canal biliaire non obstrués. Aucune lésion, nécrose, ni de stéatose et d'anomalies particulières autour de l'espace porte n'ont été observées comme le montrent les photographies (**Figures 7**).

### **2-3- Description des coupes de foie des rates**

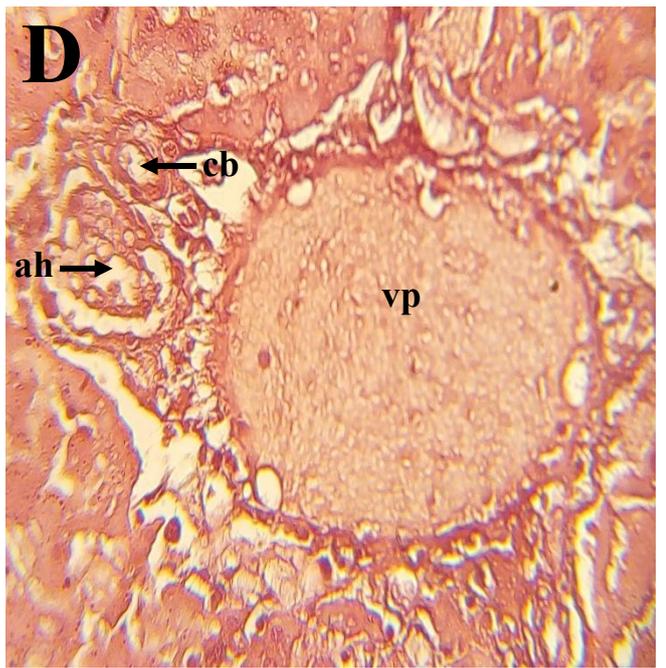
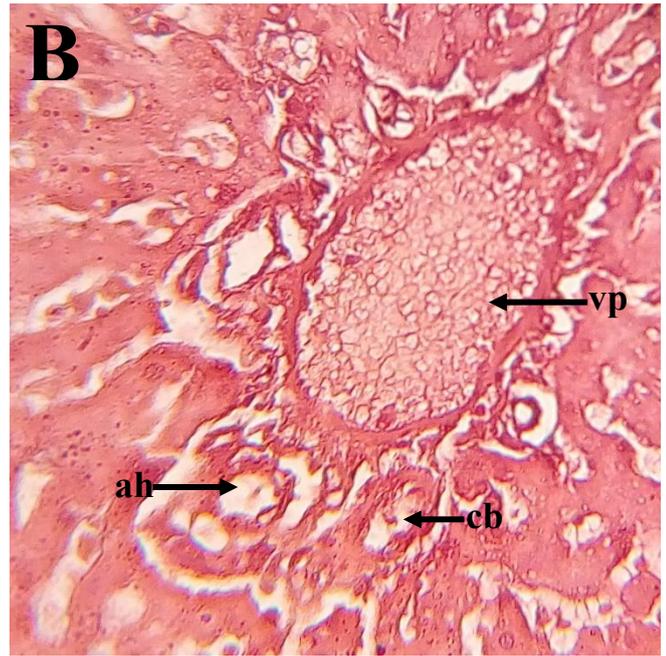
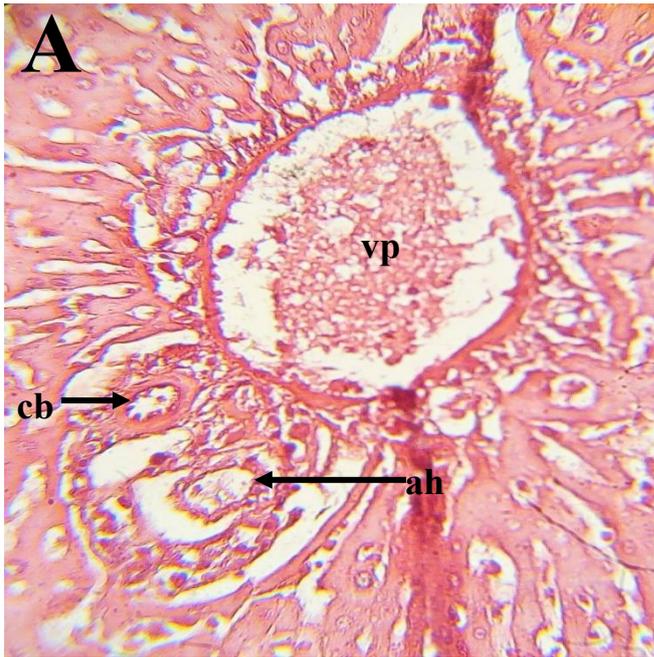
L'observation au microscope des différentes coupes de foie aussi bien des rats femelles témoins que des rats femelles du lot expérimental, montre le contour de la veine centrale contenant chacun une veine centro-lobulaire, des hépatocytes organisés en travées et des sinusoides. Aucune lésions, nécrose, ni de stéatose et d'anomalies particulières autour de la veine centro-lobulaire n'ont été observées (**Figure 8**).

**Tableau VIII : Influence de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* sur les masses relatives de foie des rats mâles et des rates**

Valeurs moyennes des masses relatives de foie (g)				
Dates de prélèvement	Lots	Mâles	Femelles	Significativité par rapport au lot témoin correspondant
J <sub>90</sub>	Témoin	3,50 ± 0,12	3,52 ± 0,12	
	Expérimental	3,47 ± 0,17	3,61 ± 0,21	ns
J <sub>120</sub>	Témoin	3,61 ± 0,2	3,74 ± 0,13	
	Expérimental	3,60 ± 0,18	3,73 ± 0,22	ns

Les valeurs sont exprimées en Moyennes ± SEM; n<sub>1</sub> = 10 animaux pour J<sub>90</sub> et n<sub>2</sub> = 5 pour J<sub>120</sub>.

Les comparaisons se font entre les lots témoins et les lots expérimentaux.



**Figure 7** : Parenchyme hépatique de rats mâles mettant en évidence les espaces porte

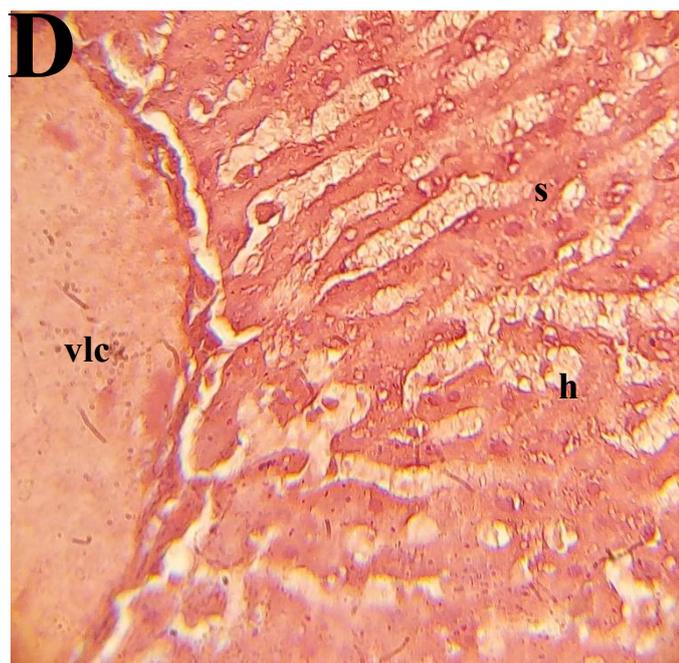
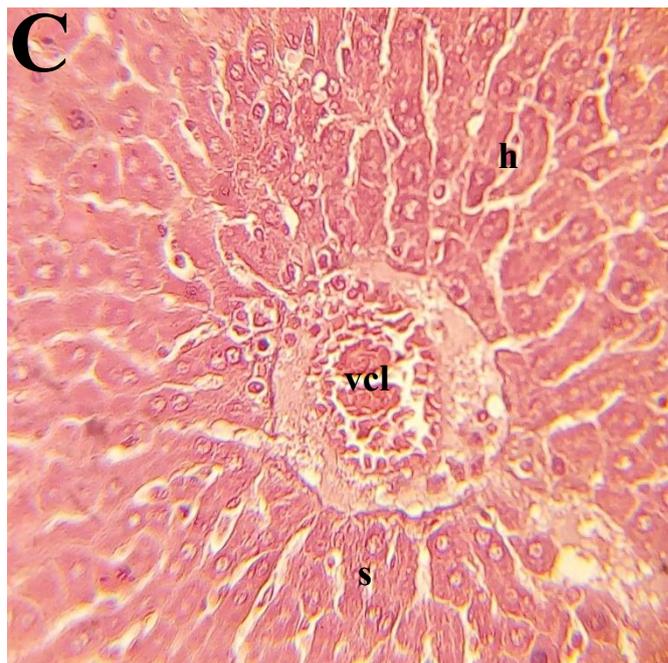
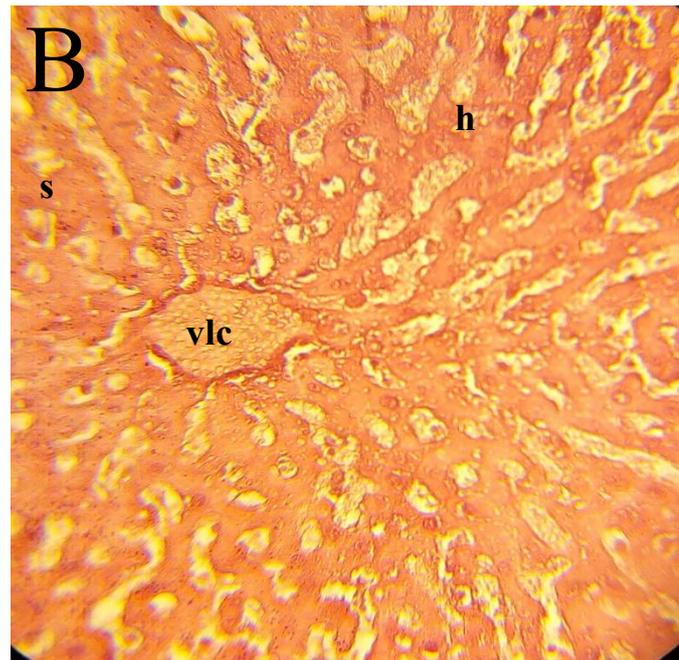
**A** : lot témoin à J<sub>90</sub> ; **B** : lot expérimental à J<sub>90</sub> ; **C** : lot témoin J<sub>120</sub> ; **D** : lot expérimental à J<sub>120</sub>

Coloration *Hémalun-éosine*

Grossissements : × 100

Les images montrent un exemple représentatif des lots d'animaux après 90 et 120 jours d'étude

**Vp** = veine portale ; **ah** = artère hépatique ; **cb** = canal biliaire.



**Figure 8** : Parenchyme hépatique de rates mettant en évidence les espaces centro-lobulaires  
**A** : lot témoin à J<sub>90</sub> ; **B** : lot expérimental à J<sub>90</sub> ; **C** : lot témoin J<sub>120</sub> ; **D** : lot expérimental à J<sub>120</sub>  
 Coloration *Hémalun-éosine*

Grossissements : × 100

Les images montrent un exemple représentatif des lots d'animaux après 90 et 120 jours d'étude

**h** = hépatocyte ; **vcl** = veine centro lobulaire ; **s** = sinusöide.

## **CHAPITRE II: EFFET DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE *H. floribunda* SUR LES REINS DES RATS**

### **1- Etude biochimique sur les reins des rats**

#### **1-1- Taux sériques des métabolites des rats**

##### **1-1-1- Effets chez les rats mâles**

Le Tableau IX présente les taux sériques des métabolites des reins chez les rats mâles avant, pendant et après arrêt des gavages.

##### **1-1-1-1 Taux sériques de l'acide urique**

Les valeurs moyennes de taux sériques d'acide urique des rats du lot expérimental n'ont pas significativement ( $p > 0,05$ ) variées comparées à celles des rats du lot témoin. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $15,00 \pm 1,15$  mg/dL et  $16,7 \pm 0,59$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $14,50 \pm 0,62$  mg/dL et  $16,10 \pm 1,25$  mg/dL dans le lot expérimental

##### **1-1-1-2- Taux sériques de la créatinine**

Aucune modification significative ( $p > 0,05$ ) des valeurs moyennes des taux de la créatinine des rats mâles du lot expérimental par rapport à celui des rats mâles du lot témoin, n'a été observée. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $0,428 \pm 0,01$  mg/dL et  $0,455 \pm 0,02$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $0,417 \pm 0,01$  mg/dL et  $0,443 \pm 0,02$  mg/dL dans le lot expérimental.

##### **1-1-2- Effets chez les rates**

Le Tableau X présente les taux sériques des métabolites des reins chez les rates avant, pendant et après arrêt des gavages.

##### **1-1-3- Taux sériques de l'acide urique**

Les valeurs moyennes des taux sériques d'acide urique des rates du lot expérimental n'ont pas significativement ( $p > 0,05$ ) varié, comparées à celles des rates du lot témoin. Ces valeurs moyennes ont varié entre  $15,00 \pm 1,15$  mg/dL et  $16,7 \pm 0,60$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $14,50 \pm 0,62$  mg/dL et  $16,10 \pm 1,25$  mg/dL dans le lot expérimental.

**Tableau IX : Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs des reins chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
Ac. U (mg/dL)	Tém	17,20 ± 0,91	15 ± 1,15	16,7 ± 0,59	16,10 ± 0,84	15,20 ± 0,95	15,60 ± 1,14	16,20 ± 0,87	15,70 ± 0,70
	Exp	15,60 ± 0,54	14,50 ± 0,62 a	15,50 ± 0,32	14,70 ± 0,56	16,10 ± 1,25	16,07 ± 1,20	15,70 ± 1,012	14,70 ± 0,83
Créa (mgd/L)	Tém	0,40 ± 0,01	0,433 ± 0,02	0,451 ± 0,01	0,433 ± 0,02	0,435 ± 0,01	0,455 ± 0,02	0,437 ± 0,02	0,428 ± 0,01
	Exp	0,40 ± 0,01	0,418 ± 0,01	0,433 ± 0,01	0,443 ± 0,02	0,417 ± 0,01	0,423 ± 0,01	0,422 ± 0,02	0,424 ± 0,01

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05 ; (\*\*) = p < 0,01 ; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; Ac. U = Acide urique ; Créa = Créatinine ; Tém = témoin ;

Exp = expérimental.

**Tableau X : Valeurs des taux sériques des métabolites marqueurs des reins chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
Ac. U mg/dL	Tém	14,00 ± 0,68	15,00 ± 1,15	16,70 ± 0,60	16,1 ± 0,84	15,20 ± 0,95	15,60 ± 1,14	16,20 ± 0,87	16,20 ± 0,69
	Exp	15,4 ± 0,76	14,50 ± 0,62	15,30 ± 0,34	14,70 ± 0,55	16,10 ± 1,25	16,2 ± 1,02	15,70 ± 1,01	14,70 ± 0,83
Créa mg/dL	Tém	0,41 ± 0,01	0,471 ± 0,01	0,473 ± 0,02	0,471 ± 0,01	0,486 ± 0,02	0,448 ± 0,02	0,488 ± 0,02	0,483 ± 0,01 b
	Exp	0,40 ± 0,01	0,427 ± 0,02	0,492 ± 0,02	0,489 ± 0,02	0,495 ± 0,02	<b>0,380 ± 0,01*</b>	0,455 ± 0,02	0,418 ± 0,01

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin: (\*) = p < 0,05; (\*\*) = p < 0,01; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; Ac. U = Acide urique ; Créa = Créatinine ; Tém = témoin ;

Exp = expérimental.

#### **1-1-4- Taux sériques de la créatinine**

Les valeurs moyennes des taux sériques de la créatinine des rates du lot expérimental ont été significativement ( $p < 0,05$ ) diminuées de manière transitoire par rapport à celles du lot témoins ( $0,380 \pm 0,01$  mg/dL contre  $0,448 \pm 0,02$  mg/dL soit de 28,03% a été observée au temps  $J_{60}$ . Aucune autre modification significative ( $p > 0,05$ ) durant les autres jours d'étude n'a été observée.

#### **1-2- Taux sériques des électrolytes des rats**

##### **1-2-1- Effets chez les rats mâles**

Le Tableau XI présente les taux sériques des électrolytes des reins chez les rats avant, pendant et après arrêt des gavages.

##### **1-2-1-1- Taux sériques de calcium**

Les valeurs moyennes des taux sériques de calcium des rats du lot expérimental, comparées à celles des rats du lot témoin n'ont pas été significativement ( $p > 0,05$ ) modifiées. Ces valeurs moyennes des taux sériques de calcium des rats ont oscillé entre  $9,49 \pm 0,22$  mg/dL et  $10,75 \pm 0,35$  mg/dL dans le lot témoin et entre  $9,40 \pm 0,23$  mg/dL et  $10,34 \pm 0,41$  mg/dL dans le lot expérimental.

##### **1-2-1-2- Taux sériques de chlore**

Au cours du premier mois d'étude, les valeurs moyennes des taux sériques de chlore des rats mâles du lot expérimental ont été statistiquement égales à celles du lot témoin. Cependant, aux temps  $J_{60}$  ( $108,10 \pm 1,69$  mEq/L contre  $99,66 \pm 2,02$  mEq/L) et  $J_{90}$  ( $107,80 \pm 0,91$  mEq/L contre  $101,24 \pm 1,55$  mEq/L), les valeurs du lot expérimental ont été significativement ( $p > 0,05$ ) augmentées par rapport à celles des rats mâles du lot témoin. Ces augmentations ont été de 08,53% au temps  $J_{60}$  et de 06,12% au temps  $J_{90}$ . Les valeurs moyennes des taux sériques de chlore des rats ont oscillé entre  $99,66 \pm 2,02$  mEq/L et  $104,40 \pm 0,73$  mEq/L dans le lot témoin et entre  $102,43 \pm 0,60$  mEq/L et  $108,10 \pm 1,69$  mEq/L dans le lot expérimental.

**Tableaux XI : Valeurs des taux sériques des électrolytes marqueurs des reins chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
Ca <sup>2+</sup> mg/dL	Tém	9,73 ± 0,24	9,49 ± 0,22	10,44 ± 0,19	9,55 ± 0,19	9,49 ± 0,22	10,25 ± 0,21	10,75 ± 0,35	10,37 ± 0,28
	Exp	10,07 ± 0,19	9,61 ± 0,19	9,40 ± 0,23	9,73 ± 0,24	9,55 ± 0,19	9,72 ± 0,44	9,77 ± 0,29	10,34 ± 0,41
Cl <sup>-</sup> mEq/L	Tém	101,30 ± 0,70	103,20 ± 0,29	101,50 ± 0,91	104,40 ± 0,73	100,00 ± 1,98	99,66 ± 2,02	101,24 ± 1,55	103,30 ± 0,53
	Exp	103,2 ± 1,24	104,21 ± 0,57	103,50 ± 1,08	102,43 ± 0,60	106,46 ± 1,47	<b>108,10 ± 1,69*</b>	<b>107,80 ± 0,91*</b>	104,20 ± 0,57 c
K <sup>+</sup> mEq/L	Tém	4,63 ± 0,22	4,18 ± 0,20	4,25 ± 0,25	4,27 ± 0,24	4,07 ± 0,28	3,97 ± 0,17	4,20 ± 0,23	3,66 ± 0,10
	Exp	4,16 ± 0,24	3,70 ± 0,11	3,81 ± 0,13	4,06 ± 0,26	3,88 ± 0,12	3,63 ± 0,17	<b>3,31 ± 0,06*</b>	4,43 ± 0,21
Na <sup>+</sup> mEq/L	Tém	141,80 ± 1,162	142,70 ± 0,96	144,10 ± 1,17	143,00 ± 1,26	145,20 ± 0,84	145,00 ± 1,12	139,60 ± 1,45	143,00 ± 2,07
	Exp	142,8 ± 0,69	145,00 ± 1,17	147,10 ± 0,46	146,80 ± 0,65	<b>153,3 ± 2,08*</b>	147,90 ± 0,57	<b>151,80 ± 3,12*</b>	145,00 ± 1,17

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin: (\*) = p < 0,05; (\*\*) = p < 0,01; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; Ca<sup>2+</sup> = (calcium) ; Cl<sup>-</sup> = (chlore) ; K<sup>+</sup> = (potassium) ; Na<sup>+</sup> = (sodium) ;  
Tém = témoin ; Exp = expérimental.

### **1-2-1-3- Taux sériques du potassium**

Les valeurs moyennes des taux sériques de potassium des rats mâles du lot expérimental comparées à celles des rats mâles du lot témoin ont baissé de manière significative ( $p < 0,05$ ) au temps  $J_{90}$  ( $3,31 \pm 0,06$  mEq/L contre  $4,20 \pm 0,23$  mEq/L), soit de 21,19%. Les valeurs moyennes des taux sériques de potassium des rats mâles ont oscillé entre  $3,66 \pm 0,10$  mEq/L et  $4,20 \pm 0,23$  mEq/L dans le lot témoin et entre  $3,31 \pm 0,06$  mEq/L et  $4,43 \pm 0,21$  mEq/L dans le lot expérimental

### **1-2-1-4- Taux sériques de sodium**

Les valeurs moyennes des taux sériques de sodium des rats mâles du lot expérimental ont été significativement ( $p < 0,05$ ) augmentées par rapport à celles des rats mâles du lot témoin aux temps  $J_{28}$  ( $153,30 \pm 2,08$  mEq/L contre  $145,20 \pm 0,84$  (mEq/L) soit de 05,58%) et  $J_{90}$  ( $151,80 \pm 3,12$  mEq/L contre  $139,60 \pm 1,45$  mEq/L soit de 08,74%). Ces valeurs moyennes des taux sériques de sodium des rats mâles ont oscillé entre  $139,60 \pm 1,45$  mEq/L et  $145,20 \pm 0,84$  mEq/L dans le lot témoin et entre  $145,00 \pm 1,17$  mEq/L et  $153,30 \pm 2,08$  mEq/L dans le lot expérimental (**Tableau XI**).

### **1-2-2- Effets chez les rates**

Le Tableau XII présente les taux sériques des électrolytes des reins chez les rates avant, pendant et après arrêt des gavages.

#### **1-2-2-1- Taux sériques de calcium**

Les valeurs moyennes des taux sériques de calcium des rates du lot expérimental ont diminué par rapport à celles des rates du lot témoin. Cette diminution a été particulièrement significative ( $p < 0,05$ ) aux temps  $J_{28}$  ( $10,16 \pm 0,23$  mg/dL contre  $11,51 \pm 0,20$  mg/dL) soit de 11,72%,  $J_{90}$  ( $9,30 \pm 0,29$  mg/dL contre  $10,68 \pm 0,28$  mg/dL) soit de 12,91% et  $J_{60}$  ( $9,69 \pm 0,32$  mg/dL contre  $11,30 \pm 0,19$  mg/dL) soit de 14,22%. Ces valeurs moyennes des taux sériques de calcium des rates ont oscillé entre  $10,41 \pm 0,40$  et  $11,51 \pm 0,20$  dans le lot témoin et entre  $9,30 \pm 0,29$  et  $10,31 \pm 0,24$  dans le lot expérimental.

**Tableaux XII : Valeurs des taux sériques des électrolytes marqueurs des reins chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant			Pendant			Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
Ca <sup>2+</sup> mg/dL	Tém	10,31 ± 0,23	11,21 ± 0,27	10,55 ± 0,47	10,77 ± 0,23	11,51 ± 0,20 b	11,30 ± 0,19	10,68 ± 0,28	10,41 ± 0,40
	Exp	9,95 ± 0,25	10,01 ± 0,31	10,12 ± 0,38	10,31 ± 0,24	<b>10,16 ± 0,23*</b>	<b>9,69 ± 0,32**</b>	<b>9,30 ± 0,29*</b>	9,73 ± 0,29
Cl <sup>-</sup> mEq/L	Tém	102,70 ± 0,68	104,30 ± 0,52	103,40 ± 0,31	102,20 ± 0,51	102,10 ± 0,37	103,60 ± 0,41	104,21 ± 0,96	104,30 ± 0,51
	Exp	102 ± 0,98	105,00 ± 0,36	106,60 ± 0,43	104,10 ± 0,18	103,80 ± 1,07	105,00 ± 0,51	105,10 ± 1,00	105,00 ± 0,36
K <sup>+</sup> mEq/L	Tém	3,38 ± 0,11	3,86 ± 0,28	3,70 ± 0,16	3,63 ± 0,09	3,73 ± 0,29	3,61 ± 0,23	3,67 ± 0,22	3,72 ± 0,21
	Exp	3,56 ± 0,06	3,48 ± 0,08	3,36 ± 0,07	3,47 ± 0,19	3,42 ± 0,08	3,35 ± 0,05	3,33 ± 0,04	3,38 ± 0,11
Na <sup>+</sup> mEq/L	Tém	141,20 ± 0,61	143,60 ± 0,68	144,00 ± 0,84	143,50 ± 0,86	146,50 ± 1,09	145,00 ± 1,23	142,40 ± 1,00	143,30 ± 0,71
	Exp	142,2 ± 0,69	143,40 ± 0,4	143,60 ± 0,77	144,00 ± 0,84	144,90 ± 0,69	146,80 ± 0,97	143,60 ± 0,77	143,40 ± 0,76

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05 ; (\*\*) = p < 0,01 ; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; Ca<sup>2+</sup> = (calcium) ; Cl<sup>-</sup> = (chlore) ; K<sup>+</sup> = (potassium) ; Na<sup>+</sup> = (sodium) ;

Tém = témoin. Exp = expérimental

#### **1-2-2-2- Taux sériques de chlore**

Les valeurs moyennes du taux sérique de chlore des rates lot expérimental sont statistiquement égales à celles des rates du lot témoin. Ces valeurs moyennes du taux sérique de chlore des rates ont oscillé entre  $102,10 \pm 0,37$  mEq/L et  $104,30 \pm 0,51$  mEq/L dans le lot témoin et entre  $103,80 \pm 1,07$  mEq/L et  $106,60 \pm 0,43$  mEq/L dans le lot essai.

#### **1-2-2-3- Taux sériques de potassium**

Les valeurs moyennes des taux sériques de potassium des rates du lot expérimental n'ont pas été significativement modifiées comparativement à celles des rates du lot témoin. Ces valeurs moyennes des taux sériques de potassium des rates ont oscillé entre  $3,61 \pm 0,23$  mEq/L et  $3,86 \pm 0,28$  mEq/L dans le lot témoin et entre  $3,33 \pm 0,04$  mEq/L et  $3,48 \pm 0,08$  mEq/L dans le lot expérimental (Tableau XII).

#### **1-2-2-4- Taux sériques de sodium**

Les valeurs moyennes des taux sériques de sodium chez les rates du lot expérimental n'ont pas été significativement modifiées par rapport à celles des rates du lot témoin. Ces valeurs moyennes des taux sériques de sodium des rates ont oscillé entre  $142,40 \pm 1,00$  mEq/L et  $146,50 \pm 1,09$  mEq/L dans le lot témoin et entre  $143,40 \pm 0,4$  mEq/L et  $146,80 \pm 0,97$  mEq/L dans le lot expérimental (Tableau XII).

### **2- Etude histologique sur les reins des rats**

#### **2-1- Masses relatives des reins des rats mâles et des rates**

Les valeurs moyennes des masses relatives des reins des rats mâles et rates des lots expérimentaux ne sont pas significativement ( $p > 0,05$ ) différentes de celles des rats et rates des lots témoins correspondants aux différentes dates de pesée (Tableau XIII).

