



**HAL**  
open science

**Effets antihypertenseurs des extraits de Terminalia  
superba Engler & Diels (Combretaceae): étude in vivo  
et in vitro**

Esther Ngo Lemba Tom

► **To cite this version:**

Esther Ngo Lemba Tom. Effets antihypertenseurs des extraits de Terminalia superba Engler & Diels (Combretaceae): étude in vivo et in vitro. Pharmacologie. Université de Franche-Comté; Université de Yaoundé. Faculté des Sciences, 2011. Français. NNT : 2011BESA3003 . tel-01227197

**HAL Id: tel-01227197**

**<https://theses.hal.science/tel-01227197>**

Submitted on 10 Nov 2015

**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.



# Effets antihypertenseurs des extraits de *Terminalia superba* Englers & Diels (Combretaceae): étude *in vivo* et *in vitro*

THESE en Co-tutelle

Présentée en vue de l'obtention du

Diplôme de Doctorat/Ph.D en Biologie Animale

Option: Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I  
et du

Diplôme de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé  
de l'Université de Franche-Comté  
Par

**NGO LEMBA TOM Esther**

(Mle 98T215/N 20708264)

Soutenue le 07 mars 2011 devant le jury composé de :

<b>M. Pierre KAMTCHOUING</b>	Professeur, Université de Yaoundé I	Président
<b>M. Alain BERTHELOT</b>	Professeur, Université de Franche-Comté	Examinateur
<b>M. Dieudonné NJAMEN</b>	Maître de Conférences, Université de Yaoundé I	Examinateur
<b>M. Théophile DIMO</b>	Maître de Conférences, Université de Yaoundé I	Rapporteur
<b>Mme Céline DEMOUGEOT</b>	Professeur, Université de Franche-Comté	Rapporteur
<b>Mme Corine GIRARD</b>	Maître de Conférences (HDR), Université de Franche-Comté	Rapporteur

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
ET PHYSIOLOGIE ANIMALES  
BP : 812 - Tél : (237) 22 22 56 59  
Fax: (237) 22 33 44 96  
CAMEROUN



FACULTE DES SCIENCES  
FACULTY OF SCIENCE

### ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés membres du jury de soutenance de **Thèse de Doctorat /Ph.D** de Biologie animale (option **Physiologie Animale**) de Madame **NGO LEMBA TOM Esther**, matricule **98T215**, soutenance autorisée par correspondance N° 11/259/UYI/VREPDTIC/AAC/DEPE/SPD du recteur de l'Université de Yaoundé I en date du 23 février 2011, attestons que les corrections exigées à la candidate lors de cette évaluation faite le **07 mars 2011**, ont réellement été effectuées et que le présent document peut être déposé sous sa forme actuelle.

En foi de quoi cette attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Yaoundé, le 24.3.11

Président du Jury

  
P. Koum Tchouin

Examineur

  
A. B. Tchouin

Le chef de département de BPA



24 MARS 2011

<b>UNIVERSITE DE YAOUNDE I</b> <b>FACULTE DES SCIENCES</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>The University of Yaoundé I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>	<b>LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF</b>	

**ANNEE ACADEMIQUE 2009/2010**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 15 NOVEMBRE 2010**

### ADMINISTRATION

**DOYEN** : BITJONG NDOMBOL, Professeur

**VICE-DOYEN / DPSAA** : NJOPWOUO Daniel, Professeur

**VICE-DOYEN / DSSE** : ABOSSOLO Monique, Chargé de cours

**VICE-DOYEN / DRC** : WOAFO Paul, Professeur

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., Chargé de Cours

<b>1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (31)</b>			
N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	ETOA François-Xavier	Professeur	<b>Chef de Département, CT/PM</b>
2	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Maître de Conférences	En poste
3	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	En poste
4	FEKAM BOYOM Fabrice	Maître de Conférences	En poste
5	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
6	MBACHAM Wilfried	Maître de Conférences	En poste
7	MOUNDIPA FEWOU Paul	Maître de Conférences	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Maître de Conférences	En poste
9	ATOGHO Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
10	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Chargé de Cours	<b>Chef DAF / FS</b>
11	BIGOGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
12	BIYITI BI ESSAM née AKAM ADA L. F.	Chargé de Cours	<i>CT MINRESI</i>
13	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
14	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
15	EVEHE BEBANDOUÉ Marie -Solange	Chargé de Cours	En poste
16	KANSCI Germain	Chargé de Cours	En poste
17	MINKA Samuel	Chargé de Cours	En poste
18	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	<i>CE SEP MINESUP</i>
19	NGONDI Judith Laure	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Chargé de Cours	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Chargé de Cours	En poste
22	NYEGUE Maximilienne	Chargé de Cours	En poste
23	RIWOM Sara Honorine	Chargé de Cours	En poste
24	SHANG Judith DZELAMBONG	Chargé de Cours	En poste
25	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
26	WAKAM née NANA Louise	Chargé de Cours	En poste
27	ACHU Merci BIH	Assistant	En poste
28	BODA Maurice	Assistant	En poste
29	BOUGNOM Blaise Pascal	Assistant	En poste
30	EFFA NNOMO Pierre	Assistant	En poste

31	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Assistant	En poste
----	---------------------------	-----------	----------

## 2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (B.P.A) (29)

1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	<b>Chef de Département</b>
2	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
3	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste
4	DIMO Théophile	Maître de Conférences	En Poste
5	FOMENA Abraham	Maître de Conférences	En Poste
6	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.S MINRESI</i>
7	NGASSAM Pierre	Maître de Conférences	En Poste
8	NJAMEN Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Maître de Conférences	En Poste
10	NOLA Moïse	Maître de Conférences	En poste
11	TAN Paul	Maître de Conférences	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis	Maître de Conférences	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
13	BAPFUBUSA Benoît Alain	Chargé de Cours	En Poste
14	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
15	DJIETO Lordon Champlain	Chargé de Cours	En poste
16	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Chargé de Cours	En poste
17	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
18	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Chargé de Cours	<i>MINSANTE</i>
19	FOTO MENBOHAN Samuel	Chargé de Cours	<i>CT2 MIN. ENERGIE</i>
20	MEGNEKOU Rosette	Chargé de Cours	En poste
21	RAKOTONIRINA Silvére	Chargé de Cours	En poste
22	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Chargé de Cours	En poste
23	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Assistant	En poste
24	ALENE Désirée Chantal	Assistant	En poste
25	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Assistant	En poste
26	KEMKA Norbert	Assistant	En poste
27	KEKEUNOU Sévilor	Assistant	En poste
28	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Assistant	En poste
29	TOMBI Jeannette	Assistant	En poste

## 3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES (B. P. V.) (24)

1	AMOUGOU AKOA	Professeur	<b>Chef de Département</b>
2	MOSSEBO Dominique Claude	Maître de Conférences	En poste
3	NKONGMENECK Bernard Aloys.	Maître de Conférences	En poste
4	YOUMBI Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
5	AMBANG Zachée	Chargé de Cours	En poste
6	BELL Joseph Martin	Chargé de Cours	En poste
7	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
8	BOYOMO ONANA	Chargé de Cours	En poste
9	DJOCGOUE Pierre François	Chargé de Cours	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Chargé de Cours	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain.	Chargé de Cours	<i>CEA MINESUP</i>
12	MBOLO Marie.	Chargé de Cours	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Chargé de Cours	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
15	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	<i>Expert national./UNESCO</i>
16	NWAGA Dieudonné M.	Chargé de Cours	En poste
17	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste

18	ZAPFACK Louis	Chargé de Cours	En poste
19	ANGONI Hyacinthe	Assistant	En poste
20	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Assistant	En poste
21	MALLA Armand William	Assistant	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Assistant	En poste
23	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Assistant	En poste
24	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy Léonard	Assistant	En poste

#### 4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (28)

1	NEMBA Robert	Professeur	En poste
2	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<b>Chef de Département</b> <i>Directeur MINESUP</i>
3	NJOPWOUO Daniel	Professeur	<b>Vice-Doyen / DPSAA</b>
4	NOAH NGAMVENG Joseph	Professeur	En poste
5	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
6	GHOGOMU Paul MINGO	Maître de Conférences	<i>Directeur Cabinet PM</i>
	KETCHA MBADCAM Joseph	Maître de Conférences	En poste
8	MELO née CHINJE Uphie F.	Maître de Conférences	<i>Directeur Mipromalo</i>
9	NDIFON Peter TEKE	Maître de Conférences	<i>IS1 MINRESI</i>
10	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
11	BABALE née DJAM DOUDOU	Chargé de Cours	<i>Chargée mission P.R.</i>
12	AGWARA ONDOH Moïse	Chargé de Cours	En poste
13	AVOM Jérôme	Chargé de Cours	<i>Directeur au IAI Gabon</i>
14	BAIZOUMI ZOUA	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINTOUR</i>
15	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
16	GWET Simon - Pierre	Chargé de Cours	En poste
17	KONG SAKEO	Chargé de Cours	C. M. au P. M.
18	LAMINSI Samuel	Chargé de Cours	En poste
19	NANSEU Charles Péguy	Chargé de Cours	En poste
20	NDIKONTAR Maurice KOR	Chargé de Cours	En poste
21	NENWA Justin	Chargé de Cours	En poste
22	NGOMO Horace MANGA	Chargé de Cours	<i>C. T. au P.M.</i>
23	SIGNING Pierre	Chargé de Cours	En poste
24	EMADACK Alphonse	Assistant	En poste
25	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude	Assistant	En poste
26	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Assistant	En poste
27	NJOYA Dayirou	Assistant	En poste
28	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Assistant	En poste

#### 5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (32)

1	DONGO Etienne	Professeur	En poste
2	FON KIMBU Samuel	Professeur	En poste
3	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	<i>Chef de dépt FMBS</i>
5	NKENGFACK Augustin Ephraïm	Professeur	<b>Chef de Département</b>
6	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Chef Cellule MINESUP</i>
7	TSAMO Etienne	Professeur	En poste
8	WANDJI Jean	Professeur	En poste
9	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>VD/UB</i>
10	KAPNANG Henriette	Maître de Conférences	En poste

11	MBAFOR Joseph	Maître de Conférences	En poste
12	NGOUELA Silvère Augustin	Maître de Conférences	En poste
13	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
14	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Maître de Conférences	<i>Chef Cellule MINESUP</i>
15	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
16	Alex de Théodore ATCHADE	Chargé de Cours	En poste
17	KEUMEDJIO Félix	Chargé de Cours	En poste
18	KEUMOGNE Marguerite	Chargé de Cours	En poste
19	KOUAM Jacques	Chargé de Cours	En poste
20	MESSANGA BERNARD BLAISE	Chargé de Cours	En poste
21	MBAZOA née DJAMA Céline	Chargé de Cours	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Chargé de Cours	<i>Chef Service Rect. UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Chargé de Cours	En poste
24	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste
25	AMBASSA Pantaleon	Assistant	En poste
26	EYONG Kenneth OBEN	Assistant	En poste
27	MKOUNGA Pierre	Assistant	En poste
28	NGO MBING Josephine	Assistant	En poste
29	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Assistant	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Assistant	En poste
31	TABOPDA KUATE Turibio	Assistant	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Assistant	En poste

#### 6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (23)

1	TCHUENTE Maurice	Professeur	<i>PCA UB</i>
2	FOTSO Pauline Laure	Maître de Conférences	<i>Vice-Recteur UDs</i>
3	ATSA ETOUNDI Roger	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINFOPRA</i>
4	FOUDA NDJODO Marcel	Chargé de Cours	<i>IA4 MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
5	LOUKA Basile	Chargé de Cours	<b>Chef de Département</b>
6	NDOUNDAM René	Chargé de Cours	En poste
7	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
8	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
9	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
10	CHEDOM FOTSO Donatien	Assistant	En poste
11	EBELE Serge	Assistant	En poste
12	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
13	KAMDEM KENGNE Christine	Assistant	En poste
14	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
15	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Assistant	En poste
16	MELATAGIA YONTA Paulin	Assistant	En poste
17	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
18	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
19	MOTO MPONG Serge Alain	Assistant	En poste
20	NGOKO Yanik Martial	Assistant	En poste
21	TAPAMO Hyppolite	Assistant	En poste
22	TSOPZE Norbert	Assistant	En poste
23	WAKU KOUAMOU Jules	Assistant	En poste

#### 7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (38)

1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<b>Doyen</b>

3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	NGUETSENG Gabriel	Professeur	<i>Chef du CUTI UYI</i>
5	NOUTCHEGUEME Norbert	Professeur	En poste
6	TONGA Marcel	Maître de Conférences	En poste
7	WAMON François	Maître de Conférences	<b>Chef de Département</b>
8	BINZOULI Etienne Jean-Jacques	Chargé de Cours	En poste
9	EMVUDU WONO Yves S.	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule. MINESUP</i>
10	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
11	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
12	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
13	MBIANDA Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14	MEWOLI Boulchard	Chargé de Cours	En poste
15	NDAKBO Victor	Chargé de Cours	En poste
16	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
17	NKUIMI JUGNIA Célestin	Chargé de Cours	En poste
18	NOUNDJEU Pierre	Chargé de Cours	En poste
19	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
20	TCHAPNDA NJABO Sophonie Blaise	Chargé de Cours	En poste
21	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
22	ZAME Alfred	Chargé de Cours	En poste
23	AKOA François	Assistant	En poste
24	AYISSI Raoult Domingo	Assistant	En poste
25	BATKAM Cyril Joël	Assistant	En poste
26	CHENDJOU Gilbert	Assistant	En poste
27	KIANPI Maurice	Assistant	En poste
28	MBANG Joseph	Assistant	En poste
29	MBEHOU Mohamed	Assistant	En poste
30	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
31	NDOUNE	Assistant	En poste
32	NGUEFACK Bernard	Assistant	En poste
33	NKONLACK Socgnia Virginie	Assistant	En poste
34	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Assistant	En poste
35	POLA DOUNDOU Emmanuel	Assistant	En poste
36	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
37	TCHOUNDJA Edgar Landry	Assistant	En poste
38	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick	Assistant	En poste

### 8-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (36)

1	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	<b>Chef de Département</b>
2	MKANKAN KAMGA François	Professeur	En poste
3	WOAFO Paul	Professeur	<b>VD / DRC</b>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Maître de Conférences	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Maître de Conférences	En poste
6	NJOMO Donatien	Maître de Conférences	En poste
7	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>Recteur UYI</i>
8	TABOD Charles TABOD	Maître de Conférences	En poste
9	TCHAWOUA Clément	Maître de Conférences	En poste
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Chargé de cours	En poste
11	BIYA MOTTO Frédéric	Chargé de cours	<i>Chef Service UYI</i>
12	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Chargé de Cours	En poste
13	MAGA Emire Mondésir	Chargé de Cours	En poste
14	MBANE BIOUELE	Chargé de Cours	En poste

15	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	<i>Vive Doyen UDs</i>
16	MOUSSA Idolko	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur MINUH</i>
17	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
18	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
19	NOUAYOU Robert	Chargé de Cours	En poste
20	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	En poste
21	PEMHA Elkana	Chargé de Cours	En poste
22	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
24	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
25	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
26	ZEKENG Serge Sylvain	Chargé de Cours	En poste
27	BODO Bernard	Assistant	En poste
28	DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE	Assistant	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Assistant	En poste
30	EYEBE FOU DA Jean sire	Assistant	En poste
31	FEWO Serge Ibraïd	Assistant	En poste
32	HONA Jacques	Assistant	En poste
33	NANA NBENDJO Blaise	Assistant	En poste
34	SEIDOU	Assistant	En poste
35	SIEWE SIEWE Martin	Assistant	En poste
36	TABI Conrad Bertrand	Assistant	En poste

**9- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (36)**

1	EKODECK	Professeur	<i>Vice-Recteur UD</i>
2	BILONG PAUL	Maître de Conférences	<i>DOYEN FS UD</i>
3	BITOM Dieudonné	Maître de conférences	<i>DAAC / UN</i>
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	MVONDO ONDOA Joseph	Maître de Conférences	<i>S / Directeur MINVILLE</i>
6	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Maître de Conférences	En poste
8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	<b>Chef de Département VD /DSSE</b>
9	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
10	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Directeur P.Barage Memvele</i>
11	BONDJE Charles	Chargé de Cours	En poste
12	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>C.E.A. MINES</i>
13	GHO GOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	En poste
14	KAMGANG Pierre	Chargé de Cours	En poste
15	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
16	LIENOU Gaston	Chargé de Cours	En poste
17	MEDJO EKO Robert	Chargé de Cours	<i>Chef Div. Rectorat UYI</i>
18	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	En poste
19	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
20	MOUNDI Amidou	Chargé de Cours	<i>Chef Div. MINIMDT</i>
21	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Chargé de Cours	En poste
22	NDJIGUI Paul-Désiré	Chargé de Cours	En poste
23	NGOS III Simon	Chargé de Cours	En poste
24	NJILAH Isaac KONFOR	Chargé de Cours	En poste
25	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
26	NYECK Bruno	Chargé de Cours	En poste

27	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NOUMBEM	Chargé de cours	En poste
28	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
29	TEMDJIM Robert	Chargé de Cours	En poste
30	YENE ATANGANA Joseph Q.	Chargé de Cours	<i>Chef Div. MINEF</i>
31	EKOMANE Emile	Assistant	En poste
32	NGO BELNOUN Rose Noël	Assistant	En poste
33	NGO BIDJECK Louise Marie	Assistant	En poste
34	NGUETCHOUA Gabriel	Assistant	En poste
35	ONANA Vincent	Assistant	En poste
36	ZO'O ZAME Philémon	Assistant	<i>S.G. MINTP</i>

### Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département (15 Novembre 2010)

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	Total
<b>BC</b>	1 (0)	7 (1)	18 (12)	5 (1)	<b>31 (14)</b>
<b>BPA</b>	3 (0)	9 (0)	09 (3)	8 (4)	<b>29 (7)</b>
<b>BPV</b>	1 (0)	3 (0)	14 (3)	6 (1)	<b>24 (4)</b>
<b>C.I.</b>	4 (0)	6 (1)	13 (1)	5 (1)	<b>28 (3)</b>
<b>C.O.</b>	8 (0)	7 (1)	09 (4)	8 (2)	<b>32 (7)</b>
<b>IN</b>	1 (0)	1 (1)	5 (0)	16 (2)	<b>23 (3)</b>
<b>MA</b>	5 (0)	2 (0)	15 (1)	16 (1)	<b>38 (2)</b>
<b>PH</b>	3 (0)	6 (0)	17 (3)	10 (1)	<b>36 (4)</b>
<b>ST</b>	1 (0)	6 (1)	23 (2)	6 (2)	<b>36 (5)</b>
<b>Total</b>	<b>27 (0)</b>	<b>47 (5)</b>	<b>123 (29)</b>	<b>80 (15)</b>	<b>277 (49)</b>

Soit un total de : 277 (49) dont

- Professeurs 27 (0)
- Maîtres de Conférences 47 (5)
- Chargés de Cours 123 (29)
- Assistants 80 (15)

- ( ) = Nombre de femmes.

# *DEDICACE*

*A mes parents, en témoignage des sacrifices consentis et des efforts déployés durant mes études.*

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de deux équipes de recherche dans le cadre d'une cotutelle de thèse entre l'Université de Yaoundé I et l'Université de Franche-Comté. Le travail a été réalisé alternativement au sein du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I sous la direction de Mr. Théophile Dimo (Maître de Conférences) et au sein de l'Equipe Optimisation Métabolique et Cellulaire (EA-3921) sous la supervision du Pr. Alain Berthelot, équipe devenue aujourd'hui l'Equipe Sciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques (EA-4267) dirigée par le Pr. Yves Guillaume.

**Au Professeur Théophile Dimo**, merci de m'avoir accueilli dans le Laboratoire de Physiologie Animale. Vous m'avez tenu la main et initié à la technique passionnante d'intubation. Je n'oublie pas les heures passées dans le laboratoire avec vous et le partage de votre expérience qui m'ont permis d'acquérir entre autre l'esprit d'équipe et la persévérance dans le travail. Merci également à la **“Third World Academy of Sciences” (TWAS)** pour le don de matériel accordé à Mr Théophile DIMO à travers la bourse N° 06-020RG/BI0/AF/AC. Veuillez trouver cher professeur ma reconnaissance la plus profonde pour les conseils scientifiques et personnels que vous m'avez prodigués durant la période d'encadrement

**Au Professeur Alain Berthelot**, merci de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Physiologie-Pharmacologie et Nutrition Préventive expérimentale de l'Université de Franche-Comté. Vous m'avez admis, « la petite Esther » comme un père près de vous et toujours veillé au bon déroulement et à la supervision de mon travail. Vos conseils et vos raisonnements ont été d'une importance capitale dans le bon déroulement de mon travail au sein de votre Laboratoire. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

**Au Professeur Céline Demougeot**, merci d'avoir dirigé mon travail avec beaucoup d'attention. La rigueur dans le travail, l'ordre, l'expertise dans la technique des anneaux et l'élaboration des protocoles, le positivisme sont des valeurs inoubliables que j'ai développées à vos côtés. Vous avez toujours veillé à optimiser mon travail au cours de mes séjours au sein du Laboratoire, si bien que, avec l'ambiance du travail, je ne voyais pas le temps passer. Que cette thèse soit pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma reconnaissance.

**Au Docteur Corinne Girard**, merci d'avoir assuré pleinement la codirection de cette thèse. J'ai ressentie votre chaleur avant même de vous connaître. A la manière d'une mère, vous avez toujours été disponible et répondu favorablement à

mes attentes lorsqu'il fallait me rassurer et résoudre divers problèmes, malgré vos multiples occupations. Merci pour l'initiation à la technique de la lixiviation. Vos idées claires et objectives, votre dynamisme, votre façon de faire avancer la science et les relations humaines ont été des atouts indispensables au bon déroulement de cette thèse. Une fois de plus, merci.

**Au Professeur Joseph Tanyi Mbafor**, merci de m'avoir admis au sein de votre Laboratoire de Chimie Organique. Vous avez mis à ma disposition tout le matériel en votre possession et nécessaire pour la réalisation des différents extraits utilisés dans ce travail. Vous n'avez pas hésité à me confier votre Laboratoire lorsque nécessaire. Merci pour les astuces d'extractions que vous m'avez prodiguées. Que ces quelques mots puissent vous exprimer ma profonde gratitude.

**Au Professeur Pierre Kamtchouing**, merci de vos encouragements et conseils pratiques. Vous avez mis à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation des coupes histologiques, et veillé par-dessus tout à nous assurer une formation adéquate par le biais de l'association Pathologie-Cytologie-Développement (PCD). Ceci me donne également l'occasion de remercier nos formatrices, les **Professeurs Catherine Cannet et Danielle Raison**. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

**Au Professeur Françoise Bevalot**, merci de m'avoir chaleureusement accueilli au Laboratoire de Pharmacognosie, et d'avoir mis à ma disposition le nécessaire pour les différentes manipulations. Veuillez trouver ici, cher professeur, l'expression de ma profonde gratitude.

**Au Professeur Lysianne Richter**, merci de m'avoir admis au sein du Laboratoire de Biologie cellulaire, pour les études sur les cytochromes, et d'avoir veillé au bon déroulement des manipulations.

**Au Professeur Charles Félix Bilong Bilong**, merci de m'avoir toujours encouragé et prodigué différents conseils pratiques pour la rédaction du présent travail. Que cette phrase soit révélatrice de ma reconnaissance.

**Au Professeur Elisabeth Ngo Bum**, merci pour l'attention et les conseils et encouragements prodigués pendant mes séjours à vos côtés.

**Aux Docteurs Sylvie Devaux et Hélène Martin**, merci pour l'initiation aux techniques de cœur isolé et de dosage des cytochromes. Travailler à vos côtés a été une expérience très enrichissante.

**Au Docteur Frédéric Muyard**, merci pour l'assistance technique et les conseils que vous m'avez prodigué au cours de mes séjours dans le Laboratoire de pharmacognosie.

**Au Professeur Mol Nang**, merci pour vos multiples encouragements et vos conseils. Votre intérêt pour la recherche ont été une grande motivation tout au long de cette thèse. Que ces quelques mots puissent exprimer toute ma reconnaissance.

**Au Docteur Paul Désire Dzeufiet Djomeni**, merci pour votre disponibilité hors paire. Il m'est impossible d'oublier les heures que vous m'avez consacré lors de la réalisation des coupes histologiques, et l'oreille attentive, les conseils plein d'intérêt que vous m'avez donné durant la réalisation de ce travail, et ce, malgré vos multiples occupations.

**Au Docteur Champlain Djieto Lordon**, merci pour vos conseils qui m'ont été très utiles pendant le déroulement de ce travail.

**Aux Docteurs Yann Pellequer et Arnaud Beduneau**, merci pour votre disponibilité et votre détermination dans le « combat » pour la dissolution de mes extraits. Vous m'avez admis au sein de votre Laboratoire de Chimie Galénique, et avez mis à ma disposition les solvants nécessaires pour mes travaux. Vous m'appelez « La reine du méthylcellulose » ? Disons plutôt que c'est vous « les rois du méthylcellulose » ! Trouvez ici l'expression de ma sincère gratitude.

**Aux Docteurs Téléphore Nguenefack, Fidèle Ntchapda, Orelie Bopda Mtopi, David Emery Tsala, Nyunai Nyemb, Edouard Akono, Danielle Claude Bilanda et Florence Ngueguim Tsofack**, merci pour vos encouragements, votre assistance technique et vos conseils qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse.

**A tous les membres de l'équipe de recherche à Besançon**, merci. Je citerais tout d'abord **Mme Maude Nappey**. Comment oublier votre habilité technique ? Votre sens de l'humour et votre manière d'aborder la recherche ont beaucoup compté pour moi. Vous êtes la personne avec qui j'ai le plus rigolé durant mes séjours à Besançon, et les plats chauds locaux ont été les bienvenus en temps de froid ! J'ai beaucoup appris de l'amour du métier à vos côtés. Merci encore. Je citerais également **François Senejoux, Magalie Alvergnas, Caroline, Rita Milagros, Brice Moulari, Manuel et Sonia**. Vous êtes des amis inoubliables, merci pour les moments de rigolade.

**A tous les membres du Laboratoire de recherche à Yaoundé**, merci. Je commencerais par mon ami **Séfirin Djiogue**. Merci pour le sens de l'amitié durable. Merci à mes amis **Maurice Kayo, Agathe Fotio Lambou, Mireille Metchi, Roméo**

**Temdié, Germain Taiwe Sotoing, Fleur Moto, Antoine Kada Sanda, Gisèle Akiki Atsang, Aboubakar Farouch, Thierry Bella, Emilienne Ngo Sock, Job Tchoumtchoua, Ivone Makom, Anne-Marie Effa, et à tous ceux que j'ai omis de citer.** Travailler à vos côtés a été une belle expérience.

**A ma famille,** je remercie en particulier chacun de vous qui, de près ou de loin a contribué, tant moralement que financièrement, à l'aboutissement de ce travail.

**Aux différents membres du jury,** merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'y apporter toutes vos compétences. Je vous remercie très sincèrement de me faire l'honneur d'assister à ma soutenance.

**A l'Agence Universitaire de la Francophonie,** merci pour la bourse de mobilité offerte qui m'a permis de réaliser un séjour à l'Université de Franche Comté, et d'y effectuer une partie de ce travail.

**A l'Université de Franche-Comté,** merci pour l'aide à la mobilité offerte dans le cadre de la cotutelle de thèse. Cette aide a rendu possible un second séjour au sein de mon Equipe d'Accueil.

**Au Ministère de l'Enseignement Supérieur du Cameroun,** merci pour l'aide à la mobilité offerte dans le cadre de l'encouragement des jeunes chercheurs.