#### **2-2- Description des coupes de reins des rats mâles et des rates**

Dans ces portions du cortex rénal, chaque capsule de Bowman (CB) bien fermé, présente des artérioles afférentes se divisant pour former des pelotons capillaires ou glomérules clairement observables. Ces glomérules sont entourés de chambres glomérulaires ou espaces de Bowman (EB). De plus, dans les différents lots, les tubes contournés proximaux (TCP) présentent chacun, un épithélium avec une bordure en brosse qui remplit presque complètement la lumière. Les tubes contournés distaux (TCD), par contre, ne présentent pas de bordure en brosse et ont une lumière plus grande et mieux délimitée. Ces différentes

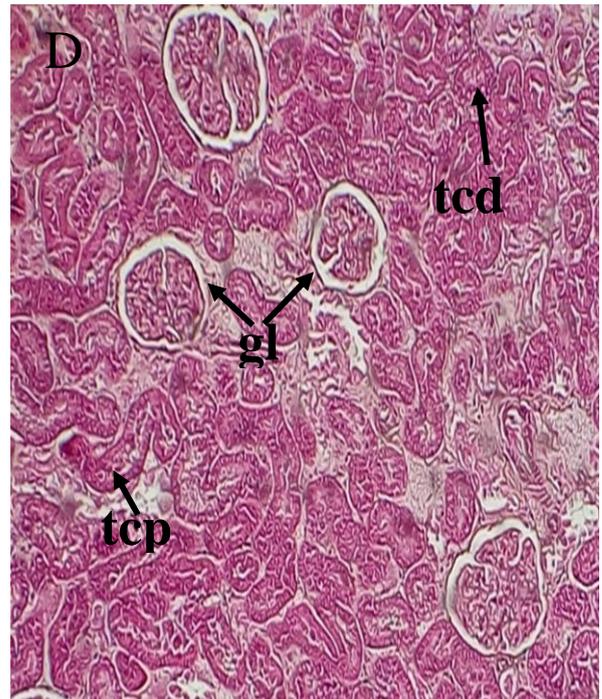
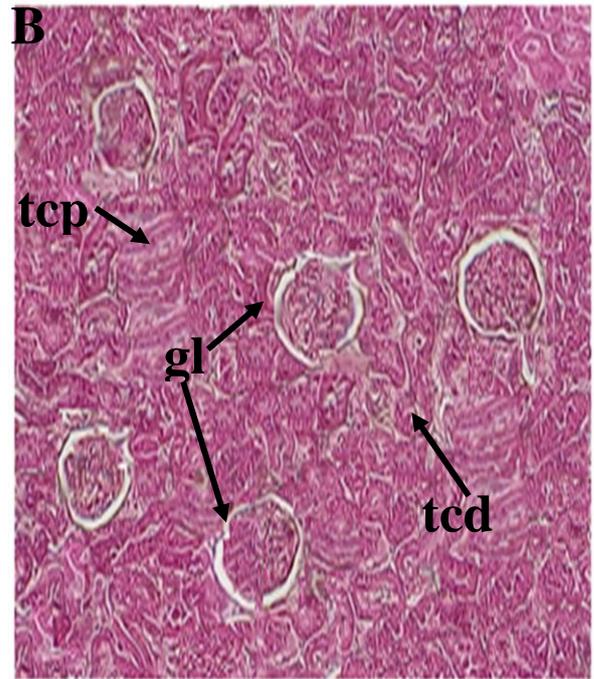
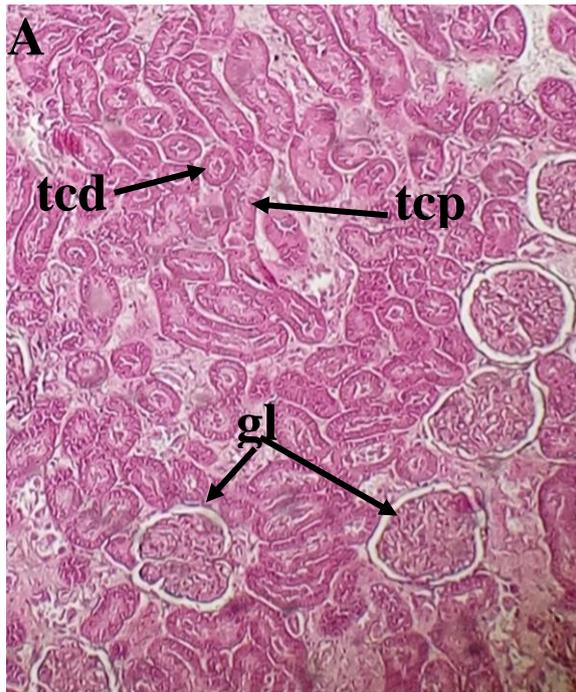
structures du néphron sont intactes et bien conservées. Aucune anomalie particulière n'est observable aussi bien dans les lots témoins que dans les lots expérimentaux (**Figure 9**) et (**Figure 10**).

**Tableau XIII : Influence de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* sur les masses relatives des reins des rats et rates**

<b>Valeurs moyennes des masses relatives des reins (g)</b>				
Dates de prélèvement	Lots	Mâles	Femelles	Significativité par rapport au lot témoin correspondant
J <sub>90</sub>	Témoin	0,72 ± 0,07	0,69 ± 0,03	
	Expérimental	0,70 ± 0,03	0,68 ± 0,06	ns
J <sub>120</sub>	Témoin	0,77 ± 0,01	0,73 ± 0,5	
	Expérimental	0,64 ± 0,02	0,73 ± 0,04	ns

Les valeurs sont exprimées en Moyennes ± SEM ; n<sub>1</sub> = 10 animaux pour J<sub>90</sub> et n<sub>2</sub> = 5 pour J<sub>120</sub>.

Les comparaisons se font entre les lots témoins et les lots expérimentaux.



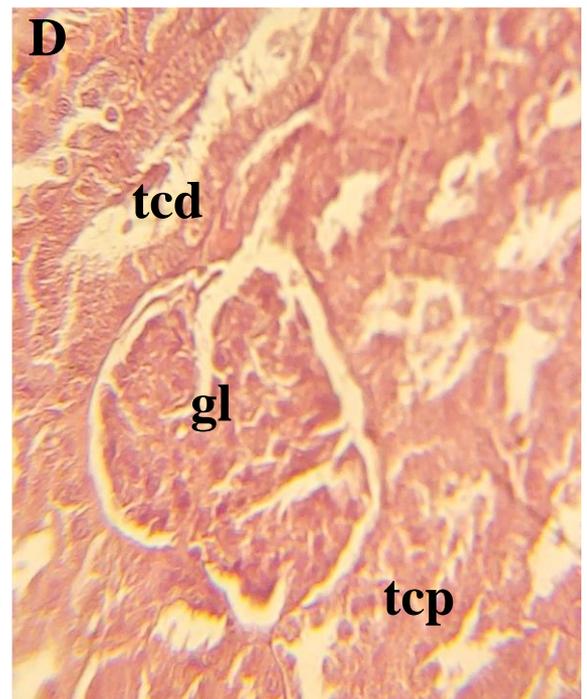
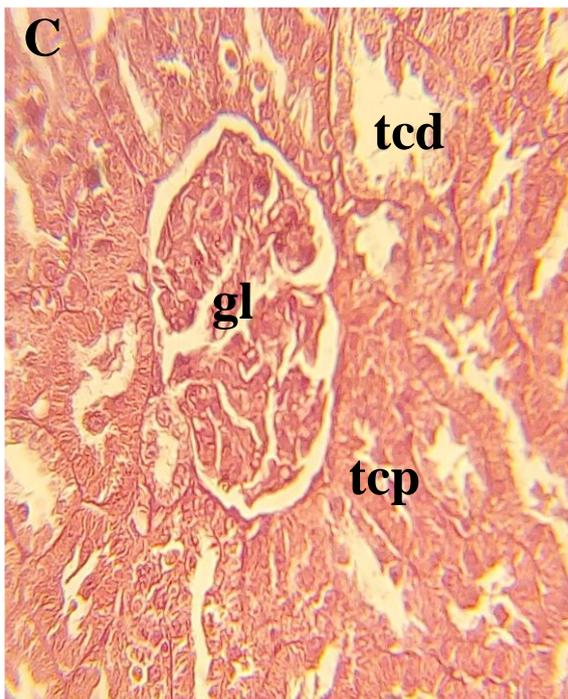
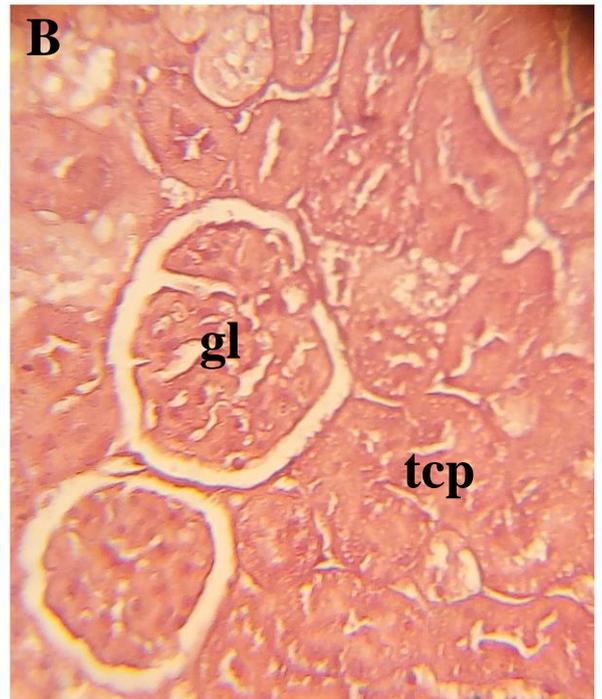
**Figure 9 : Portions du cortex rénal des rats mâles montrant les différentes parties du néphron**

A : lot témoin à J<sub>90</sub> ; B : lot expérimental à J<sub>90</sub> ; C : lot témoin J<sub>120</sub> ; D : lot expérimental à J<sub>120</sub>

Coloration *Hémalun-éosine*

Grossissement : × 20

**gl** = glomérule ; **tcp** = tube contourné proximal ; **tcd** = tube contourné distal



**Figure10 : Portions du cortex rénal des rates montrant les différentes parties du néphron**

A : lot témoin à J<sub>90</sub> ; B : lot expérimental à J<sub>90</sub> ; C : lot témoin J<sub>120</sub> ; D : lot expérimental à J<sub>120</sub>

Coloration *Hémalum-éosine*

Grossissement : × 100

**gl** = glomérule ; **tcp** = tube contourné proximal ; **tcd** = tube contourné distal

## **CHAPITRE III : EFFET DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES DE *H. floribunda* SUR LE COEUR DES RATS**

### **1- Etude biochimique sur le cœur des rats**

#### **1-1- Taux sériques des lipides**

##### **1-1-1- Effets chez les rats mâles**

Le Tableau XIV présente les valeurs des taux sériques des lipides marqueurs du cœur chez les rats mâles avant, pendant et après arrêt des gavages.

##### **1-1-1-1- Taux sériques des triglycérides**

Aucune modification significative des valeurs moyennes des taux des triglycérides des rats du lot expérimental par rapport à celles du lot témoin. Ces valeurs moyennes des taux des triglycérides ont varié de  $0,566 \pm 0,05$  mmol/L à  $0,812 \pm 0,07$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,551 \pm 0,07$  mmol/L à  $0,731 \pm 0,08$  mmol/L dans le lot expérimental.

##### **1-1-1-2- Taux sériques du cholestérol total**

L'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* a induit une diminution significative ( $p < 0,01$ ) du taux de cholestérol des rats du lot expérimental par rapport à celui des rats du lot témoin au temps J<sub>14</sub> ( $0,936 \pm 0,03$  mmol/L contre  $1,123 \pm 0,01$  mmol/L), soit de 16,65%. Aucune autre modification significative durant les autres jours d'étude n'a été observée. Les valeurs moyennes des taux de cholestérol ont varié de  $0,923 \pm 0,02$  mmol/L à  $1,123 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,936 \pm 0,03$  mmol/L à  $1,076 \pm 0,02$  mmol/L dans le lot expérimental.

##### **1-1-1-3- Taux sériques du cholestérol HDL**

Une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) transitoire du taux de cholestérol HDL des rats du lot expérimental a été observée au temps J<sub>28</sub> ( $0,592 \pm 0,01$  mmol/L contre  $0,523 \pm 0,03$  mmol/L) ; soit une hausse de 13,19%. Les valeurs moyennes des taux de cholestérol HDL ont varié de  $0,494 \pm 0,02$  mmol/L à  $0,565 \pm 0,02$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,521 \pm 0,00$  mmol/L à  $0,592 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot expérimental.

**Tableau XIV : Valeurs des taux sériques des lipides marqueurs du cœur chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant			Pendant			Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
TG mmol/L	Tém	0,590 ± 0,05	0,688 ± 0,05	0,812 ± 0,07	0,622 ± 0,08	0,568 ± 0,02	0,567 ± 0,01	0,588 ± 0,00	0,566 ± 0,05
	Exp	0,571 ± 0,06	0,551 ± 0,07	0,554 ± 0,00	0,586 ± 0,02	0,549 ± 0,06	0,731 ± 0,08	0,708 ± 0,10	0,651 ± 0,14
TC mmol/L	Tém	0,986 ± 0,02	1,038 ± 0,04	1,123 ± 0,01 c	0,977 ± 0,03	0,950 ± 0,02	0,923 ± 0,02	0,986 ± 0,02	0,970 ± 0,04
	Exp	0,943 ± 0,03	0,916 ± 0,03	<b>0,936 ±</b> <b>0,03 (**)</b>	0,958 ± 0,04	0,974 ± 0,02	1,041 ± 0,02	1,076 ± 0,02	1,020 ± 0,05
HDL-c mmol/L	Tém	0,540 ± 0,01	0,565 ± 0,02	0,563 ± 0,01	0,494 ± 0,02	0,523 ± 0,03	0,524 ± 0,01	0,547 ± 0,01	0,542 ± 0,01
	Exp	0,513 ± 0,02	0,523 ± 0,01	0,521 ± 0,00	0,542 ± 0,02	<b>0,592 ±</b> <b>0,01 (*)</b>	0,542 ± 0,01	0,553 ± 0,01	0,523 ± 0,01
LDL-c mmol/L	Tém	0,173 ± 0,03	0,155 ± 0,02	0,185 ± 0,03	0,195 ± 0,03	0,164 ± 0,02	0,136 ± 0,02	0,143 ± 0,02	0,167 ± 0,04
	Exp	0,166 ± 0,03	0,138 ± 0,03	0,159 ± 0,03	0,145 ± 0,03	0,129 ± 0,02	0,160 ± 0,02	0,183 ± 0,02	0,195 ± 0,03
IAP	Tém	0,038 ± 0,00	0,085 ± 0,03	0,159 ± 0,05	0,100 ± 0,08	0,035 ± 0,07	0,034 ± 0,00	0,031 ± 0,0	0,089 ± 0,01
	Exp	0,041 ± 0,01	0,022 ± 0,13	0,026 ± 0,04	0,033 ± 0,03	-0,032 ± 0,1	0,129 ± 0,05	0,107 ± 0,04	0,095 ± 0,02

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05 ; (\*\*) = p < 0,01 ; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; TG = triglycérides ; TC = cholestérol total ; HDL-c = cholestérol de haute densité ; LDL-c = cholestérol de basse densité ; IAP = indice d'athérogénicité plasmatique ; Tém = témoin ; Exp = expérimental

#### **1-1-1-4- Taux sériques du cholestérol LDL**

Les valeurs moyennes des taux du cholestérol LDL des rats du lot expérimental n'ont pas été significativement modifiées comparées à celles des rats du le lot témoin. Ces valeurs moyennes des taux du cholestérol LDL ont varié de  $0,136 \pm 0,02$  mmol/L à  $0,195 \pm 0,03$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,129 \pm 0,02$  mmol/L à  $0,195 \pm 0,03$  mmol/L dans le lot expérimental (**Tableau XIV**).

#### **1-1-1-5- Indice d'athérogenicité plasmatique (IAP)**

Pendant la période de traitement, aucune variation significative ( $p > 0,05$ ) de la valeur moyenne de l'indice d'athérogenicité plasmatique des rats du lot expérimental n'a été modifiée lorsqu'on la compare à celle des rats du lot témoin. Ces valeurs moyennes de l'indice d'athérogenicité plasmatique ont varié de  $0,031 \pm 0,0$  à  $0,159 \pm 0,05$  dans le lot témoin et de  $-0,032 \pm 0,1$  à  $0,129 \pm 0,05$  dans le lot expérimental (**Tableau XIV**).

#### **1-1-2- Effets chez les rates**

Le Tableau XV présente les valeurs des taux sériques des lipides marqueurs du cœur chez les rates avant, pendant et après arrêt des gavages.

##### **1-1-2-1- Taux sériques des triglycérides**

Les valeurs moyennes des taux des triglycérides des rates du lot expérimental comparées à celles des rates du lot témoin ne montrent aucune différence significative ( $p > 0,05$ ). Ces valeurs moyennes des taux des triglycérides ont varié de  $0,670 \pm 0,01$  mmol/L à  $0,692 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,695 \pm 0,01$  mmol/L à  $0,755 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot expérimental.

##### **1-1-2-2- Taux sériques du cholestérol total**

Une diminution significative ( $p < 0,05$ ) transitoire du taux de cholestérol total des rates du lot expérimental par rapport au témoin a été observée au temps  $J_{14}$  ( $0,992 \pm 0,01$  mmol/L contre  $1,089 \pm 0,01$  soit de 08,90% mmol/L). Aucune autre modification significative durant les autres jours d'étude n'a été observée. Ces valeurs moyennes des taux de cholestérol total ont varié de  $0,985 \pm 0,02$  mmol/L à  $1,089 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,992 \pm 0,01$  mmol/L à  $1,076 \pm 0,02$  mmol/L dans le lot expérimental.

**Tableau XV : Valeurs des taux sériques des lipides marqueurs du cœur chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Après		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
TG mmol/L	Tém	0,683 ± 0,01	0,682 ± 0,01	0,693 ± 0,01	0,690 ± 0,01	0,678 ± 0,01	0,670 ± 0,01	0,688 ± 0,01	0,692 ± 0,01
	Exp	0,675 ± 0,01	0,710 ± 0,01	0,710 ± 0,01	0,695 ± 0,01	0,755 ± 0,01	0,718 ± 0,00	0,702 ± 0,01	0,701 ± 0,02
TC mmol/L	Tém	0,996 ± 0,02	1,020 ± 0,03	1,089 ± 0,01	1,026 ± 0,01	1,017 ± 0,03	0,985 ± 0,02	1,0166 ± 0,02	1,0214 ± 0,03
	Exp	1,003 ± 0,02	1,026 ± 0,02	0,992 ± 0,01 (*)	1,027 ± 0,02	1,030 ± 0,02	1,021 ± 0,02	1,076 ± 0,02	1,046 ± 0,01
HDL-c mmol/L	Tém	0,552 ± 0,01	0,541 ± 0,00	0,559 ± 0,01	0,562 ± 0,01	0,554 ± 0,01	0,543 ± 0,00	0,551 ± 0,00	0,567 ± 0,01
	Exp	0,533 ± 0,0	0,563 ± 0,01	0,577 ± 0,01	0,557 ± 0,01	<b>0,614 ±</b> <b>0,0 (*)</b>	0,562 ± 0,01	0,553 ± 0,01	0,566 ± 0,01
LDL-c mmol/L	Tém	0,128 ± 0,02	0,136 ± 0,02	0,169 ± 0,01	0,125 ± 0,02	0,129 ± 0,02	0,132 ± 0,02	0,147 ± 0,02	0,135 ± 0,03
	Exp	0,137 ± 0,01	0,115 ± 0,02	0,132 ± 0,00 (*)	0,129 ± 0,01	0,107 ± 0,02	0,127 ± 0,02	0,138 ± 0,02	0,130 ± 0,01
IAP	Tém	0,093 ± 0,00	0,100 ± 0,01	0,094 ± 0,01	0,090 ± 0,01	0,098 ± 0,00	0,091 ± 0,01	0,096 ± 0,00	0,087 ± 0,02
	Exp	0,1 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,090 ± 0,00	0,096 ± 0,01	0,089 ± 0,01	0,100 ± 0,00	0,100 ± 0,00	0,092 ± 0,02

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05 ; (\*\*) = p < 0,01 ; (\*\*\*) = p < 0,001.

Para = Paramètres ; TG = triglycérides ; TC = cholestérol total ; HDL-c = cholestérol de haute densité ; LDL-c = cholestérol de basse densité ; IAP = indice d'athérogénicité plasmatique ; Tém = témoin ; Exp = expérimental.

### **1-1-2-3- Taux sériques du cholestérol HDL**

Une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) transitoire du taux de cholestérol HDL des rates du lot expérimental par rapport au témoin a été observée à J<sub>28</sub> ( $0,614 \pm 0,01$  mmol/L contre  $0,554 \pm 0,01$  mmol/L) ; soit une hausse de 10,83%. Aucune autre modification significative durant les autres jours d'étude n'a été observée. Les valeurs moyennes du taux de cholestérol HDL ont varié de  $0,541 \pm 0,00$  mmol/L à  $0,567 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,553 \pm 0,01$  mmol/L à  $0,614 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot expérimental (**Tableau XV**).

### **1-1-2-4- Taux sériques du cholestérol LDL**

Au quatorzième jour de gavage, le taux sérique du cholestérol LDL a significativement ( $p < 0,05$ ) diminué chez les rates du lot expérimental par rapport à celui des rates du lot témoin. Cette réduction a été de  $0,132 \pm 0,00$  mmol/L contre  $0,169 \pm 0,01$  mmol/L soit de 21,85%. Toutefois, elle a par la suite disparu, et, aucune modification notable du taux de cholestérol LDL des rates du lot expérimental par rapport à celui du lot témoin n'a été enregistrée. Les valeurs moyennes des taux du cholestérol LDL ont varié de  $0,125 \pm 0,02$  mmol/L à  $0,169 \pm 0,01$  mmol/L dans le lot témoin et de  $0,107 \pm 0,02$  mmol/L à  $0,138 \pm 0,02$  mmol/L dans le lot expérimental (**Tableau XV**).

### **1-1-2-5- Effets sur l'indice d'athérogénicité plasmatique chez les rates**

Les valeurs moyennes de l'indice d'athérogénicité plasmatique (IAP) des rates du lot expérimental ne sont pas significativement ( $p > 0,05$ ) différentes de celles des rats du lot témoin. Ces valeurs moyennes de l'indice d'athérogénicité plasmatique ont varié de  $0,087 \pm 0,02$  à  $0,100 \pm 0,01$  dans le lot témoin et de  $0,089 \pm 0,01$  à  $0,100 \pm 0,00$  dans le lot expérimental (**Tableau XV**).

## **1-2- Activités enzymatiques sériques**

### **1-2-1- Effets chez les rats mâles**

Le Tableau XVI présente les valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du cœur chez les rats mâles avant, pendant et après arrêt des gavages.

**Tableau XVI : Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du cœur chez les rats mâles avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
CPK	Tém	190,10 ± 5,00	212,90 ± 7,90	251,70 ± 11,40	331,48 ± 17,51	349,67 ± 22,66	412,45 ± 22,83	400,52 ± 24,33	393,00 ± 23,97
	Exp	193,1 ± 4,59	192,90 ± 14,75	260,20 ± 16,79	310,90 ± 7,89	409,52 ± 22,94	400,65 ± 24,33	410,41 ± 25,51	348,00 ± 30,62
LDH	Tém	469 ± 26,27	596,9 ± 44,56	596,7 ± 50,28	549,9 ± 37,29	628,1 ± 43,58	542,4 ± 36,21	562,7 ± 26,57	546,7 ± 46,11
	Exp	494,1 ± 32,47	649,5 ± 46,41	644,3 ± 45,70	584,4 ± 36,27	683,2 ± 46,45	681,4 ± 47,21	597,1 ± 58,07	538,3 ± 31,26

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne.  $n_1 = 10$  dans chaque lot (étude principale) ;  $n_2 = 5$  dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) =  $p < 0,05$  ; (\*\*) =  $p < 0,01$  ; (\*\*\*) =  $p < 0,001$ .

Para = Paramètres ; CPK = créatine phosphokinase ; LDH = lactate déshydrogénase.

### **1-2-1-1- Activités sériques des créatines phosphokinases**

Les valeurs moyennes des activités sériques des créatines phosphokinases (CPK) des rats du lot expérimental n'ont pas été significativement ( $p > 0,05$ ) modifiées par rapport à celles des rats du lot témoin. Ces valeurs moyennes des activités sériques des CPK des rats ont varié entre  $212,90 \pm 7,90$  UI/L et  $412,45 \pm 22,83$  UI/L dans le lot témoin et entre  $260,20 \pm 16,79$  UI/L et  $410,41 \pm 25,51$  UI/L dans le lot expérimental.

### **1-2-2- Activités sériques des lactates déshydrogénases**

Pendant toute la période d'administration de l'extrait, les valeurs moyennes des activités sériques des lactates déshydrogénases (LDH) des rats du lot expérimental n'ont pas été significativement ( $p > 0,05$ ) modifiées par rapport à celles des rats du lot témoin. Les valeurs moyennes des activités sériques des LDH des rats ont varié entre  $549,900 \pm 37,29$  UI/L et  $628,100 \pm 43,58$  UI/L dans le lot témoin et entre  $538,30 \pm 31,26$  UI/L et  $683,200 \pm 46,45$  UI/L dans le lot expérimental.

### **1-2-2- Effets chez les rates**

Le Tableau XVII présente les valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du cœur chez les rates avant, pendant et après arrêt des gavages.

#### **1-2-2-1- Activité sériques des créatines phosphokinases**

Les valeurs moyennes des activités sériques des créatines phosphokinases (CPK) des rates du lot expérimental n'ont pas été significativement ( $p > 0,05$ ) modifiées par rapport à celles des rates du lot témoin. Les valeurs moyennes des activités sériques de la CPK des rates ont varié entre  $206,80 \pm 9,38$  UI/L et  $300,90 \pm 21,63$  UI/L dans le lot témoin et entre  $171,00 \pm 13,14$  UI/L et  $283,90 \pm 21,66$  UI/L dans le lot expérimental.

#### **1-2-2-2- Activités sériques des lactates déshydrogénases**

Les valeurs moyennes des activités sériques des lactates déshydrogénases (LDH) des rates du lot expérimental n'ont pas été significativement ( $p > 0,05$ ) modifiées par rapport à celles des rates du lot témoins. Ces valeurs moyennes des activités sériques des LDH des rates ont varié entre  $413,000 \pm 32,73$  UI/L et  $540,30 \pm 48,68$  UI/L dans le lot témoin et entre  $455,4 \pm 50,58$  UI/L et  $585,800 \pm 32,87$  UI/L dans le lot expérimental.

**Tableau XVII : Valeurs des activités sériques des enzymes marqueurs du cœur chez les rates avant, pendant et après l'arrêt des gavages**

Para	Lots	Avant		Pendant				Après	
		J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>14</sub>	J <sub>21</sub>	J <sub>28</sub>	J <sub>60</sub>	J <sub>90</sub>	J <sub>120</sub>
CPK	Tém	149,5 ±	175,8 ±	181,6 ±	206,8 ±	235,4 ±	279,1 ±	276,2 ±	300,9 ±
		3,68	6,64	8,38	9,	12,26	13,7	22,4	21,63
	Exp	165,4 ±	171 ±	203,92	223,7 ±	228,70	249,9 ±	267,1 ±	283,9 ±
		5,44	13,14	± 4,56	7,6	± 4,6	8,80	10,5	21,66
LDH	Tém	440,2 ±	450,2 ±	466,3 ±	473,5 ±	413 ±	524,1 ±	488,5 ±	540,3 ±
		49,72	19,08	29,48	29,92	32,73	47,98	45,54	48,68
	Exp	397,3 ±	561,5 ±	552,8 ±	490,5 ±	547 ±	529,4 ±	585,8 ±	455,4 ±
		23,76	39,76	41,02	23,26	42,57	44,43	32,87	50,58

Les valeurs sont données sous forme de moyennes suivies de l'erreur standard sur la moyenne. n<sub>1</sub> = 10 dans chaque lot (étude principale) ; n<sub>2</sub> = 5 dans chaque lot (J<sub>120</sub>). Les comparaisons se font entre le lot témoin et le lot expérimental en fonction du temps.

(\*) = significativité par rapport au témoin : (\*) = p < 0,05 ; (\*\*) = p < 0,01 ; (\*\*\*) = p < 0,001

Para = Paramètres ; CPK = créatine phosphokinase ; LDH = lactate déshydrogénase.

## **2-Etude histologique sur le cœur des rats**

### **2-1-Masse relative de cœur des rats mâles et des rates**

Les valeurs moyennes des masses relatives de cœurs des rats et rates des lots lot expérimentaux ne sont pas significativement ( $p>0,05$ ) différentes de celles des rats et rates des lots témoins correspondants aux différentes dates de pesée (**Tableau XVIII**).

### **2-2- Description des coupes de cœur des rats mâles**

L'observation montre qu'il n'y a pas d'anomalies particulières. Les images représentatives des différents lots témoin et test à J<sub>90</sub> et J<sub>120</sub> montrent chacune un tissu cardiaque normal. On observe une organisation compacte de fibres accolées les unes aux autres. Les fibres sont disposées de façon variable. Certaines sont allongées dans le grand axe du cœur. D'autres sont perpendiculaires à cet axe de sorte qu'elles apparaissent en section transversale. Elles ne sont pas disloquées ni dispersées. Les tissus observés aussi bien dans les lots témoins que dans les expérimentaux se présentent sous l'aspect normal d'un réseau de fibres myocardiques (**Figure 11**).

### **2-3- Description des coupes de cœur des rates**

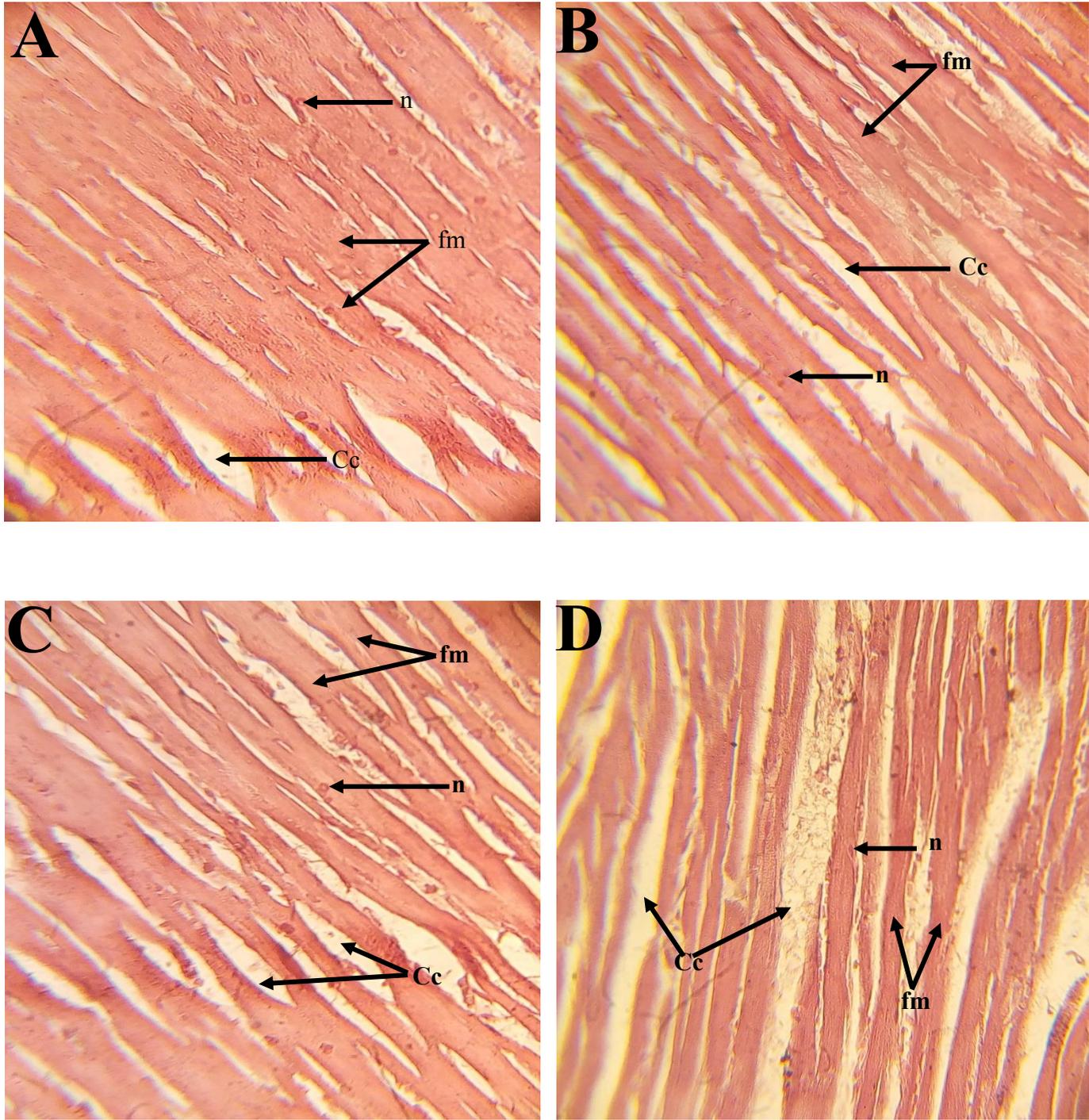
L'observation des coupes de cœur des rats a montré une structure anatomique normale presque identique au niveau de toutes les rates : aucune lésion ni d'anomalies particulières. Les fibres présentent à leurs extrémités des bifurcations et sont reliées entre elles par le réseau de collagène contenu dans le tissu conjonctif (**Figure 12**).

**Tableau XVIII : Influence de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* sur les masses relatives du cœur des rats et rates**

Valeurs moyennes des masses relatives de cœur (g)				
Dates de prélèvement	Lots	Mâles	Femelles	Significativité par rapport au lot témoin correspondant
J <sub>90</sub>	Témoin	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01	
	Expérimental	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,03	ns
J <sub>120</sub>	Témoin	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	
	Expérimental	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,01	ns

Les valeurs sont exprimées en Moyennes ± SEM ; n<sub>1</sub> = 10 animaux pour J<sub>90</sub> et n<sub>2</sub> = 5 pour J<sub>120</sub>.

Les comparaisons se font entre les lots témoins et les lots expérimentaux.



**Figure 11 : Portion de ventricule de cœur de rats mâles montrant l'architecture cellulaire du tissu cardiaque**

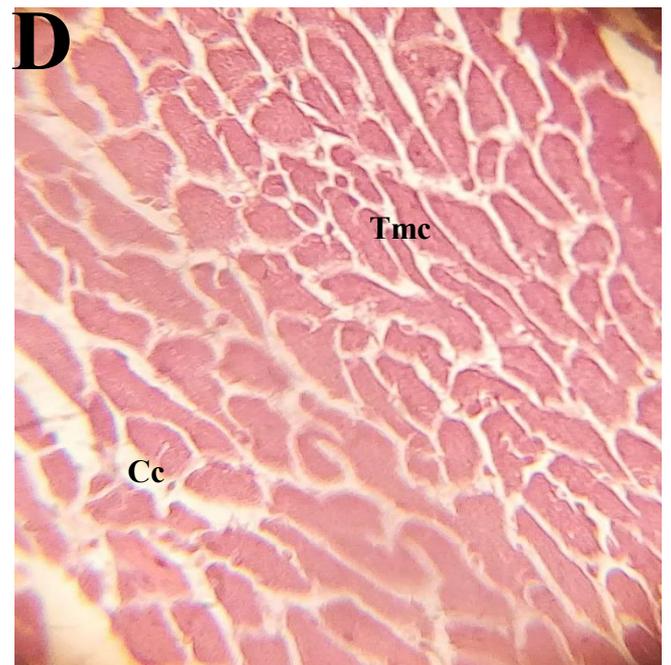
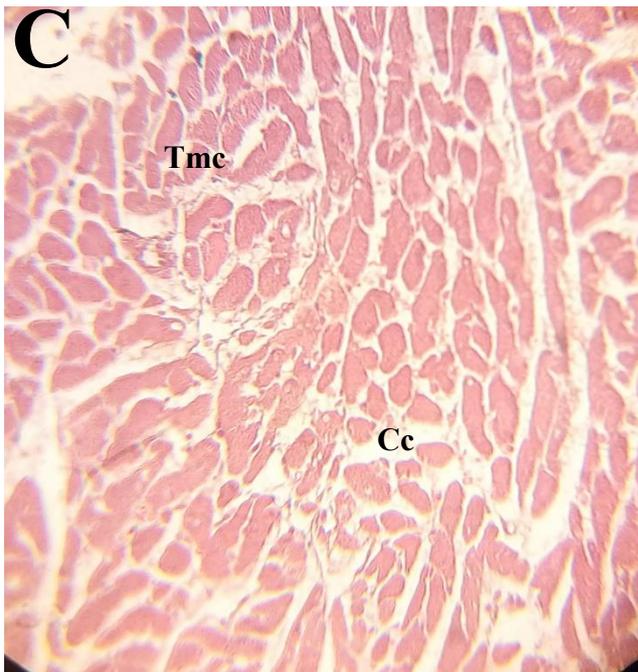
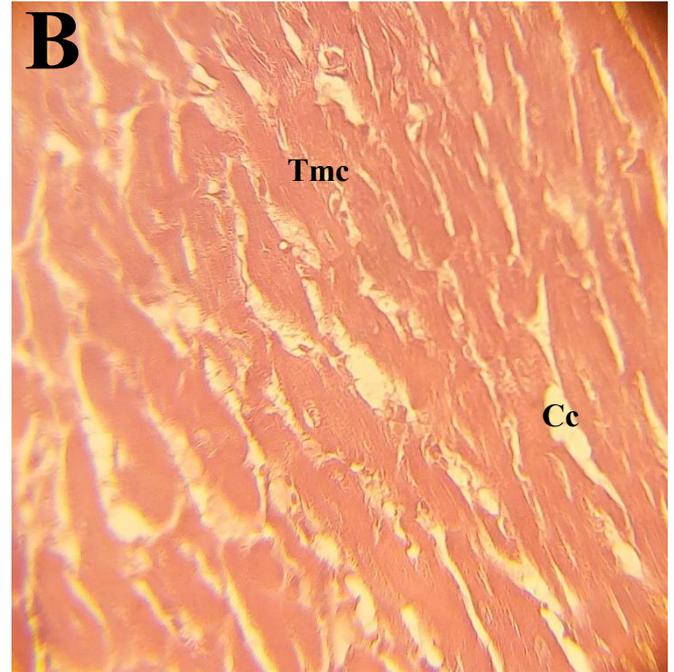
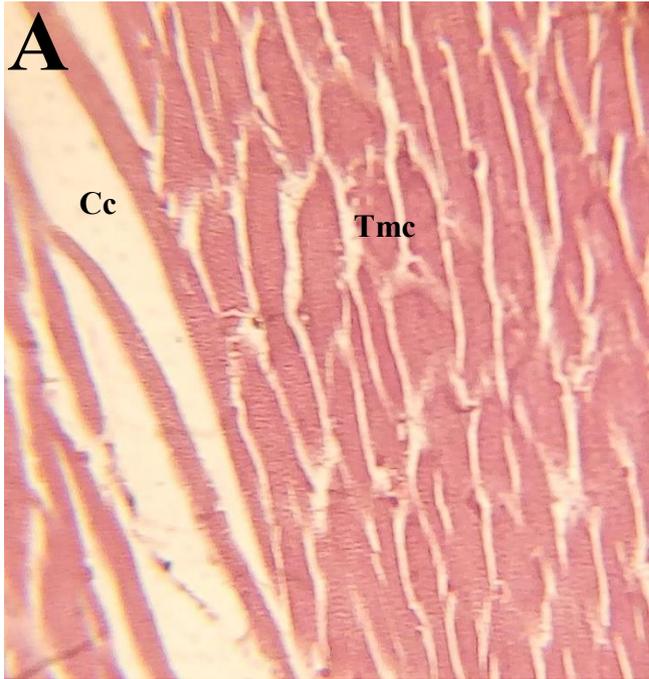
**A** : lot témoin à J<sub>0</sub> ; **B** : lot expérimental à J<sub>0</sub> ; **C** : lot témoin J<sub>120</sub> ; **D** : lot expérimental à J<sub>120</sub>

Grossissement : x 40

Coloration *Hémalun-éosine*

**fm** : faisceaux de fibres musculaires allongées ; **n** : noyau ; **Cc** : Cavité cardiaque.

L'intégrité du tissu semble conservée. Les cellules cardiaques ne sont pas endommagées



**Figure 12 : Portions d'oreillette de cœur de rates montrant l'organisation cellulaire du tissu cardiaque**

**A** : lot témoin à J<sub>90</sub> ; **B** : lot expérimental à J<sub>90</sub> ; **C** : lot témoin J<sub>120</sub> ; **D** : lot expérimental à J<sub>120</sub>

Grossissement : x 40

Coloration *Hémalun-éosine*

**Tmc** : Tissu musculaire cardiaque ; **Cc** : Cavité cardiaque.

## **IV-DISCUSSION**

L'utilisation des feuilles de *Holarrhena floribunda* comme médicaments pourrait générer des effets toxiques sur l'organisme. Dans le but d'évaluer ces effets toxiques, les effets de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de cette plante sur les fonctions et l'intégrité tissulaire du foie, des reins et du cœur ont été étudiés. Cette étude a porté sur le dosage de certains de marqueurs sériques et l'étude histologique de ces organes.

A propos de l'influence de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* sur le fonctionnement du foie, l'analyse des résultats du dosage de l'albumine et des bilirubines montre que les taux sériques de ces marqueurs n'ont pas été significativement modifiés dans les deux sexes. De cette analyse, il ressort que l'extrait de *H. floribunda* n'aurait pas d'influence sur les mécanismes hépatiques responsables de la régulation de ces paramètres. Ce résultat est similaire à celui de **Oyedeji et Bolarinwa (2012)**. Ces auteurs ont rapporté l'absence d'effets sur les taux de l'albumine et des bilirubines des rats traités avec des extraits aqueux et méthanolique de tige de feuilles de *Portulaca oleracea* et ont conclu à un non dysfonctionnement hépatique.

Cependant, l'extrait de *H. floribunda* a induit une réduction de la glycémie, dans les deux sexes. Cette diminution de la glycémie pourrait s'expliquer au niveau du foie par le stockage du glucose sous forme de glycogène, de l'inhibition de la production endogène hépatique du glucose. D'autres mécanismes comme la potentialisation de l'action de l'insuline sur les organes périphériques ou l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose peuvent aussi être mis en cause (**Lacherade., 2008**).

Ce résultat obtenu signifierait donc pour le foie, une incapacité à ne plus fournir du glucose et maintenir constante la glycémie. La conséquence de cet incident serait l'asphyxie des organes périphériques totalement dépendants du glucose pour leur fonctionnement (**Lacherade et al., 2009**).

Cependant, les diminutions de la glycémie observées ont été réversibles et se sont normalisées chez les rats dans les deux sexes. De ce fait, l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* sur la diminution de la glycémie observée ne serait donc pas le fait d'un dysfonctionnement hépatique.

Au demeurant, comme indiqué précédemment, l'hypoglycémie observée pourrait provenir soit de la potentialisation de l'action de l'insuline sur les organes périphériques, ou soit de l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau de l'intestin. A ce propos, l'on note que l'analyse des résultats d'étude *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* révèle une inhibition de l'activité de l'alpha amylase, une enzyme qui hydrolyse l'amidon en monosaccharides (**Funke et Melzig, 2006**). Par ailleurs, plusieurs d'investigations

ont montré que des extraits de plantes contenant des flavonoïdes, des terpenoïdes et des coumarines possèdent des activités hypoglycémiantes. Nous en déduisons, que les effets hypoglycémiques de l'extrait de *H. floribunda* observés proviendraient probablement des flavonoïdes dont la présence dans les feuilles de *H. floribunda* a été signalée par **Gnangoran et al., (2012)** et par **N'guessan et al., (2015)**.

En ce qui concerne l'effet de *Holarrhena floribunda* sur l'intégrité du tissu hépatique, l'évaluation des activités sériques de certaines enzymes utilisées pour évaluer cette intégrité (**Wallace et Sharon, 2010**) montre que les activités enzymatiques de l'ALAT, et de la LDH des rats testés dans les deux sexes n'ont pas été significativement modifiées par rapport à celles des rats des lots témoins. Cependant, l'administration de l'extrait a provoqué une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité de la PAL chez les rats et de l'ASAT chez des rates testées. Toutefois, les augmentations d'activité observées ont été réversibles et la valeur maximale d'activité dans chaque cas est inférieure au double de celle obtenue dans le lot témoin correspondant (**Desjarlais, 2006**). De plus, aucune modification significative sur le poids relatif du foie des rats testés par rapport à ceux des lots témoins n'a été observée. Mieux, l'étude microscopique des coupes tissulaires du foie a montré que le parenchyme hépatique, les espaces péri portaux et centro-lobulaires observés ont gardé leur structure anatomique normale. Aucune caractéristique montrant les dommages cellulaires ou une toxicité comme une désorganisation de l'architecture hépatique, une stéatose, une obstruction des canaux biliaires intra-hépatiques ou une nécrose n'a été observée (**Pariente, 2013**). Par conséquent, l'augmentation des activités de l'ASAT observée chez les rates testées peut être considérée non toxique. Cette analyse suggère que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* n'entraîne pas de lésions ou d'altérations majeures sur le tissu hépatique.

En définitive, l'extrait de *H. floribunda* n'aurait pas d'effets délétères sur le fonctionnement et l'intégrité tissulaire hépatique. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'extrait éthanolique de *Chlorella sorokiniana* (**Himuro et al., 2017**). Ces auteurs ont montré que l'extrait de cette plante n'affecte pas le foie.

Concernant l'influence de l'extrait de *H. floribunda* sur les reins il faut savoir que le rein est un organe particulièrement vulnérable à la toxicité des xénobiotiques présents dans l'organisme (**Gobe et al., 2015**). En effet, de par ses fonctions et du fait de l'existence de gradient osmotique cortico-médullaire favorisant l'accumulation interstitielle des agents toxiques, le rein peut accumuler des substances toxiques tant dans la lumière tubulaire que dans la cellule tubulaire. Ainsi, l'atteinte rénale médicamenteuse peut concerner l'intégralité de la structure rénale (les glomérules, les tubules, le tissu interstitiel et les vaisseaux) et le

fonctionnement du rein (**Karie et al., 2010**). Aussi, l'influence de l'extrait de *Holarrhena floribunda* a-t-elle été analysée au niveau de la fonction rénale et au niveau structural.

Au niveau fonctionnel, l'un des rôles des reins est d'assurer l'homéostasie plasmatique en réalisant la filtration glomérulaire, la réabsorption et l'excrétion tubulaire (**Leriverend et al., 2016**). A cet effet, les reins produisent de l'urine qui contient des déchets métaboliques que sont l'urée, l'acide urique, la créatinine et maintiennent également dans le sang certains métabolites, de l'eau et des électrolytes. Tout phénomène ou toute substance capable de modifier ces différentes fonctions rénales conduit inévitablement à la modification des concentrations plasmatiques de ces métabolites (**Port, 2015**). Le dysfonctionnement rénal peut donc être évalué à partir du dosage des différents marqueurs tels que la créatinine, l'urée, l'acide urique et les électrolytes.

L'analyse des résultats de cette étude ont montré que l'extrait n'a pas provoqué de modification significative de la concentration de l'acide urique chez les rats. Ceci suppose que l'extrait de *H. floribunda* n'influence pas les mécanismes rénaux responsables de la régulation de ce métabolite.

Par contre, l'extrait a induit chez les rates une diminution significative du taux sérique de la créatinine par rapport ceux du lot témoin. Au regard de cette modification observée, il est à noter que la créatinine qui dérive essentiellement du catabolisme de la créatine-phosphate est totalement filtrée et éliminée par les glomérules, mais n'est ni réabsorbée ni excrétée par les tubules. De ce fait, elle représente un paramètre de choix pour évaluer le débit de filtration glomérulaire (**Port, 2015**). La réduction de sa concentration par l'extrait témoignerait donc de la capacité de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* à exercer une action sur le glomérule afin d'éliminer ce métabolite.

Au niveau des résultats des électrolytes, l'analyse révèle que chez les rats mâles, l'extrait a provoqué une diminution du taux sérique du potassium et une augmentation de ceux du chlore et du sodium par rapport aux rats témoins. Chez les rates, l'extrait a induit une diminution significative du taux de calcium.

A propos de ces électrolytes, il convient de rappeler que leur réabsorption ou sécrétion le long du tube rénal est soit sous le contrôle hormonal soit le résultat d'une action directe d'une substance donnée sur des transporteurs membranaires. En effet selon la littérature, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  logé dans la membrane luminale du tubule contourné distal évacue l'ion calcium dans le fluide tubulaire contre une entrée dans la cellule de l'ion sodium. La pompe  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase située elle dans la membrane basolatérale du tubule contourné distal fait sortir le sodium dans le milieu interstitiel contre l'entrée massive de potassium dans la cellule; ce qui

favorise sa diffusion passive dans le fluide tubulaire (**Port, 2015**). Ainsi, l'hypocalcémie chez les rates puis l'hypokaliémie et la rétention du chlorure de sodium observées chez les rats mâles pourraient s'expliquer par une stimulation de ces transporteurs membranaires. Ces actions de l'extrait sur les tubules rénaux pourraient trouver leur explication par la présence de certains groupes chimiques dans l'extrait. En effet, à cause de sa richesse en phytohormones sexuelles, l'extrait de *H. floribunda*, pourrait soit agir directement sur les tubules rénaux en favorisant la rétention du chlorure de sodium et l'excrétion du calcium et du potassium (**Graceli et al., 2013**); soit agir indirectement sur la synthèse hépatique d'angiotensinogène (**Lechat et al., 1975**) ce qui aboutirait à la fin à la synthèse de l'aldostérone. Or la réabsorption du chlorure de sodium et la sécrétion du potassium au niveau du tube contourné distal et du tube collecteur sont sous le contrôle hormonal de l'aldostérone (**Meneton et al., 2004**).

Toutefois, les variations des concentrations sériques de ces électrolytes ont été réversibles et non retardées. Ces observations supposeraient que l'extrait n'altère pas les fonctions rénales. Ce résultat est semblable à celui de **Deshmukh (2016)**. Cet auteur a montré que l'extrait de *Momordica charantia* administré aux rats par gavage pdt 90 jrs quoique ayant induit des augmentations modérées des taux des électrolytes, n'a pas perturbé le fonctionnement des reins.

Quant à l'effet de *H. floribunda* sur l'intégrité des reins, il convient de rappeler qu'au niveau structural, le rein est composé d'environ un million d'unités fonctionnelles appelées néphrons. Chaque néphron est constitué d'un glomérule et des tubules, entourés de vaisseaux sanguins. Toute substance agressant le rein, aboutit à une destruction de ses composantes.

Au cours de la présente étude, aucune modification significative sur le poids relatif des reins des rats des lots essais par rapport à ceux des lots témoins n'a été observée. Mieux, les coupes histologiques réalisées n'ont révélé aucun dommage significatif au niveau de ces structures rénales. En effet, le glomérule clairement observable sur les photographies, présente un peloton capillaire dense, une chambre ou espace glomérulaire ou de Bowman bien délimité et une capsule de Bowman fermée. Le tube contourné proximal, est reconnaissable par la présence de nombreuses microvillosités lui donnant une bordure en brosse alors que le tube contourné distal se distingue par sa lumière plus grande caractérisée par l'absence de bordure en brosse. L'analyse de ces résultats histologiques montre l'absence d'action délétère de l'extrait de *H. floribunda* sur les reins. Par conséquent, l'extrait d'acétate d'éthyle de *H. floribunda* n'affecterait pas les fonctions et n'endommagerait pas les structures rénales.

Ce résultat est contraire à de celui de **Baradaran et al., (2013)**. Ces auteurs ont montré que l'extrait hydroalcoolique de *Teucrium polium*, injecté par voie intrapéritonéale aux rats pendant

28 jours a provoqué des dilatations tubulaires, une dégénérescence cellulaire et des vacuolisations des cellules tubulaires.

L'impact de l'extrait d'acétate d'éthyle de *H. floribunda* sur les fonctions et l'intégrité du cœur a été évalué à travers le dosage d'une part de certains marqueurs sériques du cœur et d'autre part à l'aide d'observation des coupes de cœurs de rats.

L'analyse de ces résultats montre que les activités enzymatiques de la CPK et de la LDH des rats des lots expérimentaux dans les deux sexes n'ont pas été significativement modifiées comparativement à celles des rats des lots témoins. De plus, aucune modification significative sur le poids relatif du cœur des rats des lots expérimentaux par rapport à ceux des lots témoins n'a été observée. Mieux, l'étude microscopique des coupes tissulaires du cœur a révélé que les fibres myocardiques observées dans la présente étude ont gardé leur structure anatomique normale au niveau des rats des lots expérimentaux comme chez les rats témoins. En effet ces fibres sont reliées les unes aux autres par le réseau de collagène contenu dans le tissu conjonctif. Aucune caractéristique montrant les dommages cellulaires ou une toxicité cardiaque comme la nécrose des myocytes, la pycnose nucléaire, la prolifération vasculaire, l'infiltration de cellules inflammatoires, la fibrose et l'hypertrophie des myocytes n'est évidente (**Stevens et al., 2004**). Ces résultats sont semblables à ceux obtenus avec l'extrait aqueux de *Hericium erinaceus*. Il a été montré que cet extrait administré aux rats par gavage pendant 90 jours ne détériorait pas le tissu cardiaque (**Hariprasath et al., 2016**).

Au plan fonctionnel, il faut noter que le cœur est doué d'automatisme dont le siège est le tissu nodal au niveau duquel le nœud sinusal joue le rôle de pacemaker. Mais, l'activité du cœur peut-être influencée par deux systèmes nerveux: le système parasympathique qui provoque une bradycardie et le système orthosympathique dont la stimulation conduit à la tachycardie (**Port, 2015**). Le fonctionnement du cœur est donc orienté vers l'une ou l'autre des deux réponses selon le système stimulé. Ainsi, toute substance, situation ou événement capable d'influencer ces systèmes, modifie de ce fait l'activité du cœur (**Port, 2015**). La variation des concentrations de certains électrolytes conduirait à des modifications de l'activité contractile du cœur

Au cours de cette étude, l'extrait a provoqué de manière significative ( $p < 0,05$ ) la diminution du taux sérique de calcium des rats femelles. Or cet ion, comme certains électrolytes, intervient dans la réalisation des potentiels d'action des cellules cardiaques.