## SOMMAIRE

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANANTS.....	i
DEDICACE.....	viii
REMERCIEMENTS.....	ix
SOMMAIRE.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES TABLEAUX.....	xx
GLOSSAIRE.....	xxii
RESUME.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. REVUE DE LITTERATURE.....	5
I.1 Généralités sur le système cardiovasculaire.....	6
I.2 Contraction/relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire.....	7
I.2.1 Couplage électromécanique : modification du potentiel de membrane.....	7
I.2.2 Couplage pharmacomécanique.....	8
I.2.3 Mécanisme moléculaire de la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire.....	9
I.2.4 Relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire.....	9
I.3 La pression artérielle.....	10
I.3.1 Définition.....	10
I.3.2 Régulation de la pression artérielle.....	10
I.4 L'hypertension artérielle.....	11
I.4.1 Définition, épidémiologie et causes de l'hypertension artérielle.....	11
I.4.2 Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle.....	13
I.4.3 Stress oxydatif et hypertension artérielle.....	16
I.5 Quelques modèles expérimentaux d'hypertension artérielle.....	19
I.5.1 Modèles génétiques de l'hypertension artérielle.....	19
I.5.2 Modèles non génétiques d'hypertension artérielle.....	20
I.6 Traitements de l'hypertension artérielle.....	23
I.6.1 Différents types de traitements.....	23
I.6.2 Intérêt de la médecine traditionnelle par les plantes dans la prise en charge de l'hypertension artérielle.....	25
I.7 Etudes toxicologiques.....	26
I.7.1 Toxicité directe.....	27

I.7.2 Toxicité indirecte et interactions médicamenteuses.....	28
I.8 <i>Terminalia superba</i> .....	30
I.8.1 Classification.....	30
I.8.2 Botanique et écologie.....	31
I.8.3 Phytochimie.....	32
I.8.4 Usage empirique .....	32
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES.....	34
II.1 Préparation d'extraits de plante.....	35
II.2 Les animaux.....	36
II.3 Etude des effets des extraits de <i>Terminalia superba</i> sur la pression artérielle.....	38
II.3.1 Induction expérimentale de l'hypertension artérielle .....	38
II.3.2 Dispositifs d'enregistrement des paramètres cardiovasculaires.....	38
II.3.3 Etude des effets aigus de l'extrait aqueux.....	40
II.3.4 Etude des effets préventifs de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> .....	41
II.3.5 Etude des effets curatifs de l'extrait aqueux sur l'HTA induite par l'alcool.....	42
II.3.6 Evaluation de marqueurs du stress oxydatif.....	42
II.3.7 Evaluation de plusieurs paramètres biochimiques sériques chez les rats hypertendus à l'alcool.....	46
II.4 Evaluation des effets vasorelaxants des extraits de <i>Terminalia superba</i> .....	52
II.4.1 Préparation et montage des anneaux d'aorte.....	53
II.4.2 Protocole expérimental.....	53
II.5 Effets d'un extrait au chlorure de méthylène de <i>Terminalia superba</i> sur l'hypertension artérielle du rat spontanément hypertendu.....	55
II.5.1 Etude des effets aigus de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> sur la pression artérielle.....	55
II.5.2 Etude des effets curatifs de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> chez les rats spontanément hypertendus.....	55
II.5.3. Métabolisme général.....	56
II.5.4 Etude <i>in vitro</i> des mécanismes antihypertensifs de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> chez les rats spontanément hypertendus.....	56
II.5.5 Effets sur le métabolisme hépatique : activité des cytochromes P 450 3A.....	57
II.5.6 Evaluation du taux de 8-isoprostaglandine F2- $\alpha$ (8-iso-PGF2 $\alpha$ ) urinaire.....	59
II.6 Etude de la toxicité des extraits de <i>Terminalia superba</i> .....	61

II.6.1 Toxicité aiguë des extraits aqueux et au chlorure de méthylène.....	61
II.6.2 Toxicité subaiguë de l'extrait au chlorure de méthylène.....	61
II.7 Réalisation des coupes histologiques.....	64
II.7.1 Recoupe ou « trimming ».....	64
II.7.2 Déshydratation.....	65
II.7.3 Inclusion.....	65
II.7.4 Coupe.....	65
II.7.5 Coloration.....	65
II.7.6 Montage.....	65
II.7.7 Observation microscopique.....	66
II.8 Analyse statistique.....	66
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	67
III.1 RESULTATS.....	68
III.1.1 Effets de l'administration intraveineuse de l'extrait aqueux sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque.....	68
III.1.2 Etude des effets préventifs de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> .....	75
III.1.3 Effets curatifs de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur l'HTA induite par l'alcool.....	86
III.1.4 Effets vasorelaxants de <i>Terminalia superba</i> .....	92
III.1.5 Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> chez les rats spontanément hypertendus.....	99
III.1.6 Toxicité des extraits <i>T. superba</i> .....	110
III.2 DISCUSSION.....	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	132
RECOMMANDATIONS.....	134
REFERENCES.....	135
LISTE DES PUBLICATIONS.....	155
TIRES A PART DES PUBLICATIONS.....	156

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Coupe longitudinale du cœur : vue antérieure interne .....	6
Figure 2. Structure de la paroi vasculaire.....	7
Figure 3. Mécanisme de la contraction des cellules musculaires lisses vasculaire..	8
Figure 4. Puissance approximative des divers mécanismes de contrôle de la pression artérielle, en fonction du temps écoulé depuis début du stimulus perturbant la pression artérielle.....	11
Figure 5A. Libération des facteurs d'origine endothéliale.....	14
Figure 5B. Voie NO-GMPc-dépendante dans les cellules musculaires lisses.....	15
Figure 6. Rôle de l'endothélium vasculaire dans le maintien de l'homéostasie vasculaire.....	16
Figure 7. Espèces réactives de l'oxygène et espèces antioxydantes dans le système vasculaire.....	17
Figure 8. Association des classes thérapeutiques favorisant la baisse tensionnelle.....	24
Figure 9. Répartition des médicaments métabolisés par les différentes isoenzymes de cytochromes P-450.....	30
Figure 10. Photo de <i>Terminalia superba</i> .....	31
Figure 11. Aire Naturelle de Distribution du <i>Terminalia superba</i> .....	32
Figure 12. Protocole de préparation des différents extraits et fractions de <i>Terminalia superba</i> .....	36
Figure 13. Dispositif d'enregistrement de la pression artérielle par voie directe.....	39
Figure 14. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur la pression artérielle systolique (PAS) des rats normotendus.....	69
Figure 15. Effets comparés d'une dose de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> , de l'acétylcholine (ACh) et de l'isoprénaline (Isop) sur la pression artérielle systolique des rats normotendus.....	70
Figure 16. Enregistrements originaux montrant l'effet de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> (15 mg/kg), de l'acétylcholine (10µg/kg) et de l'isoprénaline (10µg/kg) sur la pression artérielle d'un rat normotendu.....	71
Figure 17. Pourcentage de diminution immédiate (A) et tardive (60 min après injection, B) de la pression artérielle systolique (PAS) chez les rats anesthésiés après injection intraveineuse de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> (15 mg/kg).....	73

Figure 18. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur la pression artérielle systolique (PAS) des rats hypertendus par surcharge hydrique de glucose.....	74
Figure 19. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur la concentration de malondialdéhyde.....	76
Figure 20. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur la concentration de glutathion.....	77
Figure 21. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur l'activité spécifique du superoxyde dismutase.....	78
Figure 22. Effets de l'extrait aqueux de <i>Terminalia superba</i> sur le taux de monoxyde de d'azote.....	82
Figure 23. Effets de l'extrait aqueux de <i>Terminalia superba</i> sur le taux de malondialéhyde.....	83
Figure 24. Effets de l'extrait aqueux de <i>Terminalia superba</i> sur le taux de glutathion réduit.....	84
Figure 25. Effets de l'extrait aqueux de <i>Terminalia superba</i> sur l'activité de la catalase.....	85
Figure 26. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur l'activité de la superoxyde dismutase.....	86
Figure 27. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur l'activité des transaminases hépatiques.....	88
Figure 28. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur le taux de glutathion réduit en traitement curatif sur les rats hypertendus à l'alcool.....	89
Figure 29. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur le taux de malondialéhyde en traitement curatif chez les rats hypertendus à l'alcool.....	90
Figure 30. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur l'activité de la superoxyde dismutase en traitement curatif chez les rats hypertendus à l'alcool.....	91
Figure 31. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur la concentration en monoxyde d'azote en traitement curatif chez les rats hypertendus à l'alcool.....	91
Figure 32. Effets des différents extraits sur la contraction induite par la phényléphrine (PE, $10^{-6}$ M) (A) ou par le chlorure de potassium (KCl, $6 \times 10^{-2}$ M) (B) sur anneaux intacts.....	92
Figure 33. Rôle de l'endothélium vasculaire sur les effets relaxants des différents extraits.....	94
Figure 34. Effets de l'extrait au chlorure de méthylène (MC, 0,1 mg/mL) sur la contraction induite par le calcium sur anneaux intacts précontractés à la phényléphrine (PE) (A) ou au chlorure de potassium (KCl) (B).....	95

Figure 35. Effets de l'extrait au chlorure de méthylène (MC) de <i>T. superba</i> sur la libération du calcium intracellulaire.....	96
Figure 36. Effets du L-NAME ( $10^{-4}$ M) sur l'effet vasorelaxant de l'extrait au chlorure de méthylène/méthanol de <i>T. superba</i> (MCM) sur les anneaux intacts précontractés à la phényléphrine (PE, $10^{-6}$ M)(A) ou au chlorure de potassium (KCl, $6 \times 10^{-2}$ M) (B).....	97
Figure 37. Effets des fractions (F1 et F2) isolées de l'extrait au chlorure de méthylène sur la contraction des anneaux avec (E+) ou sans (E-) endothélium précontractés à la phényléphrine (PE, $10^{-6}$ M) (A, C) ou au chlorure de potassium (KCl, $6 \times 10^{-2}$ M)(B,D).....	98
Figure 38. Effets subchroniques de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> sur la pression artérielle des rats spontanément hypertendus (SHR) et Wistars Kyoto (WKY).....	100
Figure 39. Effet de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> sur le poids corporel des rats spontanément hypertendus (SHR) et Wistars Kyoto (WKY) .....	102
Figure 40. Effet de l'extrait au chlorure de méthylène sur la relaxation induite par l'acétylcholine (ACh) sur anneaux intacts précontractés à la PE ( $10^{-6}$ M) .....	104
Figure 41. Effet de l'extrait au chlorure de méthylène sur la relaxation induite par le nitroprussiate de sodium (NPS) sur anneaux intacts précontractés à la PE ( $10^{-6}$ M).....	105
Figure 42. Effet du L-NAME ( $10^{-4}$ M) sur la relaxation induite par l'acétylcholine (ACh) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) contrôles (A) et traités (B) et les rats wistar Kyoto contrôles (A) et traités (B).....	106
Figure 43. Effets du tempol ( $10^{-4}$ M) sur la relaxation induite par l'acétylcholine (ACh) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) contrôles (A) et traités (B) et les rats wistar Kyoto contrôle (C) et traités (D).....	107
Figure 44. Effets de l'extrait au chlorure de méthylène sur la contraction induite par la phényléphrine (PE) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et wistar kyoto (WKY).....	108
Figure 45. Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> (150 mg/kg) sur l'activité des cytochromes P450 3A (CYP 3A) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et wistar kyoto (WKY).....	109

Figure 46. Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> (150 mg/kg) sur la concentration de la 8-isoprostane urinaire chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et wistar kyoto (WKY).....	110
Figure 47. Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> sur l'évolution pondérale des souris mâles (A) et femelles(B).....	111
Figure 48. Coupes histologiques du foie (A, B, C, D) des reins (E,F,G,H) et du cœur (I,J,K,L) des souris contrôles ( A,E,I), et traitées à l'extrait au chlorure de méthylène aux doses de 150 (B,F,J), 300 (C,G,K) et 600 mg/kg (D,H,L).....	116
Figure 49. Coupes histologiques du foie (A, B, C) des reins (D,E,F) et du cœur (G, H,I) des souris contrôles ( A,D,G), et deux semaines après arrêt de l'administration de l'extrait au chlorure de méthylène aux doses de 300 mg/kg (B,E,H) et 600 mg/kg (C,F,I).....	117

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Classification de l'hypertension artérielle.....	12
Tableau II. Protocole d'établissement de la courbe d'étalonnage de la catalase.....	45
Tableau III. Dosage des protéines par la méthode de Biuret .....	47
Tableau IV. Protocole de réalisation des courbes d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité de l'ALAT et ASAT .....	48
Tableau V. Protocole de dosage de l'activité ALAT et ASAT dans les séra .....	49
Tableau VI. Technique de dosage des triglycérides .....	50
Tableau VII. Technique de dosage du cholestérol total.....	51
Tableau VIII. Dosage de la bilirubine totale.....	52
Tableau IX. Préparation de la gamme étalon des protéines microsomales.....	58
Tableau X. Préparation du standard 8-iso-PGF <sub>2</sub> α.....	60
Tableau XI. Protocole de dosage du cholestérol HDL.....	63
Tableau XII. Protocole de dosage de l'alanine aminotransférase (Fortress).....	63
Tableau XIII. Protocole de dosage de l'aspartate aminotransférase (Fortress) .....	64
Tableau XIV. Dosage du taux de glucose .....	64
Tableau XV. Effets préventifs de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur la pression artérielle des rats traités au glucose (RHG) .....	79
Tableau XVI. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque moyenne des rats rendus hypertendus par ingestion chronique de l'alcool éthylique 35° .....	79
Tableau XVII. Effets de l'extrait aqueux de <i>Terminalia superba</i> sur quelques paramètres sériques des rats rendus hypertendus par ingestion chronique de l'alcool éthylique 35° .....	81
Tableau XVIII. Effets de l'extrait aqueux de <i>T. superba</i> en traitement curatif sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque des rats rendus hypertendus par ingestion chronique de l'alcool éthylique 35° .....	87
Tableau XIX. Effets de l'administration intraveineuse de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> sur la PAS et la PAD des rats WKY et SHR.....	99

Tableau XX. Evolution de la fréquence cardiaque chez les rats spontanément hypertendus (RSH) et Wistars Kyoto (WKY) traités ou non à l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> .....	101
Tableau XXI. Métabolisme général et glycémie des rats spontanément hypertendus (RSH) et Wistars Kyoto (WKY) .....	103
Tableau XXII. Effets de l'extrait au chlorure de méthylène sur le poids relatif des organes (mg/g PC) des rats Wistars Kyoto (WKY) et spontanément hypertendus (RSH).....	103
Tableau XXIII. Poids relatifs de certains organes des souris traités à l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> .....	111
Tableau XXIV. Effets subchroniques de l'extrait au chlorure de méthylène de <i>T. superba</i> sur quelques paramètres hématologiques.....	113
Tableau XXV. Effets du traitement subchronique (5 semaines) sur quelques paramètres biochimiques tissulaires des souris.....	114
Tableau XXVI. Effets de <i>T. superba</i> sur le profil lipidique, la glycémie et le taux de protéines sériques des souris après 5 semaines.....	115

## GLOSSAIRE

8-iso-PGF2 $\alpha$  : 8-isoprostaglandine F2 alpha ou 8-isoprostane

ACh: Acétylcholine

ALAT: Alanine Amino Transférase

AQU :Extrait aqueux de *Terminalia superba*

ASAT: Aspartate Amino transférase

CE<sub>50</sub> : Concencentration induisant 50% de la relaxation maximale

CMLV: Cellules musculaires lisses vasculaires

EDHF: Endothelium Hyperpolarizing Factor

*E*<sub>max</sub>: Pourcentage de relaxation maximal

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène

GMPc: Guanosine Monophosphate Cyclique

GSH: Glutathion réduit

HTA: Hypertension artérielle

KCl: Chlorure de potassium

L-NAME: Nw-nitro-l-arginine methyl ester

MC: Extrait au chlorure de méthylène de *T. superba*

MCM :Extrait au méthanol-chlorure de méthylène de *T. superba*

MDA:Malondialdéhyde

MET : Extrait au méthanol de *T. superba*

NO : Oxyde nitrique

NPS: Nitroprussiate de sodium

O<sup>2-</sup> : Anion superoxyde

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS: Pression artérielle systolique

PE: Phényléphrine

RHA: Rats hypertendus à l'alcool

RHG:Rats hypertendus au glucose

RNT:Rats normotendus

RSH:Rats spontanément hypertendus

SOD : Superoxyde dismutase

WHO: World Health Organization

WKY: Rats Wistar Kyoto

## RESUME

*Terminalia superba* Engler & Diels est une plante de la famille des Combretaceae utilisée dans la médecine traditionnelle camerounaise pour le traitement de l'hypertension artérielle (HTA). L'objectif du travail de thèse a été d'apporter des bases scientifiques, pharmacologiques, phytochimiques et toxicologiques, à l'utilisation thérapeutique traditionnelle de cette plante. Dans une première partie, afin de mimer les conditions de l'utilisation traditionnelle, nous avons évalué les effets d'un extrait aqueux de *T. superba* chez des rats normaux ou soumis à deux modèles d'HTA secondaire : l'HTA induite par le glucose et l'HTA induite par l'éthanol. Nos résultats ont montré que, dans le modèle d'HTA induite par le glucose, l'extrait aqueux exerce un effet hypotenseur après une administration aiguë par voie intraveineuse, et prévient le développement de l'hypertension après administration chronique par voie orale. Dans le modèle d'HTA induite par l'éthanol, le traitement par l'extrait aqueux a exercé un effet anti-hypertenseur et a amélioré le profil lipidique et le taux des transaminases. Dans ces deux modèles d'HTA, les effets bénéfiques de l'extrait aqueux sur la pression artérielle se sont accompagnés d'une réduction du stress oxydatif (diminution du taux malondialdéhyde tissulaire, augmentation du taux de glutathion réduit tissulaire, diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes catalase et superoxyde dismutase). Dans une deuxième partie, quatre extraits de *T. superba* ont été réalisés à savoir un extrait aqueux (AQU), au méthanol (MET), au chlorure de méthylène (MC) et au méthanol/chlorure de méthylène (MCM). Les effets vasodilatateurs directs de ces extraits ont été étudiés sur le modèle d'anneaux aortiques isolés de rat, dénués ou non d'endothélium vasculaire, et précontractés à la phényléphrine (PE) ou au chlorure de potassium (KCl). Tous les extraits ont présenté des effets vasorelaxants aussi bien sur les anneaux contractés à la PE qu'au KCl mais l'extrait MC est le plus actif. Les extraits AQU, MET et MC ont un effet endothélium-indépendant alors que l'extrait MCM a un effet endothélium-dépendant. Nous avons déterminé les mécanismes impliqués dans l'effet de l'extrait le plus actif, l'extrait MC, et montré que cet extrait réduit les flux calciques intra et extracellulaires au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans une troisième partie, sur la base des résultats obtenus *in vitro* sur vaisseaux isolés, nous avons évalué les effets anti-hypertenseurs de l'extrait MC dans un modèle d'HTA essentielle, le rat spontanément hypertendu (SHR). L'extrait MC administré par voie orale a exercé un effet anti-hypertenseur, associé à une diminution du stress oxydatif

évalué par mesure du taux de 8-iso-PGF2 $\alpha$  urinaire, et a réduit la dysfonction endothéliale mesuré *in vitro* sur vaisseaux isolés. Cet effet endothélial passe par une amélioration de la production de monoxyde d'azote (NO). De plus, le traitement a amélioré la sensibilité du muscle lisse vasculaire au NO et a réduit la réponse contractile de la PE. Cet extrait n'a affecté ni la diurèse, ni l'activité des cytochromes P450 3A hépatiques. Dans une dernière partie, nous avons évalué la toxicité des extraits AQU et MC chez la souris. Après administration aiguë, les extraits AQU et au MC se sont révélés faiblement toxiques, avec des DL<sub>50</sub> respectivement supérieures à 5000 mg/kg et 2000 mg/kg. L'étude de la toxicité subaiguë de l'extrait MC aux doses de 300 et de 600 mg/kg a révélé des zones de congestion vasculaires et d'inflammations réversibles après arrêt du traitement.

En conclusion, nos travaux ont validé sur le plan pharmacologique l'utilisation traditionnelle de *T. superba* comme traitement de l'hypertension artérielle. Les perspectives de ce travail viseront à identifier les composés purs à l'origine de l'activité cardio-vasculaire de la plante, et à poursuivre les études toxicologiques afin de s'assurer de son innocuité.

**Mots clés :** *Terminalia superba*, extraits, antihypertenseur, vasorelaxant, endothélium, antioxydant, toxicité.

## ABSTRACT

*Terminalia superba* Engler & Diels is a plant belonging to the Combretaceae family used in cameroonian traditional medicine for the treatment of hypertension (HT). The aim of this thesis was to provide pharmacological, phytochemical and toxicological basis of the traditional therapeutic use of this plant. As a first approach, we evaluated the effects of an aqueous extract of *T. superba* in normal rats or in rats subjected to two models of secondary hypertension: hypertension induced by glucose and hypertension induced by ethanol, in order to mimic the traditional use. Our results showed that in the model of hypertension induced by glucose, the aqueous extract produced an hypotensive effect after acute intravenous administration, and prevent the development of hypertension after chronic oral administration. In the model of hypertension induced by ethanol, treatment with the aqueous extract of *T. superba* exerted an anti-hypertensive effect and improved lipid profile and transaminases levels. In both models of hypertension, the beneficial effects of aqueous extract on blood pressure were accompanied by a reduction of oxidative stress (decreased of malondialdehyde and the activity of antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase levels, reduced of glutathione levels tissues). In the second part, four extracts of *T. superba* were prepared: an aqueous extract (AQU), methanol (MET), methylene chloride (MC) and methanol/methylene chloride (MCM). We studied the direct vasodilatory effects of these on the model of isolated rat aortic rings endothelium stripped or not and precontracted with phenylephrine (PE) or potassium chloride (KCl). All extracts showed vasorelaxant effects on rings both contracted with PE or KCl but the MC extract was the most potent. The AQU, MET, and MC extracts had an endothelium-independent effect, while the MCM extract exerted an endothelium-dependent effect. We determined the mechanisms involved in the effect of the most active extract, and showed that this extract reduced the intra and extracellular calcium fluxes in vascular smooth muscle cells. Based on the results obtained *in vitro* on isolated vessels, we evaluated in the third part, the antihypertensive effects of MC extract in a model of essential hypertension, the spontaneously hypertensive rat (SHR). MC extract administered orally exerted an antihypertensive effect, associated with a decreased in oxidative stress assessed by measuring the rate of urine 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , and reduced endothelial dysfunction measured in isolated vessels. This effect involves improving endothelial production of nitric oxide (NO). Moreover, treatment with MC extract has

improved the smooth vascular muscle sensitivity to NO and reduced the contractile response of PE. This extract did not affect diuresis, or the activity of hepatic cytochrome P450 3A. Finally, we evaluated the toxicity of AQU and MC extracts in mice. After acute administration, AQU and MC extracts appeared slightly toxic, with LD<sub>50</sub> respectively greater than 5000 mg/kg and 2000 mg/kg. The subacute toxicity study of MC extract at doses of 300 and 600 mg/kg showed areas of vascular congestion and inflammation reversible after discontinuation.

In conclusion, our study validates the pharmacological traditional use of *T. superba* as a treatment for hypertension. The prospects of this work will aim at identifying the pure compounds that cause the cardiovascular activity of this plant, and further toxicological studies to ensure their safety.

**Key words:** *Terminalia superba*, extracts, antihypertensive, vasorelaxant, endothelium, antioxidant, toxicity.

# INTRODUCTION

Aujourd'hui, les maladies dites « non transmissibles » constituent une grave menace pour la santé de l'homme. Quatre pathologies en particulier - les cancers, les affections respiratoires chroniques, le diabète et les maladies cardiovasculaires - sont les premières causes de mortalité dans le monde, provoquant chaque année 60% de l'ensemble des décès à l'échelle mondiale, dont 80% se produisent dans des pays pauvres et défavorisés. C'est la raison pour laquelle l'OMS a élaboré un plan d'action 2008-2013 pour la stratégie mondiale de lutte contre ces maladies (OMS, 2008). La lutte contre les maladies cardiovasculaires occupe une place importante dans ce plan, et notamment la lutte contre l'hypertension artérielle (HTA). L'HTA est en effet la plus récurrente des maladies cardiovasculaires. Elle contribue aux maladies coronariennes et à l'insuffisance cardiaque et rénale. La prévalence de l'hypertension artérielle est croissante dans les pays en développement, probablement en relation avec le vieillissement de la population, l'urbanisation et le changement des habitudes nutritionnelles favorisant l'obésité.

En Afrique Subsaharienne, environ 80 millions de patients hypertendus sont répertoriés et les projections reposant sur des données épidémiologiques suggèrent que ce chiffre passera à 150 millions en 2025 (Fourcade et al., 2007). La revue de Addo, (2007) a montré que, dans ces pays, moins de 40% des personnes ayant une tension artérielle au dessus de la normale avaient été détectées comme étant hypertendues, moins de 30% de celles présentant une hypertension diagnostiquée étaient sous traitement médicamenteux et enfin, moins de 20% des personnes traitées atteignaient des valeurs tensionnelles normales (Addo, 2007). Le contrôle de l'HTA est en effet très mauvais : il est de 3% au Mozambique, 18% au Congo et moins de 10% au Cameroun (Grebla et al., 2010). L'étude VITARAA (visite de la tension artérielle et du risque associé en Afrique) a analysé 10 pays d'Afrique. Elle montre que l'HTA touche 11% de la population de ces pays, et que trois quarts des hypertendus ont plus de trois facteurs de risque. Elle montre aussi que la télévision a augmenté le risque d'HTA et d'obésité (Grebla et al., 2010). Il est actuellement établi qu'une consommation excessive d'hydrates de carbone (sucrose, fructose ou glucose) peut être à l'origine de différentes altérations physiologiques, qui peuvent mener à plus ou moins long terme à des complications métaboliques, cardiovasculaires ou rénales (Kamata et Yamashita, 1999 ; Thresher et al., 2000). Des études ont rapporté qu'une alimentation riche en glucose est à l'origine d'une hypertension artérielle par le biais du stress oxydatif vasculaire (El Midaoui et De

Champlain, 2002). De plus, la consommation chronique d'alcool est associée à des dysfonctions cardiovasculaires et à l'hypertension artérielle (Resstel et al., 2006). Ainsi, au Cameroun, le changement des habitudes de vie a contribué à l'essor de l'HTA : l'exode rural, la paupérisation et l'alcoolisme ayant modifié le profil épidémiologie du pays. Les chiffres montrent en effet que la prévalence de l'hypertension au Cameroun est plus importante en milieu urbain qu'en milieu rural, de même qu'elle est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (Addo et al. 2007).

Le traitement de l'hypertension artérielle permet bien sûr, de réduire la mortalité et la morbidité cardiovasculaire (Elsik et Krum, 2007). Mais, dans ces pays défavorisés, l'accès aux soins pose problème et représente un facteur majeur de surmortalité. Par exemple, l'amlodipine 5 mg a un coût prohibitif pour la plupart des pays. Au Malawi, le traitement coûte 18 jours de travail par mois alors qu'il ne représente que 1,5 jours au Sri Lanka. La population se tourne donc naturellement très souvent vers la médecine traditionnelle (MTR), qui occupe encore une place prépondérante et qui repose principalement sur l'utilisation de plantes médicinales locales. En effet, en Afrique, un grand nombre de tradi-praticiens se répartissent sur le territoire (plus de 200 000 pour l'Afrique du Sud seule) et jusqu'à 80 % de la population utilise la MTR pour répondre à ses besoins de soins de santé. Au Cameroun, la médecine traditionnelle constitue le troisième sous-secteur du secteur santé, même s'il n'est pas encore réglementé. Toutefois, on relève, en vue de la promotion de cette médecine, de nombreuses actions de l'État, telles que la création d'un service en charge de la médecine traditionnelle au ministère de la santé et la création du Centre de Recherche sur les Plantes médicinales et la Médecine traditionnelle (CRPMT/IMPM) (OMS, 2003). La richesse potentielle de la MTR partout dans le monde, a poussé l'OMS à élaborer une stratégie pour le développement et l'évaluation de la MTR, dans la période 2002-2005 (OMS, 2002).

Ainsi, de nombreux chercheurs se tournent vers l'approche ethnopharmacologique pour trouver de nouveaux dérivés naturels actifs, dans tous les domaines, notamment dans le domaine cardiovasculaire. Des études ont porté sur les effets bénéfiques et /ou les cibles des plantes médicinales dans le but de développer une base scientifique pour l'application thérapeutique de ces plantes. Les interventions thérapeutiques *via* la suppression de la génération des radicaux libres et/ou l'augmentation des enzymes antioxydantes endogènes atténueraient les

dysfonctions myocardiques. Les plantes de la famille des Combretaceae sont souvent utilisées par les tradipraticiens. Ils s'en servent pour traiter les désordres abdominaux, les hémorroïdes, la bilharziose, la toux, la conjonctivite, la diarrhée, les dysménorrhées, la fièvre, l'infertilité féminine, la lèpre, la pneumonie, les morsures de serpent et de scorpion, le mal de dents, l'ulcère gastrique, les maladies vénériennes, les maladies cardiaques, la dysenterie et la fatigue généralisée (Hutchings et al., 1996; Van Wyk et al., 1997). Les Combrétacées regroupent 18 genres parmi lesquels le genre *Terminalia*, formé d'environ 200 espèces (Mc Gaw et al., 2001). Un nombre important de plantes du genre *Terminalia* possèdent une activité antioxydante *in vitro* (Maulik et al., 1997; Gauthaman et al., 2001). *Terminalia superba* Engler & Diels est une plante utilisée traditionnellement contre le diabète et l'hypertension artérielle en Afrique. Le peuple Sotho du Sénégal utilise la poudre de ses écorces pour soigner le diabète. Au Niger et au Mali, cette plante est utilisée pour soigner l'hépatite (Adjanooun et al., 1979, 1980). Au centre et au sud du Cameroun, les populations utilisent les écorces du tronc de *T. superba* pour soigner l'hypertension artérielle. La validation de ses effets pharmacologiques et la compréhension des mécanismes mis en jeu permettrait d'identifier de nouvelles cibles et de nouvelles molécules pour le développement d'une thérapie antihypertensive efficace.