En effet, la repolarisation cellulaire se fait grâce à l'ouverture de certains canaux calciques. Pendant cette phase, c'est la quantité d'ions calcium entrant qui va activer les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique et causer par la suite la libération de

beaucoup plus de calcium à partir des stocks intracellulaires. Ainsi, l'augmentation transitoire de la concentration intracellulaire du calcium va activer et conditionner la durée de la contraction (**McKinley et al., 2014**). L'hypocalcémie obtenue chez les rates dans cette étude pourrait provoquer de possibles perturbations de la contraction cardiaque. En effet, il est largement admis que les diminutions des taux de calcium causent la faiblesse de la force de contraction cardiaque (effet inotrope négatif) (**El-Sherif et Turitto, 2011**) qui peut aboutir à une bradycardie dont la conséquence pathologique est l'insuffisance cardiaque (**Shamala et Krishna, 2013**).

Au niveau des rats mâles, l'analyse des résultats montre d'une part une hypokaliémie et d'autre part une augmentation des taux du chlorure de sodium chez les rats du lot expérimental par rapport aux taux des rats du lot témoin.

L'hypokaliémie observée pourrait provoquer des effets bathmotropes (excitabilité), chronotropes (automatisme ou fréquence de contraction) et dromotropes (conduction) négatifs (**El-Sherif et Turitto, 2011**). L'augmentation du taux sérique du chlorure de sodium obtenue dans cette étude quant à elle aurait pour conséquences le ralentissement de la vitesse de dépolarisation et la réduction de l'amplitude du potentiel. (**Remme et Bezzina, 2010**).

Toutefois, les variations des concentrations sériques de ces électrolytes comme indiqué précédemment ont été réversibles et non retardées. De cette analyse, il ressort que la dose de l'extrait de *H. floribunda* utilisée n'aurait pas d'impact sur la fonction cardiaque. Nos résultats sont semblable à ceux de **De Lima et al., (2017)** et de **Himuro et al., (2017)**. Ces auteurs ont respectivement montré que l'huile de fruit de *Attalea phalerata* et l'extrait éthanolique de *Chlorella sorokiniana* administrés aux rats par gavage pendant 90 jours ne perturbaient pas le fonctionnement des cœurs des rats quoique des modifications significatives des concentrations de ces électrolytes aient été observées.

En somme, les effets directs de l'extrait de *H. floribunda* sur la fonction et l'intégrité cardiaque semblent être non toxiques.

Néanmoins, il faut noter que toute substance entrant dans l'organisme peut agir sur un organe donné soit directement ou indirectement. Les facteurs de risques cardiaques tels que les lipides sériques ont donc été dosés et l'indice d'athérogénicité plasmatique a été calculé pour apprécier l'effet indirect que pourrait produire l'extrait sur le cœur. Les lipides sériques et l'indice d'athérogénicité sont des marqueurs qui ont été utilisées avec succès comme marqueurs de facteurs de risque majeur dans le développement de maladies coronariennes telles que la cardiopathie ischémique, l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral (**Vaziri et Norris, 2011; Deng et al., 2017; Webb et al., 2017**).

Dans ce travail, l'analyse des résultats montre que le taux des triglycérides et l'indice d'athérogénicité plasmatique des rats des lots expérimentaux n'ont pas connu de modifications significatives par rapport à ceux des rats témoins. Par ailleurs, la valeur moyenne de l'IAP des rats mâles testés a varié de  $-0,32 \pm 0,01$  à  $0,129 \pm 0,05$  et celle des rats femelles testées de  $0,089 \pm 0,007$  à  $0,100 \pm 0,005$ . Selon les travaux de **Dobiasova, (2006)**, les valeurs de l'IAP inférieures à 0,11 sont associées à un faible risque de survenue des maladies cardiovasculaires. De plus, on note que l'extrait a provoqué une augmentation du taux des HDL corrélée à une diminution de la cholestérolémie totale et du taux des LDL. Selon la littérature, les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont responsables du transport du cholestérol du foie vers les cellules du corps. Leur composante qui n'a pas été éliminée dans le processus du métabolisme lipidique est susceptible de se déverser dans l'espace sous-endothélial et de subir ensuite une oxydation puis initier l'athérosclérose comme l'indique l'étude de **Rohwedder et al., (2012)**. Quant aux lipoprotéines de haute densité (HDL) contrairement aux LDL, elles captent les esters de cholestérol et le cholestérol libre en excès dans sang et les dirigent vers le foie où le cholestérol est décomposé en acides biliaires. Les HDL jouent un rôle important dans la réduction des concentrations sanguines et périphériques du cholestérol et inhibent la formation de la plaque athéroscléreuse dans l'aorte (**Ali et al., 2012**). Partant de ce fait, les résultats de cette étude suggèrent que l'effet de l'extrait de *H. floribunda*, sur le bilan lipidique, pourrait provenir de la captation et de l'épuration hépatique du cholestérol athérogène. En effet, étant donné que dans la pratique clinique, un abaissement efficace et intensif des taux de TC, de TG et de LDL et une augmentation du taux du cholestérol sont importants afin de réduire et de prévenir les cardiopathies coronariennes (**Garelnabi et al., 2014**), les effets de l'extrait de *Holarrhena floribunda* sur les lipides sériques obtenus dans cette étude témoigneraient du rôle protecteur de cet extrait dans la survenue des maladies cardiovasculaires. La diminution des taux sériques du cholestérol total, et des LDL-c et l'augmentation du taux des HDL-c pourraient suggérer une implication de l'extrait de *Holarrhena floribunda* dans la transformation du cholestérol en acides biliaires, la réduction des LDL et la synthèse hépatique des lipoprotéines HDL, comme indiqués par **Jiang et al., (2015)** et **Zhang et al., (2017)**. Cet effet pourrait être dû à la présence des flavonoïdes à effets oestrogéniques (**Sock et al., 2013**), et des phytohormones dont les présences dans l'extrait ont été signalées par **Paris et Foucaud, (1959)**.

## **V-CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## Conclusion

Les expérimentations de toxicité subchronique conduites avec l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* chez le rat *Wistar* ont abouti à une absence de modification des taux de l'acide urique, des bilirubines, des triglycérides, des activités enzymatiques de l'ALAT de la CPK et de la LDH et de l'indice d'athérogénicité plasmatique.

Concernant la glycémie, la cholestérolémie totale, les taux sériques de la créatinine, du LDL-cholestérol, calcium et du potassium, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* a induit une baisse significative par rapport aux rats du lot témoin. Par contre cet extrait a entraîné une augmentation significative des taux sériques du cholestérol HDL, du chlore, du sodium et les activités enzymatiques de l'ASAT et de la PAL. Toutefois, les modifications de ces paramètres ci-dessus indiqués ont été modérées et transitoires. Enfin, l'étude histologique réalisée sur le foie, les reins et le cœur n'a montré aucune anomalie au niveau de l'intégrité structurale.

Ces informations suggèrent que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* ne perturberait pas les fonctions et n'endommagerait pas l'intégrité du foie, du cœur et des reins des rats.

## Perspectives

Ce travail pourrait se poursuivre par :

- une étude toxicité subchronique de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* chez les rats portant sur les paramètres hématologiques;
- une étude toxicité chronique de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* chez les rats portant sur les paramètres biochimiques et hématologiques;
- une formulation de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* aux fins d'aboutir à un médicament traditionnel amélioré pour soulager les malades du diabète.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abel C. & Busia K., 2005.** An exploratory ethnobotanical study of the practice of herbal medicine by the Akan peoples of Ghana. *Alternative Medicine Review*, **10(2)**: 112-123.
- Abell L.L., Levy B.B., Brodie B.B., Kendall F.E., Kaplan A., Jacques S., Reinhold J., 1958.** Cholesterol in serum. *Standard methods of clinical chemistry*, **2**: 26-33.
- Adamse P., Van E.H., Noordam M., Mulder P., De Nijs M., 2014.** Tropane alkaloids in food: poisoning incidents. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, **6(1)**: 15-24.
- Adeva A.M., López O.M., Funcasta C.R., Ameneiros R.E., Donapetry G.C., Vila A.M., Rodríguez S.J., 2014.** Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*, **17**: 76-100.
- Adjanahoun E., 1989.** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. *Médecine traditionnelle et pharmacopée*: 895p.
- Adjanohoun E.J. & Aké-Assi L., 1979.** Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. *Centre National de Floristique, Abidjan, Côte d'Ivoire*: 358p.
- Ahid S., El Cadi M.A., Meddah B., Cherrah Y., 2012.** *Atractylis gummifera*: de l'intoxication aux méthodes analytiques. *Annales de Biologie Clinique*, **70(3)**: 263-268.
- Aké-Assi L. & Guinko S., 1991.** Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest. *Basel (Switzerland), Ed Roches*: 151p.
- Albertolle M., Phan T.T., Pozzi A., Guengerich F.P., 2018.** Sulfenylation of human liver and kidney microsomal cytochromes P450 and other drug metabolizing enzymes as a Response to Redox Alteration. *Molecular & Cellular Proteomics*, **17**: 889-900.
- Ali K.M., Wonnerth A., Huber K., Wojta J., 2012.** Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol—current therapies and future opportunities. *British Journal of Pharmacology*, **167(6)**: 1177-1194.
- Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S., Richmond W., Fu P.C., 1974.** Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*, **20(4)**: 470-475.
- Andreelli F. & Jacquier D., 2006.** Place du foie dans le métabolisme des lipoprotéines. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*, **13(3)**: 185-190.
- Aniefiok Udobre, Udoh A. E; Nwafor P., 2014.** Effect of the methanol root extract of *Holarrhena floribunda* in albino mice. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, **4(1)**: 148-153.
- Arbonnier M., 2009.** Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. 573p. Editions Quae, France.
- Aubry P., 2012.** Intoxications par les plantes toxiques dans les zones tropicales et inter tropicales. <http://medecinotropical.free.fr/cours/intoxplante.pdf> consulté le 16/3/ 2018.

- Awodele O., Osunkalu V.O., Akinde O.R., Teixeira D.S., Okunowo W.O., Odogwu E.C., Akintonwa A., 2010.** Modulatory roles of antioxidants against the aqueous stem bark extract of *Alstonia boonei* (Apocynaceae)-induced nephrotoxicity and testicular damage. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, **4(2)**: 76-80.
- Badmus J.A., Odunola O.A., Obuotor E.M., Oyedapo O.O., 2010.** Phytochemicals and *in vitro* antioxidant potentials of defatted methanolic extract of *Holarrhena floribunda* leaves. *African Journal of Biotechnology*, **9(3)**: 340-346.
- Badmus J.A., Odunola O.A., Yekeen T.A., Gbadegesin A.M., Fatoki J.O., Godo M. O., Oyebanjo K.S., Hiss D.C., 2013.** Evaluation of antioxidant, antimutagenic, and lipid peroxidation inhibitory activities of selected fractions of *Holarrhena floribunda* (G. Don) leaves. *Acta Biochimica Polonica*, **60(3)**: 435-42.
- Badmus J., Ekpo O., Hussein A., Meyer M., Hiss D., 2015.** Antiproliferative and apoptosis induction potential of the methanolic leaf extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, Article ID 756482, 11p.
- Badmus J., Ekpo E., Rautenbach F., Marnewick J., Hussein A., Hiss D., 2016.** Isolation and antioxidant activity of flavonoids from *Holarrhena floribunda* (G.don) leaves. *Acta Biochimica Polonica*, **63(2)**: 353-358.
- Bais R. & Philcox M., 1994.** Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase (L-Lactate: NAD<sup>+</sup>Oxidoreductase, EC 1.1.1.27). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **32(8)**: 639-55.
- Balakumar P., Chakkarwar V.A., Kumar V., Jain A., Reddy J., Singh M., 2008.** Experimental models for nephropathy. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, **9(4)**: 189-195.
- Baradaran A., Yahya M., Alireza M., Mahmoud R., Mehdi., Azam A., Zahra K., Farshad H., Hamid N., 2013.** Nephrotoxicity of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* in Wistar rats. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **29(1)**: 329-333.
- Baudoux T. & Nortier J.L., 2017.** 13<sup>ème</sup> Nephrotoxicity of herbal products “In” Pelkonen, O. toxicology of herbal products, Springer International Publishing, Cham (Allemagne) 307-344.

- Bayala B., 2005.** Activité progestative et activité oestrogénique de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand et Schinz (Apocynaceae), une plante de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Thèse de Doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina-Faso, 128p.
- Bayala B., Tamboura H.H., Pellicer M.R., Zongo D., Traoré A., Ouédraogo L., Malpaux B., 2006.** Effets oestrogéniques du macéré aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur & Schinz chez la rate ovariectomisée. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, **10(3)**: 173-180.
- Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. 739 p. Éditions Le Fennec / Ibis Press Casablanca / Paris.
- Bennett R.D. & Heftmann E., 1965.** Progesterone: biosynthesis from pregnenolone in *Holarrhena floribunda*. *Science*, **149(3684)**: 652-653.
- Bensaude R.J., Monegier D.S.C., Jonville-Bera A.P., Autret E., Ouyahya F., Metman E.H., 1998.** Maladie veino-occlusive après prise prolongée de senecon (hemoluol). *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **22(3)**: 363-364.
- Bergmeyer H.U., Hørder M., Rej R., 1986.** Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC Method for alanine aminotransferase. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **24(7)**: 481-495.
- Bergstrom R.F., Kay D.R., Harkcom T.M., Wagner J.G., 1981.** Penicillamine kinetics in normal subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **30(3)**: 404-413.
- Bogne K., Penlap B., Mbofung C., Etoa F., 2012.** Acute and subacute toxicity of the methanol extract from *Holarrhena floribunda* G. Don (Apocynaceae). *European Journal of Experimental Biology*, **2(4)**:1284-1288.
- Bredo M. & Odo V., 2011.** Anatomía del hígado de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology*, **29(1)**: 76-79.
- Brewer C.T. & Chen T., 2017.** Hepatotoxicity of herbal supplements mediated by modulation of cytochrome P450. *International Journal of Molecular Sciences* **18(11)**: 2353-2380.
- Brown A.C., 2017.** Kidney toxicity related to herbs and dietary supplements. *Food Chem. Toxicol*, **107**: 502-519.
- Bucolo G. & David H., 1973.** Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical chemistry*, **19(5)**: 476-482.
- Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E., 2006.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. St Louis Missouri Elsevier Saunders, 549p.
- Butler J., Khan S., Scarzella G., 2016.** Fatal Oleander toxicosis in two miniature horses. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **52(6)**: 398-402.

- Çaksen H., Odabaş D., Akbayram S., Cesur Y., Arslan Ş., Üner A., Öner A.F., 2003.** Deadly nightshade (*Atropa belladonna*) intoxication: an analysis of 49 children. *Human & experimental toxicology*, **22(12)**: 665-668.
- Caraceni P., Tufoni M., Bonavita M.E., 2013.** Clinical use of albumin. *Blood Transfusion*, **11(4)**: 18-25.
- Chen L., Mo H., Zhao L., Gao W., Wang S., Cromie M.M., Lu C., Wang J.S., Shen C.L., 2017.** Therapeutic properties of green tea against environmental insults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **40**: 1-13.
- Coby C., Hancock M., Arne T., Anson B., Mann D., 2017.** Detection of xenobiotic-induced hepatotoxicity in human iPSC-Derived iCell hepatocytes 2.0. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **88**: 236-236.
- Chukwurah B., 1997.** Antimicrobial activity of *Holarrhena floribunda* stem bark ethanol extract. *Fitoterapia*, **68**: 180-181.
- Claude J.R., 1998.** Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. *La Semaine des hôpitaux de Paris*, **61(34)**: 2483-2496.
- D'Ythurbide G. & Hertig A., 2012.** Augmentation de la créatinine. *La Revue du praticien. Médecine générale*, **(876)**: 152-153.
- De Candolle A., 1844.** Prodrromus systematis naturalis regni vegetabilis. **4**:413.
- De Lima F.F., Traesel G.K., Menegati S.E.L., Dos Santos A.C., Souza R.I.C., De Oliveira V.S., Sanjinez A.E.J., Cardoso C.A.L., Oesterreich S.A., Do Carmo V.M., 2017.** Acute and subacute oral toxicity assessment of the oil extracted from *Attalea phalerata* Mart ex Spreng. pulp fruit in rats. *Food Research International*, **91**: 11-17.
- Deng F.E., Shivappa N., Tang Y., Mann J.R., Hebert J.R., 2017.** Association between diet-related inflammation, all-cause, all-cancer, and cardiovascular disease mortality, with special focus on prediabetics: findings from NHANES III. *European Journal of Nutrition*, **56(3)**: 1085-1093.
- Desmukh N.S., 2016.** Safety assessment of McB-E60 (extract of a *Momordica* sp.): subchronic toxicity study in rats. *Toxicology Reports*, **3**: 481-489.
- Desjarlais F., 2006.** Aspartate aminotransferase. Fiches cliniques. *Annales de Biologie Clinique*, **43(1)**: 40-43.
- Devarajan P., 2006.** Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, **17(6)**: 1503-1520.

- Dié-kacou H., Kamagaté M., Yavo J.C., Daubret T.H., Diafoukat F., 2009.** Intoxication par les plantes à Abidjan: difficultés du diagnostic étiologique et aspects ethnobotaniques. *Revue Bio-Africa*, **7**: 34-43.
- Dobiasova M., 2006.** AIP--atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice. *Vnitřní lékařství*, **52(1)**: 64-71.
- Dobiášová M. & Frohlich J., 2001.** The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apob-lipoprotein-depleted plasma (FERHDL). *Clinical biochemistry*, **34(7)**: 583-588.
- Don G., 1834.** A general system of gardeny and Botany. *London*. **3** : 516.
- Ecobichon D.J., 1997.** 3<sup>ème</sup> Acute toxicity studies "In". Ecobichon D.J. The basis of toxicity testing, 43-80, CRC press, Boca Raton (New York).
- Ekor M., 2014.** 12<sup>ème</sup> Nephrotoxicity and nephroprotective potential of african medicinal plants. "In" Kute V. Toxicological survey of african medicinal plants, 357-393, Elsevier London.
- El-Sherif N. & Turitto G., 2011.** Electrolyte disorders and arrhythmogenesis. *Cardiology journal*, **18(3)**: 233-245.
- Fabiny D.L. & Ertingshausen G., 1971.** Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clinical chemistry*, **17(8)**: 696-700.
- Fieni A. & Arcade M., 2017.** Bradycardie sinusale au cours d'une intoxication volontaire au laurier rose. *Annales françaises de médecine d'urgence*, **7(1)**: 38-41.
- Flesch F., 2012.** Plantes toxiques: les dangers du retour à la nature. *Réanimation*, **21(5)**: 525–532.
- Fotie J., Bohle D.S., Leimanis M.L., Géorges E., Rukunga G., Nkengfack A.E., 2006.** Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. *Journal of Natural Products*, **69(1)**: 62-67.
- Frank C. 1992.** Toxicologie: Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Editions Masson (Paris), 73-202.
- Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S., 1972.** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*, **18(6)**: 499-502.
- Fu P.P., Xia Q., He X., Barel S., Edery N., Beland F.A., Shimshoni J.A., 2017.** Detection of pyrrolizidine alkaloid DNA adducts in livers of cattle poisoned with *Heliotropium europaeum*. *Chemical Research in Toxicology*, **30(3)**: 851-858.

- Funke I. & Melzig M.F., 2006.** Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **16(1)**: 1-5.
- Gagnon A.C., Groleau P., Korsia M.S., 2010.** Le guide des plantes qui soignent. Issy-les-Moulineaux : Vidal: 465.
- Gaillard Y., Cheze M., Pépin G., 2001.** Intoxications humaines par les végétaux supérieurs: revue de la littérature. *Annales de Biologie Clinique*, **59(6)**: 764-765.
- Garelnabi M., Mahini H. Wilson T., 2014.** Quercetin intake with exercise modulates lipoprotein metabolism and reduces atherosclerosis plaque formation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **11(1)**: 22.
- Giknis M. & Clifford C.B., 2008.** Clinical laboratory parameters for CrI: WI (Han). *Charles River Laboratories*.  
[http://info.criver.com/flex\\_content\\_area/documents/rm\\_rm\\_r\\_Wistar\\_Han\\_clin\\_lab\\_parameters\\_08.pdf](http://info.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_r_Wistar_Han_clin_lab_parameters_08.pdf). Consulté le 18/04/2016.
- Gillery P., Jaisson S., Gorisse L., Pietrement C., 2015.** Rôle de la carbamylation des protéines dans les complications de l'insuffisance rénale chronique. *Néphrologie & Thérapeutique*, **11(3)**: 129-134.
- Gnangoran B.N., 2012.** Evaluation de l'effet des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand et Schinz (Apocynaceae), une plante utilisée dans le traitement du diabète en cote d'Ivoire, sur les paramètres biochimiques des rats Wistar (*Rattus norvegicus*). Thèse de doctorat de l'université Nangui Abrogoua, Abidjan, 126p.
- Gnangoran B.N., N'guessan B.B., Amoateng P., Dosso K., Yapo A., Ehile E.E., 2012.** Hypoglycaemic activity of ethanolic leaf extract and fraction of *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand & Schinz Apocynaceae. *Journal of Medical and Biomedical Sciences*, **1(13)**: 46-54.
- Gobe G.C., Coombes J.S., Fassett R.G., Endre Z.H., 2015.** Biomarkers of drug-induced acute kidney injury in the adult. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **11(11)**: 1683-1694.
- Gold C., 1980.** Acute renal failure from herbal and patent remedies in Blacks. *Clinical nephrology*, **14(3)**: 128-134.
- Gopalakrishnan S.K., Kandasamy S., Isaac B., Jayasankar C., Chandru C., 2017.** Oleander toxicity—the clinical spectrum and mortality predictors: an observational study. *Internet Journal of Medical Update-Ejournal*, **12(1)**: 4-8.

- Gowda S., Desai P.B., Kulkarni S.S., Hull V.V., Math A.A., Vernekar S.N., 2010.** Markers of renal function tests. *North American Journal of Medical Sciences*, **2(4)**: 170- 173.
- Graceli J., Cicilini M., Bissoli N., Abreu G., Moysés M., 2013.** Roles of estrogen and progesterone in modulating renal nerve function in the rat kidney. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **46(6)**: 521-527.
- Grados A. & Schleinitz N., 2017.** Comment j'explore une hyper-CK-émie ? *Médecine thérapeutique*, **23(6)**: 376-383.
- Guisso J., Millogo-Koné H., Kaboré I., 1992.** Etude comparative de l'activité pharmacologique de *Euphorbia hirta* L.(Euphorbiaceae) et *Holarrhena floribunda* G. Don (Apocynaceae) vis-à-vis d'amibes non pathogènes du genre *Amoeba proteus*. *Médecine d'Afrique noire*, **39(5)**: 358-363.
- Gumz M.L., Rabinowitz L., Wingo C.S., 2015.** An integrated view of potassium homeostasis. *New England Journal of Medicine*, **373(1)**: 60-72.
- Hall A., Covelli C., Manuguerra R., Luong T.V., Buzzetti E., Tsochatzis E., Pinzani M. & Dhillon A.P. 2017.** Transaminase abnormalities and adaptations of the liver lobule manifest at specific cut-offs of steatosis. *Scientific Reports*, **7**: 40-49.
- Hall P. & Cash J. 2012.** What is the real function of the Liver 'function'tests? *The Ulster Medical Journal*, **81(1)**: 30–36.
- Hami H., Soulaymani A., Skalli S., Mokhtari A., Sefiani H., Soulaymani R., 2011.** Intoxication par *Atractylis gummifera* L. Données du centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc. Poisoning by *Atractylis gummifera* L. Morocco poison control center data. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **104(1)**: 53-57.
- Hansel B. & Giral P., 2015.** Cholestérol alimentaire et morbi/mortalité cardiovasculaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **50(4)**: 202-208.
- Hariprasath L., Jegadeesh R., Pamela D., Kah-Hui W., Murali N., Vikineswary S., 2016.** Biochemical and histopathological aspects of *Hericium erinaceus* ingestion in a rodent model: a sub-chronic toxicological assessment *Journal of Ethnopharmacology*, **194**: 1051-1059.
- Hartman K., Luterotti S., Osswald H., Oehme M., Meier P., Ammann D., Simon W., 1978.** Chloride-selective liquid-membrane electrodes based on lipophilic methyl-tri-N-alkyl-ammonium compounds and their applicability to blood serum measurements. *Microchimica Acta*, **70(3-4)**: 235-246.
- Himuro S., Ueno S., Noguchi N., Uchikawa T., Kanno T., Yasutake A., 2017.** Safety evaluation of *chlorella sorokiniana* strain CK-22 based on an in vitro cytotoxicity assay

- and a 13-weeks subchronic toxicity trial in rats. *Food and chemical toxicology*, **106**: 1-7.
- Hodgeson E., 2010.** A Textbook of modern toxicology. 4<sup>th</sup> Ed. John Wiley & Sons, Inc. North Carolina, USA. 672p.
- Hoekou P., Tchadjobo T., Damintoti K., Rakiswende S., Elom A.; Ollo D., Wouyo A., 2017.** Therapeutic potentials of ethanolic extract of leaves of *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. and Schinz (Apocynaceae). *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, **14(2)**: 227-233.
- Hönes J., Müller P., Surridge N., 2008.** The technology behind glucose meters: test strips. *Diabetes Technology & Therapeutics*, **10(S1)**: S-10-S-26.
- Hooker W. J., 1849.** Niger flora. Ed. H. Bailliere (London). 450 p.
- Hørder M., Elser R.C., Gerhardt W., Mathieu M., Sampson E.J., 1991.** Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP:creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*; 29:435–56. JIFCC 1989; 1(3):130–9; JIFCC 1990; 2(1):26–35; JIFCC 1990; 2(2):80–83.
- Hould R., 1984.** Technique d'histopathologie et de cytopathologie. 399p. Edition *Maloine*, Paris, France.
- Iwu M.M., 2014.** Handbook of African medicinal plants. 506p. 2<sup>e</sup> Ed. CRC Press, Boca Raton, Floride.
- Jaffé M., 1886.** Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, **10(5)**: 391-400.
- Janot M., Cave A., Goutarel R. 1950.** Togholamine, holaphyllamine et holaphylline trois nouveaux alcaloides retirés des feuilles de *Holarrhena. floribunda*. *Bulletin de la Société Chimique de France*, **6**: 896-900.
- Jaradat N.A., Ayesh O.I., Anderson C., 2016.** Ethnopharmacological survey about medicinal plants utilized by herbalists and traditional practitioner healers for treatments of diarrhea in the West Bank/Palestine. *Journal of Ethnopharmacology*, **182**: 57-66.
- Jiang C., Wang Q., Wei Y., Yao N., Wu Z., Ma Y., Lin Z., Zhao M., Che C., Yao X., 2015.** Cholesterol-lowering effects and potential mechanisms of different polar extracts from *Cyclocarya paliurus* leave in hyperlipidemic mice. *Journal of ethnopharmacology*, **176**: 17-26.