La présente étude a donc pour objectif principal l'évaluation des effets antihypertenseurs des extraits de *Terminalia superba* par une étude *in vivo* et *in vitro*. Pour atteindre cet objectif, il était question plus spécifiquement:

- D'évaluer les effets de l'extrait aqueux (utilisé en médecine traditionnelle) sur la pression artérielle de rats normotendus, rendus hypertendus par surcharge de glucose ou d'éthanol et sur le stress oxydatif associé à ces modèles ;
- D'évaluer et de comparer les effets vasodilatateurs directs de différents extraits de *T. superba* ;
- D'évaluer les effets de l'extrait le plus actif sur un modèle d'hypertension artérielle essentielle (rat spontanément hypertendu) ;
- D'évaluer la toxicité de l'extrait aqueux et de l'extrait le plus actif.

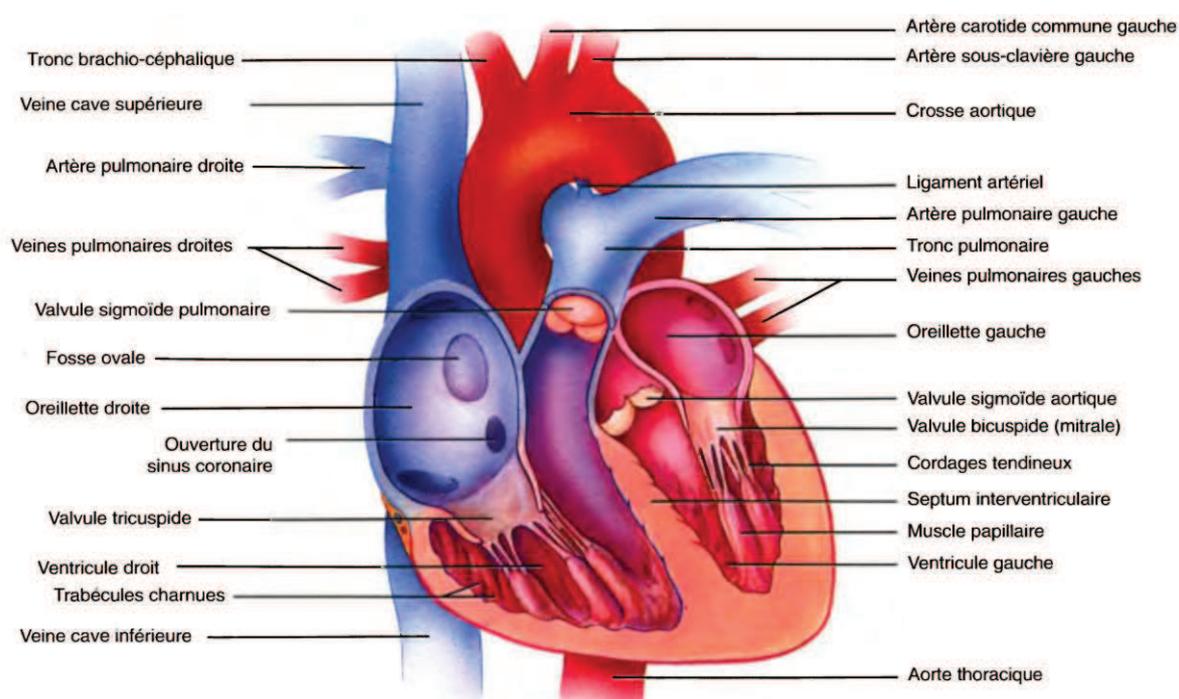
# CHAPITRE I

## REVUE DE LITTÉRATURE

## I.1 Généralités sur le système cardiovasculaire

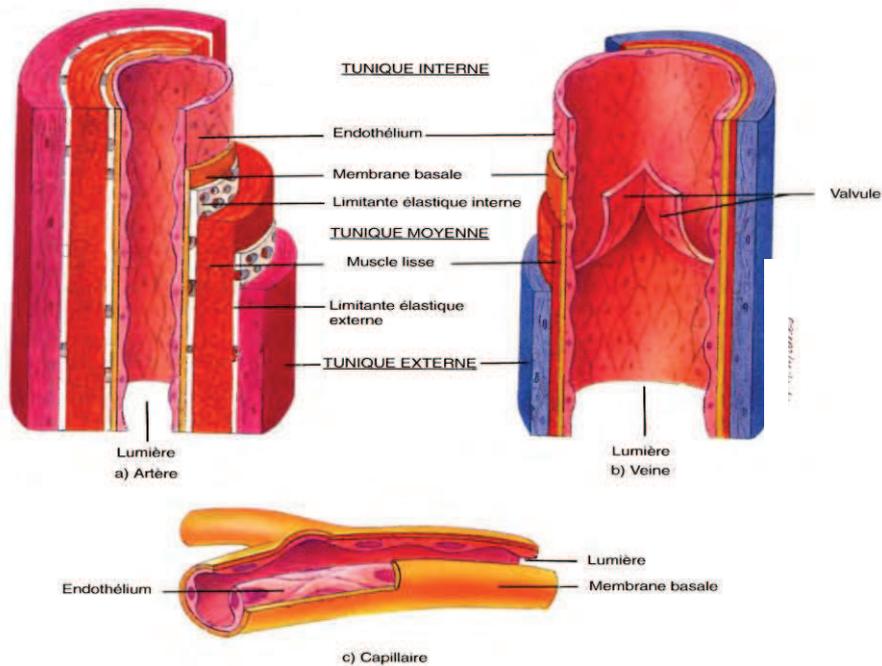
Le système cardiovasculaire est constitué par le cœur, les vaisseaux sanguins et le sang. Sa fonction principale est d'approvisionner les organes, les tissus et les cellules en nutriments et d'éliminer les déchets issus du métabolisme cellulaire.

Le sang venant des organes est collecté par les veines caves supérieure et inférieure pour le cœur droit. A partir du ventricule droit, le sang est éjecté dans la circulation pulmonaire puis revient dans le cœur gauche d'où il est éjecté pour la circulation systémique. Le cœur se trouve donc au centre du système cardiovasculaire. Les vaisseaux sanguins : artères, veines, artérioles et veinules servent de conduits au passage du sang (Seeley et al., 2003). La figure 1 illustre un schéma du cœur.



**Figure 1.** Coupe longitudinale du cœur : vue antérieure interne (Tortora et Grabowski, 1994).

L'intima du vaisseau sanguin est composée d'une membrane basale constituée de collagène et de mucopolysaccharides, de tissu conjonctif et d'une couche unique de cellules endothéliales en contact avec la lumière des vaisseaux. Cet endothélium revêt une importance capitale puisqu'il constitue la zone de contact du sang avec les vaisseaux (Pelletier, 1998). La media, localisée sous l'intima, est composée d'un mélange de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques. Finalement, l'adventice est formée d'une couche de fibres de collagène disposées parallèlement au grand axe du vaisseau. La figure 2 présente la structure des vaisseaux sanguins.



**Figure 2.** Structure de la paroi vasculaire (Tortora et Grabowski, 1994).

## I.2 Contraction/relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire

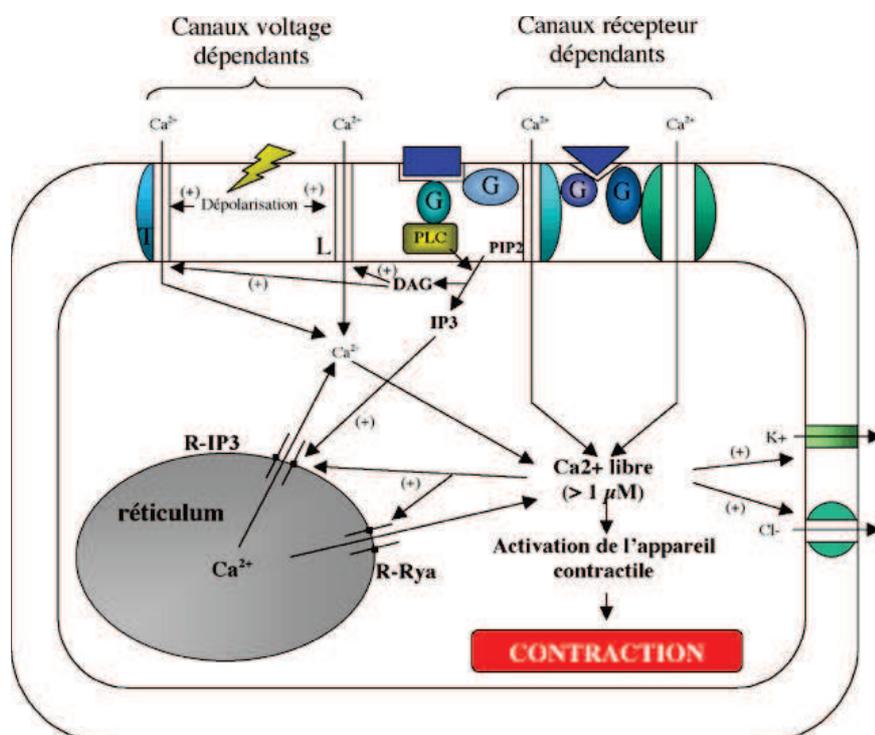
Dans le muscle lisse vasculaire (CMLV), comme dans la plupart des autres muscles lisses, l'événement initial qui déclenche la contraction est l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Rico et al., 1990). L'augmentation de  $Ca^{2+}$  peut être due à une modification du potentiel de membrane (initiation électromécanique) qui va provoquer l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (de type T ou de type L) et permettre l'entrée du  $Ca^{2+}$  extracellulaire. La hausse de  $Ca^{2+}$  peut également résulter de la liaison d'un agoniste à un récepteur spécifique (initiation pharmacomécanique), ce qui augmente le taux de  $Ca^{2+}$  par la libération du calcium des réservoirs intracellulaires (Hirst et Edwards, 1989).

### I.2.1 Couplage électromécanique : modification du potentiel de membrane

En fonction des territoires vasculaires, le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses varie entre -45 et -70 mV. Les canaux  $K^+$  et les canaux  $Cl^-$ , tous deux dépendants du  $Ca^{2+}$  interviennent dans la modulation du potentiel de membrane dans les CMLV. Dans le cas d'une augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$ , ces canaux sont activés. Le canal chlore dépendant du  $Ca^{2+}$  va provoquer une sortie de  $Cl^-$ , et donc une dépolarisation de la membrane plasmique. Au contraire, l'activation par le  $Ca^{2+}$  des canaux potassiques dépendants du  $Ca^{2+}$  provoque une sortie de  $K^+$  et donc une hyperpolarisation et par voie de conséquence une diminution du tonus vasculaire (Tsien et al., 1991 ; McDonald et al., 1994).

## I.2.2 Couplage pharmacomécanique

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le couplage pharmacomécanique : le plus important est l'activation de la cascade des phosphatidyl-inositols qui provoque l'augmentation intracellulaire du taux d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). Un autre, plus controversé, serait une stimulation de l'influx de Ca<sup>2+</sup> sans dépolarisation, par augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux de type L, ou encore par activation d'un récepteur canal calcique par liaison de son ligand. La majorité des vasoconstricteurs provoquent une contraction des CMLV *via* leur liaison à un récepteur couplé à une protéine G (protéine "collée"), dont l'effecteur est une phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ). La liaison de ce type de ligand provoque dans un premier temps la libération de Ca<sup>2+</sup> des compartiments intracellulaires sarcoplasmiques (Chiu et al., 1987 ; Tawada et al., 1987), puis un flux transmembranaire de Ca<sup>2+</sup>. La PLC va former, à partir du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) de la bicouche phospholipidique de la membrane, de l'inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et du diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> libéré va ensuite venir se fixer sur les récepteurs-canaux à l'IP<sub>3</sub> (R-IP<sub>3</sub>) du réticulum sarcoplasmique, ce qui va ouvrir un canal calcique et ainsi libérer du calcium dans le cytosol. (Figure 3) (Chadwick et al., 1990).



**Figure 3.** Mécanisme de la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (Chadwick et al., 1990). La contraction est principalement due à l'activation d'une phospholipase C (PLC) et à la production d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). DAG : diacylglycérol ; PIP<sub>2</sub> : Phosphoinositide phosphate ; R-IP<sub>3</sub> : récepteur de l'IP<sub>3</sub> ; R-Rya : récepteur de la ryanodine.

### **I.2.3 Mécanisme moléculaire de la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire**

Le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire va ensuite se complexer avec différentes molécules dont la calmoduline, et former ainsi des complexes  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (une molécule de calmoduline pour quatre ions calciques) (Means et al., 1991). La fixation réversible du  $\text{Ca}^{2+}$  induit un changement de conformation de la molécule qui va pouvoir interagir avec la kinase de la chaîne légère de la myosine (KCLM). Cette enzyme va phosphoryler la chaîne légère de la myosine (CLM) sur la Sérine 19. La phosphorylation de la CLM est nécessaire à l'interaction actine-myosine et donc à la contraction de la CML (Ikebe et al., 1987). La fixation de la myosine activée (qui a lié une molécule d'ATP) sur l'actine provoque un changement de conformation de la myosine qui va " pivoter " et provoquer un glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais. La force nécessaire est produite par l'activité ATPasique intrinsèque de la myosine.

En réponse à la hausse de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et à la hausse en phosphoinositides, une PKC dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et des phospholipides est activée. Une fois activées, les PKC favorisent la contraction des CMLV par phosphorylation des canaux calciques voltage dépendants (CCVDs) (Schuhmann et Groschner, 1994), mais aussi en sensibilisant l'appareil contractile. Cette sensibilisation a lieu en phosphorylant la KCLM ou la CLM elle-même ou plus vraisemblablement en phosphorylant la protéine CPI-17 qui va inhiber l'activité de la Phosphatase de la chaîne légère de la myosine (PCLM).

### **I.2.4 Relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire**

On peut distinguer deux types de relaxation. Une relaxation passive, par retrait d'un agent vasoconstricteur, et une relaxation active, par effet d'un vasodilatateur. Dans le premier cas, ce sont les mécanismes d'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui vont diminuer ce taux. Ce sont les pompes calciques membranaires et les «Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases» (SERCAs) qui, dans ce cas, vont induire une relaxation et un retour à l'état basal. Dans le cas de l'action d'un vasodilatateur, la vasorelaxation peut être induite par trois mécanismes distincts : la baisse du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, la baisse de la sensibilité au calcium de l'appareil contractile et l'action directe sur les protéines du cytosquelette. L'activité de la KCLM est en concurrence avec la PCLM qui va déphosphoryler la chaîne légère de la myosine et ainsi provoquer la rupture de l'interaction actine-myosine. De plus, l'acide

arachidonique (AA) (activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire) produit par la PLA2 va activer la PLC et la PKC. (Ikebe et al., 1985).

L'état de contraction des CML artérielles est l'un des déterminants du niveau de pression artérielle.

### **I.3 La pression artérielle**

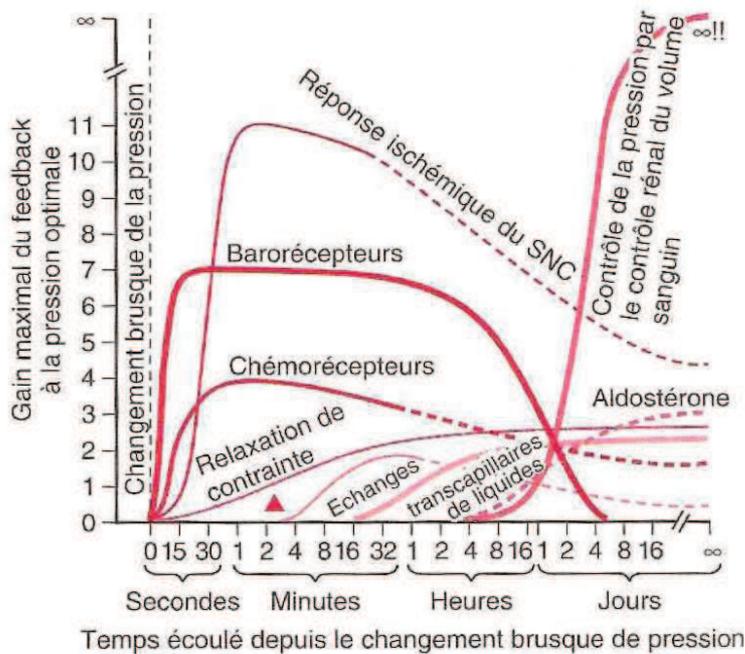
#### **I.3.1 Définition**

La pression artérielle est la force qu'exerce le sang sur chaque unité de la surface de la paroi artérielle, elle est presque toujours exprimée en millimètre de mercure (mmHg) (Asmar, 2007).

Trois composantes principales déterminent la pression artérielle : le débit cardiaque, le volume sanguin et la résistance des artéioles périphériques. Le caractère pulsatile de la contraction cardiaque explique l'existence d'une pression artérielle systolique (PAS) correspondant à la pression dans l'aorte et les larges branches artérielles lors de l'augmentation du volume sanguin maximal éjecté par le ventricule gauche et celle de la pression artérielle diastolique (PAD) après éjection du sang pendant la phase de repos du cœur ou diastole. La différence entre la pression artérielle systolique et diastolique permet de déterminer la pression artérielle différentielle, pression à l'origine de la dilatation de l'aorte. La pression artérielle moyenne (PAM) est la moyenne de la pression artérielle au cours du cycle cardiaque. Elle est plus proche de la PAD que de PAS. La PAM est déterminée par la formule suivante :  $\text{PAM} = \text{PAD} + 1/3(\text{PAS} - \text{PAD})$  (Pelletier, 1998).

#### **I.3.2 Régulation de la pression artérielle**

La pression artérielle est réglée par plusieurs systèmes interdépendants ayant chacun une fonction spécifique. La figure 4 est la représentation schématique des réponses régulatrices immédiates et à long terme. Les réactions à court terme sont presque uniquement des réflexes nerveux immédiats mettant en jeu des barorécepteurs, des chémorécepteurs et une réponse ischémique du système nerveux central (Cowley et al., 1973). D'autres mécanismes s'intercalent entre les deux types de régulation : l'action vasoconstrictrice du système rénine-angiotensine, la relaxation de contrainte et le transfert de liquide à travers les parois capillaires vers ou hors circulation pour ajuster le volume sanguin aux besoins (Hall et al., 1989). Enfin, les reins jouent un rôle important dans le contrôle à long terme, ce contrôle prend plusieurs heures pour produire une réponse significative, mais il est bien capable de ramener la pression artérielle à sa valeur initiale (Bianchetti et al., 1986).



**Figure 4.** Puissance approximative des divers mécanismes de contrôle de la pression artérielle, en fonction du temps écoulé depuis le début du stimulus perturbant la pression artérielle (Asmar, 2007).

Le défaut de régulation de la pression artérielle conduit à plusieurs pathologies dont l'hypertension artérielle.

## I.4 L'hypertension artérielle

### I.4.1 Définition, épidémiologie et causes de l'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est une élévation permanente de la pression artérielle systémique. On parle d'HTA chez l'adulte lorsque la PAS est habituellement  $\geq 140$  mmHg et/ou la PAD  $\geq 90$  mmHg (WHO, 1999). Le tableau I présente les différents niveaux d'hypertension artérielle. On distingue l'hypertension artérielle primaire (ou essentielle) et l'hypertension artérielle secondaire. L'HTA essentielle, sans cause spécifique, est étroitement liée au style de vie et représente 90 à 95 % des cas d'HTA. L'HTA secondaire représente 5 à 10 % des cas d'HTA. Elle est causée par des désordres préexistants tels que des insuffisances rénales et hépatiques, des désordres endocriniens et cardiaques (Anderson, 2003).

L'hypertension est une maladie fréquente qui touche plus de 972 millions de personnes dans le monde, dont environ 26% de la population adulte en 2000 et ce chiffre va passer à 1,56 milliards de patients (environ 30%) en 2025 (Kearney et al., 2005). L'hypertension dans le monde est responsable de 7,1 millions de décès prématurés et de 4,5% de la charge de morbidité (WHO, 2002). De nombreuses études indiquent que l'hypertension artérielle est non seulement plus fréquente, mais

aussi plus précoce et plus sévère chez les personnes de race noire (Balde et al., 2006). Sa prévalence dans les populations d'Afrique Noire, des Caraïbes et des États-Unis d'Amérique est respectivement estimée à 14, 26, et 33 %, avec un ratio Noir/Caucasien de l'ordre de 1,5 (Cooper et al., 1997). Dans une étude collaborative croisée régionale récente portant sur les populations noires, il a été également démontré que les taux d'HTA augmentaient de 16% en Afrique occidentale, 26 % dans les Caraïbes et 33 % aux États-Unis (Walinjorn et Face, 2000). Aux États-Unis, on lui attribue 20 % de décès chez les noirs contre 10 % chez les blancs (Tiechev, 2001).

**Tableau I.** Classification de l'hypertension artérielle selon l'OMS et la Société Internationale de l'Hypertension (ISH)

Catégorie	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Seuil optimal	<120	<80
<b>Normal</b>	<130	<85
Normal 'haut'	130-139	85-89
<b>Hypertension</b>		
Stade ou grade 1	140-159	90-99
Sous-groupe limite	140-159	90-94
Stade ou grade 2	160-179	100-109
Stade ou grade 3	≥ 180	≥ 110
<b>Hypertension</b>		
Systolique isolée	≥ 140	<90
Sous-groupe limite	140-149	<90

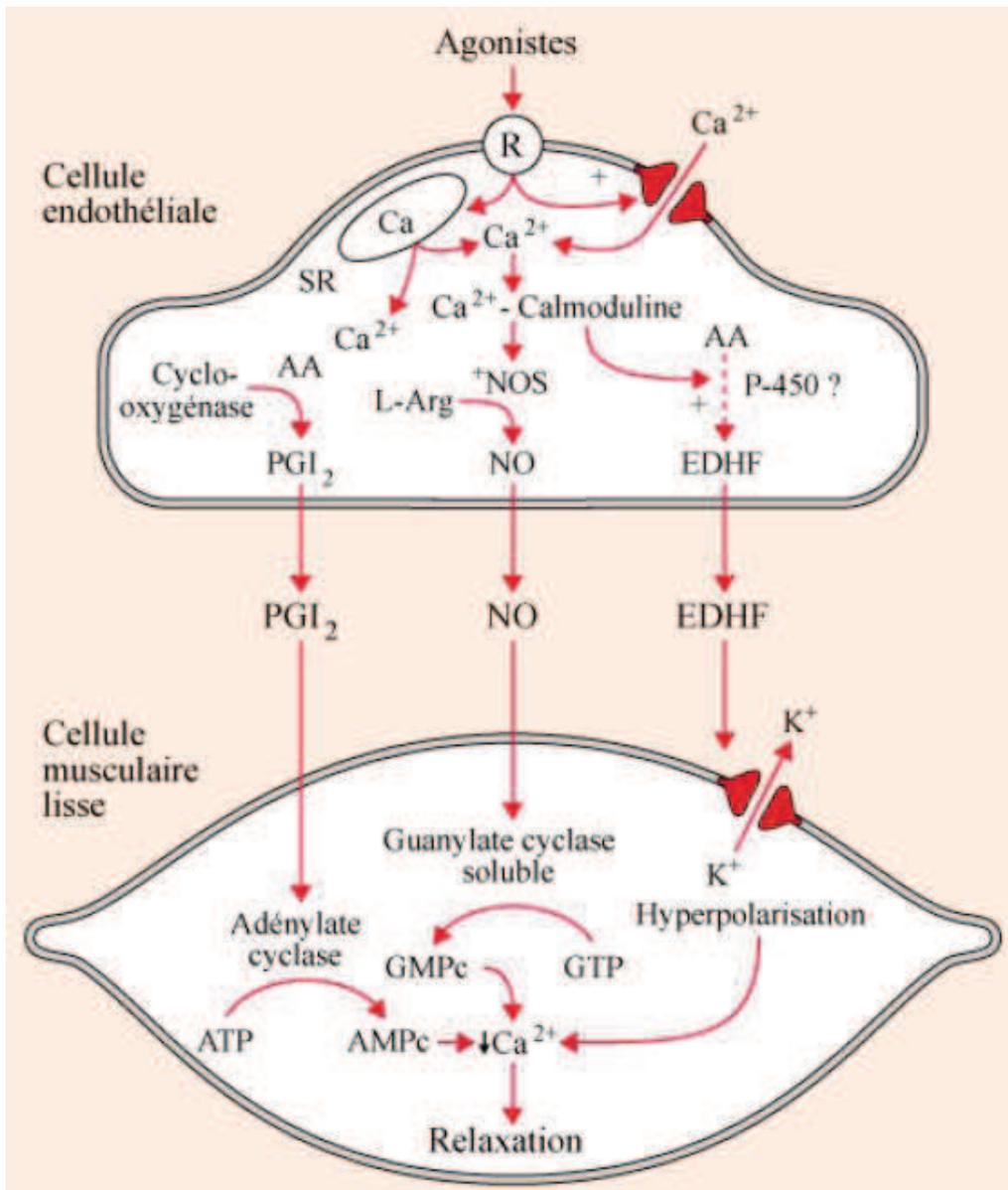
Classification reposant sur une moyenne de 2 mesures au moins par consultation, au cours de 3 visites distinctes. PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique (WHO/ISH, 1999).

L'hypertension artérielle est associée à une déficience de la vasodilatation endothélium-dépendante (Brunner et al., 2005) à la fois dans la macro et la microvasculature.

#### **I.4.2 Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle**

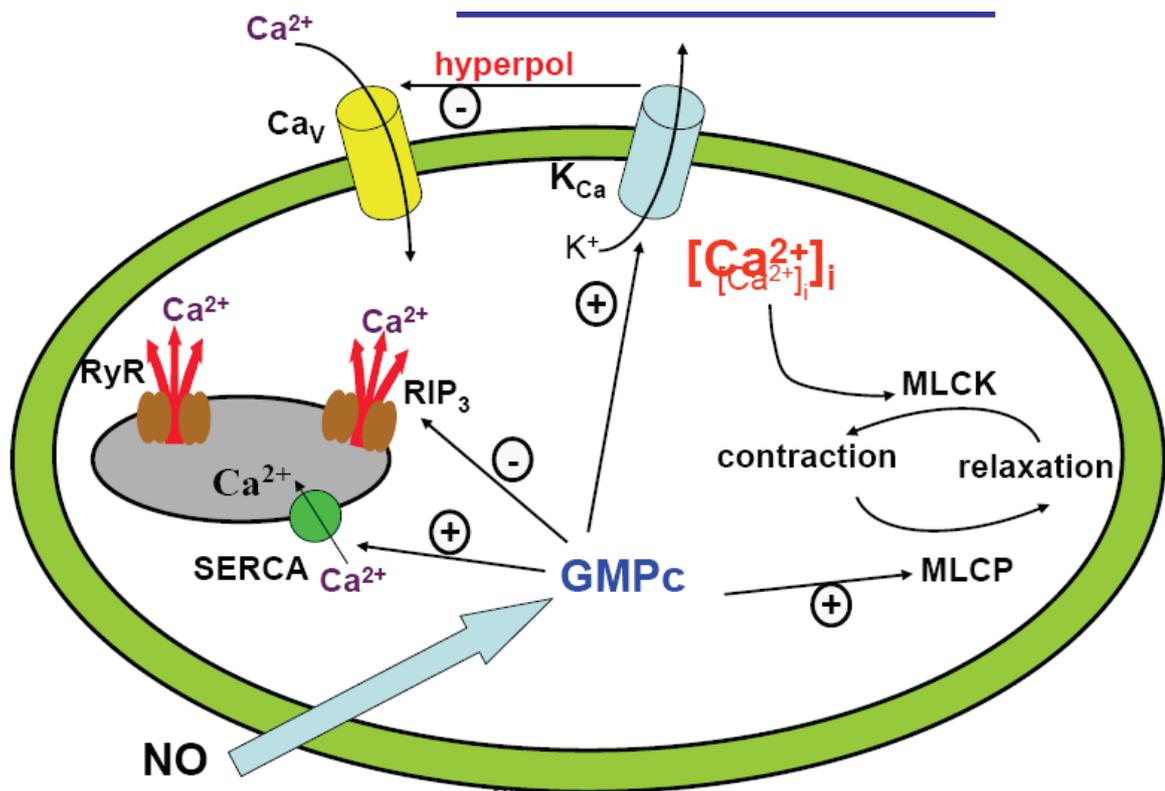
L'endothélium participe comme un régulateur important du tonus vasculaire en libérant des facteurs de relaxation dérivés de l'endothélium (EDRF) (Török, 2000). Beaucoup d'EDRF sécrétés par l'endothélium sont impliqués dans le contrôle de la vasomotricité, le plus important de la plupart de ces molécules est probablement l'oxyde nitrique (NO) (Gryglewski et al., 1986 ; Lüscher, 1994 ; Barton et al., 1997). Le NO est synthétisé par les cellules endothéliales et il relaxe les cellules musculaires lisses par stimulation de la guanylate cyclase soluble, enzyme qui synthétise la guanosine monophosphate cyclique (GMP<sub>c</sub>) (Furchgott et Vanhoutte, 1989). La figure 5 A présente la libération des facteurs de relaxation endothéliaux et la figure 5 B détaille le mécanisme d'action du NO dans la cellule musculaire lisse. La dysfonction endothéliale est un prélude d'événements cardiovasculaires (Schachinger et al., 2000 ; Suwaidi et al., 2000 ; Halcox et al., 2002) et la restauration de la fonction endothéliale est importante dans le traitement antihypertenseur (Modena et al., 2002). La vasodilatation endothélium-dépendante est médiée par le NO, les prostanoïdes et le mécanisme d'un dérivé hyperpolarisant de l'endothélium, soit par la libération d'un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, soit par le transfert myoendothélial des jonctions lacunaires (Feletou et Vanhoutte, 2006a).

Il est cependant important de souligner que le concept de dysfonction endothéliale n'inclut pas simplement la perte de l'effet vasodilatateur NO-dépendant en réponse à des stimuli tels que l'acétylcholine ; il implique également une diminution de la production ou de la biodisponibilité du NO, associée ou non à un déséquilibre de la balance vasodilatateurs-vasoconstricteurs (Verma et al., 2003, Landmesser et al., 2004 ). La figure 6 illustre le rôle de l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie vasculaire.

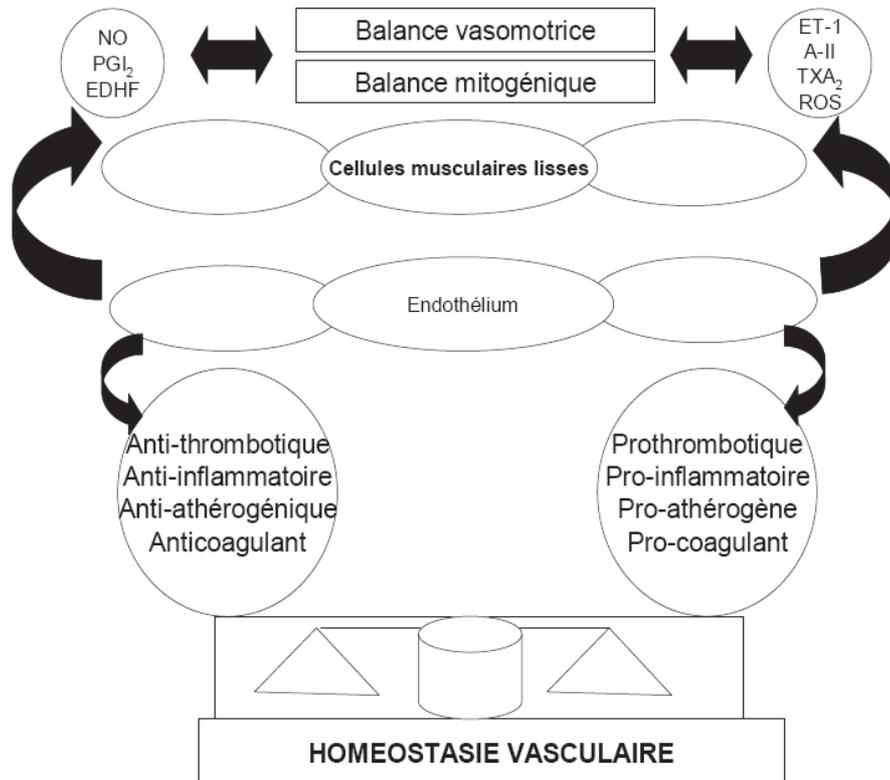


**Figure 5 A.** Libération des facteurs de relaxation d'origine endothéliale. L'activation des récepteurs endothéliaux induit un influx de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le cytoplasme des cellules endothéliales (Vanhoutte et Boulanger, 1995).

Lorsque les agonistes activent les cellules endothéliales, une augmentation de l'inositol phosphate ( $\text{IP}_3$ ) pourrait contribuer à l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique en induisant sa libération par le réticulum sarcoplasmique (SR). Après interaction avec la calmoduline, le  $\text{Ca}^{2+}$  active la NO synthase (NOS) et entraîne la libération de facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF). L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  accélère également la formation de prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) à partir de l'acide arachidonique (AA) par la voie de la cyclooxygénase. Le NO provoque la relaxation en activant la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir du guanosine triphosphate (GTP). La prostacycline provoque la relaxation en activant la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). L'EDHF provoque l'hyperpolarisation et la relaxation en ouvrant les canaux  $\text{K}^+$  activés par le calcium.



**Figure 5 B.** Voie NO-GMP<sub>c</sub>- dépendante dans les cellules musculaires lisses (Savineau, 2008) RyR : canaux sensibles à la ryanodine et activés par le calcium ; RIP<sub>3</sub> : Récepteur-canal activé par l'inositol 1, 4, 5 triphosphate ; SERCA : « Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase », ATPases calcium-dépendantes ; GMP<sub>c</sub> : guanosine monophosphate cyclique ; hyperpol : hyperpolarisation ; Ca<sub>v</sub> : canal calcique voltage-dépendant ; K<sub>Ca</sub> : canal potassique activé par le calcium ; MLCK : « Myosin Light Chain Kinase » ; MLCP : « Myosin Light Chain Kinase Phosphorylate ».



**Figure 6.** Rôle de l'endothélium vasculaire dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (Verma et al., 2002). Les substances vasoactives libérées par les cellules endothéliales agissent de concert pour maintenir la vasomotricité, la prolifération des cellules musculaires lisses, la thrombose, l'inflammation, la coagulation et la fibrinolyse. Monoxyde d'azote (NO), prostacycline (PGI<sub>2</sub>), facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF), endothéline-1 (ET-1), angiotensine II (A-II), thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS).

### I.4.3 Stress oxydatif et hypertension artérielle

#### I.4.3.1 Radicaux libres et stress oxydatif

##### I.4.3.1.1 Définition

Les radicaux libres (RL) sont des espèces chimiques paramagnétiques instables caractérisées par un électron non apparié ou "célibataire" sur leur orbitale externe : cet électron est conventionnellement représenté par un point " • ". Les RL tendent soit à perdre leur électron libre (radicaux réducteurs), soit à en gagner un autre (radicaux oxydants), et génèrent ainsi d'autres radicaux libres dans des réactions en chaîne qui ne s'arrêtent que lorsque deux radicaux se rencontrent ou rencontrent un système de détoxification approprié.

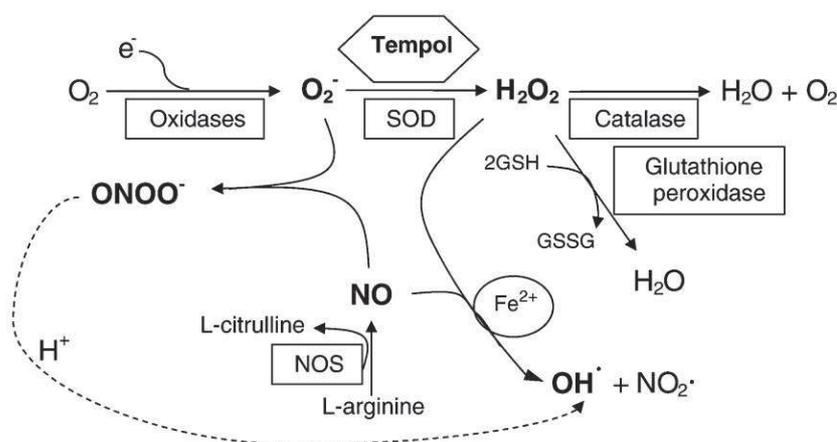
Les RL sont synthétisés de façon physiologique dans notre organisme mais leur taux est cependant rigoureusement contrôlé par des antioxydants. Quand ce précaire équilibre est rompu, en faveur des RL, il survient un stress oxydatif. Un stress oxydatif est donc causé, soit par une baisse de l'activité antioxydante, soit par une augmentation de production de RL (Favier, 2003).

### I.4.3.1.2 Principaux radicaux libres

Les espèces radicalaires les plus importantes dans les processus biologiques sont les radicaux libres oxygénés et le monoxyde d'azote (Halliwell, 1996 ; Halliwell, 1997).

#### I.4.3.1.2.1 Les dérivés activés de l'oxygène

Les espèces actives de l'oxygène (EAO) sont formées à la suite d'une réaction impliquant le dioxygène ( $O_2$ ) : la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. On distingue : l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) et les radicaux alkyle ( $R^{\bullet}$ ), alkoxy ( $RO^{\bullet}$ ) et alkylperoxy ( $ROO^{\bullet}$ ). La figure 7 résume les réactions conduisant à la production des principales EAO.



**Figure 7.** Espèces actives de l'oxygène et espèces antioxydantes (Simonsen et al., 2009). Les plus importants ERO dans les cellules vasculaires sont écrits en gras. Un électron est transféré à l'oxygène, qui est transformé en superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ). La superoxyde dismutase (SOD) et le tempol convertissent le superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui peut être converti en radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) en présence de fer réduit ( $Fe^{2+}$ ). Le superoxyde peut également réagir avec l'oxyde nitrique ( $NO$ ) pour former le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ), qui est instable à un pH inférieur à 8, et donc se décompose rapidement en radical hydroxyle. Il ya concurrence entre le  $NO$  et le peroxyde d'azote pour l' $O_2^{\bullet-}$ . GSH : glutathion réduit, NOS : NO synthase, GSSG : glutathion oxydé,  $H^+$  : proton  $H^+$ .

#### I.4.3.1.2.2 Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ( $NO$ ) est produit sous l'action des NO synthases à partir de la L-arginine. Il peut réagir avec d'autres radicaux libres, avec le fer ou avec l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) pour former l'anion peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) (Beckman et al., 1990).

#### I.4.3.1.3 Systèmes antioxydants

L'organisme possède des défenses spécifiques qui sont de type enzymatique ou non enzymatique.

#### **I.4.3.1.3.1 Systèmes de défense enzymatiques**

Trois enzymes forment la clé de voûte de ce système antioxydant. Il s'agit de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase (GPx).

Le rôle de la superoxyde dismutase est d'accélérer la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène afin d'empêcher la coexistence de ces deux espèces radicalaires, et par conséquent la génération du radical hydroxyle. La catalase désamorce le potentiel oxydant du peroxyde d'hydrogène en le transformant en eau et en dioxygène. La GPx réduit le peroxyde d'hydrogène en eau et les peroxydes lipidiques instables en acides gras hydroxylés, en utilisant les capacités réductrices du couple glutathion/glutathion disulfide (GSH/GSSG).

Une autre enzyme a un rôle clé dans les systèmes anti-radicalaires enzymatiques, il s'agit de la glutathion réductase ou GR. Le rôle de la GR est de régénérer le glutathion en utilisant le NADPH comme cofacteur.

#### **I.4.3.1.3.2 Systèmes de défense non enzymatiques**

Ces antioxydants sont représentés soit par des substances comme les vitamines C et E, le  $\beta$ -carotène ou provitamine A, les flavonoïdes ou vitamine P, les composés à groupements thiols dont la métallothionéine (Romero-Isart et Vasak, 2002) ou l'homocystéine, les sucres, les acides nucléiques, les acides gras insaturés, les acides aminés à noyau phénol, l'albumine (Bourdon et Blache, 2001).

#### **I.4.3.2 Stress oxydatif, dysfonction endothéliale et hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle est caractérisée par une augmentation des résistances vasculaires périphériques. Le rétrécissement luminal des artères de résistance du soit à l'augmentation du tonus vasculaire ou à la rénovation structurelle contribue à l'augmentation des résistances (Mulvany et al., 1996). L'élévation du tonus vasculaire est une conséquence de la vasoconstriction accrue et/ou de la réduction de la vasodilatation des petites artères. En effet, la vasoconstriction induite par une série d'agonistes (par exemple l'angiotensine II, l'endothéline, l'U46619) est considérée comme médiée au moins en partie par la formation de superoxyde ( $O_2^-$ ) (Rajagopalan et al., 1996 ; Cai et al., 2003) ; tandis que la vasodilatation réduite des vaisseaux sanguins chez l'animal hypertendu est attribuée à l' $O_2^-$  réagissant avec le monoxyde d'azote (NO) (Cai & Harrison, 2000). L'augmentation de niveaux de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) associée à la réduction de la biodisponibilité de NO semble jouer un rôle de premier plan dans la réduction de la vasodilatation endothélium-

dépendante dans les artères de patients et d'animaux hypertendus (Feletou et Vanhoutte, 2006b).

L'élévation de la pression artérielle est ainsi associée à l'augmentation du stress oxydant et des espèces réactives de l'oxygène dans le lit vasculaire qui résulte de la dysfonction endothéliale. L'une des causes de cet état est la réduction de la vasodilatation médiée par le monoxyde d'azote (NO) qui est également un marqueur de la sévérité des maladies cardiovasculaires. On suppose souvent que les antioxydants récupèrent simplement le superoxyde, ce qui augmente la disponibilité du NO fonctionnel (Li et al., 2002). De ce fait, l'amélioration de la vasodilatation endothélium-dépendante est un objectif important dans le traitement antihypertenseur (Simonsen et al., 2009).

## **I.5 Quelques modèles expérimentaux d'hypertension artérielle**

L'HTA est une maladie multifactorielle, polygénique qui implique des interactions complexes entre les mécanismes homéostatiques génétiquement déterminés et les facteurs environnementaux (Takahashi et Smithies, 2004). De ce fait, son exploration nécessite des modèles expérimentaux d'animaux. La complexité de cette pathologie exige l'utilisation de différents modèles animaux ayant subi des modifications génétiques, physiologiques ou nutritionnelles (Bakris et Mensah, 2003).

### **I.5.1 Modèles génétiques de l'hypertension artérielle**

Les modèles génétiques de l'HTA ont pour but d'approcher les conditions physiopathologiques de l'hypertension essentielle chez l'homme (Lerman et al., 2005). Les rats spontanément hypertendus (SHR), le rat Dahl sensibles au sel, les rats hypertendus de Milan sont très utilisés dans l'étude de l'influence du facteur génétique sur la pression artérielle. La différence entre ces modèles réside dans le degré d'altération génétique et cellulaire de la régulation de la pression artérielle (Lerman et al., 2005)

Le modèle de rats SHR représente la reproduction la plus fidèle de l'hypertension essentielle chez l'homme (Pinto et al., 1998). La modification de 1 à 6 gènes est responsable de l'élévation de la pression artérielle chez ces rats (Kurtz et al., 1990). Leurs rats contrôles normotendus sont les rats Wistar Kyoto (WKY). Cette hypertension est caractérisée par une augmentation du taux de rénine plasmatique, des dysfonctions endothéliale et rénale, une hypertrophie et une insuffisance cardiaques. Outre l'étude de la physiopathologie de l'hypertension essentielle, ce

modèle est d'une grande utilité dans l'étude et dans l'évaluation de l'efficacité des nouveaux agents hypotenseurs (Yamori et al., 1992).

Les rats SHR "stroke prone" sont issus de la reproduction des SHR et développent une hypertension sévère associée aux lésions cérébrovasculaires et hémorragies cérébrales dans 80% des cas (Okamoto et Aoki, 1973). Ce modèle peut être utilisé dans l'étude des complications de l'HTA essentielle.

On distingue également le modèle de rats hypertendus lyonnais à faible taux de rénine, et forte sensibilité à l'angiotensine II (Vincent et al., 1980) ; et le modèle de rats hypertendus de Milan, avec altération du métabolisme hydro-sodé rénal (Bianchi et al., 1975).

Contrairement aux rats SHR, la modification de l'alimentation contribue au développement de l'hypertension du modèle Dahl sensible au sel (Deng, 1998). En effet, une alimentation riche en sel (8% NaCl) contribue au développement de l'hypertension chez les rats Dahl sensibles au sel (Pinto et al., 1998). Parallèlement on distingue les rats Dahl résistants au sel (Dahl et al., 1962). Il ya modification des gènes de l'enzyme de conversion et du peptide natriurétique auriculaire. Ces rats présentent une altération de la fonction endothéliale, une dysfonction rénale, un taux de rénine bas, une surcharge volémique, une hypertrophie ventriculaire gauche et une insuffisance cardiaque précoce (Deng, 1998). Ce modèle est donc très utile pour l'étude de l'effet de l'alimentation et des facteurs génétiques sur le développement de l'hypertension (Takahashi et Smithies, 2004).

En plus des modèles précités qui sont naturellement génétiques, on distingue également des modèles génétiques induits par des manipulations, ce sont les rats transgéniques (TGR) ou « (mRen2)<sup>27</sup> » issus de l'introduction et la surexpression chez le rat du gène de souris codant pour la rénine (Ren-2). Ils sont caractérisés par une dysfonction endothéliale et une hypertrophie cardiaque. Ce modèle est utile dans l'étude du système rénine-angiotensine-aldostérone (Paul et Jurgen, 1994).

### **I.5.2 Modèles non génétiques d'hypertension artérielle**

Les modèles d'hypertension non génétiques sont des modèles d'hypertension artérielle secondaire.

#### **I.5.2.1 Modèles d'hypertensions chirurgicaux**

Le modèle de Goldblatt consiste en une constriction partielle de l'un ou des deux artères rénales chez le rat. Ceci stimule la production de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires entraînant la formation de l'angiotensine II et

l'augmentation de la pression artérielle. Le système rénine angiotensine joue un rôle très important dans le développement et le maintien de l'hypertension artérielle dans ce modèle animal (Cervenka et al., 2002).

Une néphrotomie unilatérale avec une sténose de l'artère rénale permet la réalisation d'un modèle animal de Goldblatt à rein unique connu sous le nom de « one kidney, one clip rat (1K1C) » (Pinto et al., 1998). Ce modèle est caractérisé par une augmentation importante du volume plasmatique et de la pression artérielle. On distingue également le modèle de Goldblatt à deux reins avec une néphrotomie bilatérale et une sténose de l'artère rénale, modèle connu sous le nom de «two kidneys one clip 2K1C » (Van Epps, 2005). Dans ce cas, les rats présentent une dysfonction endothéliale, une hypertrophie cardiaque et l'activité de la rénine plasmatique est significativement augmentée (Goldblatt, 1960).

### **I.5.2.2 Modèles d'hypertension non chirurgicaux**

#### **I.5.2.2.1 Modèle d'hypertension induite par réduction de la masse rénale**

La physiopathologie de l'HTA est très liée au dysfonctionnement de la fonction rénale; 90% des personnes à insuffisance rénale sont des hypertendus (Hall, 2003). En pratique, une ablation de 60% de la masse rénale chez le rat provoque l'apparition d'une hypertension artérielle avec une augmentation du taux d'urée et de créatinine plasmatique (Bohr et Dominiczak, 1991). Une augmentation de l'apport en sel exacerbe l'augmentation de la pression artérielle. C'est un modèle sodium-dépendant avec un taux de rénine plasmatique très faible (Cervenka et al., 2002).

#### **I.5.2.2.2 Modèle d'hypertension d'origine endocrine**

Il s'agit de l'HTA induite par l'acétate de déoxycorticostérone (DOCA). Les minéralocorticoïdes sont des hormones secrétées au niveau de la corticosurrénale, actives sur le métabolisme de sodium, du potassium et de l'eau, ils contribuent au maintien de la pression artérielle (Bohr et Dominiczak, 1991). L'HTA induite par le DOCA est dépendant du sel. (Oparil et al., 2003 ; Webb, 2003). Le DOCA est implanté en sous-cutané, et l'eau de boisson est remplacé par du NaCl à 1%. Il ya augmentation de la réabsorption hydro-sodée et donc, de la volémie ; et augmentation de la sécrétion de la vasopressine entraînant une élévation de la rétention de l'eau et la vasoconstriction (Dahl, 1960 ; Hakim et Goyal, 2000).

### **I.5.2.2.3 Modèles d'hypertension pharmacologiques**

L'administration chronique par voie orale d'un inhibiteur de la synthèse de monoxyde d'azote (NO), le Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), induit une augmentation de la pression artérielle chez le rat (Naseem, 2005). De même, l'inhibition de la synthèse du NO avec le NG-monomethyl-L-arginine (LNMA), induit une forte augmentation de la pression artérielle (Rees et al., 1989).

L'angiotensine II (0,7 mg/kg/j, s.c) provoque une hypertension artérielle secondaire au bout de 4 à 8 semaines (Georbea-Oppliger et al., 1992).

L'hypertension est produite par administration de chlorure de cadmiun (1 mg/kg/j, i.p) pendant deux semaines (Rathod et al., 1997).

### **I.5.2.2.4 Modèles d'hypertension nutritionnels**

Des données épidémiologiques montrent que dans une population donnée, la prévalence de l'HTA augmente avec l'augmentation de la consommation de sel (Badyal et al., 2003). L'ingestion chronique de sel à l'excès produit l'hypertension chez les rats (Dahl, 1960). L'hypertension d'origine saline a été obtenue chez le rat, le lapin et le poussin en remplaçant l'eau de boisson par la solution de chlorure de sodium (1-2%) pendant 9 à 12 mois (Boura et Green, 1964 ; Rathod et al., 1997).

L'abus d'alcool est un facteur contribuant à l'élévation de la pression artérielle et serait la cause la plus courante d'HTA secondaire. L'hypertension due à l'abus d'alcool est réversible, au moins temporairement et contribue à l'augmentation du risque des complications cardiovasculaires observées chez les alcooliques (Luther, 1985). Expérimentalement, une hypertension artérielle est observée par administration orale d'éthanol (20-30%, v/v) à la dose de 4g/kg à partir de la 8<sup>eme</sup> semaine de traitement chez les rats (Husain et al., 2005). Cette hypertension artérielle serait due à l'augmentation de la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, la stimulation du système nerveux sympathique (Chan, 1982), et un mécanisme myogénique impliquant l'altération des propriétés relaxantes du muscle lisse vasculaire (Chan et al, 1985). L'altération de l'activité baroreflexe serait également impliquée (Abdel-rahman et al., 1985).

Une diète riche en fructose (Bunnag et al., 1997 ; Cosenzi et al., 1999) induit l'hypertension artérielle. L'administration de fructose 60% provoque une élévation significative de la pression artérielle chez les rats sprague Dawley à partir de la 3<sup>eme</sup> semaine (Delbosc et al., 2005). De même, un régime riche en glucose induit l'hypertension artérielle et l'insulinorésistance par le biais du stress oxydatif vasculaire (Kaufman et al., 1991 ; Bunnag et al., 1997 ; Vasdez et al., 2000).

L'élévation de l'insulinémie induite par ces glucides simples (fructose et glucose) y contribue sans doute par les mécanismes d'action de l'insuline sur la rétention sodée et l'activation sympathique. Le glucose à 10 % dans l'eau de boisson (El Midaoui et De Champlain, 2002) induit l'hypertension artérielle expérimentale chez des rats Wistars au bout de 3 semaines.

Au cours du présent travail, les modèles d'hypertension artérielle induits par l'éthanol et le glucose seront étudiés comme modèles d'étude de l'hypertension artérielle secondaire.

En médecine moderne, il existe plusieurs approches pour le traitement des pathologies hypertensives.

## **I.6 Traitements de l'hypertension artérielle**

### **I.6.1 Différents types de traitements**

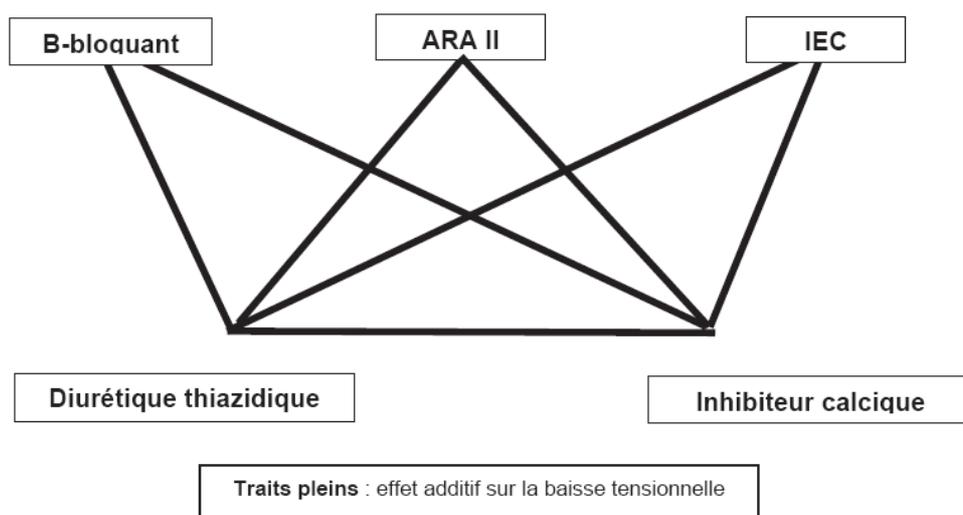
Le traitement de l'hypertension artérielle est de deux types : pharmacologique et non pharmacologique.

Le traitement non pharmacologique repose sur des mesures hygiéno-diététiques recommandées chez des patients hypertendus quel que soit le niveau tensionnel, avec ou sans traitement pharmacologique associé. Ces mesures comprennent :

- la limitation de la consommation de sel (Chlorure de sodium, NaCl) ;
- une réduction du poids en cas de surcharge pondérale, de façon à maintenir un indice de masse corporelle (IMC) en dessous de 25 kg/m<sup>2</sup>.
- la pratique d'une activité physique régulière adaptée à l'état clinique du patient d'au moins 30 min environ, 3 fois par semaine ;
- la limitation de la consommation d'alcool à moins de 3 verres de vin ou équivalent par jour chez l'homme et 2 verres de vin ou équivalent par jour chez la femme ;
- l'arrêt du tabac, associé si besoin à un accompagnement du sevrage tabagique ;
- un régime alimentaire riche en légumes, en fruits et pauvre en graisses saturées (graisses d'origine animale) (HAS, 2005).

Le traitement pharmacologique comprend différents antihypertenseurs tels que les diurétiques, les bêta-bloquants, les antagonistes calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, les alpha-bloquants. Dans l'HTA non compliquée, 5 classes

d'antihypertenseurs majeurs (diurétiques, bêta-bloquants, inhibiteurs calciques, inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II)) ont montré un bénéfice sur la morbi-mortalité cardiovasculaire, dans les essais cliniques (Goyal et McFadyen 2006). Ces différents traitements ont été utilisés pour gérer et atténuer les symptômes de l'hypertension artérielle (Goyal et McFadyen 2006). Cependant, l'efficacité de ces médicaments est seulement de 40-60% et, en général, deux ou trois médicaments antihypertenseurs de différentes catégories doivent être combinés pour obtenir un résultat optimal. Dans toutes ces possibilités, le recours à la trithérapie doit comprendre un diurétique thiazidique. La figure 8 illustre l'association des classes thérapeutiques favorisant la baisse tensionnelle. Les autres classes d'antihypertenseurs (alpha bloquants et antihypertenseurs centraux) n'ayant pas démontré leur efficacité sur la morbi-mortalité cardio-vasculaire, ne sont pas recommandées mais peuvent aider à atteindre l'objectif tensionnel en cas d'effets indésirables ou à compter du stade de trithérapie (HAS, 2005). Le développement d'une manière sûre et efficace pour gérer l'hypertension est une préoccupation des chercheurs depuis des siècles (Yeh et al., 2009). De plus, le choix d'un traitement médicamenteux sera adapté à chaque patient en fonction de l'efficacité et de la tolérance des médicaments vis-à-vis de l'origine du patient. En effet, à partir d'études menées chez des patients afro-américains et africains des caraïbes, il apparaît que l'HTA chez ces patients est plus sensible aux diurétiques et aux inhibiteurs calciques qu'aux classes thérapeutiques agissant sur le système rénine-angiotensine (IEC, ARA-II) ou qu'aux bêta-bloquants (HAS, 2005).