- Kageyama N., 1971.** A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. *Clinica Chimica Acta*, **31(2)**: 421-426.
- Kakar F., Akbarian Z., Leslie T., Mustafa M., Watson J., Van H., Mofleh J., 2010.** An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *Journal of toxicology*, **313280**: 1–7.
- Kanbay M., Jensen T., Solak Y., Le M., Roncal-Jimenez C., Rivard C., Lanaspa M.A., Nakagawa T., Johnson R.J., 2016.** Uric acid in metabolic syndrome: from an innocent bystander to a central player. *European Journal of Internal Medicine*, **29**: 3-8.
- Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L., 2008.** Clinical biochemistry of domestic animals. 928p. Academic press, San Diego.
- Kanga D., Ayyar P., Simonsen J., 1926.** Conessine. *Journ. Chem. Soc*, **129** : 2123.
- Karie S., Launay-Vacher V., Deray G., Isnard-Bagnis C., 2010.** Toxicité rénale des médicaments. *Néphrologie & Thérapeutique*, **6(1)**: 58-74.
- Kerharo J. & Adam J.G., 1974.** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques. 1011p. Ed. Vigot frères, Paris.
- Khattabi A., Rhalem N., Chabat A., Skali S., Soulaymani-Bencheich R., 2010.** Plantes toxiques: définition et classification. *Toxicologie Maroc*, **2**: 3-4.
- Kiedel A., 1878.** Über die physiologische Wirkung des Conessin. *Inaug. Diss.* Göttingen.
- Kouassi K.B., Gnangoran B.N., Adjambri A.E., Koné M., Yapo A.P., 2017.** Influence of an ethyl acetate extract of *Holarrhena fribunda* (G. Don) T. Durand and Schinz (Apocynaceae) on blood cells in normal rats, plant used in traditional medicine for treating diabetes in Côte d'Ivoire. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **6(3)** : 97-108.
- Kristanc L. & Kreft S., 2016.** European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part II: Plants with hepato-, neuro-, nephro- and immunotoxic effects. *Food and chemical toxicology*, **92**: 38-49.
- Kumar S. & Yadav J., 2014.** Ethnobotanical and pharmacological properties of *Aloe vera*: a review. *Journal of Medicinal Plants Research*, **8(48)**: 1387-1398.
- Laccourreya O., Werner A., Laccourreya L., Bonfils P., 2017.** La phytothérapie en pratique clinique en otorhinolaryngologie: apport, limites et risques. *Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale*, **134(2)**: 90-95.
- Lacherade J.C., 2008.** Les conséquences de l'hypoglycémie. *Réanimation*, **17**: 437-441.

- Lacherade J.C., Jacqueminet S., Preiser J.C., 2009.** An overview of hypoglycemia in the critically ill. *Journal of Diabetes Science and Technology*, **3(6)**: 1242-1249.
- Lai C.K., Poon W.T., Chan Y.W., 2006.** Hidden aconite poisoning: identification of yunaconitine and related aconitum alkaloids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **30(7)**: 426-433.
- Lapostolle F. (2013).** Intoxications digitales. «In» Intoxications aiguës. Springer-Verlag, Paris. 149-159.
- Larrey D., Vial T., Pauwels A., Castot A., Biour M., David M., Michel H., 1992.** Hepatitis after germander (*Teucrium chamaedrys*) administration: another instance of herbal medicine hepatotoxicity. *Annals of Internal Medicine*, **117(2)**: 129-132.
- Leblanc G. A., 2010.** 10<sup>ème</sup> Toxic action “In”. John Wiley & Sons, Inc, A Textbook of modern toxicology, 277-289, Hodgson Ernest, New Jersey, USA.
- Leboeuf M., Cave A., Goutarel R., 1964.** Steroids alkaloids. Presence of progesterone in the leaves of *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand. and Schinz. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, **259**: 3401.
- Leboeuf M., Cavé A., Goutarel R., 1969.** Steroid alkaloids. LXXXII.(16). Chemical composition of the leaves of *Holarrhena floribunda* Dur. et Schinz. Isolation of progesterone and 4 new alkaloids: methylholaphylline, holaphyllinol, holaphyllidine and dihydroholaphyllamine. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **27(3)**: 217-228.
- Lechat P., Bisseliches F., Bournerias F., 1975.** Abrégé de pharmacologie médicale. Masson. 245p.
- Lemaigre G., Tebbi Z., Galinsky R., Michowitz S., Abelanet R., 1975.** Fulminating hepatitis caused by glue thistle (*Atractylis glummifera*-L.), poisoning. Anatomicopathological study of 4 cases. *La Nouvelle presse medicale*, **4(40)**: 2565-2568.
- Leriverend H., Clere N., Faure S., 2016.** Insuffisance rénale et néphrotoxicité médicamenteuse. *Actualités Pharmaceutiques*, **55(557)**: 23-30.
- Lima C.M., Lima A.K., Melo M.G.D., Dória G.A.A., Serafini M.R., Albuquerque J. R.L. Araújo A.S., 2014.** Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*, **10(3)**.
- Loukaci A., Kayser O., Bindseil K., Karsten S., Frevert J., Pedro A., 2000.** New Trichothecenes isolated from *Holarrhena floribunda*. *Journal of Natural Products*, **63(1)**:52-56.

- Luyckx V.A., Ballantine R., Claeys M., Cuyckens F., Van den Heuvel H., Cimanga R.K., Vlietinck A.J., De Broe M.E., Katz I.J., 2002.** Herbal remedy-associated acute renal failure secondary to Cape aloes. *American journal of kidney diseases*, **39(3)**: e13. 11-e13. 15.
- Luyckx V.A., Steenkamp V., Stewart M.J., 2005.** Acute renal failure associated with the use of traditional folk remedies in South Africa. *Renal failure*, **27(1)**: 35-43.
- Luyckx V.A. & Naicker S. 2008.** Acute kidney injury associated with the use of traditional medicines. *Nature Reviews Nephrology*, **4(12)**: 664.
- Madhiri R. & Vijayalakshmi G., 2018.** A Review on phytochemical composition and pharmacological aspects of the genus *Alstonia*. *PharmaTutor*, **6(1)**: 50-55.
- Malloy H.T. & Evelyn K.A., 1937.** The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *Journal of Biological Chemistry*, **119(2)**: 481-490.
- Manahan S.E., 2002.** Toxicological chemistry and biochemistry. 425p. CRC Press Floride USA.
- Martoja R. & Martoja-Pierson M. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale.
- McKinley M.P., O'Loughlin V.D., Bidle T.S., 2014.** Anatomie et physiologie: une approche intégrée. 1478p. Ed. Maloine, Paris.
- Meneton P., Loffing J., Warnock D.G., 2004.** Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **287(4)**: 593-601.
- Meyer S.R. & Meyer K., R. 2012.** Biochimie métabolique. 187p. Ed. De Beck, Allemagne.
- Millogo K.H., 1992.** Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand et Schinz (Apocynacées): Etude de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes et leur évaluation toxicopharmacologique. Thèse de Doctorat. 117 p. *Université Ouagadougou*.
- Mouhib M. & Omari Z.E., 1988.** Nos plantes médicinales: emploi en médecine moderne, en homéopathie, en médecine populaire. 158p. Ed. Casa- copies, Casablanca, Maroc.
- N'guessan B., Gnangoran B., Sarkodie A., Dosso K., Kretchy A., Amoateng P., Gyekye A., Owusu D., Nyarko A., Yapo A., 2015.** Alternative to conventional diabetic management: the antihyperglycaemic potential of an ethyl acetate fraction extract of *Holarrhena floribunda*. *European Journal of Medicinal Plants*, **8(4)**: 175-189.
- Nkono N.B.L., Sokeng S.D., Dzeufiet D.P.D., Longo F., Kamtchouing P., 2015.** Subchronic toxicity of aqueous extract of *Alstonia boonei* de wild. (apocynaceae) stem bark in normal rats. *International Journal of Pharmacology and Toxicology*, **3(1)**: 5-10.

- Nnadi C., Nwodo N., Kaiser M., Brun R., Schmidt T., 2017.** Steroid alkaloids from *Holarrhena africana* with strong activity against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Molecules*, **22(7)**: 1129.
- OCDE., 1998.** *Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070714-fr>.
- Olugu S.V., Nyegue M., Kamga P.B., Bayoï J.R., Etoa F.X., 2014.** Activity of conessine at various temperatures and pH on inhibition of germination of *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spores. *African Journal of Microbiology Research*, **8(4)**: 320-326.
- OMS., 2013.** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. 72 p. OMS, Hong Kong, Chine.
- OMS., 2016.** Rapport mondial sur le diabète.  
([http://apps.who.int/iris/bistream/10665/204875/1/WHO\\_NMH\\_NVI\\_16.3\\_fre.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bistream/10665/204875/1/WHO_NMH_NVI_16.3_fre.pdf?ua=1)) (consulté le 30.01.2017)
- Oyedéji K. & Bolarinwa A., 2012.** Effects of Crude Extracts of *Portulaca oleracea* on Haematological and Biochemical Parameters in Albino Rats. *African Journal of Biomedical Research*, **15**: 41-47.
- Oze G., Nwanjo H., Onyeze G., 2007.** Nephrotoxicity caused by the extract of *Alstonia boonei* (De wild) stem bark in Guinea pigs. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*, **3(2)**: 10-19.
- Page C. & Murtaugh R., 2015.** Hypoglycemia associated with Oleander toxicity in a dog. *Journal of Medical Toxicology*, **11(1)**: 141-143.
- Pariante A., 2013.** Cytolyse hépatique (augmentation des aminotransférases) chez l'adulte. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*, **20(8)**: 629-638.
- Paris R. & Foucaud A., 1959.** Flavonoids in the leaves of *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand and Schinz (Apocynaceae): isolation of a flavonoside identified as isoquercitroside. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, **248(18)**: 2634.
- Peyrin B.L., Barraud H., Petit.L.F., Ancel D., Watelet J., Chone L., Hudziak H., Bigard M.-A., Bronowicki J.P., 2004.** Hépatotoxicité de la phytothérapie: données cliniques, biologiques, histologiques et mécanismes en cause pour quelques exemples caractéristiques. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **28(6-7)**: 540-550.

- Philips B.J., Lane K., Dixon J., MacPhee I., 2014.** The effects of acute renal failure on drug metabolism. *Expert opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **10(1)**: 11-23.
- Pioda L.A., Stankova V., Simon W., 1969.** Highly selective potassium ion responsive liquid-membrane electrode. *Analytical Letters*, **2(12)**: 665-674.
- Polstorff K. & Shirrner P., 1886.** Ueber conessin. *Ber. Deutsch. Chem. Ges*, **19** : 1682-1685.
- Port C., 2015.** Essentials of pathophysiology: Philadelphia, USA. 1247p. 4 éd. Wolters Kluwer.
- Poupon R., 2015.** Liver alkaline phosphatase: a missing link between cholestasis and biliary inflammation. *Hepatology*, **61(6)**: 2080-2090.
- Pousset J.L., 1989.** African medicinal plants: practical use. Edition Marketing, Paris. 159p.
- Remme C.A. & Bezzina C.R., 2010.** Sodium channel (dys) function and cardiac arrhythmias. *Cardiovascular therapeutics*, **28(5)**: 287-294.
- Richette P., Perez R.F., Doherty M., Jansen T.L., Nuki G., Pascual E., Punzi L., So A.K., Bardin T., 2014.** Improving cardiovascular and renal outcomes in gout: what should we target? *Nature Reviews Rheumatology*, **10(11)**: 654-661.
- Rohwedder I., Montanez E., Beckmann K., Bengtsson E., Dunér P., Nilsson J., Soehnlein O., Fässler R., 2012.** Plasma fibronectin deficiency impedes atherosclerosis progression and fibrous cap formation. *EMBO molecular medicine*, **4(7)**: 564-576.
- Schmeller T., 1998.** 18<sup>ème</sup>: Utilization of alkaloids in modern medicine “In”Margaret F. Robberts and Michael Wink, Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications, 435-459, Edition Springer, New York.
- Schmelzer G. & Gurib F.A., 2006.** *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand et Schinz (Apocynaceae). In Schmelzer, G.H. et Gurib-Fakim, A. *Medicinal plants/Plantes médicinales I. (CD-Rom)*. PROTA, Wageningen, Pays Bas.
- Seddik M., Lucidarme D., Creusy C., Filoche B., 2001.** Y at-il des risques d’hépatotoxicité avec Exolise®? *Gastroenterol Clinical Biology*, **25**: 834-835.
- Serrano F., Vidal P.E., Flamant M., 2015.** Évaluer la fonction rénale. *La revue du Praticien Médecine générale*, **29(945)**: 555-557.
- Shamala S. & Krishna K., 2013.** Cardioprotective activity of fruit extracts of *Momordica dioca Roxb* on doxorubicin-induced toxicity on rats. *Science International*, **1(12)**: 392-400.
- Shono T., Okahara M., Ikeda I., Kimura K., Tamura H., 1982.** Sodium-selective PVC membrane electrodes based on bis (12-crowns-4)s. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **132**: 99-105.

- Singh N.P. & Prakash A., 2011.** Nephrotoxic potential of herbal drugs. *Journal of International Medical Sciences Academy*, **24(2)**: 79-81.
- Singh R. & Kotecha M., (2016).** A review on the Standardization of herbal medicines. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, **7**: 97-106.
- Sock E.N., Cote I., Mentor J., Prud'homme D., Bergeron R., Lavoie J.M., 2013.** Ovariectomy stimulates hepatic fat and cholesterol accumulation in high-fat diet-fed rats. *Hormone and Metabolic Research*, **45(04)**: 283-290.
- Sofowora A., 1982.** Medicinal plant and traditional medicine in Africa. 256p. Jhon Wiley and Sons Ltd, London (UK).
- Staack R.F. & Hopfgartner G., 2007.** New analytical strategies in studying drug metabolism. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **388(7)**:1365-1380.
- Stark R. & Kibbey R.G., 2014.** The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: has it been overlooked? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1840(4)**: 1313-1330.
- Stedman C. 2002.** Herbal hepatotoxicity. Pages 195-206. Seminars in liver disease: Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
- Steenkamp V. & Stewart M.J., 2005.** Nephrotoxicity associated with exposure to plant toxins, with particular reference to Africa. *Therapeutic drug monitoring*, **27(3)**: 270-277.
- Stevens A., Lowe J.S., Young B., (2004).** Anatomie pathologique: Atlas de Wheater. 286p. 4nd Ed De Boeck Bruxelles.
- Stickel F., Patsenker E., Schuppan D., 2005.** Herbal hepatotoxicity. *Journal of hepatology*, **43(5)**: 901-910.
- Sticova E. & Jirsa M., 2013.** New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World Journal of Gastroenterology*, **19(38)**: 6398-6407.
- Strimbu K. & Tavel J.A., 2010.** What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, **5(6)**: 463-466.
- Sugiuchi H., Uji Y., Okabe H., Irie T., Uekama K., Kayahara N., Miyauchi K., 1995.** Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clinical chemistry*, **41(5)**: 717-723.
- Tak S., Lakhotia M., Gupta A., Sagar A., Bohra G., Bajari R., 2016.** Aconite poisoning with arrhythmia and shock. *Indian Heart Journal*, **68**: S207-S209.
- Takechi R., Alfonso H., Harrison A., Hiramatsu N., Ishisaka A., Tanaka A., Lee A.H., 2018.** Assessing self-reported green tea and coffee consumption by food frequency

- questionnaire and food record and their association with polyphenol biomarkers in Japanese women. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **27(2)**: 460-465.
- Tamboura H., Bayala B., Lompo M., Guissoe I., Sawadogo L., 2006.** Ecological distribution, morphological characteristics and acute toxicity of aqueous extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand and Schinz (Apocynaceae), *Leptadenia hastata* (Pers.) Decne and *Cassia sieberiana* (DC) used by veterinary healers in Burkina Faso. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **2(1)**: 13-24.
- Tietz N.W., Burtis C.A., Duncan P., Ervin K., Petitclerc C.J., Rinker A.D., 1983.** A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem*, **29(5)**:751–761.
- UNESCO., 2010.** Avant-projet de rapport sur la médecine traditionnelle et ses implications éthiques. 19p. UNESCO, Paris.
- Valdiguié P. Farge F., Solera M.L., Lagente M., Graeve J., 2000.** Biochimie clinique. 356p. Editions Médicales Internationales, Condé-sur-Noireau (France).
- Vaziri N.D. & Norris K., 2011.** Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. *Blood purification*, **31(1-3)**: 189-196.
- Vergès B., 2017.** Prise en charge des dyslipidémies: quelles nouvelles recommandations? *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux-Pratique*, **2017(261)**: 3-8.
- Visser L.-E., 1975.** Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. Une étude ethnobotanique des usages médicaux et comestibles des plantes sauvages par les Ando de la Côte d'Ivoire (Afrique occidentale). *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, **22(10)**: 371-372.
- Wahlefeld A., 1972.** Modification of the Malloy-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serum. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **29**: 11-12.
- Wallace A. & Sharon A.M., 2010.** 13<sup>ème</sup> Hepatotoxicity “In”. John Wiley & Sons, Inc, A Textbook of Modern Toxicology, 277-289, Hodgson Ernest, New Jersey, USA.
- Wang T., Li Q., Bi K., 2017.** Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **135(1)**: 12-23.
- Waugh A. & Grant A., 2010.** Ross and Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illness. 12 Ed. Churchill Livingstone Elsevier, London. 522p.
- Webb T.R., Erdmann J., Stirrups K.E., Stitzel N.O., Masca N.G., Jansen H., Kanoni S., Nelson C.P., Ferrario P.G., König I.R., 2017.** Systematic evaluation of pleiotropy

- identifies 6 further loci associated with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **69**(7): 823-836.
- Wiedenfeld H. 2011.** Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **28**(3): 282-292.
- Wu J., Guo Z., Zhu Y., Huang Z., Gong X., Li Y., Son W., Li X., Lou Y., Zhu L., 2018.** A systematic review of pharmacokinetic studies on herbal drug Fuzi: implications for Fuzi as personalized medicine. *Phytomedicine*, **15**(44):187-203.
- Xiaojing Y., Weiwei L., Ying S., Xiucan G., Wenlin H., Ying P., Jiang Z., 2017.** Comparative study of hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids retrorsine and monocrotaline. *Chemical Research In Toxicology*, **30**: 532–539.
- Yakubu M. & Akanji M., 2011.** Effect of aqueous extract of *Massularia acuminata* stem on sexual behaviour of male Wistar rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**(738103):1-10.
- Yang Y.C., Yan J., Doerge D.R., Chan P.C., Fu P.P., Chou M.W., 2001.** Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine, leading to DNA adduct formation *in vivo*. *Chemical Research in Toxicology*, **14**(1): 101-109.
- Yemoa A., Joachim G., Dissou A., Mansourou M., 2015.** Beninese medicinal plants as a source of antimycobacterial agents: bioguided fractionation and *In vitro* activity of alkaloids isolated from *Holarrhena floribunda* used in traditional treatment of Buruli ulcer. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 835767, 5p.
- Zhang C., Zhang R., Li Y.M., Liang N., Zhao Y., Zhu H., He Z., Liu J., Hao W., Jiao R., 2017.** Cholesterol-lowering activity of tartary buckwheat protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**(9): 1900-1906.
- Zimmer R.S., Amet S., Janus N., Deray G., Launay V.V., 2013.** Néphrotoxicité des médicaments. *Revue Francophone des Laboratoires*, **2013**(455): 75-82.

# ANNEXES

## **Produits chimiques**

Des produits chimiques et des réactifs ont été utilisés au cours des différentes manipulations. Il s'agit de:

Solvants organiques à savoir l'éthanol 90%, l'hexane, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle pour l'extraction du produit et de l'éthanol 95% et 100%, du toluène, de la paraffine, de l'hématoxyline, l'éosine, du baume d'Eukitt® et du May Gründwald Giemsa pour l'étude histologique

Réactifs pour le dosage des paramètres biochimiques sont constitués des cassettes Cobas c pack multi et du kit Snapack pour le dosage des électrolytes sur l'analyseur AVL 9180. Tous ces réactifs proviennent de Roche Diagnostics GmbH D-68298 Mannheim (Allemagne).

**Tableau I : Réactifs pour analyse de Bilirubine directe**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>1</sub>	Acide phosphorique	85 mol/L
	HEDTA	4.0 mmol/L
	NaCl	50mmol/L
	détergent	pH 1,9
R <sub>2</sub> :	Dichloro-3,5 phényldiazonium	1,5 mmol/L; pH 1,3

**Tableau II : Réactifs pour analyse de Bilirubine totale**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>3</sub>	Phosphate	25 mol/L
	détergent	pH 1,0
R <sub>4</sub> :	Sel de 3,5-dichlorophényl diazonium	≥1,35 mmol/L

**Tableau III : Réactifs pour analyse d'alanine aminotransférase (ALAT)**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>5</sub>	Tampon TRIS	224 mol/L, pH 7,3 (37°C)
	L'alanine	1120 mmol/L
	albumine (bovine)	0,25%
	LDH (de microorganisme)	≥ 45 µk/L
	stabilisateurs, conservateur	
R <sub>6</sub> :	Pyridoxal phosphate (diluant)	730 µmol/L
	conservateur	
R <sub>7</sub>	NADH (de levure)	≥ 1,7 mol/L
	2-oxoglutarate ou acide α- céto glutarique	94 mol/L
	conservateur	

**Tableau IV : Réactifs pour analyse d'aspartate aminotransférase (ASAT)**

Réactifs	Composition	Concentration
<b>R<sub>8</sub></b>	Tampon TRIS	264 mol/L pH 7,8 (37°C)
	L-aspartate ou acide aspartique	792 mmol/L)
	MDH (microorganisme)	≥ 24 µk/L
	LDH (de microorganisme)	≥ 48 µk/L
	albumine (bovine) conservateur	0,25%
<b>R<sub>9</sub></b>	NADH (de levure)	≥ 1,7 mol/L
	2-oxoglutarate ou acide α-céto glutarique	94 mol/L
	conservateur	

**Tableau V : Réactifs pour analyse de la phosphatase alcaline (PAL)**

Réactifs	Composition	Concentration
<b>R<sub>10</sub></b>	Amino-2 méthyl-2 propanol (-1)	1,724 mol/L, pH 10,44 (30°C)
	acétate de magnésium	3,83 mmol/L
	sulfate de zinc	0,766 mmol/L
	acide N-(hydroxy-2 éthyl)-éthylènediamine-triacétique	3,83 mmol/L
<b>R<sub>11</sub></b>	p-nitrophénylphosphate conservateurs	132,8 mmol/L, pH 8,50 (25°C)

**Tableau VI : Réactifs pour analyse d'acide urique**

Réactifs	Composition	Concentration
<b>R<sub>12</sub></b>	Tampon phosphate	0,05 mol/L, pH 7,8
	TOOS	7 mmol/L
	monoéther d'alcool gras de polyéthylèneglycol	4,8%
	ascorbate oxydase (EC 1.10.3.3; curcubita)	≥ 83,5 µkat/L (25°C)

stabilisateurs		
R <sub>13</sub>	Tampon phosphate	0,1 mol/L, pH 7,8
	hexacyanoferrate (II) de potassium	: 0,3 mmol/L
	amino-4 phénazone	≥ 3mmol/L
	uricase (EC 1.7.3.3; d'Arthrobacter protophomiae)	≥ 83,4 µkat/L (25°C)
	péroxydase (POD) (de raifort; EC 1.1.1.1.7)	≥ 50 µkat/L (25°C)
	stabilisateurs	

**Tableau VII : Réactifs pour analyse de la créatinine**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>14</sub>	Hydroxyde de potassium	900 mmol/L
	Phosphate	135 mmol/L; pH ≥ 13,5
	conservateur	
R <sub>15</sub> :	Acide picrique	38 mmol/L, pH 6,5
	tampon non réactif	

**Tableau VIII : Réactifs pour analyse des triglycérides**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>16</sub>	Tampon PIPES	50 mmol/L pH 6,8
	Mg <sup>2+</sup>	40 mmol/L
	cholate de sodium	0,20 mmol/L
	ATP	≥ 1,4 mmol/L
	amino-4 phénazone	≥ 0,13 mmol/L
	chloro-4-phénol	4,7 mmol/L
	lipoprotéine-lipase (de Pseudomonas)	≥ 83 µkat/L
	glycolérokinase (Bacillus stearothermophilus)	≥ 3 µkat/L
	glycolérophosphate-oxydase (E. coli)	≥ 41 µkat/L
	peroxydase (de raifort)	≥ 1,6 µkat/L
	stabilisateurs; conservateur	

**Tableau IX : Réactifs pour analyse du cholestérol total**

Réactifs	Composition	Concentration
R17	Tampon PIPES	225mmol/L, pH 6,8
	Mg <sup>2+</sup>	10mol/L
	cholate de sodium	0,6 mmol/L
	4-aminophenazone	≥ 0,45 mmol/L
	Phénol	≥ 12,6 mmol/L
	monoéther d'alcool gras de polyéthylèneglycol	3%
	cholestérol estérase (de <i>Pseudomonas</i> )	≥ 25 µkat/L (≥ 1,5 U/mL)
	cholestérol-oxydase (d' <i>E. coli</i> )	≥ 7,5 µkat/L (≥ 0,45 U/mL)
	peroxydase (de raifort)	≥ 12,5 µkat/L (≥ 0,75 U/m)
	stabilisateurs; conservateur	
	étalon cholestérol	

**Tableau X : Réactifs pour analyse du cholestérol HDL**

Réactifs	Composition	Concentration
R18	Tampon HEPES	10,07 mmol/L
	CHES	96,95 mmol/L pH 7,4
	sulfate de dextran	1,5 g/L
	nitrate de magnésium hexahydrate	≥ 11,7 mmol/L
	HSDA	0,96 mmol/L
	ascorbate- oxydase (d' <i>Eupenicillium</i> recombinante)	≥ 50 µkat/L
	peroxydase (de raifort)	≥ 16,7 µkat/L
	conservateur	
R19:	Tampon HEPES	10,07 mmol/L, pH 7
	(PEG)-cholestérol estérase (de <i>Pseudomonas</i> ):	≥ 3,33 µkat/L
	(PEG)-cholestérol estérase (de <i>Streptomyces</i> , recombinante)	≥ 127 µkat/L
	peroxydase (de raifort)	≥ 333 µkat/L 10mol/L
	4-amino-antipyrine	2,46 mmol
	conservateur	

polyéthylèneglycol = (PEG)

**Tableau XI : Réactifs pour analyse de la créatine phosphokinase**

Réactifs	Composition	Concentration	
<b>R20</b>	Tampon Imidazole	123 mmol/L, pH 6,5 (37°C)	
	EDTA	2,46 mmol/L	
	Mg <sup>2+</sup>	12,3 mmol/L	
	ADP	2,46 mmol/L	
	AMP	6,14 mmol/L	
	diadénosine pentaphosphate	19 µmol/L	
	NADP (levure)	2,46 mmol/L	
	N-acétylcystéine	24,6 mmol/L	
	HK (levure)	≥ 36,7 µk/L (25°C)	
	G6P-DH (E.coli)	≥ 23,4 µkat/L (25°C)	
conservateur, stabilisateur, additif			
<b>R21:</b>	Tampon (CAPSO)	20 mmol/L, pH 8,8 (37°C)	
	Glucose	120 mmol/L	
	EDTA	2,46 mmol/L	
	créatine phosphate	184 mmol/L	
	4 anticorps monoclonaux (souris) anti - CK - M capacité d'inhibition ≥ 99,6%	66,8 µkat/L (4000 U/L) (37°C)	
	conservateur, stabilisateur, additif		