**Figure 8.** Association des classes thérapeutiques favorisant la baisse tensionnelle (HAS, 2005). ARA II : antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II ; IEC : inhibiteurs de l'enzyme de conversion.

Les effets secondaires de ces médicaments constituent une préoccupation importante.

### **I.6.2 Intérêt de la médecine traditionnelle par les plantes dans la prise en charge de l'hypertension artérielle**

Les plantes, utilisées depuis des temps immémoriaux par l'homme pour se soigner constituent un volet primordial de la médecine traditionnelle (MTR) dans de nombreux pays. L'OMS définit la médecine traditionnelle comme étant « ...la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales. Dans certains pays, les appellations médecine parallèle/alternative/douce sont synonymes de médecine traditionnelle » (OMS, 2000).

Les statistiques de l'OMS révèlent qu'en Afrique, jusqu'à 80 % de la population utilise la MTR pour répondre à ses besoins de soins de santé. En Asie et en Amérique latine, les populations continuent d'utiliser la MTR en raison de circonstances historiques et convictions culturelles. En Chine, la MTR représente 40 % des soins de santé administrés. Ce phénomène n'est pas seulement limité aux pays en voie de développement puisque, dans le même temps, dans de nombreux pays développés, cette même médecine plutôt nommée sous le terme de médecine complémentaire (MCP) gagne en popularité. Le pourcentage de population ayant utilisé la MCP au moins une fois se chiffre à 48 en Australie, 70 au Canada, 42 aux États-Unis, 38 en Belgique et 75 en France (OMS, 2002). Aux États-Unis, les plantes médicinales entrent dans 25% des ordonnances délivrées par les pharmaciens communautaires (Phillipson, 2007).

Au Cameroun, de nombreuses études ont contribué à la connaissance des plantes médicinales. Les auteurs ont travaillé avec des tradi-praticiens, ou médecins traditionnels, qui faisaient des récoltes dans les différentes formations végétales de leur zone d'influence. Ces études sont toujours poursuivies et ont déjà inventorié plus de 500 espèces de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle et dont la pharmacopée camerounaise fait état. Les résultats desdites études montrent que les espèces inventoriées rentrent dans le traitement de diverses pathologies, telles que: affections de la rate, alcoolisme, anémie, Interruption Volontaire de la Grossesse (IVG), bilharziose, bronchite, asthme, brûlures diverses, carie dentaire, odontalgie,

céphalées, constipation, diabète, diarrhée d'origines diverses, diarrhée du nouveau-né, diarrhée dysentérieforme, douleurs thoraciques, éléphantiasis, hypertension artérielle, hypogalactite et insuffisance cardiaque (Jiofack et al., 2009).

Partout dans le monde, les plantes utilisées pour le traitement de l'hypertension artérielle sont nombreuses et issues de diverses familles botaniques, mais force est de constater que peu d'études concernant leur efficacité ont été menées. Nous pouvons, à titre d'exemple, citer : les extraits ou infusions préparées à partir de l'écorce de la tige de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae), utilisés dans la médecine traditionnelle de l'hypertension artérielle (Di Stasi et al., 1989). Les études chimiques des écorces de cette plante ont conduit à l'isolement de plusieurs diterpènes tels que le trans-déhydrocrotonine, qui présente une activité vasorelaxante (Guerrero et al., 2004). *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees (Acanthaceae) porte la réputation de médicament efficace dans le traitement de l'hypertension artérielle (Ahmad et Asmawi, 1993). L'extrait aqueux de *A. paniculata* diminue la pression artérielle chez le rat (Zhang et Tan, 1996) ; une réponse qui est induite par le 14-déoxyandrographolide, un diterpène isolé de cette plante, et qui a montré un effet hypotensif et bradycardique chez le rat anesthésié (Zhang et al., 1998). *Bidens pilosa* (Asteraceae) est exploitée en Afrique tropicale et en Amérique centrale pour le traitement de divers troubles cardiovasculaires, en particulier l'hypertension artérielle et les troubles rénaux (Dimo et al., 1998, Dimo et al., 2003) ; *Morus alba* (Moraceae) est utilisée en Chine et au Japon pour réduire la pression artérielle (Manli et al., 2008) ; *Curcuma longa* (Zingiberaceae) est d'usage en Asie du sud et en Afrique de l'ouest pour des désordres vasculaires et l'hypertension artérielle (Adaramoye et al., 2009) ; *Adenantha pavonina* (Leguminosae) est utilisée en Afrique orientale et occidentale, au îles du pacifique et carribéenes, en Chine et en Inde pour les soins des affections cardiovasculaires chez la femme enceinte (Adedapo et al., 2009).

Les rapports réalisés sur la médecine traditionnelle par l'OMS soulignent l'importance de la médecine traditionnelle et encouragent la mise au point de batterie de protocoles standards pour la réalisation des enquêtes ethnopharmacologiques et les travaux expérimentaux permettant de valider les utilisations traditionnelles. (Kim, 2005).

## **I.7 Etudes toxicologiques**

Comme nous l'avons vu précédemment, le recours à la médecine traditionnelle, et en particulier aux plantes, revient au goût du jour partout dans le

monde. Cet intérêt grandissant fait que les autorités sanitaires accordent de plus en plus d'importance à l'efficacité et l'innocuité des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle. C'est pourquoi l'OMS a rédigé, en 2000, (OMS, 2000) un rapport sur les principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle, dans lequel une partie est dédiée aux plantes issues de la médecine traditionnelle, intégrant un rappel des lignes directrices sur lesquelles s'appuyer pour l'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité ou toxicité potentielle de ces plantes (OMS, 1993).

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives (non mesurables) ou quantitatives (mesurables). Il existe plusieurs types d'études permettant d'évaluer les effets d'un toxique :

- les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus,
- les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (ex. : lapin, rat et souris); Certains organismes de réglementation préconisent l'utilisation d'au moins deux espèces animales, dont l'une appartenant aux rongeurs,
- les études expérimentales *in vitro*, biochimiques ou cellulaires, les études théoriques par modélisation (exemple : structure-activité) (Lapointe, 2004).
- Il est important de préciser, concernant ces différentes méthodes d'évaluation, que l'OMS rappelle que « ...Les données d'innocuité *in vitro* doivent être considérées comme des indicateurs de toxicité potentielle, mais non comme des marqueurs absolus. Les données *in vivo* sur les animaux sont plus indicatives de la toxicité et peuvent être considérées comme des marqueurs d'innocuité ». Cependant, il est également précisé que « Quand il s'agit d'innocuité ou d'efficacité, l'effet pharmacologique observé *in vitro* ou chez des modèles animaux n'est pas nécessairement applicable aux humains ». Dans ce cas, les études épidémiologiques peuvent apporter des éléments pour l'évaluation de la toxicité chez l'homme.

La toxicité des plantes peut être directe (composés de la plante-organe) ou indirecte via la genèse d'interactions avec les médicaments allopathiques ou de phytothérapie (composés de plante-métabolisme d'autres médicaments/xénobiotiques).

### **I.7.1 Toxicité directe**

Concernant les différentes formes de toxicité, la terminologie fréquemment utilisée selon la fréquence et la durée de l'exposition à une substance est la suivante :

- La toxicité aiguë permet de connaître la plus petite dose qui, administrée en une seule prise entraîne la mort de 50% des animaux dans les 24 à 48 heures après le traitement, la durée maximale d'observation étant de 15 jours (Dubick et al., 1993). Elle permet de déterminer la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>).
- Et la toxicité à long terme avec :
  - la toxicité subaiguë ou subchronique, qui permet de déceler les troubles de croissance, d'alimentation, les troubles biochimiques et histologiques secondaires à l'administration continue d'une substance (Diezi, 1992) ;
  - la toxicité chronique, qui permet d'avoir des renseignements sur le degré de toxicité des médicaments qui habituellement sont utilisés de façon répétée par des patients (Cheftel et al., 1989).

Dans le cas de l'évaluation de la toxicité à long terme, la durée d'administration de la substance expérimentale dépendra de la durée d'utilisation clinique prévue. La durée dans le cadre de l'étude de toxicité variera d'un pays à l'autre, selon la réglementation en vigueur (OMS, 2000).

Concernant la dose, il est recommandé de prévoir des groupes pour au moins trois niveaux de dose différents : une dose n'engendrant aucun effet toxicologique (dose sans effet) et une dose entraînant des effets toxicologiques manifestes. Dans cette fourchette, l'adjonction d'au moins un autre niveau de dose augmente la possibilité d'observer une relation dose-réaction. Toutes les études doivent inclure un groupe témoin d'animaux d'expérience chez lequel on n'administre que le véhicule (OMS, 2000).

## **1.7.2 Toxicité indirecte et interactions médicamenteuses**

### **1.7.2.1 Concept d'interactions plantes-médicaments**

Les interactions médicamenteuses peuvent résulter soit d'une inhibition, soit d'une induction, soit d'une compétition entre deux substrats d'une isoenzyme particulière impliquée dans le métabolisme (Michaud et al., 2006). Il en est de même pour certaines plantes médicinales, telles que le Millerpertuis (*Hypericum perforatum*), utilisé sous forme d'extrait pour ses propriétés antidépressives, et pour lequel ont été mises en évidence des propriétés d'inducteur, entraînant des interactions avec des médicaments tels que l'irinotecan, les anticonvulsivants, la carbamazépine et le télithromycine. Cette interaction a pour conséquence une diminution des concentrations thérapeutiques et donc de l'effet thérapeutique de ces

médicaments (Komoroski et al., 2004). Les conséquences cliniques de l'inhibition du métabolisme des médicaments sont une augmentation de la concentration du produit actif et une augmentation de la durée de l'effet thérapeutique avec un risque de toxicité si la formation de métabolites inactifs est ralentie par l'inhibition enzymatique (Loichot et Grima, 2004).

Pour comprendre et prédire les différentes réponses aux médicaments qui peuvent être causées par des interactions médicamenteuses, une connaissance plus approfondie des caractéristiques des différents déterminants majeurs influençant le métabolisme des médicaments est requise.

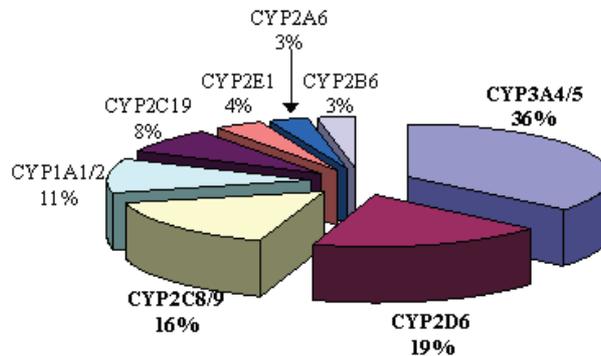
### **I.7.2.2 Généralités sur la biotransformation des médicaments**

Le métabolisme d'un médicament correspond à la transformation par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs composés, dits métabolites qui peuvent être pharmacologiquement actifs ou inactifs ou parfois toxiques. Cette biotransformation est une des phases de l'élimination du médicament (Loichot et Grima, 2004).

Les principales réactions de biotransformation sont des réactions dites de phase I (oxydation, réduction ou hydrolyse). Leur but est de produire un métabolite intermédiaire à caractère électrophile, sur lequel pourra s'exercer une seconde transformation, celle de phase II (conjugaison) qui aboutit à la formation de substances hydrosolubles facilement éliminées par les urines, la bile, la salive ou la sueur (Loichot et Grima, 2004).

### **I.7.2.3 Cytochromes P 450 3A et interactions médicamenteuses**

Les réactions d'oxydation sont les plus fréquemment rencontrées et constituent souvent une étape clé de la biotransformation. Elles ont essentiellement lieu au niveau des microsomes hépatiques et mettent en jeu le cytochrome P450 (CYP) et la NADPH-cytochrome P-450 réductase (Gerbai-Chaloin, 2000). Il existe un grand nombre d'isoenzymes du CYP (57 isoenzymes identifiées en 2004 chez l'Homme) (Loichot et Grima, 2004). La figure 9 présente la répartition des médicaments métabolisés par les différentes isoenzymes de CYPs.



**Figure 9.** Répartition des médicaments métabolisés par les différentes isoenzymes de cytochromes P-450. (Guengerich, 1995).

Certaines substances présentes dans le jus de pamplemousse inhibent le CYP3A4, ce qui augmente la biodisponibilité entre autres de la terfénaire, d'antagonistes du calcium du groupe des dihydropyridines et de la ciclosporine (Simon-Lestang, 2003). Le CYP3A4, est d'une importance capitale puisqu'il est impliqué dans le métabolisme de plus de 50% des médicaments, de même que dans l'activation de substances toxiques et carcinogènes (Michaud et al., 2006).

## I.8 *Terminalia superba*

### I.8.1 Classification

L'espèce *Terminalia superba* (figure 10) appartient à la famille des *Combretaceae*. Cette famille compte environ 18 genres renfermant environ 450 espèces dont à peu près 200 sont du genre *Terminalia*. Le nom latin vient du fait que les feuilles sont groupées en touffes à l'extrémité des rameaux (Groulez et Wood, 1984). La classification de *Terminalia superba* est la suivante (USDA, 2005):

Règne : Végétal

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Combretaceae

Genre : *Terminalia*

Espèce : *superba* (Engler & Diels, 1900)



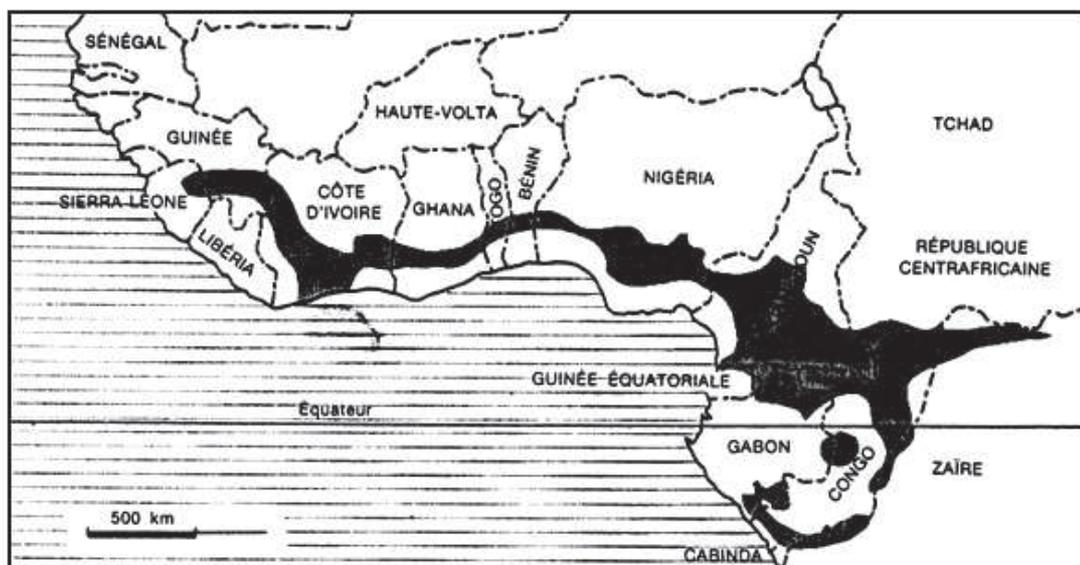
**Figure 10.** Photo de *Terminalia superba*. Photo prise au quartier Mendong-village, Yaoundé-Cameroun, octobre 2009 par Esther Ngo Lemba Tom.

### **I.8.2 Botanique et écologie**

L'espèce *Terminalia superba* est un arbre qui atteint 30 à 40 m de haut, à cime étagée et à contreforts ailés s'élevant à 3-5 m de haut (Pauwels, 1993). Son fût est régulier, très droit et à faible décroissance. Le diamètre au dessus de l'empattement varie en général de 60 cm à 120 cm, sans dépasser 150 cm. La décroissance du diamètre du fût est très régulière et atteint 10 à 12 mm par mètre. Le fût, pour des arbres adultes, peut avoir 20 à 30 m de longueur sans branches.

Selon Groulez et Wood (1984), *T. superba*, qui porte les noms commerciaux de Limba ou Fraké, est une espèce africaine, endémique, des forêts ombrophiles, semi-sempervirentes appartenant à la région phytogéographique guinéenne. Les peuplements à *Terminalia superba* se développent préférentiellement sous une pluviométrie annuelle supérieure à 1500 mm et une saison sèche inférieure à 4 mois. Dans la zone de distribution naturelle du Limba, la température moyenne mensuelle est comprise entre 20 et 28°C. Le *Terminalia superba* est une espèce héliophile. On

le trouve majoritairement entre 150 et 280 m d'altitude, dans des vallées, des pentes de l'ordre de 0,5 à 50 %, des sommets des collines et des bas des pentes. Il préfère des sols alluvionnaires riches et frais, se ressuyant bien, aussi des sols rouges ou rouges violacés développés sur des amphibolites et on le retrouve sur des sols sableux, sablo-argileux bruns ou brun jaune, à pH acide avec un taux élevé de matières organiques. C'est dans ces milieux qu'il atteint son développement maximum. La figure 11 présente les différentes aires naturelles de distribution du *Terminalia superba* en Afrique centrale et occidentale.



**Figure 11.** Aire Naturelle de Distribution du *Terminalia superba* (Groulez et Wood, 1984). Les zones de distribution de *T. superba* sont coloriées en noir.

### I.8.3 Phytochimie

Des études récentes conduites sur *Terminalia superba* ont identifié des dérivés d'acide galliques et ellagiques, des phytostérols, des lignans et des composés triterpenoides (Wansi et al., 2007; Tabopda et al., 2008; Tabopda et al., 2009).

### I.8.4 Usage empirique

Au sud du Cameroun, plusieurs espèces du genre *Terminalia* sont utilisées dans le traitement des gastroentérites, de l'infertilité masculine, des douleurs abdominales et des bronchites (Adjanohoun et al., 1996). Cette plante a des propriétés antipalustres (Mustofa et al., 2000), antidiabétiques (Sabu et Kuttan 2002; Kamtchouing et al., 2005) et cardioprotectrices (Gauthaman et al., 2001). *Terminalia superba* est utilisée dans les régions du sud et du centre du Cameroun dans le traitement du diabète et des troubles cardiovasculaires (Kamtchouing et al., 2005;

Dimo et al., 2006). Les écorces du tronc sont utilisées en décoction dans le traitement de l'hypertension artérielle.

# CHAPITRE II

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

## II.1 Préparation des extraits de plante

Les écorces du tronc de *T. superba* ont été récoltées dans la région de Djoum (Sud Cameroun), en mai 2005. Elles ont été authentifiées à l'herbier national de Yaoundé, par comparaison avec l'échantillon N°19632/HNC, précédemment collecté et identifié par Leuwenberg. Ces écorces ont ensuite été séchées puis broyées, avant extraction.

- **Extrait aqueux**

Une décoction a été obtenue en portant à ébullition pendant 20 minutes 120 g de poudre des écorces de tronc de *T. superba* dans 3L d'eau distillée. Le mélange a été filtré et séché à l'étuve à 50°C, permettant ainsi d'obtenir 27,82g d'extrait aqueux (AQU), soit un rendement de 23,18%.

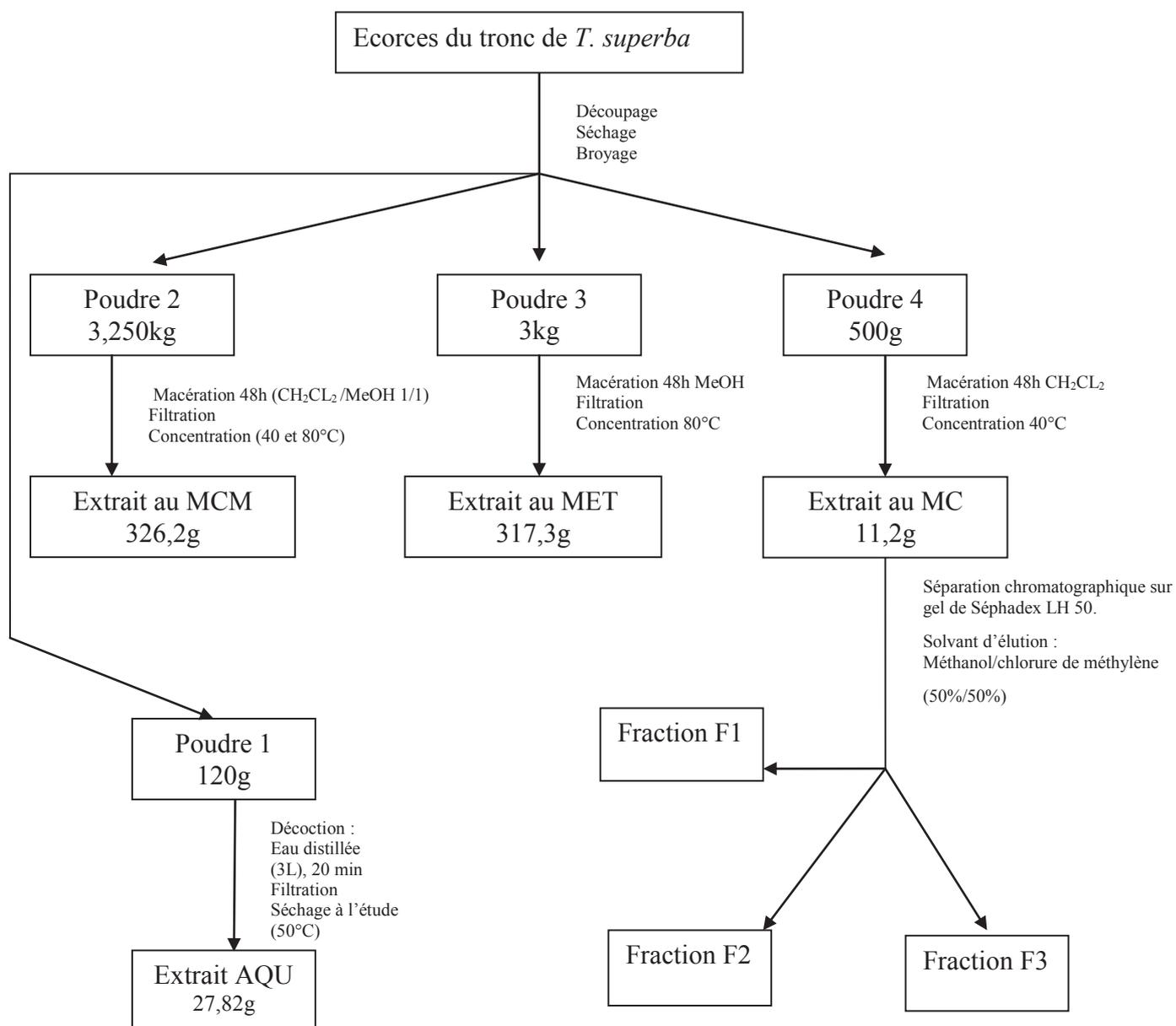
- **Extraits organiques**

Une macération avec 3 kg de poudre des écorces du tronc de *T. superba* a été réalisée dans 6 L de méthanol pendant 48h. Le filtrat a été concentré à une température de 80°C à l'aide d'un évaporateur rotatif, sous pression réduite. Cette opération a permis d'obtenir 317,3 g d'extrait au méthanol (MET), soit un rendement de 10,57%.

L'extrait au chlorure de méthylène ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) / méthanol (MeOH) (MCM) et l'extrait au chlorure de méthylène (MC) ont été obtenus par macérations respectives de 3,250 kg et 500 g de poudre des écorces de tronc de *T. superba* dans 7L, du mélange chlorure de méthylène-méthanol (1 :1, V/V) ou dans 1,5 L de chlorure de méthylène pendant 48h. Après filtration, les solutions extractives obtenues ont été concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif respectivement à 80°C et à 40°C. Il a ainsi été obtenu 326,2 g (10,03%) d'une pâte de couleur marron foncée, représentant l'extrait au MCM et 11,2 g (2,24%), d'une pâte de couleur jaune foncée représentant l'extrait au MC. La figure 12 présente le schéma récapitulatif de la préparation des différents extraits de plante et la séparation chromatographique de l'extrait au chlorure de méthylène.

L'obtention des différentes fractions de l'extrait au MC s'est faite par séparation chromatographique. Pour ce faire, 1g d'extrait au MC était introduit progressivement dans une colonne en gel Séphadex. L'éluant utilisé était le mélange chlorure de méthylène-méthanol (50%/50%). Les différentes fractions obtenues ont été regroupées par affinité après observation de leur migration sur chromatographie sur couche mince. Cette opération a permis d'obtenir trois fractions dénommées respectivement F1, F2 et F3.

Les différentes fractions ont fait l'objet d'essais de dilution pour les tests *in vitro*. A cet effet, la fraction F1 n'ayant pas pu être dissoute n'a pas été étudiée ; les fractions F2 et F3 ont été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).



**Figure 12.** Protocole de préparation des différents extraits et fractions de *T. superba*. AQU : extrait aqueux, MCM : extrait au chlorure de méthylène (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) / méthanol (MeOH), MET : extrait au méthanol, MC : extrait au chlorure de méthylène.

## II.2 Les animaux

Les études pharmacologiques des effets des extraits de *T. superba* ont été réalisées sur des rats mâles de différentes souches en fonction de l'expérimentation et des souris blanches, mâles et femelles.

Des rats albinos de souche Wistar (Animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale, Université de Yaoundé I) âgés de 3 à 4 mois et pesant en moyenne 200 g ont été utilisés pour l'évaluation des effets des extraits sur la pression artérielle :

- des rats normotendus (R.N.T) de souche Wistar ayant une pression artérielle systolique  $\leq 120$  mmHg ;

- des rats albinos de souche Wistar rendus hypertendus au D-glucose (R.H.G) ayant une pression artérielle systolique  $\geq 140$  mmHg. Ce type d'hypertension représente une forme d'hypertension secondaire résultant des facteurs nutritionnels rencontrés chez l'homme.

- des rats de souche Wistar rendus hypertendus à l'éthanol (RHA) dont la pression artérielle systolique était  $\geq 140$  mmHg. Ce type d'hypertension expérimentale représente également une forme d'hypertension secondaire.

Pour l'étude de la réactivité vasculaire, l'expérience a été réalisée sur des rats mâles Wistars (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) de 250 à 350g. Les animaux ont été maintenus dans une salle sous un cycle de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité, avec libre accès à l'eau et à la nourriture.

Des rats spontanément hypertendus (SHR) et leurs contrôles, Wistar Kyoto (WKY) (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) âgés de 11 semaines au début de l'expérience ont été utilisés pour l'évaluation des effets de l'extrait le plus actif. Les SHR avaient une pression artérielle systolique  $\geq 160$  mmHg. Les SHR sont un bon modèle d'étude de l'hypertension essentielle rencontrée chez l'homme.

Pour les tests de toxicité, les animaux utilisés étaient des souris Balb/C de 7 à 8 semaines d'âge des élevages (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) et des souris de même souche élevées à l'Animalerie du laboratoire de Physiologie Animale de l'université de Yaoundé I (Cameroun).

Les différentes manipulations de toxicité ont été réalisées conformément aux instructions du Guide N° 423 de l'OECD de décembre 2001 portant sur les tests de toxicité aiguë de substance administrées aux animaux de laboratoire. Les différentes études ont été réalisées suivant les normes du guide de manipulations et d'usage des animaux de laboratoire publié par l'Institut National de la Santé (NIH publication No. 85-23, révisée en 1996).

## **II.3 Etude des effets des extraits de *T. superba* sur la pression artérielle**

### **II.3.1 Induction expérimentale de l'hypertension artérielle**

#### **II.3.1.1 Hypertension artérielle provoquée par le D-glucose**

L'hypertension artérielle (HTA) induite par le D-glucose est provoquée chez les rats normotendus en leur imposant un régime riche en glucose (El Midaoui et De Champlain, 2002). Deux groupes d'animaux ont été constitués : un lot contrôle et un lot test. Les rats avaient accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson. Les rats traités au glucose ont reçu à volonté une solution de D-glucose 10% dans l'eau de boisson pendant une période expérimentale de trois semaines. La solution de D-glucose était préparée tous les jours par dilution du glucose dans l'eau de boisson. Les animaux contrôle recevaient de l'eau courante. Le poids des rats, la consommation alimentaire et d'eau étaient évalués quotidiennement pendant la durée du traitement. Au terme du traitement, la pression artérielle systolique des rats traités au glucose était supérieure ou égale à 140 mmHg (mesurée par méthode invasive).