Tampon (acide cyclohexylamine-2-hydroxy-1 propane sulfonique = (CAPSO))

**Tableau XII: Réactifs pour analyse d'albumine**

Réactifs	Composition
<b>R22</b>	-Tampon tris
	-sérumalbumine bovine
	-immunoglobuline (de souris)
	-conservateur
<b>R23:</b>	-Particules de latex recouvertes d'anticorps (de souris) anti-albumine
	-tampon glycine
	-conservateur

**Tableau XIII : Réactifs pour analyse de lactate déshydrogénase (LDH)**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>24</sub>	N-méthylglucamine	400 mmol/L; pH 9,4 (37°C)
	lactate de lithium	62 mmol/L
	stabilisateurs; conservateur	
R <sub>25</sub> :	NAD	62 mmol/L
	stabilisateurs; conservateur	

**Tableau XIV : Réactifs pour analyse du calcium**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>26</sub>	Acide cyclohexylamino-3 hydroxy-2 propanesulfonique-1 (CAPSO)	557 mmol/L
	NM-BAPTA	2 mmol/L, pH 10.0
	agent tensioactif non réactif; stabilisateur	
R <sub>27</sub> :	EDTA	7.5 mmol/L, pH 7.3
	agent tensioactif non réactif; conservateur	

**Tableau XV : Réactifs pour analyse du chlore, du potassium et du sodium**

Réactifs	Composition	Concentration
R <sub>28</sub>	Tampon HEPES	10 mmol/L
	Triéthanolamine	7 mmol/L
	Chlorure de sodium	3.06 mmol/L
	Acétate de sodium	1.45 mmol/L
	Chlorure de potassium	0.16 mmol/L
	Conservateur	

## **PUBLICATIONS**

# **ARTICLE 1**

## Original Research Article

**Cardiac Tolerance of An Ethyl Acetate Extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand and Schinz Leaves in Wistar Rats**D. D. Koudou\*<sup>1</sup>, Tra-Bi Irie Otis<sup>2,3</sup>, Oussou J.B<sup>1</sup>, Kone Mama<sup>1</sup>, A. P. Yapo<sup>1</sup>, A. J. Djaman<sup>2,4</sup><sup>1</sup>Laboratory of Physiology, Pharmacology and Pharmacopoeia, Natural Sciences Research and Training Unity, Nangui Abrogoua University, 02 PO Box 801 Abidjan 02, (Côte d'Ivoire)<sup>2</sup>Biochemical Pharmacodynamic Laboratory, Biosciences Department, Felix Houphouët Boigny University, PO Box 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire)<sup>3</sup>Biochemical Microbiological Laboratory, Department of Life and Earth Sciences, Higher Teacher training school, PO Box, 10 Abidjan 08- Côte d'Ivoire<sup>4</sup>Department of Clinical and fundamental Biochemistry of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, PO Box 490 Abidjan 01 (Côte d'Ivoire)**\*Corresponding author**

D. D. Koudou

Email: ddesirekoudou@gmail.com

**Abstract:** *Holarrhena floribunda* is a plant used in traditional medicine for the treatment of various pathologies. However, it could cause toxic effects on the heart of patients. In order to determine its possible cardiotoxic effects, forty rats were randomly grouped into 2 (control group and treated group), combined with 10 rats (control satellite group and satellite treated group). Treated and satellite treated groups received, by gavage, 1000 mg / kg b.w. of the ethyl acetate extract of the leaves of *H. floribunda* (EAHf). Control and satellite control groups were administered orally with distilled water for 90 days. Animals blood samples were taken a day before the beginning of administration of *H. floribunda* and every week during the first month and at the end of every month from the second month until the end of the experiment. Serum was prepared for cardiac biochemical markers assay. The rats of the treated group at the end of the third month and those of the satellite group at the end of the fourth month were euthanized using overdose of ether, the heart of the rats was removed for gross morphology and histopathology analysis. The results of the biochemical parameters showed that this extract induced a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in total cholesterol, calcium, potassium and a significant increase ( $p < 0.05$ ) of HDL, sodium levels, and AST activities. On the other hand, ALT, LDH and CPK activities, and serum triglyceride concentrations did not show any significant changes ( $p < 0.05$ ) in treated rats group compared to controls. Microscopic observations of heart tissue sections of rats treated with the ethyl acetate extract of *H. floribunda* showed no lesions, no edema, and no necrosis. These results suggest that *H. floribunda* did not interfere with functioning or altered the integrity of the heart.

**Keywords:** Cardiac bio-tolerance, *Holarrhena floribunda*, histopathology, wistar rats.

**INTRODUCTION**

Medicinal plants are recognized to have a very important role on the health of men [1]. WHO [2] has identified more than 22 000 medicinal plants used by traditional medicine? These medicinal plants continue to be, subject to different research work that give preference generally to ethno botanical studies, pharmacological and phytochemical [3]. *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae) is a plant used in traditional medicine in Ivory Coast for the treatment of dysentery, diarrhea, colic, infertility and particularly diabetes [4]. This plant has been subject of many previous studies. Some researchers showed its *in vitro* inhibitory effect of the aqueous extract of *H. floribunda* on the growth of non-pathogenic *amoebae* of the species *Amoeba proteus*

[5]. Others demonstrated the estrogenic effects in the ovariectomized rat and the antioxidant potential of the methanolic extract of *H. floribunda* leaves [6, 7]. Phytochemical investigations on the plant led to isolation of flavonoids, phytohormones, and alkaloids [8, 9]. More recently, our research team has shown the hypoglycemic activity of the ethyl acetate extract with 1000 mg/kg b.w. as a therapeutic dose [10]. According to Khattabi *et al.*; [11], ignorance of the toxic effects of medicinal plants constitutes a brake on their use. To guarantee the safety use of *H. floribunda* by population, acute and subacute toxicity studies carried out indicate no danger of *H. floribunda* [6, 10]. However, its safety studies on vital organs such as heart, over a long period of use have not been reported in the literature yet.

Considering the heart as the leading engine of blood circulation, this organ could be a potential target of any substance conveyed by the blood. This work was therefore carried out to evaluate the effect of the ethyl acetate extract of *H. floribunda* on wistar rats' heart.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

The plant material consists of the leaves of *Holarrhena floribunda*. They were harvested in the department of Agboville (Côte d'Ivoire) from July to September 2013. The plant has been identified at the national floristic center of Felix Houphouët-Boigny University (Côte d'Ivoire) as a voucher specimen was deposited (*Holarrhena floribunda* (G. DON) DURAND AND SCHINZ (Apocynaceae) n° 13240).

### Animal material

Animals were selected as per the Organization of Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines no. 408 [12]. Healthy young and nulliparous, non-pregnant Wistar rats weighing from 90- 127 mg of 6-8 weeks old. The animals were bred in the animal house of the Center for Ecological Research (CRE) of the University of Nangui Abrogoua (Côte d'Ivoire). The animals are randomly selected, marked to permit individual identification, and kept in plastic cages with wood chips renewed every two days for 5 days prior to dosing to allow for acclimatization of the laboratory conditions (room temperature 25°C ( $\pm$  3°C), moisture 35 to 60%, light and dark period 12/12 hours, bedding cleaned and sterilized). All animals had a regular supply of clean drinking water and food.

### Methods

#### Preparation of ethanol extract

*Holarrhena floribunda* leaves were dried out of the sun at room temperature of  $27 \pm 2$  ° C. The dried leaves were pulverized using a mill (RETSCH S M ® 100). The ethanol extract of *H. floribunda* is obtained considering the traditionally method used by traditional healers to treat diabetes. Hundred grams of the previously obtained powder were dissolved in two liters of ethanol 80 %. The solution was homogenized with a magnetic stirrer (STURART SB 162) for 48 hours and filtered on cotton wool and on whatmann n° 1 paper. The residue was re-extracted with ethanol 80 % twice for 6 hours. The solution is also filtered on cotton wool and whatmann n° 1 paper. The filtrates were put together and concentrated using a rotary evaporator (Buchi R110/NKE 6540/2) at reduced pressure at 45 ° C and then dried in an oven (Retch type SM 100, Haan, Germany) at 45° C for 48 hours. This extraction obtained a yield of 13.01%.

#### Preparation of the ethyl acetate extract

With a separation final, Ten (10) g of the ethanol extract was dissolved into 100 mL of distilled water. 100 mL of hexane was added to the preparation to obtain 200 mL of a solution of water-hexane in the ratio 1:1. After shaking and then decanting the solution, the aqueous layer was collected. The mixture was further successively partitioned (1:1, v/v) by dichloromethane and ethyl acetate. Solvents were evaporated using a rotary evaporator (Buchi Rotavapour) at 45 ° C and extracts were dried using an oven. The powder obtained was the ethyl acetate extract from the leaves of *Holarrhena floribunda*. The yield of the ethyl acetate fraction from the 10 g of ethanol extract was 15.23 %.

#### Subchronic Toxicity Test

Subchronic toxicity tests were conducted in accordance with OECD Guideline No. 408 [12]. Fifty rats were divided into four groups: control (20 rats), treated (20 rats), control satellite (5) and treated satellite (5). Rats in Control and Control Satellite were administered by gavage with distilled water daily at 2 mL / 100 g b.w. Those of Treated and Treated Satellite groups received orally and daily doses of 1000 mg / kg b.w. of EAHf, the dose which induces the hypoglycaemic effect in hyperglycemic rats according to Gngoran *et al.*; [10]

#### Collection of blood samples

Rats were fasted for 24 hours and then anesthetized with ether; 1 ml / 100 g of blood was taken from the retro-orbital sinus. Blood samples were taken a day before the administration of either the extract or distilled water to rats and every week during the first month and every month from the second month until the end of the Experiments. The whole collected blood in dry tubes was centrifuged immediately in a JOUAN BR4i centrifuge (Buckinghamshire, England) at 3000 rpm for 5 min to obtain a serum for the determination of biochemical parameters.

#### Determination of serum cardiac markers

Cardiac enzymes activities, calcium and serum lipid levels were determined using a Cobas C311® HITACHI biochemistry automaton (Roche Diagnostics, France). The experiments were conducted using commercial kits (Roche Diagnostics, France) based on the manufacturer's instructions, as summarized in Tables 1. Serum sodium, and potassium were determined by direct ion selective electrode methods by using Roche electrolyte analyzer (AVL 9180®, Roche Diagnostics, Germany).

LDL cholesterol and atherogenic index (AI) level were calculated according to Friedwald's formula [13].

$LDL-c = Total\ Cholesterol - HDL-c - TG/5$  (g/L)

$AI = Total\ Cholesterol / HDL-c$

**Table 1: Operating parameters for the quantitative determination of serum cardiac markers**

cardiac biochemical markers	Methods (Spectrophotometry)	Wave length (nm)
Alanine aminotransferase (ALT)	Absorption kinetics (Disappearance of NADH)	340
Aspartate aminotransferase (AST)	Absorption kinetics (Disappearance of NADH)	340
Creatine phosphokinase (CPK)	Absorption kinetics (Formation of NADH/H <sup>+</sup> )	340
Lactate dehydrogenase (LDH)	Absorption kinetics (Disappearance of NADH)	340
Total cholesterol	Colorimetric (formation of phenolic chromogen)	505
HDL-cholesterol	Colorimetric in homogeneous phase	600
Triglycerides	Colorimetric (formation of phenolic chromogen)	505
Calcium	Colorimetric	340

### Cardiac tissue sampling and analysis of histological sections

At the end of the third month, the rats of the main test and those of the satellite batches at the end of the fourth month were euthanized by overdose with ether. Their hearts were removed and attached to 10% formalin. On the cores removed from the formalin, longitudinal sections of 5 mm of tissue pieces were taken using scalpel blade and then deposited in cassettes. These cassettes were introduced into an automaton (Technicon® Tissue Tek) where the tissue pieces were respectively subjected to fixing baths with 10% formaldehyde, dehydration baths with 70% and 90% ethanol, Lightening with toluene and impregnation baths with paraffin using microtome (Microme® GmbH (walldorf, Germany), cuts of 3 µm thickness were made. The sections obtained were mounted on slides and then stained with hematoxylin-eosin. Blade readings were made using a binocular optical microscope (Motic®); and the photos were taken using an electronic photography device (Am Scope® FMA050, 8.0 PIXEL) adapted to the objective of the microscope.

### Statistical Analysis

The results are expressed as averages followed by the standard error on the mean (M ± ESM). The repeated variance analysis (ANOVA) was used to compare the administered dose (Control/ Test) effects and the treatment time effects. The tests were supplemented by the Bonferroni post-Hoc test. The differences were considered significant for a probability level  $p < 0.05$ . All these analyzes were carried out using the GraphPad prism Version 5.0 software

## RESULTS

### Biochemical study

#### Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on cardiac enzymes activities of rats

The enzymatic activities of ALT, LDH and CPK of the rats in treated group did not change significantly from those of the rats in control group; But in relation to the values of day0, significant increases were observed in all rats (control and treated group) in the activities of CPK (D14 to D120) and LDH (D28 and 60). The activity of AST, on the other hand, increased significantly in relation to the value of J0 as compared to those of the rats in the control group.

**Table 2: Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on cardiac enzymes activities of rats**

Days	Groups	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	LDH (IU/L)	CPK (IU/L)
D0	Control	23,26 ± 2,313	39,20 ± 2,970	454,6 ± 27,57	180,2 ± 4,499
	Treated	26,68 ± 2,082	38,00 ± 3,521	445,7 ± 22,51	182,7 ± 4,842
D7	Control	27,10 ± 1,795	38,30 ± 1,913	523,6 ± 28,98	203,0 ± 6,995
	Treated	27,70 ± 2,217	40,10 ± 4,026	605,5 ± 31,41 (a)	177,0 ± 9,897
D14	Control	30,80 ± 3,206	42,00 ± 3,494	531,5 ± 32,07	245,1 ± 8,787 (a)
	Treated	24,95 ± 1,939	47,05 ± 3,541	598,6 ± 31,68	265,1 ± 13,57 (a)
D21	Control	28,10 ± 2,421	45,95 ± 4,595	511,7 ± 24,87	300,1 ± 12,77 (c)
	Treated	28,87 ± 2,443	48,10 ± 4,186	537,5 ± 23,58	303,1 ± 9,688 (c)
D28	Control	27,90 ± 1,764	40,20 ± 1,853	520,6 ± 36,23	325,0 ± 20,14 (c)
	Treated	28,49 ± 2,207	58,00 ± 2,186 (*) (b)	615,1 ± 34,42 (a)	350,0 ± 22,99 (c)
D60	Control	25,00 ± 2,513	47,35 ± 3,671	533,3 ± 29,33	380,4 ± 18,76 (c)
	Treated	23,70 ± 2,421	50,65 ± 3,672	605,4 ± 36,05 (a)	360,4 ± 20,07(c)
D90	Control	23,75 ± 2,247	50,45 ± 3,300	525,6 ± 27,04	360,4 ± 20,07(c)
	Treated	26,65 ± 1,643	42,10 ± 3,343	591,5 ± 32,50	373,9 ± 18,98 (c)
D120	Control	31,70 ± 2,563	48,40 ± 3,732	543,5 ± 32,64	396,5 ± 18,03 (c)
	Treated	28,81 ± 2,657	51,40 ± 3,721	496,9 ± 30,46	376,6 ± 20,59 (c)

Values are means ± SEM. The asterisk indicate significant differences in the treated group compared to control group; (\*) =  $P < 0.05$ ; (\*\*) =  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) =  $p < 0.001$ . The letters indicate significant differences for each group according to the time (in relation to day 0); a =  $p < 0.05$ ; b =  $p < 0.01$ ; c =  $p < 0.001$ . ALT= alanine aminotransferase; AST= aspartate aminotransferase; LDH= lactate dehydrogenase; CPK= Creatine phosphokinase.

**Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on the serum electrolytes levels of rats.**

In the electrolytes, there was a significant decrease in calcium and potassium levels on day 60 and

day 90 in rats in the test batch compared with those in the control batch. The level of sodium in the treated rats increased significantly at day 90 compared to the day of D0 and those of the control rats.

**Table 3: Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on the serum electrolytes levels of rats**

Days	groups	Electrolytes parameters		
		CALCIUM	POTASSIUM	SODIUM
D0	Control	10,02 ± 0,178	4,005 ± 0,188	141,5 ± 0,642
	Treated	10,01 ± 0,155	3,820 ± 0,146	142,5 ± 0,456
D7	Control	10,60 ± 0,290	4,095 ± 0,172	143,2 ± 0,586
	Treated	9,810 ± 0,182	3,980 ± 0,178	144,2 ± 0,705
D14	Control	10,50 ± 0,250	4,085 ± 0,147	144,1 ± 0,701
	Treated	9,760 ± 0,232	3,865 ± 0,157	145,4 ± 0,595
D21	Control	9,960 ± 0,193	4,145 ± 0,180	143,3 ± 0,746
	Treated	10,02 ± 0,178	4,170 ± 0,180	145,4 ± 0,608
D28	Control	10,65 ± 0,301	4,170 ± 0,180	145,9 ± 0,689 (c)
	Treated	9,960 ± 0,193	3,775 ± 0,156	147,5 ± 0,806 (c)
D60	Control	10,78 ± 0,184	4,190 ± 0,212	145,0 ± 0,811 (c)
	Treated	9,478 ± 0,314 (**)	3,340 ± 0,048 (*)	147,4 ± 0,563 (c)
D90	Control	10,72 ± 0,219	4,170 ± 0,180	142,1 ± 0,770
	Treated	9,535 ± 0,206 (*)	3,320 ± 0,040 (*)	145,7 ± 0,692 (*)
D120	Control	10,39 ± 0,241	4,040 ± 0,171	143,2 ± 1,067
	Treated	10,04 ± 0,257	4,005 ± 0,188	144,2 ± 0,705

Values are means ± SEM. The asterisk indicate significant differences in the treated group compared to control group; (\*) = P< 0.05; (\*\*) = p< 0.01; (\*\*\*) = p< 0.001. The letters indicate significant differences for each group according to the time (in relation to day 0); a = p< 0.05; b = p<0.01; c =p<0.001

**Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on the serum lipids levels of rats.**

There were no significant changes in serum triglyceride levels in treated rats compared to control. As for other serum lipids, a significant increase (p <0.05) in the HDL cholesterol level of (+17,41%) at D28 and a significant decrease (p <0.05) on D14, for

serum total cholesterol of (-15,87%) and LDL cholesterol of (-17,32%), were observed. As for the atherogenicity index of the treated rats, it decreased with Compared to the rats of the control group during the first two months of the study. This decrease was significant (p <0.05) and reached a rate of (-17.32%) at D28

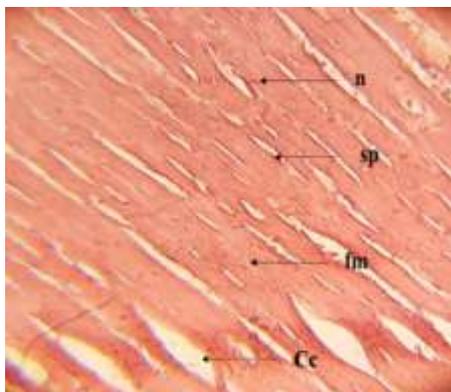
**Table 4: Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on the serum electrolytes levels of rats**

		TC	HDL-C	LDL-C	TG	AI
D0	Control	1,04 ± 0,033	0,540 ± 0,014	0,255 ± 0,009	1,23 ± 0,168	1,95 ± 0,072
	Treated	0,964 ± 0,020	0,538 ± 0,008	0,257 ± 0,009	0,840 ± 0,112	1,79 ± 0,038
D7	Control	1,06 ± 0,035	0,553 ± 0,024	0,249 ± 0,006	1,29 ± 0,159	1,96 ± 0,077
	Treated	0,997 ± 0,034	0,541 ± 0,010	0,249 ± 0,009	1,04 ± 0,190	1,86 ± 0,0749
D14	Control	1,13 ± 0,020	0,582 ± 0,009	0,252 ± 0,006	1,50 ± 0,082	2,00 ± 0,091
	Treated	0,983(*) ± 0,029	0,514 ± 0,003	0,212(*a)±0,000	1,29 ± 0,157	1,92 ± 0,066
D21	Control	1,03 ± 0,027	0,531 ± 0,021	0,253 ± 0,006	1,23 ± 0,147	2,02 ± 0,091
	Treated	1,01 ± 0,027	0,552 ± 0,0181	0,243 ± 0,005	1,06 ± 0,135	1,85 ± 0,068
D28	Control	1,02 ± 0,028	0,517 ± 0,019	0,262 ± 0,009	1,21 ± 0,149	2,02 ± 0,080
	Treated	1,01 ± 0,020	0,607(**) ± 0,005	0,248 ± 0,013	0,787± 0,083	1,67 (*)±0,033
D60	Control	0,981 ± 0,031	0,527 ± 0,014	0,263 ± 0,003	0,955 ± 0,157	1,89 ± 0,076
	Treated	0,991 ± 0,033	0,551 ± 0,012	0,248 ± 0,008	0,962 ± 0,136	1,80 ± 0,052
D90	Control	1,02 ± 0,019	0,543 ± 0,015	0,250 ± 0,007	1,12 ± 0,128	1,90 ± 0,064
	Treated	1,05 ± 0,039	0,545 ± 0,010	0,254 ± 0,003	1,25 ± 0,194	1,93 ± 0,076
D120	Control	1,010 ± 0,031	0,539 ± 0,011	0,261 ± 0,004	1,05 ± 0,158	1,88 ± 0,063
	Treated	1,03 ± 0,027	0,515 ± 0,022	0,256 ± 0,003	1,27 ± 0,149	2,06 ± 0,093

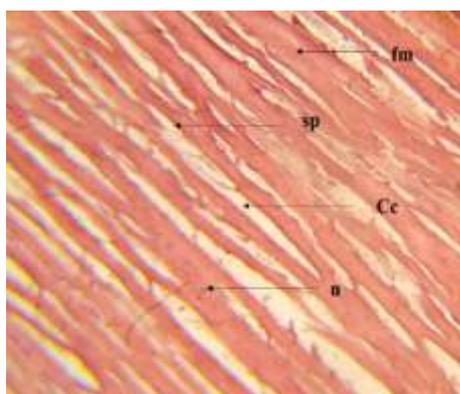
Values are mean ± SEM. The asteris indicated significant différences in the Treated group compared to control group; (\*) = P< 0.05; (\*\*) = p< 0.01; (\*\*\*) = p< 0.001. The letters indicate significant differences for each group according to the time (in relation to day 0); a = p< 0.05; b = p<0.01; c =p<0.001. T C= total cholesterol; HDL-C= HDL cholesterol; LDL-C=LDL cholesterol; TG= triglyceride; AI= atherogenic index.

### Histological study of rat hearts

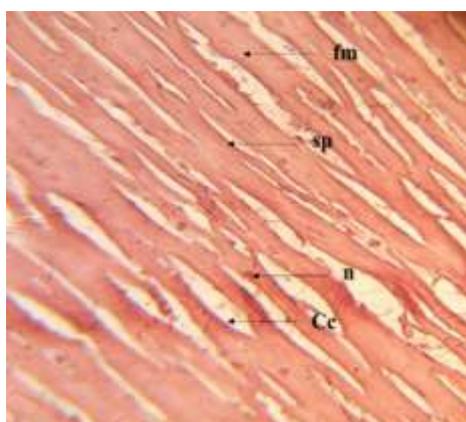
The observation of the ventricles portions shows a normal anatomical structure almost identical to the level of all the hearts of the rats. The elongated myocardial fibers with bifurcations at their ends are interconnected (Figures).



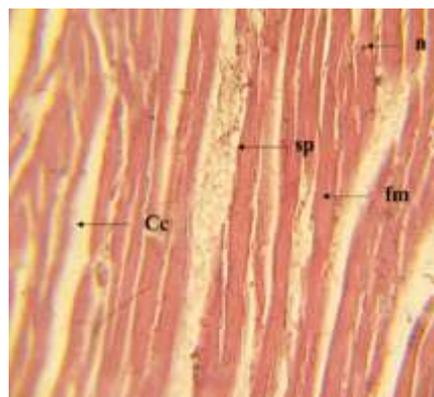
**Fig 1a: Photomicrograph of the cardiac tissues of rats of Control group on the 90th day (H&E x400).**  
*sp: sarcoplasm; fm: elongated muscle fibers; n: nucleus; Cc: Cardiac cavity.*



**Fig 1b: Photomicrograph of the cardiac tissues of rats of Treated group on the 90th day (H&E x400).**  
*sp: sarcoplasm; fm: elongated muscle fibers; n: nucleus; Cc: Cardiac cavity.*



**Fig 2a: Photomicrograph of the Heart ventricle portion of rats of control group on the 120th day (H&E x400)**  
*sp: sarcoplasm; fm: elongated muscle fibers; n: nucleus; Cc: Cardiac cavity.*



**Fig 2b: Photomicrograph of the Heart ventricle portion of rats of treated group on the 120th day (H&E x400)**  
*sp: sarcoplasm; fm: elongated muscle fibers; n: nucleus; Cc: Cardiac cavity.*

### DISCUSSION

The vast majority of exogenous composites administered to the body are gastrointestinal tract. The composites will therefore be subsequently distributed to the general blood circulation. The heart which is one vital organ undergoes the toxic effect of substances [14]. Changes in cardiac markers have often proved to be an important aid in diagnostic select diseases and determining patients' prognosis [15]. This is why, the effects of *Holarrhena floribunda* on integrity and cardiac function and also on cardiovascular risk factors were evaluate by assaying markers such as: calcium, potassium and sodium (for function); CPK, AST, ALT and LDH (for integrity), total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides for lipid cardiovascular risk factors [16, 17]. The dosage of electrolytes indicated significant reductions in calcium and potassium levels on day 60 and day 90 and a significant increase ( $p < 0.01$ ) of sodium level on day 90 was observed. this study showed that the ethyl acetate extract of the leaves of *Holarrhena floribunda* caused hypocalcaemia, hypokalaemia and hypernatremia in rats treated with this plant. However, it is widely accepted that decreases in calcium and potassium levels indicate on the one hand, a decrease in the contraction force and, on the other, a slowing of the conduction velocity and the increase of automatism [18, 19]. The high sodium level indicates an increase in excitability [20]. In this regard, our results indicate show the extract could exert negative chronotropic, dromotropic and inotropic effects, and a positive bathmotropic effect. These results show that the action of the extract on cardiac tissue could lead to a decrease in rhythm and to bradycardia, the pathological consequence of which is heart failure [21]. The extract of *Holarrhena floribunda* may therefore be a good candidate for cardiac pathologies associated with tachycardias and arrhythmias [18].

Regarding the effects of *Holarrhena floribunda* on the integrity of cardiac cells, the assay of enzymatic activities showed that the ALT, LDH and

CPK activities did not show any significant changes. However, the serum activity of AST were increased significantly ( $p < 0.05$ ) on Day 28. It is reported that plasma levels of these markers are directly proportional to the degree of necrotic lesions present in the myocardium and thus are markers of myocardial damage [22]. Similar types of results were obtained by experimental animal study, where rats have been induced of myocardial infarction by isoproterenol resulted in elevated SGOT (AST) level. [23]. However, leakage of transaminases in blood stream, particularly that of AST, observed on D28 may result the appearance of a membrane breach due to a temporary disorganization of the sarcolemma [24]. These results suggest that the extract of *Holarrhena floribunda* would have no effect on the heart. This would imply a lack of aggression on the part of the extract on the cardiac tissue.