#### **II.3.1.2 Hypertension artérielle induite par l'alcool**

L'hypertension artérielle provoquée par l'alcool a été induite chez des rats mâles Wistars normotendus âgés de 8 semaines par surcharge orale d'éthanol. Les animaux ont reçu par voie orale et en prise quotidienne unique de l'éthanol à 35° à la dose de 3 g/kg (à partir de l'éthanol pur) par gavage pendant 8 semaines. Les animaux contrôle ont reçu également par gavage de l'eau distillée (10 mL/kg) pendant toute la période expérimentale. Le poids des animaux était évalué quotidiennement. Après 8 semaines de traitement à l'alcool, tous les animaux étaient hypertendus, avec une pression artérielle systolique (PAS)  $\geq$  140 mmHg. (mesurée par méthode invasive).

### **II.3.2 Dispositifs d'enregistrement des paramètres cardiovasculaires**

L'enregistrement de la PA des animaux a été faite dans cette étude suivant deux techniques expérimentales. La méthode invasive après anesthésie des rats et la méthode non-invasive (pléthysmographique).

#### **II.3.2.1 Méthode invasive ou directe**

La pression artérielle (PA) est évaluée par la méthode invasive (sanglante) encore dite méthode directe. La technique consiste à enregistrer la pression artérielle grâce à un cathéter introduit dans la carotide du rat anesthésié (Van Vliet et al.,

2000). Le cathéter est relié au transducteur connecté à l'enregistreur hémodynamique "Biopac Student Lab" de type MP 35. Le transducteur est un capteur possédant une membrane ultrasensible capable de convertir en signaux électriques, les moindres variations mécaniques de la PA de l'animal. Le dôme du transducteur est rempli de liquide physiologique, de type Mac Even (NaCl 147 mM ; KCl 5,6 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,6 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,66 mM ; CO<sub>3</sub>HNa 11,6 mM ; MgCl<sub>2</sub> 0,24 mM ; Glucose 11 mM) hépariné, de même que la canule qui sera fixée à la carotide de l'animal. Pour un maximum de sensibilité, ce système est débarrassé de toute bulle d'air. Un enregistreur hémodynamique "Biopac Student Lab" MP 35 connecté au transducteur envoie les signaux vers un ordinateur contenant le logiciel "Biopac Student Lab" 3,7 qui visualise les différents tracés enregistrés (Figure 13). La fréquence cardiaque (FC) était mesurée par le même dispositif et visualisée au même moment que la PA.



**Figure 13.** Dispositif d'enregistrement de la pression artérielle par voie directe. 1 : transducteur ; 2 Biopac « MP 35 » ; 3 : ordinateur ; 4 : potence réglable.

### II.3.2.2 Méthode pléthysmographique ou indirecte

La pression artérielle des rats spontanément hypertendus a été enregistrée par la méthode pléthysmographique ou indirecte. Le système d'enregistrement est un ensemble « Visitech BP 2000 » qui permet de mesurer la pression de 4 rats simultanément. Cet ensemble comprend :

- une plate-forme magnétique chauffante avec 4 manchons, 4 tunnels et 1 thermomètre ;
- une unité de contrôle, qui contrôle la température de la plate-forme et le gonflage des manchons ;

- un ordinateur portable avec le logiciel BP-2000 Blood Pressure Analysis (version 2004) permettant de visualiser les variations de pression et de FC.

Avant chaque enregistrement, la veine caudale est dilatée grâce au passage des rats dans un sauna pendant 5 min. Les rats sont ensuite placés dans les cellules de contention, et le capteur de pression inséré sur la queue. Une fois le signal de pression détecté, les variations de pression sont visualisées sur l'écran de l'ordinateur, de même que les valeurs de pression et de fréquence cardiaque correspondantes.

### **II.3.3 Etude des effets aigus de l'extrait aqueux**

Les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'uréthane (15% ; 1,5 g/kg). La trachée a été exposée et canulée pour faciliter la respiration spontanée. La veine fémorale droite a été intubée avec un cathéter en polyéthylène, suivie d'une injection d'héparine (10 %, 0,1 mL/100 g de poids corporel). Un autre cathéter a été inséré dans la carotide gauche connectée au transducteur de pression (Biopac Student Lab MP 35), permettant d'obtenir les signaux de pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Une période de stabilisation de 30 minutes a été nécessaire avant l'administration de la substance étudiée à travers le cathéter placé à demeure dans la veine fémorale (Dimo et al., 2003). Après la période d'équilibration, les effets aigus de l'extrait aqueux ont été évalués chez les rats normotendus et les rats rendus hypertendus au glucose (RHG). Dans cette étude, l'extrait ou les substances pharmacodynamiques étudiées ont été administrées à travers la veine fémorale sous un volume de 0,1 mL/100 g de poids corporel. Les effets de l'extrait aqueux ont été évalués aux doses de 10, 15 et 20 mg/kg chez les RNT et de 15, 20 et 40 mg/kg chez les RHG. L'activité de chaque dose était évaluée sur 5 rats. Après administration de l'extrait, l'effet sur la variation de la PA était observé pendant 1h. Le solvant de l'extrait était également administré dans les mêmes conditions.

En vue de déterminer les mécanismes d'action hypotensifs de l'extrait aqueux de *T. superba* chez les RNT, les effets de cet extrait ont été évalués sur la PA, cinq minutes après administration de l'atropine (1 mg/kg), du propranolol (100 µg/kg) ou de yohimbine (0,1 mg/kg). L'intégrité des récepteurs a été vérifiée en évaluant les effets du propranolol en présence de l'isoprénaline (10 µg/kg) ou de l'atropine en présence de l'acétylcholine (10 µg/kg). Dans une autre série d'étude, les effets de l'extrait ont été évalués chez les rats réserpinés. La réserpine (5 mg/kg) était préalablement administrée par gavage pendant 3 jours aux RNT et l'effet de l'extrait (15 mg/kg, i.v) déterminé au quatrième jour.

### **II.3.4 Etude des effets préventifs de l'extrait aqueux de *T. superba***

Les effets préventifs de l'extrait aqueux de *T. superba* ont été évalués pendant 3 semaines sur l'HTA induite par le D-glucose et pendant 8 semaines sur l'HTA induite par l'éthanol 35°.

#### **II.3.4.1 Effets préventifs de l'extrait aqueux sur l'HTA induite par le glucose**

Des rats mâles normotendus âgés de 8 semaines ont été répartis en cinq groupes de 5 rats chacun. Les rats des lots témoins ont reçu de l'eau distillée (lot 1), une solution de glucose à 10% (lot 2), ou une solution de glucose à 10% et la nifédipine à la dose de 10 mg/kg administrée par gavage (lot 3). Les rats des groupes essais ont reçu comme eau de boisson une solution de glucose à 10% et, par gavage, l'extrait de plante, aux doses respectives de 50 et de 100 mg/kg/jour (lot 4 et lot 5). La durée de l'expérimentation était de 3 semaines. A la fin de la période expérimentale, le poids corporel, la pression artérielle et la fréquence cardiaque ont été déterminés comme précédemment décrit. Plusieurs marqueurs du stress oxydatif (malondialdéhyde, glutathion réduit, superoxyde dismutase) au niveau tissulaire (cœur, foie, rein, aorte) ont été évalués à la fin de cette étude

#### **II.3.4.2 Effets préventifs de l'extrait aqueux sur l'HTA induite par l'alcool**

Cinq lots de 5 rats chacun ont été constitués. Les animaux des lots témoins ont reçu respectivement par gavage de l'eau distillée (10 mL/kg), de l'éthanol 35° (3 g/kg) ou de l'éthanol (3 g/kg) et la solution de nifédipine (10 mg/kg). Les rats des lots tests ont reçu concomitamment de l'éthanol 35° à la dose de 3 g/kg et l'extrait aqueux de *T. superba* à la dose de 100 ou de 200 mg/kg. Les différentes substances étaient administrées en dose quotidienne unique pendant 8 semaines. A la fin de la période expérimentale, le poids corporel, la pression artérielle et la fréquence cardiaque ont été déterminés comme précédemment décrit. Les rats ont été également sacrifiés par exsanguination. Le sang artérioveineux a été collecté, laissé au repos pendant 30 minutes, puis centrifugé à 1500 trs/min. Le sérum collecté a été conservé à une température de -20°C. Le cœur, le foie, l'aorte ainsi que les reins ont été prélevés, et les homogénats préparés comme précédemment décrit pour l'évaluation de paramètres du stress oxydatif (malondialdéhyde, glutathion réduit, catalase, superoxyde dismutase, monoxyde d'azote). Plusieurs paramètres sériques (transaminases, triglycérides, cholestérol total, créatinine, bilirubine totale) ont également été dosés.

### **II.3.5 Etude des effets curatifs de l'extrait aqueux sur l'HTA induite par l'alcool**

Les rats rendus expérimentalement hypertendus par ingestion chronique de l'éthanol 35° (3 g/kg) pendant 8 semaines et présentant une PAS $\geq$ 140 mmHg ont été traités durant 4 semaines consécutives avec l'extrait aqueux de *T. superba*.

Les rats hypertendus à l'alcool ont été répartis en quatre lots de cinq rats chacun. Les rats des lots contrôle ont reçu de la 8<sup>ème</sup> à la 12<sup>ème</sup> semaine l'éthanol (3 g/kg/j) ou l'éthanol (3 g/kg/j) et la nifédipine (10 mg/kg/j). Le lot contrôle neutre a continué à recevoir de l'eau distillée (10 mL/kg). Les animaux des lots essais ont reçu pendant la même période expérimentale concomitamment l'éthanol (3 g/kg/j) et l'extrait de plante (100 ou 200 mg/kg/j). A la fin de la période expérimentale, la pression artérielle et la fréquence cardiaque ont été enregistrées par la méthode directe comme précédemment décrit. Le sérum et les homogénats d'organes ont été également préparés et conservés pour les analyses des paramètres biochimiques (glutathion réduit, malondialdéhyde, monoxyde d'azote, superoxyde dismutase).

### **II.3.6 Evaluation de marqueurs du stress oxydatif**

Après enregistrement de la pression artérielle, le sang artérioveineux a été prélevé et laissé au repos pendant 30 min puis centrifugé à 1500 trs/min. Le sérum a été aliquoté et conservé à -20°C pour des analyses biochimiques ultérieures. La cavité abdominale de l'animal était ensuite ouverte. Le cœur, le foie, les reins et l'aorte ont été prélevés et homogénéisés (20 %) dans du tampon Tris-HCl 50 mM (foie et reins) ou le Mac Even (cœur et aorte). Les homogénats ont été conservés à -20°C pour des dosages ultérieurs.

#### **II.3.6.1 Dosage de la superoxyde dismutase (Misra et Fridovich, 1972).**

##### **Principe**

La présence de la superoxyde dismutase (SOD) dans l'échantillon inhibe l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome. L'augmentation de l'absorbance qui est proportionnelle à l'activité de la superoxyde dismutase est mesurée entre 20 et 80 s à 480 nm.

##### **Mode opératoire**

134  $\mu$ L d'homogénat ont été introduits dans la cuve à spectrophotométrie pour les essais et 1666  $\mu$ L de tampon carbonate dans la cuve témoin. L'adrénaline (0,3 mM ; 0,2 $\mu$ L) a été ajoutée dans chaque cuve pour déclencher la réaction. Chaque tube a été homogénéisé par inversion rapide de la cuve. La densité optique (DO) a

été déterminée à 20 et à 80 s. L'activité spécifique de la SOD a été exprimée en unité de SOD/ mg de protéine. (Les protéines ont été évaluées par la méthode de Biuret décrite ci-après).

Une unité de l'activité de la SOD est définie comme la quantité de la SOD nécessaire pour causer une inhibition de 50 % de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant 1 minute.

La variation de la DO:  $\Delta DO (\text{min}) = DO_{20\text{s}} - DO_{80\text{s}}$ .

% inhibition =  $100 - (\Delta DO_{\text{essai}} \times 100 / \Delta DO_{\text{blanc}})$

50 % d'inhibition correspond à 1 unité

X % d'inhibition correspond à n unités

L'activité spécifique de la SOD (unités de SOD par mg de protéines) =  
(Nombre d'unités SOD/mL)/mg de protéine  $\times$  facteur de dilution.

### **II.3.6.2 Dosage du malondialdéhyde (Wilbur et al., 1949)**

#### ***Principe***

Au cours des phases finales, les peroxydes se décomposent en composés volatiles responsables de l'odeur de rance. Il y a notamment formation d'aldéhydes dont l'aldéhyde malonique qui réagit avec l'acide thiobarbiturique pour former un complexe rose qui absorbe à 530 nm. Ce complexe rend compte de la quantité de malondialdéhyde.

#### ***Mode opératoire***

Dans une série de tubes à essais, a été introduit 1 mL de l'homogénat. Le tube témoin a reçu 1 mL de tampon Tris-HCL 50 mM KCL 150mM. Dans chaque tube a été ajouté 0,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 20% et 1 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67%. Les tubes ont été bouchés à l'aide des billes de verre et chauffés pendant 10 minutes à 90°C au bain marie. Ils ont ensuite été refroidis à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 trs/min pendant 15 min à température ambiante. Le surnageant a été décanté et la DO lue à 530 nm contre le blanc. La concentration en malondialdéhyde (MDA) a été calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{mole}^{-1}$  à partir de la formule :

$DO = \epsilon \times C \times L$  où DO représente la densité optique

$\epsilon$  représente le coefficient d'extinction molaire

C représente la concentration en malondialdéhyde,

L est le trajet optique de la cuve (1cm)

### **II.3.6.3 Dosage du glutathion tissulaire (Ellman, 1959)**

#### ***Principe***

L'acide 2,2-dithio-5,5'-nitrodibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements thiols (-SH) du glutathion formant un complexe coloré jaune qui absorbe à 412 nm.

#### ***Mode opératoire***

Dans un tube à essai a été introduit 0,02 mL de l'homogénat d'organe et 3 mL de réactif d'Ellman (4,96 mg de DTNB + tampon phosphate 0,1M ; pH 6,5 qsp 250 mL). Après agitation au vortex, les tubes ont été laissés pendant 60 min à température ambiante pour que se développe la coloration. Dans le tube contrôle a été introduit 0,02 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM, pH 7,4 et 3mL de réactif d'Ellman. L'absorbance de chaque tube a été ensuite lue à 412 nm, contre le blanc. La concentration en glutathion a été calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire,  $\epsilon$  (=13600/ mole.cm) à partir de la formule  $DO = \epsilon \times C \times L$ .

### **II.3.6.4 Dosage indirect des nitrites/nitrates**

Le dosage du monoxyde d'azote (NO) a été réalisé à partir du réactif de GRIESS dont la préparation a été faite à l'abri de la lumière. Le sulfanilamide (1%) et le naphthyléthylènediamide (0,1%) ont été dilués (v/v) dans de l'acide phosphorique (2,5%). La solution standard utilisée était une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) de concentration 1mM.

#### ***Principe***

Le dosage du NO a été fait par la méthode de Griess qui repose sur deux réactions de diazotation. Le nitrite acidifié produit un agent nitrosant qui réagit avec l'acide sulfanilique pour produire l'ion diazonium. Ce dernier est couplé au naphthyléthylènediamine pour former un dérivé azoté chromophorique qui absorbe à 570 nm (Fermor et al., 2001).

#### ***Mode opératoire***

Une dilution sériée de la solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ , 1 mM) a été faite dans 13 tubes à essais. La plus grande concentration étant 1 mM. Les dilutions ont été réalisées au demi. Pour le premier tube, à 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  ont été ajoutés 100  $\mu\text{L}$  de réactif de GRIESS. L'ensemble a été homogénéisé au vortex et 100  $\mu\text{L}$  prélevés pour le tube 2. La densité optique a été lue à 570 nm après 10 minutes. Dans chacun des 12 tubes restant ont été introduits initialement 100  $\mu\text{L}$  d'eau distillée. La dilution de  $\text{NaNO}_2$  a été ensuite faite de la manière suivante : au contenu du tube N° 2 ont été ajoutés 100  $\mu\text{L}$  de la solution prélevée dans le tube N° 1, l'ensemble a été homogénéisé au vortex et 100  $\mu\text{L}$  de ce mélange ont été prélevés et

ajoutés dans le tube N° 3 et ainsi de suite jusqu'au tube N° 13. Pour le dernier tube (N° 13), 100 µL du mélange ont été prélevés et jetés. Au contenu des tubes 2 à 13 ont ensuite été ajoutés 100 µL de réactif de GRIESS et l'absorbance de chaque tube a été lue après 10 minutes à 570 nm. Cette première série de tubes a permis d'établir une courbe d'étalonnage.

L'évaluation de la quantité de NO dans différents échantillons a été faite de la manière suivante : dans chaque tube test ont été introduits dans l'ordre 100 µL d'homogénat d'organes et 100 µL de réactif de GRIESS. Après homogénéisation du mélange, la densité optique de chaque tube a été déterminée au spectrophotomètre (Genesys 20 Thermo spectronic) après 10 minutes à 570 nm.

### II.3.6.5 Dosage de la catalase (Sinha, 1972)

#### **Principe**

Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase. Ce peroxyde détruit se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable qui va être ensuite décomposé par la chaleur et former un complexe vert qui absorbe à 570 nm. L'activité de la catalase, qui est proportionnelle à la densité optique, sera déterminée grâce à une courbe d'étalonnage.

#### **Mode opératoire**

50 mL d'une solution aqueuse de dichromate de potassium à 5% ont été initialement préparés. A cette solution ont été ajoutés lentement 150 mL d'acide acétique glacial. Une solution de peroxyde d'hydrogène à 50 mM et le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5 ont été ensuite préparés

Les différents réactifs ont été mélangés comme l'indique le tableau II afin d'établir la courbe d'étalonnage.

**Tableau II:** Protocole d'établissement de la courbe d'étalonnage de la catalase

N° tubes	1	2	3	4	5
Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (50 mM)(µL)	0	20	40	80	160
Solution de dichromate/acide acétique (mL)	2	2	2	2	2
Eau distillée (µL)	1000	980	960	920	840

Lorsque le précipité bleu s'est formé après introduction de la solution de dichromate de potassium/acide acétique glacial, les tubes ont été chauffés jusqu'à ébullition pendant 10 minutes (apparition de la couleur verte de l'acétate chromique)

puis refroidis à température ambiante. Après introduction d'eau distillée, l'absorbance des différents tubes est lue à 570 nm.

Dans les tubes tests ont été introduits dans l'ordre 50 µL de l'homogénat et 750 µL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). Le chronomètre a été ensuite déclenché après ajout de 200 µL de peroxyde d'hydrogène (50 mM). Après une minute, la réaction a été arrêtée par ajout de 2 mL de solution de dichromate/acide acétique. Dans le tube témoin a été introduit 50 µL d'homogénat et 800 µL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). Chaque tube a été chauffé à 100° C pendant 10 minutes. Après refroidissement, la densité optique a été lue au spectrophotomètre (Genesys 20 Thermo spectronic) à 570 nm. Pour chaque tube, la quantité de peroxyde d'hydrogène restant dans la solution après ajout de l'acide perchromique a été évaluée en utilisant la courbe d'étalonnage. L'activité spécifique de la catalase a été exprimée en mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéine.

### **II.3.7 Evaluation de plusieurs paramètres biochimiques sériques chez les rats hypertendus à l'alcool**

#### **II.3.7 1 Dosage des protéines (Gornall et al., 1949)**

##### ***Principe***

##### **Méthode de Biuret**

En milieu basique (NaOH), le tartrate de sodium et potassium forme avec les ions cuivriques un complexe soluble. En présence d'une protéine apparaît un complexe cuivroprotéique de couleur bleu-violet qui présente un maximum d'absorption à 540 nm, l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la quantité de protéines présente dans le milieu.

##### ***Mode opératoire***

Les tubes étalons et échantillons ont été préparés comme l'indique le tableau

III

**Tableau III : Dosage des protéines par la méthode de Biuret**

N° tubes	0	1	2	3	4	5	X1	...	Xn
SAB (3 mg/mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	1	-		-
Echantillon (µL)	-	-	-	-	-	-	20	...	20
NaCL 9% (mL)	3	2,9	2,8	2,6	2,4	2	2,98	...	2,98
Réactif de Biuret	3	3	3	3	3	3	3	...	3
Quantité de protéines (mg)	0	0,3	0,6	1,2	1,98	3	?	...	?

Tube 0 : tube blanc

Tubes 1 à 5 : tubes étalons

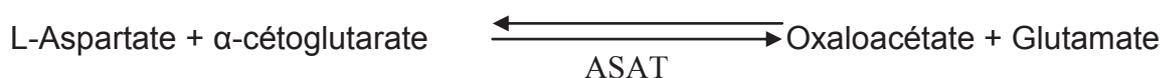
Tubes X1 à Xn : tubes échantillons

Les tubes ont été agités et incubés entre 20 et 30°C pendant 20 minutes. Les densités optiques (DO) ont été lues au spectrophotomètre à 550 nm contre le blanc. La concentration des protéines dans les tubes échantillons a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage.

### II.3.7.2 Dosage des transaminases sériques (Reitman et Frankel, 1957)

#### **Principe**

Les transaminases (aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT)) catalysent respectivement les réactions suivantes :



L'ALAT et l'ASAT catalysent le transfert du groupement aminé respectivement de l'alanine sur l'α-cétoglutarate pour former le pyruvate et le glutamate, et de l'aspartate vers l'α-cétoglutarate pour former l'oxaloacétate et le glutamate. Le pyruvate ou l'oxaloacétate formé réagit avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) (200 mg de 2,4 DNPH + HCl 1M qsp 1 L) pour donner le complexe pyruvate hydrazone ou oxaloacétate hydrazone marron qui absorbe en présence du NaOH à

505 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de pyruvate ou de l'oxaloacétate dans le milieu c'est-à-dire reliée à l'activité de l'ALAT et de l'ASAT.

### **Mode opératoire**

La courbe d'étalonnage pour déterminer l'activité de l'ALAT et de l'ASAT a été obtenue en remplissant les tubes par des réactifs dans l'ordre comme décrit sur le tableau IV suivant:

**Tableau IV:** Protocole de réalisation des courbes d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité de l'ALAT et ASAT

Tubes	Blanc	S1	S2	S3	S4
Etalon pyruvate (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
Substrat ASAT ou ALAT (mL)	1	0,9	0,8	0,7	0,6
Eau distillée (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Solution de 2,4-DNPH (mL)	1	1	1	1	1
NaOH 0,4M (mL)	10	10	10	10	10
Activité ASAT (en U/L de sérum)	0	24	61	114	190
Activité ALAT (en U/L de sérum)	0	28	57	97	1150

L'étalon pyruvate 2 mM est obtenu comme suit : (solution A (10 mL): 220 mg de pyruvate de sodium + tampon phosphate en qsp 100 mL + tampon phosphate qsp 100 mL).

Le substrat ALAT est préparé en dissolvant 1,78 g de DL-alanine et 30 mg d' $\alpha$ -cetoglutarate dans 20 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5 contenant 1,25 ml de NaOH 0,4 M. L'ensemble est complété a 100 mL avec le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5. Le pH est ajusté si nécessaire et 1 ml chloroforme y est additionné comme conservateur.

Le substrat ASAT est préparé en dissolvant 2,66 g de DL- acide aspartique et 30 mg d' $\alpha$  -cetoglutarate dans 20.5 mL de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5. Le pH de la solution est ajusté a 7,4 en ajoutant quelques gouttes de NaOH 1 M. La solution est ensuite complétée a 100 mL avec le tampon phosphate 0,1 M pH 7,5. Puis 1 mL de chloroforme est ajouté a cette solution comme conservateur.

Après ajout de la solution de 2,4-DNPH, les tubes ont été agités et laissés à température ambiante pendant 20 minutes. Après ajout de la solution de NaOH les

tubes ont été agités et laissés à température ambiante pendant 20 minutes et l'absorbance de ces tubes est lue à 505 nm contre le blanc

Tubes S1 à S4 : tubes étalons

Les courbes d'étalonnages ont été établies en faisant correspondre l'absorbance des tubes standards avec l'activité de l'ALAT ou de l'ASAT.

L'évaluation du taux de transaminase sérique a été faite suivant le protocole du tableau V.

**Tableau V:** Protocole de dosage de l'activité ALAT et ASAT dans les séra

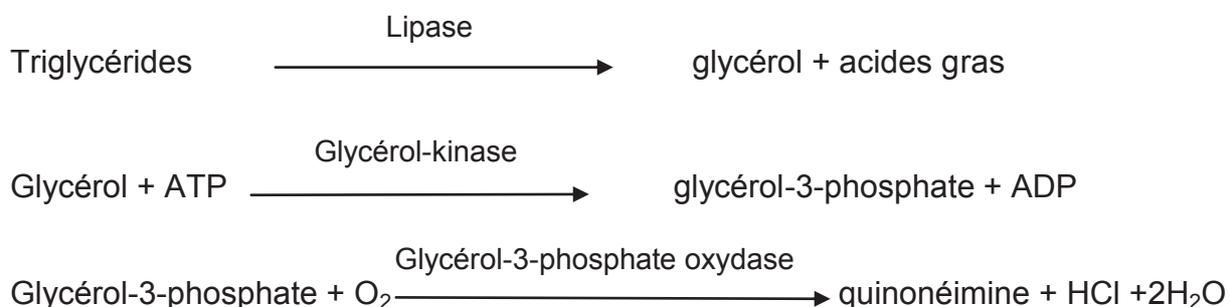
	Blanc Test	Test
Substrat ALAT/ ASAT (mL)	0,5	0,5
Echantillon (mL)	0	0,1
2,4 DNPH (mL)	0,2	0,2
Echantillon (mL)	0,1	0
NaOH 0,4M (mL)	5	5

Après ajout de l'échantillon dans le tube test, les tubes ont été agités et laissés 30 min au bain marie à 37°C pour l'ALAT et 60 min pour l'ASAT. Après ajout de l'échantillon dans le tube blanc test, les tubes ont été agités et laissés 20 min à température ambiante. Une fois toutes les solutions introduites, les tubes ont été agités et laissés 5 min à température ambiante, et l'absorbance a été lue à 500 nm

### II.3.7.3 Dosage des triglycérides

#### *Principe*

Sous l'action de lipases, les triglycérides sont hydrolysés en glycérol. Le glycérol sera ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène sous l'action successive de la glycérol-kinase et de la glycérol-3-phosphate oxydase. La quinonéimine sert d'indicateur qui se forme de peroxyde d'hydrogène, 4-aminoantipyrine et 4-chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase.



### Mode opératoire

Les différents tubes ont été constitués comme l'indique le tableau VI. Le taux de triglycérides a été déterminé à l'aide du kit Randox (SA 34130).

**Tableau VI.** Technique de dosage des triglycérides

	Blanc de réactif	Standard	Echantillon
Etalon (µL)	0	10	0
Sérum (µL)	0	0	10
Réactif (µL)	1000	1000	1000

Les différents tubes ont été homogénéisés et incubés pendant 10 minutes à 25° C et l'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc au bout de 60 minutes.

La concentration de triglycérides a été déterminée dans les tubes échantillons suivant la formule suivante :

Concentration de triglycéride (mg/dL) =  $\Delta$  Abs Echantillon /  $\Delta$  Abs Standard x concentration standard

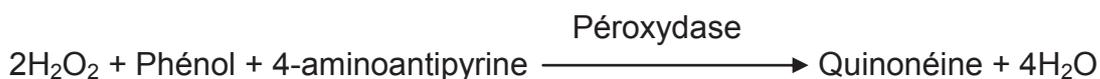
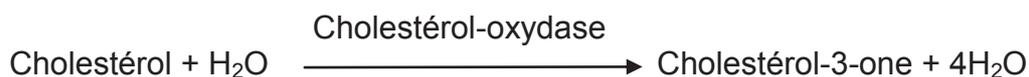
$\Delta$ Abs = absorbance échantillon ou standard – absorbance blanc

Concentration standard=200 mg/dL

### II.3.7.4 Dosage du cholestérol total

#### Principe

Sous l'action de la cholestérol-estérase, le cholestérol estérifié est transformé en cholestérol et en acides gras. L'oxydation du cholestérol en présence de cholestérol-oxydase produit le cholestérol-3-one et du peroxyde d'hydrogène. La quinonéimine sert d'indicateur qui se forme par action de peroxyde d'hydrogène, de 4-aminoantipyrine et de phénol sous l'action catalytique de la peroxydase.