At the level of the risk factors studied, the serum lipid assay indicates that serum triglyceride levels have not been significantly altered; On the other hand the extract caused significant ( $p < 0.05$ ) decreases in the total cholesterol concentration at D28 and induced significant ( $p < 0.05$ ) increases in HDL cholesterol concentration on Day 14. The effect of our extract, on the lipid balance, could come from the capture and the hepatic purification of the atherogenic cholesterol. This would reflect the ability or power of our extract to contribute to the elimination of atherogenic cholesterol [25]. Based on data from the literature that agrees that estrogen administration results in reduced LDL cholesterol and an increase in HDL [26], we can assume that the effect of the extract on the lipids could come from flavonoids with estrogenic effects and phytohormones whose presence was reported by Paris *et al.*; [27].

## CONCLUSION

After oral administration for 90 days at a dose of 1000 mg / kg body weight, the ethyl acetate extract of the leaves of *Holarrhena floribunda* did not result in functional disturbances or cardiac damage in rats. However, biochemical and histological studies of other organs would be necessary in order to provide additional information to those already obtained in this study.

## Acknowledgment

We would like to express our sincere thanks to the management of the Ecology Research Center for accepting that our works will conduct the premises of its structure. We also wish to express my gratitude to the Management of the Pasteur Institute of Abidjan Cocody for having welcomed us to the Department of Clinical and Fundamental Biochemistry for the determination of biochemical parameters

## REFERENCES

1. Carillon, E. La phytothérapie face à l'évolution médicale. Ed: Phyto. 2000: 10-15

2. Organisation Mondiale de la Santé. Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Genève, Suisse. 2003.
3. Zirihi GN, Kra AK, Guédé-Guina F. Evaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lamarck) O. kuntze (Asteraceae) pymi sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. Rev Med Pharmacol Afr. 2003; 17: (3):11-8.
4. Schmelzer, G.H. *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand & Schinz. [Internet] Record from PROTA4U. Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. (2006). <<http://www.prota4u.org/search.asp>>. Accessed 31 May 2017.
5. Guissou JP, Millogo KH, Kaboré IZ. Etude comparative de l'activité pharmacologique d'*Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) et *Holarrhena floribunda* G. Don (Apocynaceae) vis à vis des amibes non pathogènes du gène *amoeba proteus*. Méd. Afr. 1992; 39 (5): 359-363.
6. Bayala B, Tamboura HH, Pellicer MR, Zongo D, Traoré A, Ouédraogo L, Malpaux B. Effets œstrogéniques du macéré aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur & Schinz chez la rate ovariectomisée. Biotechnologie, agronomie, société et environnement. 2006; 10(3):61-64.
7. Badmus JA, Odunola OA, Obuotor EM, Oyedapo OO. Phytochemicals and in vitro antioxidant potentials of defatted methanolic extract of *Holarrhena floribunda* leaves. Afr. J. Biotech. 2010; 9 (3): 34-346.
8. Leboeuf M, Cave A, Goutarel R. Steroid Alkaloids. Presence of Progesterone in the Leaves of *Holarrhena Floribunda* (G. Don) Duer. And Schinz. Hebd. Seances. Acad. Sci. 1964; 259: 3401-3403.
9. Bennett RD, Heftmann E. Progesterone: biosynthesis from pregnenolone in *Holarrhena floribunda*. Science. 1965 Aug 6; 149(3684):652-3.
10. Gnanjoran BN, N'guessan BB, Amoateng P, Dosso K, Yapo AP, Ehile EE. Hypoglycaemic activity of ethanolic leaf extract and fractions of *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae). Journal of Medical and Biomedical Sciences. 2012;1(3):46-54.
11. Khattabi A, Rhalem N, Chabat A, Skali S, Souleymani Bencheich R.. Plants toxiques: définition et classification. Toxicology Maroc. 2010; 2: 3-4.
12. Organization of Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines n°: 408. 1998.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clinical chemistry. 1972 Jun 1; 18(6):499-502.

14. Timbrell JA. Principles of biochemical toxicology. 4th ed. Informa healthcare, New York (USA). 2008: 76-77.
15. Bryant J, Picot J, Baxter L, Levitt G, Sullivan I, Clegg A. Use of cardiac markers to assess the toxic effects of Anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. *European journal of cancer*. 2007 Sep 30; 43(13):1959-66.
16. Lobo DN. Fluid, electrolytes and nutrition: physiological and clinical aspects. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2004 Aug 1; 63(03):453-66.
17. Bogarapu Kiranmayi, A. Navaneetha Lakshmi, R. Tagore, Chandrakala Kambar. Evaluation of Cardiac Markers in Chronic Renal Failure. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2015; 14 (1): 46-52.
18. El-Sherif N, Turitto G. Electrolyte disorders and arrhythmogenesis. *Cardiol J*. 2011 May 1; 18(3):233-45.
19. Osadchii OE. Mechanisms of hypokalemia-induced ventricular arrhythmogenicity. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2010 Oct 1; 24(5):547-59.
20. Remme CA, Bezzina CR. Review: sodium channel (dys) function and cardiac arrhythmias. *Cardiovascular therapeutics*. 2010 Oct 1; 28(5):287-94.
21. Beaudoux Jean Louis, Durand Geneviève. *Biochimie médicale marqueurs actuels et perspectives, 2<sup>ème</sup> édition*, Edition Lavoisier MSP. 2011 : 607.
22. Fiacre A., Plouvier E, Vincent A. *Les examens de laboratoire*. Ed. Maloine- Paris. 2002; 324.
23. Lobo Filho HG, Ferreira NL, Sousa RB, Carvalho ER, Lobo PL, Lobo Filho JG. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2011 Sep; 26(3):469-76.
24. Dieusaert P. *Guide pratiques des analyses de laboratoire*. Edition Maloine- Paris. 2005: 1453.
25. Hughes Jeremy, Jefferson Ashley. *Bilan biochimique* Edition Elsevier/Masson. 2009: 229.
26. Sock EN, Cote I, Mentor JS, Prudhomme D, Bergeron R, Lavoie JM. Ovariectomy stimulates hepatic fat and cholesterol accumulation in high-fat diet-fed rats. *Hormone and Metabolic Research*. 2013 Apr; 45(04):283-90.
27. Paris RR, Foucaud A. Flavonoids in the leaves of *Holarrhena floribunda* G. Don (Durand and Schinz): isolation of a flavonoside identified as isoquercitroside. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*. 1959 May 4; 248(18):2634-2635.

## **ARTICLE 2**

# The Journal of Phytopharmacology

(Pharmacognosy and phytomedicine Research)

## Research Article

ISSN 2320-480X

JPHYTO 2017; 6(6): 322-328

November- December

Received: 07-10-2017

Accepted: 27-11-2017

© 2017, All rights reserved

### Désiré D. Koudou

Laboratory of Physiology, Pharmacology and Pharmacopoeia, Natural Sciences Research and Training Unity, Nangui Abrogoua University, 02 PO Box 801 Abidjan 02, (Côte d'Ivoire)

### Tra-Bi Irie Otis

a) Biochemical Pharmacodynamic Laboratory, Biosciences Department, Felix Houphouët Boigny University, PO Box 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire)

b) Biochemical Microbiological Laboratory, Department of Life and Earth Sciences, Higher Teacher training school, PO Box, 10 Abidjan 08- Côte d'Ivoire

### Kouadio Yao E.

Laboratory of Physiology, Pharmacology and Pharmacopoeia, Natural Sciences Research and Training Unity, Nangui Abrogoua University, 02 PO Box 801 Abidjan 02, (Côte d'Ivoire)

### A.P. Yapo

Laboratory of Physiology, Pharmacology and Pharmacopoeia, Natural Sciences Research and Training Unity, Nangui Abrogoua University, 02 PO Box 801 Abidjan 02, (Côte d'Ivoire)

### A.J. Djaman

a) Biochemical Pharmacodynamic Laboratory, Biosciences Department, Felix Houphouët Boigny University, PO Box 582 Abidjan 22 (Côte d'Ivoire)

b) Department of Clinical and fundamental Biochemistry of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, PO Box 490 Abidjan 01 (Côte d'Ivoire)

## Correspondence:

### Désiré D. Koudou

Laboratory of Physiology, Pharmacology and Pharmacopoeia, Natural Sciences Research and Training Unity, Nangui Abrogoua University, 02 PO Box 801 Abidjan 02, (Côte d'Ivoire)  
Email: ddesirekoudou[at]gmail.com

## Hepatic tolerance of an ethyl acetate extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand and Schinz leaves in Wistar Rats

Désiré D. Koudou\*, Tra-Bi Irie Otis, Kouadio Yao E., A.P. Yapo, A.J. Djaman

### ABSTRACT

**Purpose:** This study aims to evaluate the hepatic biochemical effects associated with the use of ethyl acetate extract of *Holarrhena floribunda* leaves as a traditional medicine. **Methods:** The rats were randomly divided into four groups of 10 (male control, female control, male test and female test) and combined with four groups of 5 (male control satellite, female control satellite, male test satellite and female test satellite) were force-fed for 90 days. The control and control satellite control rats received distilled water at a rate of 2 mL / 100g PC, and treated and treated satellite treated rats received the 1000 mg / kg PC dose of the acetate extract of ethyl leaves of *Holarrhena floribunda*. The blood collected each week during the first month, then at the end of each month as of the 2nd month allowed to assay liver serum markers such as ALT, ASAT, PAL, LDH, total bilirubin, direct bilirubin, albumin, glucose, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol and triglycerides. **Results:** The animals were well supported gavage of the extract since no sign of pathological manifestation was observed on them. The biochemical analysis indicated on the one hand a significant decrease in the level of total cholesterol, glucose (in both sexes), LDL cholesterol (in the female rats), and on the other hand an increase in the HDL cholesterol level (in both sexes), the rate of ASAT activities (in female rats) and PAL (in rats). On the other hand serum levels of total bilirubin, direct bilirubin, albumin, triglycerides, activities of ALT and LDH did not significantly vary. Microscopic observations of the liver tissue sections of the rats in the test lot did not show any lesions. **Conclusion:** Administration of the ethyl acetate extract of *Holarrhena floribunda* leaves to the rats for 90 days did not interfere with liver function or cause liver tissue damage.

**Keywords:** *Holarrhena floribunda*, biochemical parameters, liver tolerance, histopathology, wistar rats.

### INTRODUCTION

The use of complementary traditional medicine, which includes herbal medicines for the treatment of various diseases, has developed rapidly in both developed and developing countries because of their accessibility and effectiveness. According to the World Health Organization (WHO), more than 80% of the world's population uses traditional medicine to cope with their health problems [1]. It is with this in mind that WHO has recommended the use of herbal medicines whose quality assurance, safety, appropriate use and efficacy are guaranteed [2]. *Holarrhena floribunda* is one of the medicinal plants of the flora of Ivory Coast used for the treatment of several diseases such as dysentery, diarrhea, colic, sterility and especially diabetes. This tree, 10 to 25 m tall, with a white latex abundant in all parts, has opposite, single whole and cuneiform leaves [3]. It has been subject of many previous studies. Some researchers showed its in vitro inhibitory effect of the aqueous extract of *H. floribunda* on the growth of non-pathogenic amoebae of the species *Amoeba proteus* [4]. Others demonstrated the estrogenic effects in the ovariectomized rat and the antioxidant potential of the methanolic extract of *H. floribunda* leaves [5, 6]. Phytochemical investigations on the plant led to isolation of flavonoids, phytohormones, and alkaloids [7, 8]. More recently, our research team has shown the hypoglycemic activity of the ethyl acetate extract with 1000 mg/kg b.w. as a therapeutic dose [9]. To guarantee the use of this plant which offers a promising therapeutic perspective, an earlier study by [10] showed that ethyl acetate extract from *Holarrhena floribunda* leaves at a dose of 1000 mg / kg body weight did not have significant effects on heart integrity in wistar rats. So far, there are no studies on the effect of this hypoglycemic extract on liver structure. Given the key role in the metabolism to maintain the energy level and structural stability of the body on the one hand and secondly in the detoxification of xenobiotics and thus the high risk of exposure of this organ to toxic entering in the body such a study concerning the tolerance of this extract could be conducted.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

The plant material consists of the leaves of *Holarrhena floribunda*. They were harvested in the department of Agboville (Côte d'Ivoire) from July to September 2013. The plant has been identified at the national floristic center of Felix Houphouët-Boigny University (Côte d'Ivoire) as a voucher specimen was deposited (*Holarrhena floribunda* (G. DON) DURAND AND SCHINZ (Apocynaceae) n° 13240).

### Animal material

Animals were selected as per the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines no. 408 [11]. Healthy young and nulliparous, non-pregnant Wistar rats weighing from 90-127 mg of 6-8 weeks old. The animals were bred in the animal house of the Center for Ecological Research (CRE) of the University of Nangui Abrogoua (Côte d'Ivoire). The animals are randomly selected, marked to permit individual identification, and kept in plastic cages with wood chips renewed every three days

### Methods

#### Preparation of ethanol extract

*Holarrhena floribunda* leaves were dried out of the sun at room temperature of  $27 \pm 2$  ° C. The dried leaves were pulverized using a mill (RETSCH S M ® 100). The ethanol extract of *H. floribunda* is obtained considering the traditionally method used by traditional healers to treat diabetes. Hundred grams of the previously obtained powder were dissolved in two liters of ethanol 80 %. The solution was homogenized with a magnetic stirrer (STURART SB 162) for 48 hours and filtered on cotton wool and on whatmann n° 1 paper. The residue was re-extracted with ethanol 80 % twice for 6 hours. The solution is also filtered on cotton wool and whatmann n° 1 paper. The filtrates were put together and concentrated using a rotary evaporator (Buchi R110/NKE 6540/2) at reduced pressure at 45 ° C and then dried in an oven (Retch type SM 100, Haan, Germany) at 45° C for 48 hours. This extraction obtained a yield of 13.01%.

#### Preparation of the ethyl acetate extract

With a separation final, Ten (10) g of the ethanol extract was dissolved into 100 mL of distilled water. 100 mL of hexane was added to the preparation to obtain 200 mL of a solution of water-hexane in the ratio 1:1. After shaking and then decanting the solution, the

aqueous layer was collected. The mixture was further successively partitioned (1:1, v/v) by dichloromethane and ethyl acetate. Solvents were evaporated using a rotary evaporator (Buchi Rotavapour) at 45 ° C and extracts were dried using an oven. The powder obtained was the ethyl acetate extract from the leaves of *Holarrhena floribunda*. The yield of the ethyl acetate fraction from the 10 g of ethanol extract was 15.23 %.

### Subchronic Toxicity Test

Subchronic toxicity tests were conducted in accordance with OECD Guideline No. 408 [11].

The rats were divided into four groups of 10 (male control, female control, male and female treated) and in four groups of 5 (male control, female control, male-treated and female-treated satellite) were force-fed for 90 days. Rats in Control and Control Satellite were administered by gavage with distilled water daily at 2 mL / 100 g b.w. Those of Treated and Treated Satellite groups received orally and daily doses of 1000 mg / kg b.w. of EAHf, the dose which induces the hypoglycaemic effect in hyperglycemic rats according to Gnanngoran *et al.*, [9].

### Collection of blood samples

Rats were fasted for 24 hours and then anesthetized with ether; 1 ml / 100 g of blood was taken from the retro-orbital sinus. Blood samples were taken a day before the administration of either the extract or distilled water to rats and every week during the first month and every month from the second month until the end of the Experiments. The whole collected blood in dry tubes was centrifuged immediately in a JOUAN BR4i centrifuge (Buckinghamshire, England) at 3000 rpm for 5 min to obtain a serum for the determination of biochemical parameters.

### Determination of serum hepatic markers

Hepatic enzymes activities, serum albumin, bilirubin (Total and Direct) and lipids levels were determined using a Cobas C311® HITACHI biochemistry automaton (Roche Diagnostics, France). The experiments were conducted using commercial kits (Roche Diagnostics, France) based on the manufacturer's instructions, as summarized in Serum glyceic level were determined by glucose meter (Tables 1). The LDL cholesterol level has been calculated according to Friedwald's formula [12].

$$\text{LDL-c} = \text{TC} - \text{HDL-c} - \text{TG}/2,17 \text{ (mmol/L)}$$

**Table 1:** Operating parameters for the quantitative determination of serum hepatic markers

Hepatic biochemical markers	Methods	Waves length (nm)
albumin	turbidimetric	570
Total bilirubin	Colorimetric (formation of azobilirubine)	546
Direct bilirubin	Colorimetric (formation of azobilirubine)	546
Glucose	Blood glucose meter (glucose dehydrogenase)	
Cholestérol total	Colorimetric (formation of phenolic chromogen)	505
Cholestérol HDL	Colorimetric in homogeneous phase	600

Triglycerides	Colorimetric (formation of phenolic chromogen)	505
Alanine aminotransferase (ALT)	Absorption kinetics (Disappearance of NADH	340
Aspartate aminotransferase (AST)	Absorption kinetics (Disappearance of NADH	340
Lactate dehydrogenase (LDH)	Absorption kinetics (Disappearance of NADH)	340
Alkaline phosphatase (ALP)	Colorimetric (Rate of p-nitrophenol formation)	450

### Hepatic tissue sampling and analysis of histological sections

At the end of the third month, the rats of the main test and those of the satellite batches at the end of the fourth month were euthanized by overdose with ether. Their livers were removed and attached to 10% formalin. On the cores removed from the formalin, longitudinal sections of 5 mm of tissue pieces were taken using scalpel blade and then deposited in cassettes. These cassettes were introduced into an automaton (Technicon® Tissue Tek) where the tissue pieces were respectively subjected to fixing baths with 10% formaldehyde, dehydration baths with 70% and 90% ethanol, Lightening with toluene and impregnation baths with paraffin using microtome (Microme® GmbH (walldorf, Germany), cuts of 3 µm thickness were made. The sections obtained were mounted on slides and then stained with hematoxylin-eosin. Blade readings were made using a binocular optical microscope (Motic®); and the photos were taken using an electronic photography device (Am Scope® FMA050, 8.0 PIXEL) adapted to the objective of the microscope.

### Statistical Analysis

The results are expressed as averages followed by the standard error

on the mean (M ± ESM). The repeated variance analysis (ANOVA) was used to compare the administered dose (Control/ Test) effects and the treatment time effects. The tests were supplemented by the Bonferroni post-Hoc test. The differences were considered significant for a probability level p < 0.05. All these analyzes were carried out using the GraphPad prism Version 5.0 software

## RESULTS

### Biochemical study

#### Effects of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on serum levels some metabolites of rat liver

The ethyl acetate extract of *Holarrhena floribunda* leaves did not cause significant effects on the serum albumin, total bilirubin and total bilirubin levels of the rats in the treated group compared to the control rats in both sexes gender. In regards to blood glucose, significant decreases (p < 0.05) of (-12.53%) to J7, and (-11.55%) to J60 in male rats and (-12.97 %) at day 7, of, (-17.62%) at day 28 and (-17.26%) at day 60 in female rats were observed (Table 2)

**Table 2:** Effects of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on serum levels some metabolites of rat liver

Parameters	Groups	Day0	Day7	Day14	Day21	Day28	Day60	Day90	Day120
<b>Males</b>									
Albumin	Control	31,750 ± 0,69	34,440 ± 1,20	32,380 ± 1,35	34,140 ± 1,00	35,240 ± 0,71	34,960 ± 1,18	36,880 ± 0,96	32,400 ± 1,39
	Treated	33,270 ± 0,86	35,030 ± 1,52	36,100 ± 0,96	36,870 ± 1,62	39,290 ± 1,28	34,180 ± 0,91	36,070 ± 0,88	36,180 ± 1,15
Direct bilirubin	Control	0,303 ± 0,03	0,290 ± 0,02	0,297 ± 0,02	0,323 ± 0,02	0,292 ± 0,03	0,311 ± 0,02	0,301 ± 0,03	0,302 ± 0,03
	Treated	0,308 ± 0,03	0,283 ± 0,02	0,278 ± 0,03	0,281 ± 0,03	0,273 ± 0,03	0,290 ± 0,03	0,263 ± 0,03	0,261 ± 0,03
Total bilirubin	Control	0,8678 ± 0,04	1,134 ± 0,09	0,853 ± 0,06	1,136 ± 0,09	0,955 ± 0,11	0,974 ± 0,11	0,956 ± 0,11	0,802 ± 0,05
	Treated	0,9078 ± 0,02	0,955 ± 0,11	0,980 ± 0,10	0,955 ± 0,11	1,183 ± 0,18	1,141 ± 0,18	1,184 ± 0,18	0,970 ± 0,10
Glucose	Control	107,400 ± 3,40	111,700 ± 3,47	113,300 ± 5,37	106,300 ± 5,17	106,100 ± 5,11	112,500 ± 2,64	119,400 ± 5,96	115,800 ± 5,05
	Treated	110,100 ± 4,42	97,700 ± 1,51 (*)	107,100 ± 3,70	96,900 ± 3,72	107,100 ± 2,19	99,500 ± 5,07 (*)	111,800 ± 3,54	108,600 ± 3,59
<b>Females</b>									
Albumin	Control	34,680 ± 0,69	35,410 ± 1,11	35,960 ± 1,11	37,790 ± 1,83	37,200 ± 1,02	36,880 ± 1,05	33,210 ± 0,80	36,710 ± 1,00
	Treated	33,620 ± 0,71	36,730 ± 1,25	35,880 ± 1,59	36,800 ± 0,96	35,770 ± 1,40	38,500 ± 1,17	34,220 ± 0,61	33,850 ± 1,68
Direct bilirubin	Control	0,246 ± 0,03	0,263 ± 0,02	0,259 ± 0,03	0,259 ± 0,01	0,257 ± 0,03	0,254 ± 0,02	0,271 ± 0,03	0,276 ± 0,03
	Treated	0,267 ± 0,02	0,233 ± 0,03	0,248 ± 0,03	0,248 ± 0,03	0,276 ± 0,02	0,244 ± 0,03	0,227 ± 0,02	0,302 ± 0,03
Total bilirubin	Control	1,227 ± 0,11	1,094 ± 0,15	1,137 ± 0,15	1,1093 ± 0,14	1,145 ± 0,12	1,146 ± 0,11	1,232 ± 0,14	1,0951 ± 0,12
	Treated	1,258 ± 0,14	1,213 ± 0,13	1,301 ± 0,14	1,145 ± 0,12	1,280 ± 0,12	1,183 ± 0,10	1,326 ± 0,13	1,178 ± 0,16
Glucose	Control	114,200 ± 5,74	114,100 ± 4,92	117,800 ± 4,10	113,900 ± 3,50	121,400 ± 4,61	114,700 ± 3,61	105,900 ± 3,58	114,200 ± 2,74
	Treated	111,700 ± 4,92	99,300 ± 2,03 (*)	105,100 ± 3,12	102,300 ± 3,15	100,000 ± 2,91 (**)	94,900 ± 1,76 (**)	102,500 ± 4,12	112,400 ± 2,74

Values are means ± SEM. Comparisons are made between the control and the corresponding treated group according to gender. The asterisk indicate significant differences (\*) = P < 0.05; (\*\*) = p < 0.01; (\*\*\*) = p < 0.001

**Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on the serum lipids levels of rats.**

Serum triglyceride levels in treated rats in both sexes compared to control rats were not significantly changed. The extract significantly decreased the serum total cholesterol level by (-16.56%) on day 14 in male rats and (-8.99%) in female rats compared to their counterparts

in control groups. At the level of cholesterol. LDL, a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of (-21.76%) compared to the rats of the control group was observed in the female rats on day 14. The extract also significantly increased (+ 12.98%) and (+ 10.63%) at day 28 the HDL cholesterol level respectively in the rats and rats treated with respect to their counterparts in the batches. controls (Table 3).

**Table 3:** Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on the serum lipids levels of rats

Parameters	Groups	Day0	Day7	Day14	Day21	Day28	Day60	Day90	Day120
<b>Mâles</b>									
HDL-c	Control	0,540 ± 0,01	0,565 ± 0,02	0,563 ± 0,01	0,494 ± 0,02	0,523 ± 0,03	0,524 ± 0,01	0,547 ± 0,01	0,542 ± 0,01
	Treated	0,513 ± 0,02	0,523 ± 0,01	0,521 ± 0,00	0,542 ± 0,02	0,592 ± 0,01 (*)	0,542 ± 0,01	0,553 ± 0,01	0,523 ± 0,01
TC	Control	0,986 ± 0,02	1,038 ± 0,04	1,123 ± 0,01	0,977 ± 0,03	0,950 ± 0,02	0,923 ± 0,02	0,986 ± 0,02	0,970 ± 0,04
	Treated	0,943 ± 0,03	0,916 ± 0,03	0,936 ± 0,03 (**)	0,958 ± 0,04	0,974 ± 0,02	1,041 ± 0,02	1,076 ± 0,02	1,020 ± 0,05
LDL-c	Control	0,173 ± 0,03	0,155 ± 0,02	0,185 ± 0,03	0,195 ± 0,03	0,164 ± 0,02	0,136 ± 0,02	0,143 ± 0,02	0,167 ± 0,04
	Treated	0,166 ± 0,03	0,138 ± 0,03	0,159 ± 0,03	0,145 ± 0,03	0,129 ± 0,02	0,160 ± 0,02	0,183 ± 0,02	0,195 ± 0,03
Triglycérides	Control	0,590 ± 0,05	0,688 ± 0,05	0,812 ± 0,07	0,622 ± 0,08	0,568 ± 0,02	0,567 ± 0,01	0,588 ± 0,00	0,566 ± 0,05
	Treated	0,571 ± 0,06	0,551 ± 0,07	0,554 ± 0,00	0,586 ± 0,02	0,549 ± 0,06	0,731 ± 0,08	0,708 ± 0,10	0,651 ± 0,14
<b>Females</b>									
HDL-c	Control	0,552 ± 0,01	0,541 ± 0,00	0,559 ± 0,01	0,562 ± 0,01	0,554 ± 0,01	0,543 ± 0,00	0,551 ± 0,00	0,567 ± 0,01
	Treated	0,533 ± 0,00	0,563 ± 0,01	0,577 ± 0,01	0,557 ± 0,01	0,614 ± 0,01 (*)	0,562 ± 0,01	0,553 ± 0,01	0,566 ± 0,01
TC	Control	0,996 ± 0,02	1,020 ± 0,03	1,089 ± 0,01	1,026 ± 0,01	1,017 ± 0,03	0,985 ± 0,02	1,0166 ± 0,02	1,0214 ± 0,03
	Treated	1,003 ± 0,02	1,026 ± 0,02	0,992 ± 0,01 (*)	1,027 ± 0,02	1,030 ± 0,02	1,021 ± 0,02	1,076 ± 0,02	1,046 ± 0,01
LDL-c	Control	0,128 ± 0,02	0,136 ± 0,02	0,169 ± 0,01	0,125 ± 0,02	0,129 ± 0,02	0,132 ± 0,02	0,147 ± 0,02	0,135 ± 0,03
	Treated	0,137 ± 0,01	0,115 ± 0,02	0,132 ± 0,00 (*)	0,129 ± 0,01	0,107 ± 0,02	0,126 ± 0,02	0,138 ± 0,02	0,130 ± 0,01
Triglycérides	Control	0,683 ± 0,01	0,682 ± 0,01	0,693 ± 0,01	0,690 ± 0,01	0,678 ± 0,01	0,670 ± 0,01	0,688 ± 0,01	0,692 ± 0,01
	Treated	0,675 ± 0,01	0,710 ± 0,01	0,710 ± 0,01	0,695 ± 0,01	0,755 ± 0,01	0,718 ± 0,00	0,702 ± 0,01	0,701 ± 0,02

Values are means ± SEM. Comparisons are made between the control and the corresponding treated group according to gender. The asterisk indicate significant differences (\*) =  $P < 0.05$ ; (\*\*) =  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) =  $p < 0.001$

**Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on serum liver activities some enzymes of rat liver**

In this study, serum ALT and LDH activities in rats treated in both

sexes were not significantly different from controls in rats. The serum activity of AST and ALP respectively indicate a significant decrease in serum AST activity in treated rats and an increase in those of ALP in treated male rats (Table 4)

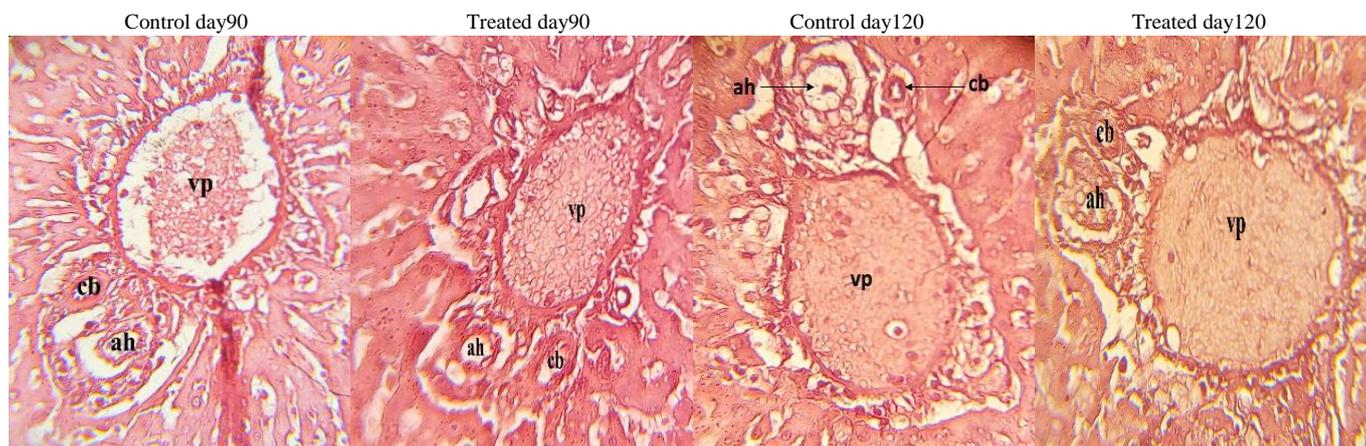
**Table 4:** Effect of ethyl acetate extract of leaves of *Holarrhena floribunda* on serum liver activities some enzymes of rat liver

Parameters	Groups	Day0	Day7	Day14	Day21	Day28	Day60	Day90	Day120
<b>Mâles</b>									
ALT	Control	27,936 ± 3,10	29,300 ± 2,69	36,500 ± 5,48	36,100 ± 1,16	29,800 ± 3,08	26,900 ± 3,71	27,200 ± 1,97	26,900 ± 3,67
	Treated	30,236 ± 2,70	31,660 ± 2,80	29,100 ± 2,23	34,771 ± 3,25	31,471 ± 3,01	24,660 ± 3,26	28,200 ± 2,20	23,799 ± 3,39
AST	Control	43,900 ± 4,44	46,300 ± 3,10	53,200 ± 3,53	51,300 ± 6,54	43,400 ± 2,09	47,800 ± 5,87	56,300 ± 4,27	44,800 ± 4,94
	Treated	45,800 ± 5,07	42,200 ± 6,04	56,200 ± 3,55	49,600 ± 4,62	59,300 ± 3,16	43,100 ± 4,98	48,400 ± 4,19	55,300 ± 4,13
LDH	Control	469,000 ± 26,27	596,900 ± 44,56	596,700 ± 50,28	549,900 ± 37,29	628,100 ± 43,58	542,400 ± 36,21	562,700 ± 26,57	546,700 ± 46,11
	Treated	494,100 ± 32,47	649,500 ± 46,41	644,300 ± 45,70	584,400 ± 36,27	683,200 ± 46,45	681,400 ± 47,21	597,100 ± 58,07	538,300 ± 31,26
PAL	Control	428,600 ± 15,25	406,300 ± 20,94	434,700 ± 12,16	388,700 ± 21,26	407,200 ± 13,90	337,500 ± 14,88	293,100 ± 18,05	226,300 ± 14,36
	Treated	436,900 ± 10,27	423,900 ± 13,66	406,300 ± 20,94	454,700 ± 8,45 (*)	434,700 ± 12,16	369,100 ± 6,90	305,100 ± 18,15	208,700 ± 15,76
<b>Femelles</b>									
ALT	Control	18,58 ± 2,84	24,900 ± 2,29	25,100 ± 2,46	20,100 ± 3,02	26,000 ± 1,67	23,100 ± 3,47	20,300 ± 3,84	27,498 ± 1,02
	Treated	23,116 ± 2,85	23,740 ± 3,06	20,800 ± 2,65	22,965 ± 2,61	25,510 ± 3,07	22,740 ± 3,72	25,100 ± 2,45	26,825 ± 2,13
AST	Control	39,000 ± 4,41	40,100 ± 1,82	40,500 ± 2,66	39,700 ± 4,05	39,600 ± 1,55	40,300 ± 3,91	40,600 ± 2,29	39,800 ± 3,06

	Treated	39,900 ± 2,21	42,100 ± 2,90	41,900 ± 3,99	41,800 ± 2,18	50,700 ± 1,42 (*)	41,600 ± 2,71	41,800 ± 1,32	41,400 ± 1,97
LDH	Control	440,200 ± 49,72	450,200 ± 19,08	466,300 ± 29,48	473,500 ± 29,92	413,000 ± 32,73	524,100 ± 47,98	488,500 ± 45,54	540,300 ± 48,66
	Treated	397,300 ± 23,76	561,500 ± 39,76	552,800 ± 41,02	490,500 ± 23,26	547,000 ± 42,57	529,400 ± 44,43	585,800 ± 32,87	455,400 ± 50,58
PAL	Control	388,800 ± 13,96	404,900 ± 7,95	363,200 ± 14,94	397,400 ± 26,61	343,600 ± 19,46	257,000 ± 12,06	218,200 ± 4,02	209,900 ± 9,86
	Treated	383,900 ± 13,44	386,000 ± 14,01	404,900 ± 7,95	363,200 ± 14,94	347,200 ± 15,66	261,800 ± 12,69	214,200 ± 2,76	252,500 ± 19,30

Values are means ± SEM. Comparisons are made between the control and the corresponding treated group according to gender. The asterisk indicate significant differences (\*) = P < 0.05; (\*\*) = p < 0.01; (\*\*\*) = p < 0.001

### Histological study of rat liver

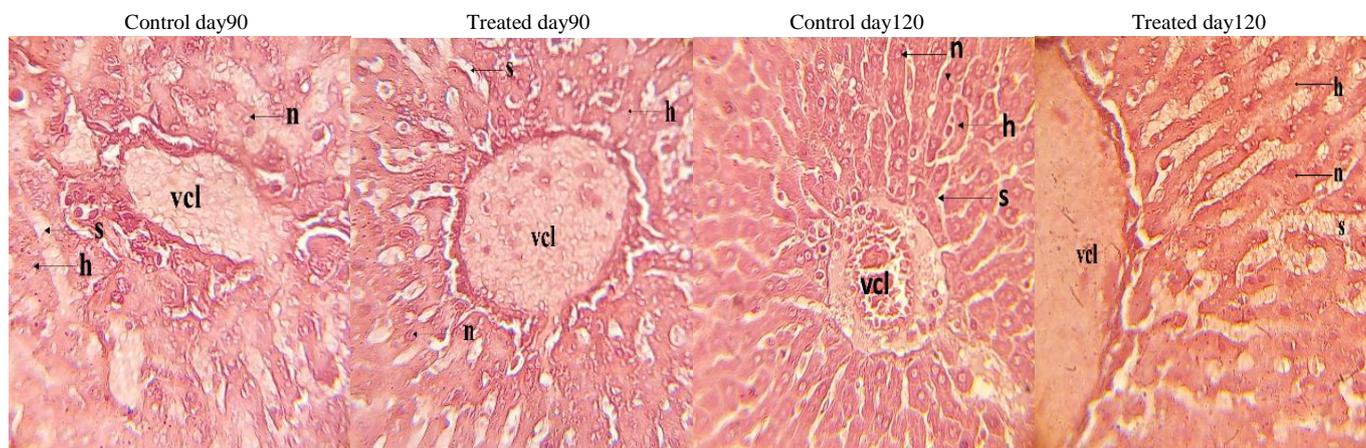


hematoxylin-eosin stain; Magnification: x400

The images show a representative example of the batches of animals after 90 and 120 days of study

vp = portal vein; ah = hepatic artery; cb = biliary canal

**Figure 1:** Photomicrograph of the Hepatic parenchyma of rats showing portal space at different dates



hematoxylin-eosin stain; Magnification: x400

The images show a representative example of the batches of animals after 90 and 120 days of study

Vcl= centrilobular vein; n = nucleus; h = hepatocyte; s = sinusoids

**Figure 2:** Photomicrograph of Hepatic parenchyma of rats showing the centrilobular vein at different dates

Figures present photomicrograph of portal space (**fig 1**) and centrilobular vein (**fig 2**) of liver of rat in control and treated group at different dates. Compared to the control group, the sections of the rats in the test group show normal structures. The integrity of the liver tissue seems to be preserved. The liver cells, the blood vessels and the bile duct are not damaged, there is an absence of white vacuoles

### DISCUSSION

The liver is the main organ that is able to convert drugs into forms that can be easily removed from the body. A wide range of adverse effects of many drugs on liver function and integrity has been documented. These reactions range from mild transient changes to complete liver

destruction. In this work, the impact on the liver of the ethyl acetate extract of *Holarrhena floribunda* used in the treatment of diabetes was evaluated by assaying some markers of liver integrity and functional.

In terms of liver integrity, ASAT, ALT, PAL and LDH are serum markers of the liver. The increase in serum activity of these enzymes is evidence of alterations or lesions in liver cells [13]. In this study, serum ALT and LDH activities in rats treated in both sexes were not significantly different from controls in rats. This assumes that the extract of *Holarrhena floribunda* did not cause membrane lysis of the liver cells that could allow the escape of these enzymes into the blood. Assay results for ASAT and PAL respectively indicate a significant decrease in ASAT serum activity in treated rats and an increase in

PAL in treated male rats. The reduction in serum activity of ASAT obtained in this study is identical to that observed by [14] and [15] respectively with the aqueous extracts of the leaves of *Artemisia afra* and *Passiflora foetida* Linn. in the rats. It could reflect a hepatoprotective effect of *Holarrhena floribunda* extract in these rats. On the other hand, the increase of the serum activities of the PAL is similar to that obtained by Kamo *et al.* (2015) [16] in the study of hepatic biotolerance of the aqueous-alcoholic extract of *Terminalia mantaly* H. Perrier in rats. It could be explained either by an obstruction of the intrahepatic bile ducts (inducing a cholestasis), or by a disorganization of the hepatic architecture [17]. In this case, the action of *Holarrhena floribunda* extract could result in a possible toxic effect on the hepatobiliary pathway. However, the average value of serum activities of the PAL observed in treated male rats is less than twice the value of activities obtained in the control rats and also lower than the reference values published by [18]. In addition, the microscopic study of the tissue sections of the liver revealed that the portal and centrolobular spaces observed in the present study kept their normal anatomical structure in treated groups as in the control groups. In fact, the portal spaces each contain a branch of the portal vein, the hepatic artery and an unobstructed bile duct. No degeneration in centrolobular spaces, nor steatosis or necrosis was observed as suggested by [19]. As a result, the increase in ALP activities observed in this study, described as moderate increases [20], can not be attributed to liver injury.

Functionally, serum albumin, bilirubin (total and direct), and triglyceride levels in treated rats in both sexes compared to control rats were not significantly modified. The extract, however, significantly decreased blood glucose, serum total cholesterol, and LDL cholesterol, and increased HDL cholesterol levels in both sexes compared to rats in the corresponding control groups. The reduction in blood glucose observed could be due to either the secretion of insulin, the potentiation of the action of insulin on peripheral organs, or the inhibition of glucose uptake at the level of the intestine with *Holarrhena floribunda* extract. These observations support the results of [21] and [9] who respectively showed the inhibition of alpha amylase activity and a significant decrease in blood glucose with ethanolic and acetic extracts of leaves of *Holarrhena floribunda*. As for the decrease in serum levels of total cholesterol, and LDL-c and the increase in HDL-c levels obtained in this study, they could suggest an implication of *Holarrhena floribunda* extract in the transformation of cholesterol into acids. bile ducts, LDL reduction and hepatic synthesis of HDL lipoproteins, as reported by [22]. Since in clinical practice, effective and intensive lowering of CT, TG and LDL levels and increased cholesterol levels are important in order to reduce and prevent [23] coronary heart disease, the effects of the extract of *Holarrhena floribunda* on the serum lipids obtained in this study testify to the protective role of this extract in the occurrence of cardiosclerotic diseases.

## CONCLUSION

After oral administration for 90 days at a dose of 1000 mg / kg body weight, the ethyl acetate extract of the leaves of *Holarrhena floribunda* did not result in functional disturbances or hepatic damage in rats. However, biochemical and histological studies of other organs would be necessary in order to provide additional information to those already obtained in this study.

## Acknowledgment

We would like to express our sincere thanks to the management of the Ecology Research Center for accepting that our works will conduct the premises of its structure. We also wish to express our gratitude to the Management of the Pasteur Institute of Abidjan Cocody for having welcomed us to the Department of Clinical and Fundamental Biochemistry for the determination of biochemical parameters.

## REFERENCES

1. Organisation mondiale de la santé (OMS). Rapport sur la médecine traditionnelle et ses implications éthiques. Paris, France 2010.
2. Organisation mondiale de la santé (OMS). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. Genève, Suisse 2013.
3. Schmelzer, GH. *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand & Schinz. In Schmelzer G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands 2006.
4. Guissou JP, Millogo KH, Kaboré IZ. Etude comparative de l'activité pharmacologique d'*Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) et *Holarrhena floribunda* G. Don (Apocynaceae) vis à vis des amibes non pathogènes du gène amoeba proteus. Méd. Afr. 1992; 39(5):59-363.
5. Balé B, Tamboura H, Pellicer R, Zongo D, Traoré A, Ouédraogo L, *et al.* Effets oestrogéniques du macéré aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. And Schinz chez la rate ovariectomisée. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 2006; 10(3):61-64.
6. Badmus JA, Odunola OA, Obuotor EM, Oyedapo OO. Phytochemicals and in vitro antioxidant potentials of defatted methanolic extract of *Holarrhena floribunda* leaves. Afr. J. Biotech. 2010; 9(3):34-346.
7. Leboeuf M, Cave A, Goutarel R. Steroid Alkaloids. Presence of Progesterone in the Leaves of *Holarrhena Floribunda* (G. Don) Durand. And Schinz. Hebd. Seances. Acad. Sci. 1964; 259:3401-3403.
8. Bennett RD, Heftmann E. Progesterone: biosynthesis from pregnenolone in *Holarrhena floribunda*. Science. 1965; 149(3684):652-3.
9. Nngoran BN, N'guessan BB, Amoateng P, Dosso K, Yapo A, Ehilé EE. Hyperglycaemic activity of ethanolic leaf extract and fraction of *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand & Schinz Apocynaceae. Journal of Medical and Biomedical Sciences 2012; 1(13):46-54.
10. Koudou DD, Tra-Bi IO, Oussou JB, Kone M, Yapo AP, Djaman AJ. Cardiac Tolerance of An Ethyl Acetate Extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand and Schinz Leaves in Wistar Rats. Sch. Acad. J. Pharm. 2017; 6(6):229-235.
11. Organisation de Coopération et Développement Economique (OCDE). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: Toxicité orale à dose répétées-rongeurs: 90 jours. OCDE 408, 1998.
12. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972; 18:499-502.
13. Wallace AD, Meyer SA. Hepatotoxicity. In: A Textbook of Modern toxicology. 4<sup>th</sup>ed. John Wiley & Sons. Inc Hoboken, New Jersey, 2010; 277-290.
14. Mukinda JT, Syce JA. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. J. Ehtnopharmacol. 2007; 112(1):138-144.
15. Gomé BM, Koffi K, Touré A, Traoré F. Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris. Int. J. Biol. Chem. Sci, 2011; 5(5):1777-1789.
16. Kamo IL, Tra Bi IO, Gnahoue G, Kra AK, Djaman AJ, N'guessan JD. Hepatic tolerance study of hydro-alcoholic extract of *Terminalia mantaly* H. Perrier (Combretaceae) in rats. The Journal of Phytopharmacology. 2015; 4(3):164-171.
17. Akhtar A, Deshmukh AA, Raut CG, Somkuwar AP, Bhagat SS. Pallethrin induced serum biochemical changes in Wistar rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2012; 102:160-168.
18. Boussarie D. Consultation des petits mammifères de compagnie. *Maisons- Alfort: Editions du Point Vétérinaire* 2003; 218 p.
19. Pariente alexandre. Cytologie hépatique (augmentation des aminotransférases chez l'adulte. *Hépatogastro* 2013; 20:630-639.
20. Coatmeur O, Latournerie M, Hillon P. Thérapeutique chez les patients atteints de maladie du foie. *Médecine thérapeutique*, 2007; 10(1):34-8.

21. Funke I, Melzig MF. Traditionally used plants in diabetes therapy phytotherapeutics as inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006; 16(1):1-5.
22. Cuihua J, Qingqing W, YuJian W, Nan Y, Zhengfeng W, Yonglan M, Zi L, *et al*. Cholesterol-lowering effects and potential mechanisms of different polar extracts from *Cyclocarya paliurus* leave in hyperlipidemic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 176:17-26.
23. Mahdy KA, Wonnerth A, Huber K, Wojta J. Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol – current therapies and future opportunities. *British Journal of Pharmacology*. 2012; 167:1177-1194.

**HOW TO CITE THIS ARTICLE**

Koudou DD, Tra-Bi IO, Kouadio YE, Yapo AP, Djaman AJ. Hepatic tolerance of an ethyl acetate extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand and Schinz leaves in *Wistar* Rats. *J Phytopharmacol* 2017; 6(6):322-328.

## RESUME

*Holarrhena floribunda* est une plante utilisée dans le traitement traditionnel du diabète en Côte d'Ivoire. Afin de vérifier son innocuité, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles à la dose de 1000 mg/kg de poids corporel a été administré quotidiennement par voie orale sur une période de 90 jours aux rats *wistar* du lot essai. Un lot satellite a été constitué afin d'apprécier la persistance ou la réversibilité d'éventuels effets qui apparaîtraient après l'arrêt du traitement. Des prélèvements sanguins ont été effectués aux temps J<sub>0</sub> (avant le début de l'expérimentation), J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub>, J<sub>21</sub>, J<sub>28</sub>, J<sub>60</sub>, J<sub>90</sub> et J<sub>120</sub> (un mois après l'arrêt des gavages), afin de déterminer les effets de l'extrait sur les paramètres biochimiques sanguins. Au terme des 90 jours (pour les rats de l'étude principale) et 120 jours (pour les rats des lots satellites), une l'étude histologique a été réalisée sur le cœur, le foie et les reins. Ces différentes études ont montré d'une part que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* n'a pas modifié de manière significative les masses relatives des différents organes (cœur, foie et reins) et les taux sériques de l'acide urique, des bilirubines, des triglycérides, les activités enzymatiques de l'ALAT, LDH, et de l'indice d'athérogénicité des rats traités (dans les deux sexes) par rapport aux rats témoins aussi bien durant toute la période de traitement qu'un mois après l'arrêt de celui-ci. D'autre part, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* a provoqué des modifications significatives soit chez les rats mâles pour les paramètres tels que : le chlore, le sodium et la PAL ; soit chez les rats femelles pour la créatinine le calcium et l'ASAT soit dans les deux sexes pour la glycémie, le cholestérol LDL, le cholestérol HDL et le cholestérol Total ou par rapport au temps pour la CPK. Cependant, ces variations étaient modérées et les valeurs obtenues sont restées dans les limites de leur valeur standard. Par ailleurs, les coupes histologiques n'ont pas révélé de lésions au niveau des trois organes étudiés à savoir le cœur, le foie et les reins. En définitive, la dose de 1000 mg/kg de poids corporel de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* a été bien tolérée par l'organisme des rats après une administration par gavage de 90 jours.

Mots clés : *Holarrhena floribunda*, innocuité, paramètres biochimiques, histopathologie, rat *wistar*

## ABSTRACT

*Holarrhena floribunda* is a medicinal plant used in traditional treatment of diabetes in Côte d'Ivoire. In order to verify its safety, the ethyl acetate extract of its leaves at a dose of 1000 mg / kg of body weight was administered daily over a period of 90 days to *wistar* rats of the test groups. A satellite group was established to assess the persistence or reversibility of any effects that would appear after discontinuation of treatment. Blood samples were taken on (day 0) (D<sub>0</sub>) (before the start of the experiment), D<sub>7</sub>, D<sub>14</sub>, D<sub>21</sub>, D<sub>28</sub>, D<sub>60</sub>, D<sub>90</sub> and D<sub>120</sub> (one month after stopping the Treatment) to determine the effects of the extract on serum biochemical parameters. At the end of the 90 days (for the rats of the main study) and 120 days (for the rats of the satellite batches), a histological study was carried out on rats heart, liver and kidneys. These different studies have shown that the ethyl acetate extract from the leaves of *H. floribunda* did not significantly change the relative body weight of the liver, kidneys and heart. Serum levels of uric acid, bilirubins, albumin, triglycerides, enzymatic activities of ALT, CPK, LDH and of the atherogenicity index of treated rats (in both sexes) were not affected compared to the control rats both throughout the treatment period and one month after stopping treatment. However, administration of the ethyl acetate extract of the leaves of *H. floribunda* caused significant changes in male rats for parameters such as chlorine, sodium potassium and PAL. In the female rats, the levels of creatinine, calcium and AST activity have been punctually modified. Otherwise, serum concentrations of total cholesterol, HDL, LDL, and blood glucose levels showed slight changes in both sexes. However, these changes were moderate and the values obtained remained within their standard values. In addition, histological sections did not show any lesions in the heart, liver and kidneys. Ultimately, the 1000 mg / kg body weight of the ethyl acetate extract of *H. floribunda* leaves was well tolerated by the rat organism after 90-day oral administration.

Key words: *Holarrhena floribunda*, safety, biochemical parameters, histopathology, *wistar* rat

## RESUME

*Holarrhena floribunda* est une plante utilisée dans le traitement traditionnel du diabète en Côte d'Ivoire. Afin de vérifier son innocuité, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles à la dose de 1000 mg/kg de poids corporel a été administré quotidiennement par voie orale sur une période de 90 jours aux rats *wistar* du lot essai. Un lot satellite a été constitué afin d'apprécier la persistance ou la réversibilité d'éventuels effets qui apparaîtraient après l'arrêt du traitement. Des prélèvements sanguins ont été effectués aux temps J<sub>0</sub> (avant le début de l'expérimentation), J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub>, J<sub>21</sub>, J<sub>28</sub>, J<sub>60</sub>, J<sub>90</sub> et J<sub>120</sub> (un mois après l'arrêt des gavages), afin de déterminer les effets de l'extrait sur les paramètres biochimiques sanguins. Au terme des 90 jours (pour les rats de l'étude principale) et 120 jours (pour les rats des lots satellites), une l'étude histologique a été réalisée sur le cœur, le foie et les reins. Ces différentes études ont montré d'une part que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* n'a pas modifié de manière significative les masses relatives des différents organes (cœur, foie et reins) et les taux sériques de l'acide urique, des bilirubines, des triglycérides, les activités enzymatiques de l'ALAT, LDH, et de l'indice d'athérogénicité des rats traités (dans les deux sexes) par rapport aux rats témoins aussi bien durant toute la période de traitement qu'un mois après l'arrêt de celui-ci. D'autre part, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H. floribunda* a provoqué des modifications significatives soit chez les rats mâles pour les paramètres tels que : le chlore, le sodium et la PAL ; soit chez les rats femelles pour la créatinine le calcium et l'ASAT soit dans les deux sexes pour la glycémie, le cholestérol LDL, le cholestérol HDL et le cholestérol Total ou par rapport au temps pour la CPK. Cependant, ces variations étaient modérées et les valeurs obtenues sont restées dans les limites de leur valeur standard. Par ailleurs, les coupes histologiques n'ont pas révélé de lésions au niveau des trois organes étudiés à savoir le cœur, le foie et les reins. En définitive, la dose de 1000 mg/kg de poids corporel de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *H.a floribunda* a été bien tolérée par l'organisme des rats après une administration par gavage de 90 jours.

Mots clés : *Holarrhena floribunda*, innocuité, paramètres biochimiques, histopathologie, rat *wistar*.

## ABSTRACT

*Holarrhena floribunda* is a medicinal plant used in traditional treatment of diabetes in Côte d'Ivoire. In order to verify its safety, the ethyl acetate extract of its leaves at a dose of 1000 mg / kg of body weight was administered daily over a period of 90 days to *wistar* rats of the test groups. A satellite group was established to assess the persistence or reversibility of any effects that would appear after discontinuation of treatment. Blood samples were taken on (day 0) (D<sub>0</sub>) (before the start of the experiment), D<sub>7</sub>, D<sub>14</sub>, D<sub>21</sub>, D<sub>28</sub>, D<sub>60</sub>, D<sub>90</sub> and D<sub>120</sub> (one month after stopping the Treatment) to determine the effects of the extract on serum biochemical parameters. At the end of the 90 days (for the rats of the main study) and 120 days (for the rats of the satellite batches), a histological study was carried out on rats heart, liver and kidneys. These different studies have shown that the ethyl acetate extract from the leaves of *H. floribunda* did not significantly change the relative body weight of the liver, kidneys and heart. Serum levels of uric acid, bilirubins, albumin, triglycerides, enzymatic activities of ALT, CPK, LDH and of the atherogenicity index of treated rats (in both sexes) were not affected compared to the control rats both throughout the treatment period and one month after stopping treatment. However, administration of the ethyl acetate extract of the leaves of *H. floribunda* caused significant changes in male rats for parameters such as chlorine, sodium potassium and PAL. In the female rats, the levels of creatinine, calcium and AST activity have been punctually modified. Otherwise, serum concentrations of total cholesterol, HDL, LDL, and blood glucose levels showed slight changes in both sexes. However, these changes were moderate and the values obtained remained within their standard values. In addition, histological sections did not show any lesions in the heart, liver and kidneys. Ultimately, the 1000 mg / kg body weight of the ethyl acetate extract of *H. floribunda* leaves was well tolerated by the rat organism after 90-day oral administration.

Key words: *Holarrhena floribunda*, safety, biochemical parameters, histopathology, *wistar* rat.