#### Mode opératoire

Le taux de cholestérol total a été déterminé à l'aide du kit Randox. Les tubes étalons (blanc et standard) et échantillons ont été préparés comme indiqué dans le tableau VII.

**Tableau VII.** Technique de dosage du cholestérol total

	Blanc de réactif	Standard	Echantillon
Eau distillée (µL)	10	0	0
Etalon (µL)	0	10	0
Sérum (µL)	0	0	10
Réactif (µL)	1000	1000	1000

Les tubes ont été agités à l'aide d'un vortex, puis incubés à 25°C pendant 10 minutes. Les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre à 500 nm après 60 minutes.

La concentration en cholestérol total a été donnée par la relation suivante :  
 Cholestérol total (mg/dL) = ( $\Delta$  Abs Echantillon/ $\Delta$  Abs Standard) x concentration standard. Concentration standard = 200 mg/mL

### II.3.7.5 Dosage de la créatinine

#### **Principe**

En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate de sodium un complexe orangé qui absorbe à 492 nm. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans le milieu réactionnel.

#### **Mode opératoire**

Le taux de créatinine sérique a été évalué dans le sérum par la méthode décrite par Bartels et al. (1972).

Dans une série de trois cuves (étalon, blanc, essai) contenant chacune 1 mL de solution de travail, ont été introduits respectivement 100 µL d'étalon créatinine, d'eau distillée, ou de sérum. Après mélange par inversion de chaque cuve, la densité optique a été lue au spectrophotomètre à 592 nm contre le blanc après 20 s et 80 s.

L'étalon créatinine a été obtenu en dissolvant 0,15 g de picrate de sodium dans un volume total de 75 mL d'eau distillée (solution A). Ensuite 16 g de soude ont été dissouts dans un volume total de 1 L d'eau distillée (solution B). 75 mL de la solution A o été mélangé à 75 mL de la solution B.

Les expériences ont été effectuées en double et la moyenne des données exprimée en mg/mL à partir de la formule suivante :

$$[\text{Créatinine}] = \Delta\text{DO échantillon} \times n / \Delta\text{DO étalon}$$

n = concentration de la solution étalon (1,5 mg/mL). [Créatinine] = concentration de la créatinine et  $\Delta\text{DO}$  = variation de la densité optique

### II.3.7.6 Dosage de la bilirubine totale

#### **Principe**

L'agent de diazotation est l'acide sulfanilique sur lequel on fait réagir des nitrites de sodium pour donner un sel de diazonium instable avec le réactif d'Erlich. La densité optique du composé coloré produit par réaction avec la bilirubine est lue à 550 nm.

#### **Mode opératoire**

Les tubes étalon et échantillons ont été complétés comme l'indique le tableau VIII.

**Tableau VIII.** Dosage de la bilirubine totale

	Blanc réactif	Blanc étalon	Étalon	Blanc test	Test
Sérum (µL)	0	0	0	100	100
Étalon (µL)	0	100	100	0	0
Jendrassik (µL)	200	200	200	200	200
Eau distillée (µL)	600	600	600	600	600
Acide sulfanilique (µL)	100	100	0	100	0
Réactif d'Erlich (µL)	0	0	100	0	100

Le réactif de Jendrassik est préparé en dissolvant 20g de caféine, 30 g de benzoate de sodium, 50 g d'acetate de sodium dans l'eau distillée en quantité suffisante pour faire 400 mL. La DO des différents tubes a été lue à 550 nm, 5 minutes après ajout du réactif d'Erlich (10 mL d'acide sulfanilique 0,1 % + 0,3 mL nitrite de sodium 0,5 %). La concentration de bilirubine totale dans le sérum a été déterminée par la formule suivante :

Taux de bilirubine (mg/mL) = (Abs test - Abs blanc test) / (Abs étalon - Abs blanc étalon) x concentration étalon

Concentration étalon = 0,56 mg/mL

### II.4 Evaluation des effets vasorelaxants des extraits de *T. superba*

Les effets vasorelaxants des extraits aqueux, au méthanol, au chlorure de méthylène, au chlorure de méthylène/méthanol de *T. superba* ont été évalués sur des anneaux d'aorte thoracique de rats Wistars mâles.

## **II.4.1 Préparation et montage des anneaux d'aorte**

Après anesthésie du rat au pentobarbital sodique (60 mg/kg, i.p), l'aorte thoracique a été dégagée des tissus environnants, nettoyée puis découpée en anneaux d'environ 2 mm de longueur. Les anneaux ont été suspendus dans des cuves à organes isolées de 10 mL. Le système de mesure de la réactivité vasculaire est un ensemble constitué de cuves à organes isolées EMKA. L'anneau d'aorte est maintenu en survie dans un liquide physiologique (liquide de Krebs) thermostaté et oxygéné comme décrit par Demougeot et al., 2005. Les variations de tension consécutives aux variations du diamètre du vaisseau sont captées et converties en signaux électriques à l'aide d'un "Transducer" isométrique. Ces signaux électriques sont visualisés sur un enregistreur graphique grâce au programme IOX. Les cuves d'anneaux d'aortes isolés contiennent une solution de Krebs (NaCl 118mM ; KCl 4,65mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,5m ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18mM ; NaHCO<sub>3</sub> 24,9mM ; MgSO<sub>4</sub> 1,18mM ; glucose 12mM ; pH 7,4), maintenue à 37°C et continuellement aéré (O<sub>2</sub> : 95% ; CO<sub>2</sub> : 5%). L'oxygénation de la préparation était réalisée grâce à un cathéter relié à un bulleur. La vidange des cuves était effectuée grâce au cathéter relié à la pompe à vide. Après une période d'équilibration de 90 minutes jusqu'à une tension de 2g, la présence d'un endothélium fonctionnel a été vérifiée par la capacité de l'acétylcholine (ACh, 10<sup>-6</sup>M) à produire une relaxation de plus de 90% sur des anneaux précontractés à la phényléphrine (PE, 10<sup>-6</sup>M). Sur certains anneaux, l'endothélium a été enlevé mécaniquement, et dans ce cas, l'absence de l'endothélium a été évaluée par une relaxation à l'ACh <10%.

## **II.4.2 Protocole expérimental**

### **II.4.2.1 Effets des différents extraits sur la contraction induite par la phényléphrine ou le chlorure de potassium**

L'objectif de ce protocole était d'évaluer et de comparer les effets vasorelaxants des extraits de *T. superba*. A cet effet, les anneaux avec ou sans endothélium ont été contractés par la phényléphrine (PE, 10<sup>-6</sup>M) ou le chlorure de potassium (KCl, 6x10<sup>-2</sup>M). Une fois le plateau de contraction atteint, les différents extraits (aqueux, au méthanol, au chlorure de méthylène et au chlorure de méthylène/méthanol) ont été ajoutés dans le milieu d'incubation de façon cumulée (10<sup>-3</sup> à 1 mg/mL). Le pourcentage de relaxation a été calculé suite à la contraction induite par la PE ou le KCl. Pour chaque extrait, l'effet du solvant seul a été évalué dans les mêmes conditions expérimentales. La concentration finale du solvant dans le milieu d'incubation était de 7,52 µL/10mL.

#### **II.4.2.2 Détermination du rôle du calcium dans les effets vasorelaxants de l'extrait le plus actif**

Pour déterminer le rôle de l'influx calcique dans la relaxation induite par l'extrait le plus actif, des anneaux d'aorte sans endothélium ont été rincés 4 à 5 fois dans du Krebs dépourvu de calcium et contenant l'éthylène glycol-bis [ $\beta$ -aminoéthyléther]-N, N, N, N- acide tétraacétique (EGTA), chélateur de calcium, avant d'induire la contraction à la PE ( $10^{-6}$  M) ou au KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M). Au plateau de contraction, le calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) a été ajouté en concentrations cumulatives ( $10^{-5}$  à  $3 \times 10^{-3}$  M) dans le milieu d'incubation de façon à obtenir une courbe concentration-réponse. Sur une autre série d'anneaux, les anneaux ont été préincubés pendant 30 minutes avec la concentration efficace 50 ( $\text{CE}_{50}$ ) de l'extrait MC, avant l'addition de la PE ou du KCl.

Dans une 2<sup>ème</sup> expérience, le rôle du calcium intracellulaire sur la relaxation induite par l'extrait MC a été déterminé en incubant des anneaux sans endothélium en présence de vérapamil ( $10^{-6}$  M), un inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants de type L, pendant 30 minutes. La contraction de ces anneaux a été induite par la PE ( $10^{-6}$  M) et la  $\text{CE}_{50}$  de l'extrait le plus actif a été ajoutée dans le milieu lorsque la contraction induite par la PE a atteint un plateau stable.

#### **II.4.2.3 Détermination du rôle du monoxyde d'azote dans les effets vasorelaxants de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol**

Les effets relaxants de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol ont été évalués sur des anneaux avec endothélium préincubés pendant 30 minutes avec la  $\text{N}_w$ -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME,  $10^{-4}$  M) avant l'induction de la contraction par la PE ( $10^{-6}$  M) ou le KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M). Une fois le plateau atteint, l'extrait a été ajouté dans le milieu de façon cumulative comme précédemment décrit.

#### **II.4.2.4 Effets des fractions isolées de l'extrait le plus actif**

L'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* a fait l'objet d'un fractionnement bioguidé qui a permis d'obtenir trois fractions F1, F2 et F3. Après des essais de dissolution, les effets des fractions F2 et F3 ont été évalués sur des anneaux avec ou sans endothélium. La fraction F1, n'ayant pas pu être dissoute, n'a pas été étudiée. Les effets des fractions F2 et F3 ont été évalués à des concentrations cumulées de  $10^{-3}$  à 1 mg/mL sur des anneaux avec ou sans endothélium, précontractés au KCl ou à la PE, suivant le même protocole utilisé pour l'évaluation des effets des extraits totaux décrit ci-dessus.

## **II.5 Effets de l'extrait chlorométhylénique de *T. superba* sur l'hypertension artérielle du rat spontanément hypertendu**

Les effets de l'extrait au chlorure de méthylène ont été évalués chez le rat spontanément hypertendu.

### **II.5.1 Etude des effets aigus de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur la pression artérielle**

L'étude des effets directs des doses 5, 10, 20 et 30 mg/kg de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* a été réalisée chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et leurs contrôles Wistars Kyoto (WKY). La technique d'enregistrement de la PA est celle précédemment décrite pour l'étude des effets aigus de l'extrait aqueux, exception faite du dispositif d'enregistrement. L'enregistreur utilisé était un système Easy Graf Gould TA 240S. La température corporelle des rats était maintenue autour de 37° C grâce à une couverture chauffante Harvard.

### **II.5.2 Etude des effets curatifs de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* chez les rats spontanément hypertendus**

Quatre groupes de 9 à 10 rats chacun ont été constitués comme suit:

- Un groupe de rats normotendus Wistar Kyoto contrôle (WKY Contrôles)
- Un groupe de rats normotendus Wistar Kyoto traités (WKY Traités)
- Un groupe de rats spontanément hypertendus contrôle (SHR Contrôles)
- Un groupe de rats spontanément hypertendus traités (SHR Traités)

Les rats, âgés de 11 semaines au début du test, ont reçu, par gavage, respectivement de la méthylcellulose 1% dans de l'eau distillée pour les groupes contrôle (10 mL/kg), ou l'extrait de plante à la dose de 150 mg/kg/jour, dissout dans la solution de méthylcellulose 1% pour les groupes tests. L'extrait de plante était préalablement solubilisé dans un bain à ultrasons à 37°C, jusqu'à homogénéisation complète. Le traitement a duré 5 semaines. La pression artérielle et la fréquence cardiaque des rats ont été mesurées en début de traitement, puis une fois par semaine par la méthode pléthysmographique (indirecte) sur des rats conscients, grâce à un système d'analyse Visitech BP-2000. Plusieurs enregistrements successifs ont été effectués dans un délai rapproché ; et la valeur moyenne des différents enregistrements a été déterminée.

### **II.5.3. Métabolisme général**

Au cours de la dernière semaine de traitement, les rats des différents groupes ont été placés dans des cages à métabolisme. Après une période d'acclimatation de 24h, la consommation hydrique et alimentaire, l'élimination fécale et l'excrétion urinaire ont été évalués pendant 24h. Le volume des urines et le poids des fèces ont été mesurés et conservés à -20°C pour les analyses ultérieures.

### **II.5.4 Etude des mécanismes vasodilatateurs de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* chez les rats spontanément hypertendus**

#### **II.5.4.1 Effets sur la fonction endothéliale**

Au terme de la période expérimentale et après la mesure des paramètres cardiovasculaires (PAS, PAD et Fc), les rats ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg/kg, i.p). Le sang a été prélevé par l'aorte abdominale et la glycémie a été mesurée à l'aide des bandelettes GlucoMen. L'aorte thoracique a été isolée et nettoyée. Des anneaux d'environ 2 mm de diamètre ont été préparés et suspendus dans un bain marie comme précédemment décrit. Tous les anneaux d'aorte utilisés dans cette étude étaient des anneaux intacts, avec endothélium. L'évaluation de la fonction endothéliale a été réalisé par relaxation des anneaux d'aorte des rats de différents groupes précontractés à la PE ( $10^{-6}$  M) par des doses cumulées d'ACh ( $10^{-11}$  à  $10^{-4}$  M).

#### **II.5.4.2 Effets sur la vasorelaxation induite par le nitroprussiate de sodium**

Sur une autre série d'anneaux, les effets du nitroprussiate de sodium (SNP) donneur exogène de monoxyde d'azote, ont été étudiés. Les anneaux d'aorte ont été contractés à la phényléphrine ( $10^{-6}$  M). Une fois la contraction stabilisée, le SNP a été introduit dans le milieu d'incubation à des concentrations cumulatives de  $10^{-11}$  à  $10^{-4}$  M.

#### **II.5.4.3 Effets sur la production du monoxyde d'azote et du superoxyde ( $O_2^-$ )**

Dans une autre étude, les anneaux d'aorte de SHR avec endothélium ont été préincubés en présence de L-NAME ( $10^{-5}$ M), un inhibiteur de la synthèse du NO d'origine endothélial. Après 30 minutes d'incubation, la contraction a été induite par la phényléphrine ( $10^{-6}$ M) puis les effets des concentrations cumulatives d'ACh ( $10^{-11}$  à  $10^{-4}$  M) ont été évalués.

Dans le but de déterminer les effets de la 4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthylpiperidine 1-oxyl ou tempol, antioxydant mimétique de l'enzyme superoxyde dismutase sur le stress oxydant présent chez les SHR, des anneaux d'aorte avec endothélium ont été incubés en présence du tempol ( $10^{-4}$ M) pendant 30 minutes. Après contraction à la phényléphrine ( $10^{-6}$  M), les effets vasculaires des concentrations cumulées d'ACh ( $10^{-11}$  à  $10^{-4}$  M) ont été déterminés.

#### **II.5.4.4 Effets sur la contraction calcium-dépendante.**

Dans cette étude, des anneaux d'aorte intacts des SHR et WKY ont été contractés à la PE à des concentrations cumulées de  $10^{-11}$  à  $10^{-4}$  M.

### **II.5.5 Effets sur le métabolisme hépatique : activité des cytochromes P 450 3A**

#### **II.5.5.1 Préparation des homogénats et des microsomes hépatiques**

Le foie a été pesé et lavé dans du tampon d'homogénéisation froid (50 mM Tris-HCl, KCl 150 mM, EDTA 2mM, pH 7,4) à la fin du traitement curatif. Des homogénats du foie ont été réalisés à raison de 1g de foie pour 4 mL de tampon. Pour la préparation des microsomes, les homogénats ont subi trois centrifugations différentielles. Après une première centrifugation à 8600 trs/min pendant 30 min à 4°C, le surnageant (fraction S9) a été prélevé, puis centrifugé à 28800 trs/min, pendant 60 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et 2 mL de tampon ont été ajoutés au culot qui a été broyé délicatement. L'ensemble a été recentrifugé à 28800 trs/min pendant 60 min à 4°C. Le culot (microsomes) a été suspendu dans une solution de sucrose (0,25 mM, 0,25-0,5 mL). L'ensemble a été broyé dans un potter équipé d'un pilon téflon, aliquoté, puis stocké à -80 °C. Une quantité nécessaire a été utilisée pour la détermination des protéines, par la méthode utilisant le réactif de Pierce (Richter et al., 2002)

#### **II.5.5.2 Détermination des protéines microsomales**

##### ***Principe***

L'acide bicinchoninique (BCA) sous forme de sel de sodium soluble en milieu aqueux réagit de façon stable, sensible et hautement spécifique avec les ions cuivreux ; deux molécules de BCA réagissent avec un ion cuivreux pour former un complexe violet qui montre un pic d'absorption à 562 nm.

### **Préparation des solutions**

- Solution de soude (NaOH 0,1M)  
2g de soude ont été dissous dans 500 mL d'eau distillée
- Solution mère d'Albumine Bovine Sérique (BSA, 2 mg/mL)  
100 mg de BSA ont été dissous dans 50 mL de « Phosphate Buffered Saline » (PBS), aliquotés en eppendorfs de 1 mL qui ont été stockés à -20 °C.
- Réactif de Pierce  
50 volumes de BCA ont été mélangés extemporanément avec 1 volume de sulfate de cuivre 4%.

### **Protocole**

Un aliquot de BSA (2 mg/mL) décongelé a permis de préparer une gamme d'étalonnage des protéines de 0 à 2 mg/mL de BSA selon le protocole indiqué dans le tableau IX:

**Tableau IX.** Préparation de la gamme étalon des protéines microsomales

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (µL)	0	25	50	75	100	125	250	sol. mère
NaOH (µL)	500	475	450	425	400	375	250	0
protéines (mg/mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2

Pour le dosage des protéines microsomales, une dilution au 1/50 des microsomes hépatiques dans du NaOH a été préalablement effectuée. Pour ce faire, 980 µL de NaOH ont été ajoutés à 20 µL d'échantillon de microsomes. Ensuite, 20 µL d'échantillon dilué ou de chaque solution des tubes d'étalonnage ont été déposés sur une microplaque de 96 puits. 200 µL de réactif de Pierce ont été ajoutés dans chaque puits, et l'ensemble a été incubé pendant 30 minutes à 37°C. La lecture de la DO a été faite à 370 nm. La concentration des protéines a été exprimée en mg/mL à partir de la courbe d'étalonnage d'albumine.

### **II.5.5.3 Détermination de l'activité du CYP 3A par la méthode de l'hydroxylation 6-β de la testostérone**

La 6 β-hydroxylation de la testostérone a été mesurée pour déterminer l'activité catalytique des CYP 3A dans les microsomes hépatiques de rats selon la méthode décrite par Pearce et al. (1996). Un volume de microsomes hépatiques équivalent à 0,1 mg de protéines a été incubé avec la testostérone (0,25 mM) et le

NADPH (2mM) pendant 8 minutes à 37° C sous un volume final de 250 µL. La réaction a été arrêtée par ajout d'acétonitrile (1 mL) conservé dans la glace. Après centrifugation, le surnageant a été analysé par chromatographie liquide sous haute performance (HPLC) avec la détection spectrophotométrique UV à 230 nm. La quantification de la 6 β-hydroxytestostérone formée a été faite par normalisation interne avec la 11 β-hydroxytestostérone. Les résultats ont été exprimés en pmol de 6 β-hydroxytestostérone formée/min/mg de protéines microsomales.

## **II.5.6 Evaluation du taux de 8-isoprostaglandine F2-α (8-iso-PGF2α) urinaire**

### ***Principe***

La 8-iso-PGF2α ou 8 isoprostane est un eicosanoïde produit par voie non enzymatique par induisant la peroxydation des radicaux libre oxygénés des phospholipides tissulaires et des lipoprotéines. Elle apparaît normalement dans le plasma et des urines et est élevée par le stress oxydatif (Niki, 2009). La quantité de 8-iso-PGF2α dans les échantillons d'urine a été déterminée par comparaison de la densité optique des échantillons d'urine à celle connue d'une courbe standard de 8-iso-PGF2α obtenue grâce au kit de dosage « Cell Biolabs OxiSelect™ 8-isoprostanglandin F2α ELISA ».

### ***Protocole***

#### ***Préparation des échantillons d'urines***

Les échantillons d'urine collectées pendant 24h ont été centrifugés à 1500 g pendant 15 minutes (Ho, et al., 2003). Le surnageant a été prélevé, aliquoté, et conservés à -20°C. Pour le dosage de la 8-iso-PGF2α, les échantillons d'urines ont été préalablement dilués au tiers avec le diluant d'échantillons contenu dans le Kit. Le dosage a été fait avec un kit ELISA Oxiselect 8-iso-prostaglandine F2α, Cell Biolabs, Inc.

#### ***Préparation du standard 8-iso-PGF2α***

Une série de 8 tubes standards a été préparée comme indiqué dans le tableau X.

**Tableau X.** Préparation du standard 8-iso-PGF2 $\alpha$ 

Tubes standards	Standard 8-iso-PGF2 $\alpha$ ( $\mu$ L)	Diluant d'échantillons ( $\mu$ L)	8-iso-PGF2 $\alpha$ standard (pg/mL)
	5 $\mu$ L de la solution		
1	stock	4995	200000
2	250 $\mu$ L du tube 1	750	50000
3	251 $\mu$ L du tube 2	750	12500
4	252 $\mu$ L du tube 3	750	3125
5	253 $\mu$ L du tube 4	750	781
6	254 $\mu$ L du tube 5	750	195
7	255 $\mu$ L du tube 6	750	49
8	0 $\mu$ L	200	0

**Protocole de dosage**

Chaque échantillon ou standard a été réalisé en double sur une plaque de microtitration de 96 puits. Le dosage a été effectué d'après les étapes suivantes :

- 100  $\mu$ L de l'Anticorps Anti-8-iso-PGF2 $\alpha$  (dilué au 1/1000) ont été introduit dans chaque puits. La plaque a été incubée 1h à 25°C sur un agitateur orbital (Labnet Orbit 300, 30 rpm)
- La solution d'Anticorps a été enlevée des puits. Ces derniers ont été lavés 5 fois avec 300  $\mu$ L de tampon de lavage (diluée au 1/10<sup>e</sup>). Après lavage, les puits ont été vidés sur un papier absorbant afin de retirer l'excès de solution de lavage. Il faut noter q'un bon lavage est nécessaire pour enlever tout l'azide présent dans la solution d'Anticorps.
- 55  $\mu$ L de standard 8-iso-PGF2 $\alpha$  ou d'échantillon d'urine ont été mélangés dans un tube eppendorf à 55  $\mu$ L de 8-iso-PGF2 $\alpha$ -HRP conjugué et 100  $\mu$ L du mélange ont été transférés dans chaque puits. Un puits contenant le diluant d'échantillon a été utilisé comme contrôle. La plaque ainsi préparée a été incubée pendant 1h à 25°C sur un agitateur orbital.
- Le mélange a été ensuite retiré des puits, et ces derniers ont été lavés comme précédemment décrits.
- 100  $\mu$ L de substrat 8-iso-PGF2 $\alpha$  ont été ensuite ajoutés dans chaque puits, et la plaque a été incubée pendant 25 min sur l'agitateur orbital.

- La réaction enzymatique a été stoppée par ajout de 100 µL de la solution « stop » dans chaque puits et la densité optique lue immédiatement à 450 nm.

## **II.6 Etude de la toxicité des extraits de *T. superba***

### **II.6.1 Toxicité aigüe des extraits au chlorure de méthylène et aqueux**

Les souris âgées de 8 semaines ont été soumises à un jeûne non hydrique de 4h (OECD, 2001) et réparties en neuf groupes de 10 souris chacun (5 mâles et 5 femelles).

Les extraits ont été administrés par gavage aux animaux selon les normes de l'OECD (2001). Les lots contrôles (groupe 1 et 2) ont été traités respectivement avec le solvant de dilution de chaque extrait (eau distillée pour l'extrait aqueux et méthylcellulose 1% pour l'extrait au chlorure de méthylène) dans un volume de 10mL/kg. Pour l'évaluation de la toxicité de l'extrait aqueux, les animaux des lots tests ont reçu respectivement les doses de 1000, 1500, 2000 et 5000 mg/kg. Les animaux essais pour l'extrait au chlorure de méthylène ont reçu respectivement l'extrait de plante aux doses de 1000, 1500 et 2000 mg/kg.

Après l'administration des substances étudiées, les animaux ont été observés pendant 2h pour l'évaluation de signes externes de toxicité. puis ont été laissés en observation pendant une semaine. Au terme de la période expérimentale, les souris survivantes ont été pesées, anesthésiées et autopsiées en vue de l'observation macroscopique.

### **II.6.2 Toxicité suchronique de l'extrait au chlorure de méthylène**

Les souris mâles et femelles ont été réparties en quatre groupes de 10 souris chacun (5 mâles et 5 femelles). Les animaux ont reçu par gavage le solvant de dilution de l'extrait au chlorure de méthylène ou l'extrait de plante. Les substances étudiées ont été administrées en dose unique quotidienne à raison de 10mL/kg pendant 35 jours. Les groupes essais ont reçu respectivement l'extrait de plante aux doses de 150, 300 et 600 mg/kg.

Pendant la période de traitement, le poids corporel des souris était évalué quotidiennement, les consommations hydrique et alimentaire étaient déterminées une fois par semaine. Le comportement des animaux, de même que les signes extérieurs de toxicité ont été notés pendant la durée du traitement. Les animaux ont été mis à jeun à la veille de la fin du traitement.

A la fin du traitement, les animaux ont été anesthésiés, le sang a été recueilli par la carotide dans deux types de tubes. Certains tubes étaient héparinés, pour les tests hématologiques, et d'autres non héparinés pour les tests biochimiques. L'aspect des organes internes a été observé et noté après autopsie des animaux. Le cœur, le rein droit et une partie du foie ont été mis dans du formol 10% pour les analyses histopathologiques. La seconde partie du foie et le rein gauche ont été pesés et conservés à -4°C pour des analyses biochimiques.

### II.6.2.1 Evaluation du profil lipidique

Le profil lipidique (taux de cholestérol total, cholestérol HDL, triglycérides et LDL cholestérol) a été évalué par colorimétrie, grâce aux kits de dosages Fortress diagnostics. Le cholestérol total et les triglycérides ont été évalués suivant le protocole décrit précédemment. Le cholestérol HDL et le cholestérol LDL ont été déterminés comme décrit ci-après :

#### - Cholestérol HDL

##### **Principe**

Les lipoprotéines de basse densité sont précipitées par l'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. La fraction de lipoprotéines de haute densité (HDL) reste dans le surnageant et est déterminée par le dosage du cholestérol.

##### **Protocole**

Le taux de cholestérol HDL a été déterminé suivant le protocole détaillé dans le tableau XI.

**Tableau XI.** Protocole de dosage du cholestérol HDL

	Blanc	Standard	Echantillon
Eau distillée (µL)	100	---	---
Echantillon (µL)	---	---	100
Standard R4 (µL)	---	100	---
Réactif R2 (mL)	1	1	1

Les tubes ont été bien mélangés et incubés à 37°C. Les DO de l'échantillon ou du standard ont été lues contre le blanc à 500 nm.

La concentration en cholestérol HDL a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Conc. Cholestérol HDL (mg/dL)} = \text{DO échantillon/DO standard} \times \text{conc. Standard (50 mg/dL)}$$

## - Cholestérol LDL

Le cholestérol LDL a été déterminé par la formule indiquée sur le kit de dosage Fortress :

Cholestérol LDL (mg/dL)=Cholestérol total – triglycérides/5 – cholestérol HDL

### II.6.2.2 Evaluation du taux des transaminases

Le taux de transaminases hépatiques a été déterminé à l'aide de kits Fortress. Le principe de la réaction est le même que précédemment décrit.

#### -Alanine aminotransférase (ALAT)

##### *Protocole*

Le taux d'ALAT a été déterminé suivant le protocole décrit dans le tableau XII.

**Tableau XII.** Protocole de dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) (Fortress)

	Blanc	Echantillon
Echantillon (µL)	---	100
Tampon ALAT (µL)	500	500
Eau distillée (µL)	100	
Réactif Dye ALAT	500	500
NaOH dilué (mL)	5	5

Après ajout d'eau distillée dans le tube blanc, les tubes ont été bien mélangés et incubés 30 min à 37°C. Une fois le réactif ALAT introduit dans les tubes, ces derniers ont été mélangés et laissés 20 min à température ambiante. Après ajout de NaOH les tubes ont été mélangés et l'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc après 5 min.

#### -Aspartate aminotransférase (ASAT)

##### *Protocole*

Le taux d'ASAT a été déterminé suivant le protocole décrit dans le tableau XIII

**Tableau XIII.** Protocole de dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) (Fortress)

	Blanc	Echantillon
Echantillon (µL)	---	100
Tampon ASAT (µL)	500	500
Eau distillée (µL)	100	
Réactif Dye ASAT	500	500
NaOH dilué (mL)	5	5

Après ajout d'eau distillée dans le tube blanc, les tubes ont été bien mélangés et incubés 30 min à 37°C. Une fois le réactif ASAT introduit dans les tubes, ces derniers ont été mélangés et laissés 20 min à température ambiante. Après ajout de

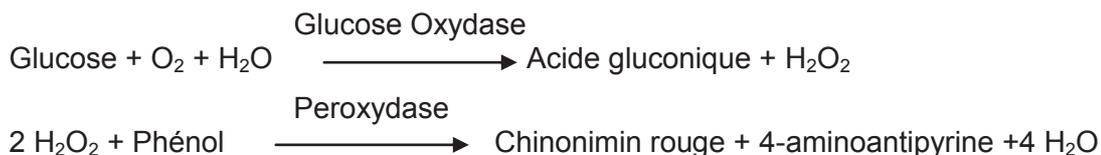
NaOH les tubes ont été mélangés et l'absorbance a été lue à 500 nm contre le blanc après 5 min.

### II.6.2.3 Effet sur la glycémie

Le taux de glucose sérique a été évalué par colorimétrie, grâce au kits de dosages Fortress diagnostics.

#### **Principe**

Le taux de sucre dans le sérum a été déterminé suivant le principe décrit par les réactions suivantes :



#### **Protocole**

Le taux de glucose a été déterminé dans le sérum des souris suivant le protocole présenté par le tableau XIV.

**Tableau XIV.** Dosage du taux de glucose

	Blanc	Standard/Echantillon
Standard/Echantillon (µL)	---	100
Réactif de travail (mL)	1	1
Eau distillée (µL)	100	

Les tubes ont été mélangés et incubés 15 min à 37°C. L'absorbance a été lue à 500 nm dans les 60 min contre le blanc.

La concentration de glucose est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Conc. Glucose (mg/dL)} = \text{DO Echantillon} / \text{DO standard} \times \text{Conc. Standard (mg/dL)}$$

$$\text{Conc standard} = 100 \text{ mg/dL}$$

## II.7 Réalisation des coupes histologiques

La préparation des coupes histologiques a été réalisée suivant plusieurs étapes:

### II.7.1 Recoupe ou « trimming »

Après fixation des organes dans du formol à 10%, les biopsies du cœur, du foie ou du rein ont été découpées en petites tranches sous une hotte ventilée, puis introduites dans des cassettes numérotées au crayon

### **II.7.2 Déshydratation**

La déshydratation était faite en introduisant les cassettes dans des bacs pour déshydratation contenant de l'alcool éthylique à des degrés croissants à une durée déterminée: 50° (1h), 70°(1h), 95°(2 bacs dont 1h pour le 1<sup>er</sup> et 1h30 pour le 2<sup>e</sup> ) et 3 bacs de 100° (pendant respectivement 1h, 1h30 et 2h). Après la sortie du 3<sup>e</sup> bac d'alcool de 100°, les cassettes ont été introduites dans 2 bacs de xylène à raison de 1h et 1h30 respectivement. Les cassettes ont ensuite été introduite dans 3 séries de bac de paraffine sous vide dans une étuve à 60°C à raison de 1h, 1h30 et 2h respectivement.

### **II.7.3 Inclusion**

Les cassettes ont été introduites dans un distributeur de paraffine contenant de la paraffine fondue à 60°C. Les organes ont ensuite été introduits dans des moules à l'intérieur desquels a été coulée la paraffine fondue. Une fois la paraffine refroidie, les blocs ont été placés dans le congélateur à -20°C pour durcissement.

### **II.7.4 Coupe**

Les blocs refroidis ont été fixés sur un microtome et coupés en épaisseur de 5 µm. Une fois coupées, les sections ont mises à déplier dans un bain d'eau chaude (40°C) puis récupérées sur une lame microscopique. Les lames ont ensuite été laissées 24h dans une étuve à 45°C avant coloration.

### **II.7.5 Coloration**

Avant la coloration, les lames ont été déparaffinées dans 3 bacs de xylène pendant 5 min chacun, puis réhydratées par passages successifs de 5 min dans des bacs d'alcool éthylique de degrés décroissants : 100° (3 bacs), 95° (1 bac), 70°(1 bac) et enfin dans l'eau distillée pendant 5 min. Les coupes ont ensuite été depicriquées dans du carbonate de lithium a 1 % pendant 1 min. Les organes ont été colorés à l'hématoxyline-éosine. Pour ce faire, les lames ont été introduites dans l'hématoxyline pendant 10 min pour colorer les noyaux cellulaires en bleu foncé. Après rinçage à l'eau de robinet, les lames ont été plongées dans l'éosine pendant 15 min pour colorer le cytoplasme en rose, puis elles ont été rincées à l'eau distillée.

### **II.7.6 Montage**

Après une déshydratation rapide dans un bac d'alcool absolu, les lames ont été trempées dans du toluène et montées à l'eukitt.

### II.7.7 Observation microscopique

Les coupes colorées ont été observées au microscope photonique de type Olympus CH2 et les photographies ont été effectués à l'aide d'un appareil de marque Olympus 101 monté sur le microscope.

### II.8 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  ESM

Pour les études de réactivité vasculaire *in vitro*, la concentration de l'extrait qui induit 50% de la relaxation maximale ( $CE_{50}$ ) et la valeur de relaxation maximale ( $E_{max}$ ) ont été déterminés à partir de courbes concentration-réponse réalisées à partir du logiciel Sigma Plot (Systat Software Inc., San Jose, USA). Les analyses d'interaction entre les différents groupes aux différentes concentrations ont été effectués par le test « ANOVA Two Way ». La comparaison entre deux groupes a été réalisée par le test de t-student.

Les résultats des tests *in vivo* sur l'hypertension artérielle induite par le glucose ou l'alcool, ont été traités par l'analyse de la variance ANOVA «One Way» suivit du post test de Dunnett, utilisé pour comparer les différents groupes grâce au programme GraphPad Instat.

La comparaison des résultats des tests de toxicité a été effectuée par rapport au groupe contrôle grâce au logiciel Sigma Stat (Systat Software Inc., San Jose, USA) par l'analyse de la variance ANOVA suivi du test de Dunnett).

Quelle que soit l'analyse statistique utilisée, la différence était considérée significative pour un  $P < 0,05$ .

# CHAPITRE III

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### III.1 RESULTATS

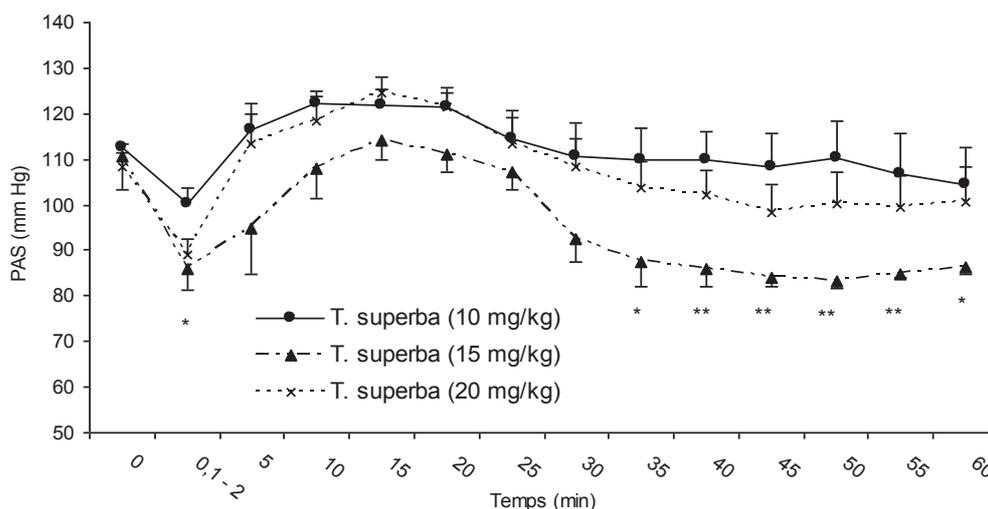
#### III.1.1 Effets de l'administration intraveineuse de l'extrait aqueux sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque

##### III.1.1.1 Chez les rats normotendus

L'injection de l'extrait aqueux de *T. superba* a provoqué une diminution immédiate de la pression artérielle du rat normotendu. L'importance de la chute était fonction de la dose administrée.

A la dose de 10 mg/kg, la PAS est passée de 113 mmHg à 100 mmHg, soit une diminution immédiate et non significative de 11,5%. La pression est remontée ensuite rapidement et a retrouvée sa valeur de départ après 4 minutes. La dose de 15 mg/kg a provoquée une diminution brutale et significative de la PAS de 22,5%. La PAS au départ de 111 mmHg a baissé dès injection intraveineuse de *T. superba* jusqu'à 86 mm de Hg, puis est remontée jusqu'à la valeur initiale au bout de 13 minutes environ avant de rechuter progressivement pour se maintenir autour de 85 mmHg, soit environ à 23% au dessous de la valeur initiale dès la 40<sup>ème</sup> minute ; Cette diminution tardive et significative de la pression artérielle perdure jusqu'à la 60<sup>ème</sup> minute. L'extrait à la dose de 20 mg/kg a provoqué une diminution immédiate de la PAS de 18%. La PAS est remontée ensuite rapidement et était de 125 mmHg (contre 108 mmHg au départ) avant de diminuer ensuite progressivement pour se stabiliser à 7,4% ( $P>0,05$ ) environ au dessous de la valeur initiale.

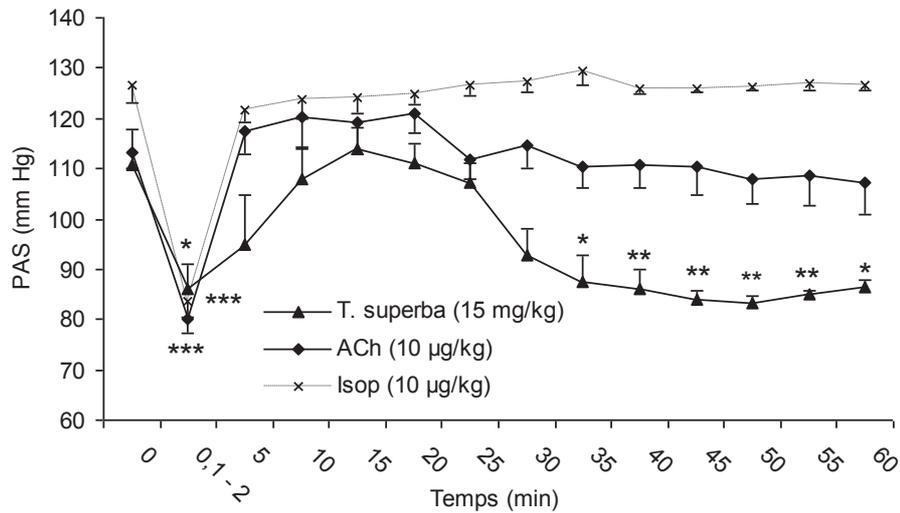
La figure 14 récapitule la variation moyenne de la PAS des R.N.T après injection de l'extrait aqueux de *T. superba*. Cette figure permet de remarquer que la dose 15 mg/kg provoque une diminution, à la fois rapide et tardive, de la PAS des R.N.T.



**Figure 14.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur la pression artérielle systolique (PAS) des rats normotendus. Chaque point représente la PAS moyenne  $\pm$  ESM, n = 5. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$ , différence significative par rapport à la valeur initiale.

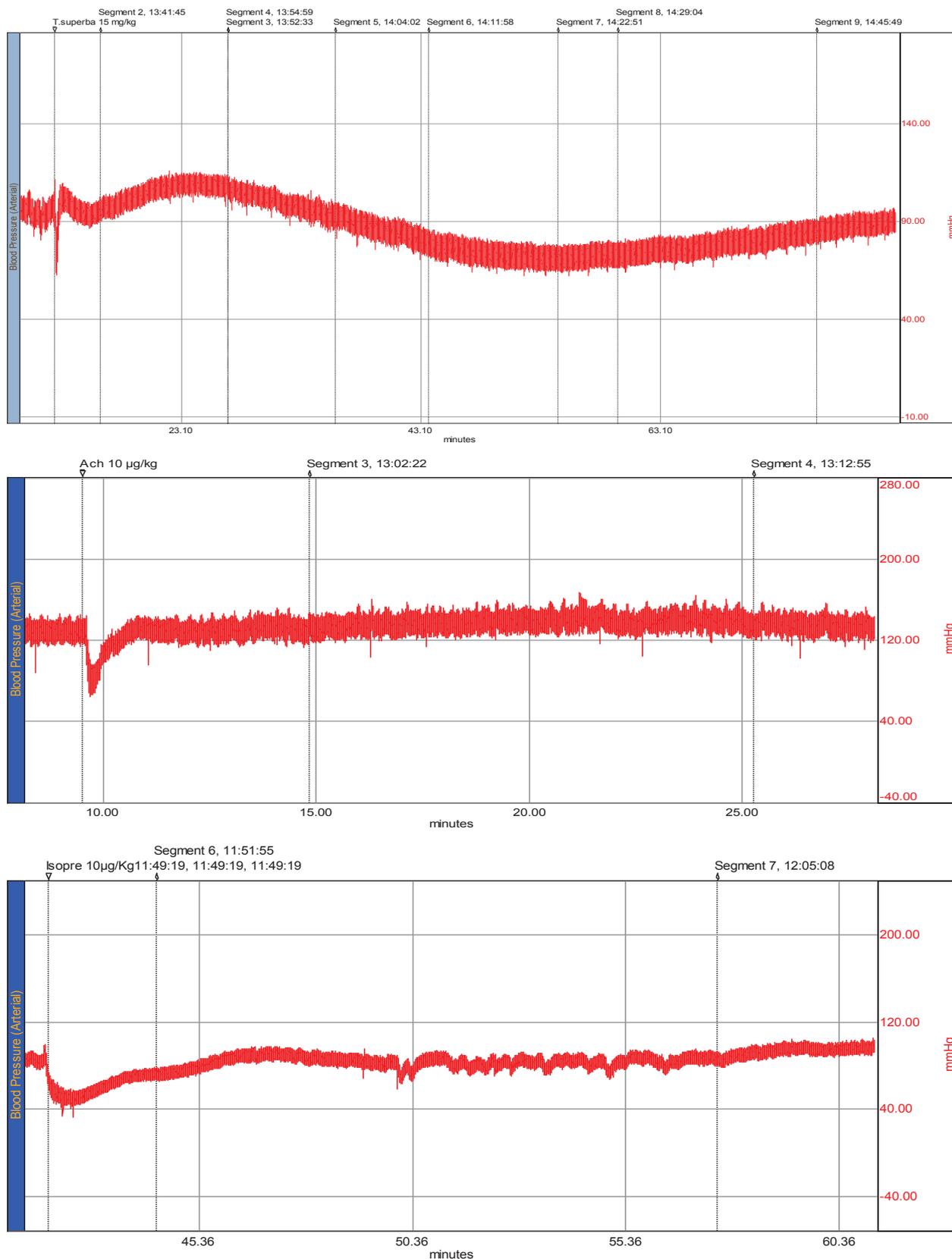
### III.1.1.1.1 Effets comparés de *T. superba* et des substances pharmacologiques

L'injection intraveineuse de l'acétylcholine (ACh) à la dose de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a provoqué une diminution brutale et significative ( $P < 0,001$ ) de la pression artérielle. La PAS au départ de 113 mmHg diminue dès injection de l'ACh jusqu'à 80 mmHg, soit une chute brutale de 29,20%. La pression remonte ensuite progressivement jusqu'à 120 mm de Hg à la 10<sup>ème</sup> minute avant de redescendre pour se stabiliser autour d'une valeur non significativement différente de la valeur initiale (figure 15). L'administration intraveineuse de l'isoprénaline à la dose 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a provoqué une baisse immédiate, brutale et significative de la pression artérielle. La PAS au départ de 126 mmHg est passée à 83 mmHg, soit une baisse de 34%. La pression est remontée ensuite progressivement jusqu'à atteindre sa valeur de départ à la 25<sup>ème</sup> minute, valeur autour de laquelle la pression s'est stabilisée. La figure 15 montre que l'extrait de plante tout comme toutes les substances pharmacologiques étudiées provoquent une diminution rapide de la PA. Contrairement à l'ACh et à l'isoprénaline, l'extrait aqueux présente une seconde phase d'activité hypotensive qui commence pour la dose de 15 mg/kg à partir de la 20<sup>ème</sup> min et perdure pendant une heure.



**Figure 15.** Effets comparés d'une dose de l'extrait aqueux de *T. superba*, de l'acétylcholine (ACh) et de l'isoprénaline (Isop) sur la pression artérielle systolique des rats normotendus. Chaque point représente la PAS moyenne  $\pm$  E.S.M.  $n = 5$ . \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$ , différence significative par rapport à la valeur initiale.

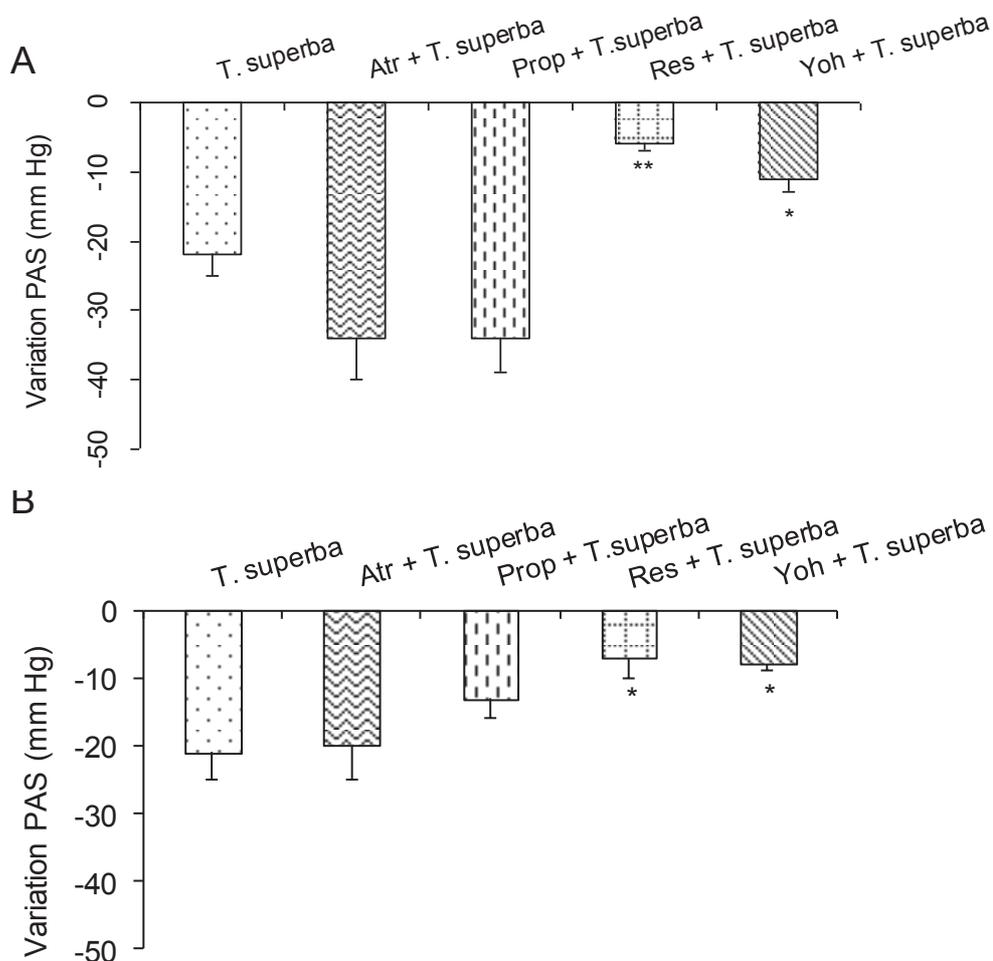
La figure 16 présente les tracés originaux illustrant la variation de la pression artérielle obtenus respectivement par injection intraveineuse de *T. superba* (15 mg/kg), de l'acétylcholine (10 µg/kg) et de l'isoprénaline (10 µg/kg).



**Figure 16.** Enregistrements originaux montrant l'effet de l'extrait aqueux de *T. superba* (15 mg/kg), de l'acétylcholine (10µg/kg) et de l'isoprénaline (10µg/kg) sur la pression artérielle d'un rat normotendu. Les valeurs sur l'axe des abscisses représentent le temps en minutes et les valeurs sur l'axe des ordonnées représentent la PA en mmHg.

### III.1.1.1.2 Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* en présence de différents agents pharmacologiques

Les effets de l'extrait aqueux de *T. superba* ont été évalués en présence de quelques antagonistes pharmacologiques : L'atropine est un antagoniste des récepteurs muscariniques de l'ACh ; le propranolol est un antagoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques utilisés par l'isoprénaline ; la yohimbine est un antagoniste des récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques ; la réserpine entraîne la déplétion du taux de catécholamines et donc la diminution de leur libération par les nerfs sympathiques. Le prétraitement des rats normotendus (RNT) anesthésiés par l'atropine (1 mg/kg) ou le propranolol (100  $\mu$ g/kg) n'a pas affecté significativement l'effet hypotensif initial (Figure 17 A) et tardif (Figure 17 B) de l'extrait de plante. Le prétraitement des RNT à la réserpine (5 mg/kg) ou à la yohimbine (0,1 mg/kg) a réduit de façon significative l'effet hypotensif immédiat de l'extrait (Figure 17 A). L'activité hypotensive immédiate de *T. superba* à la dose de 15 mg/kg de  $22,5 \pm 3,6\%$  n'était plus que de  $6,1 \pm 1,4 \%$  chez RNT prétraités à la réserpine et de  $11,4 \pm 1,8 \%$  chez ceux prétraités à la yohimbine, soit une diminution de l'effet hypotensif de 72,88 % ( $P < 0,01$ ) et de 49,33 % ( $P < 0,05$ ), respectivement. La baisse tardive de la pression artérielle induite par l'extrait (15 mg/kg) a été également significativement réduite par le prétraitement des RNT par la réserpine ou la yohimbine (Figure 17 B).



**Figure 17.** Pourcentage de diminution immédiate (A) et tardive (60 min après injection, B) de la pression artérielle systolique (PAS) chez les rats anesthésiés après injection intraveineuse de l'extrait aqueux de *T. superba* (15 mg/kg).

Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SEM  $n= 5$ , \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$  différence significative par rapport à l'action de *T. superba* seul. Certains animaux ont été prétraités à l'atropine (Atr, 1 mg/kg), au propranolol (Prop, 100  $\mu$ g/kg), ou à la yohimbine (Yoh, 0,1 mg/kg) 5 min avant administration de l'extrait de *T. superba*. La réserpine (Res, 5 mg/kg) a été administrée 3 jours avant injection de l'extrait de *T. superba*.

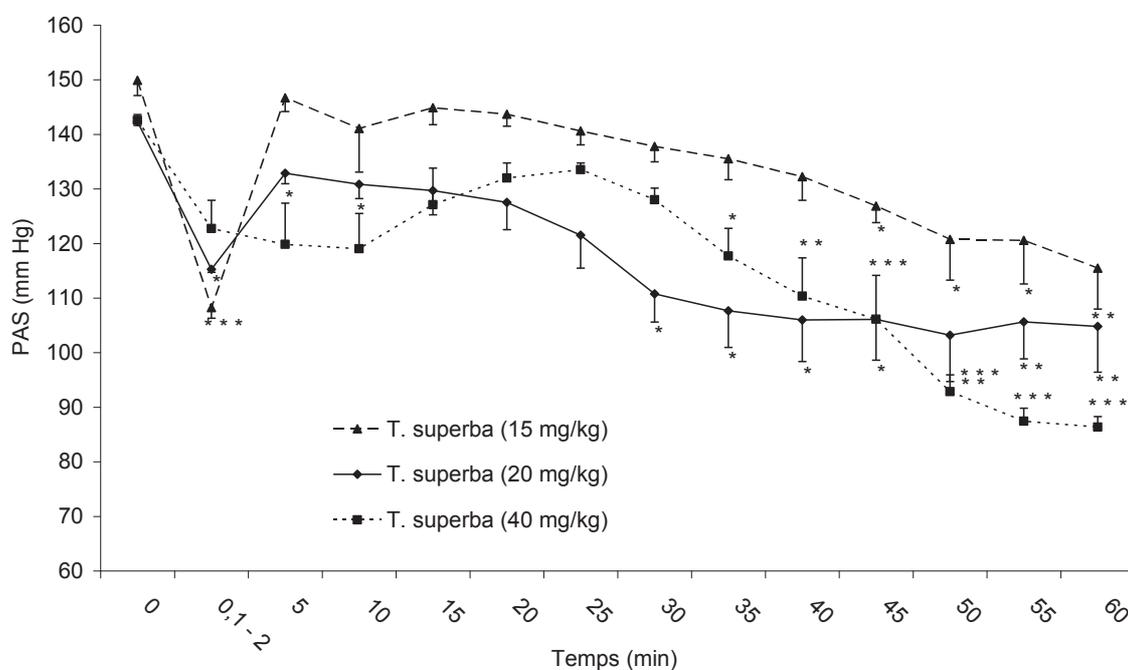
### III.1.1.2 Chez les rats hypertendus au D-glucose

L'extrait aqueux de *T. superba* aux doses étudiées a induit une activité hypotensive biphasique. La durée et l'importance de la chute de pression artérielle étaient fonction de la dose administrée (Figure 18).

A la dose de 15 mg/kg, la PAS est passée de 150 mmHg à 108 mmHg, soit une diminution immédiate et significative de 28%. La pression est remontée ensuite rapidement vers la valeur de départ et était d'environ 147mmHg après 5 minutes (figure 18). Elle a ensuite diminué progressivement et était de 116 mmHg après 60 minutes, soit une diminution tardive de près de 23%.

La dose de 20 mg/kg a provoqué une chute brutale et significative de la PAS de 19%, suivie d'une légère remontée pendant les 5 premières minutes suivant l'injection. La PAS a rechuté pour se maintenir à 26% environ en dessous de la valeur initiale.

La forte dose de 40 mg/kg a provoqué une diminution immédiate de la PAS de 14% seulement. Cependant, il faut remarquer que la cinétique d'action de l'extrait révèle une diminution progressive plus importante de la PAS. La pression initiale de 143 mmHg a diminuée brusquement jusqu'à 123 mmHg. La PAS a ensuite diminuée progressivement et était de 119 mmHg à la 15<sup>ème</sup> minute Cette diminution initiale de la PAS était suivie d'une légère remontée jusqu'à un maximum de 134 mmHg à la 25<sup>ème</sup> minute. La PAS a ensuite diminuée progressivement jusqu'autour de 87 mmHg, 55 minutes après injection de l'extrait, ce qui représente une diminution tardive de 39%.



**Figure 18.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur la pression artérielle systolique (PAS) des rats hypertendus par surcharge hydrique de glucose.

Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SEM, n=5, \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  par rapport à la valeur initiale.

### III.1.2 Etude des effets préventifs de l'extrait aqueux de *T. superba*

#### III.1.2.1 Effets préventifs de *T. superba* sur l'hypertension artérielle induite par le glucose chez le rat

L'administration chronique d'une solution de glucose 10% aux RNT pendant 3 semaines a provoquée une augmentation significative de la pression artérielle (PA) et de la fréquence cardiaque (Fc) des rats (tableau XV). La PAS a augmenté de 20,34% par rapport aux contrôles normotendus et la Fc de 9,92%. Chez les RNT traités concomitamment avec la solution de D-glucose et l'extrait de plante (50 et 100 mg/kg) ou la nifédipine (10 mg/kg) pendant la même durée expérimentale, il a été observé que l'extrait de plante tout comme la nifédipine est capable d'empêcher l'élévation de la PA et de la Fc provoquées par une consommation chronique de D-glucose. Par rapport aux rats traités uniquement au glucose, la PAS a diminué de 27,67% et de 38,58%, respectivement aux doses de 50 et de 100 mg/kg. La nifédipine a provoquée une réduction de la PAS par rapport aux contrôles (RHG). L'extrait à la dose de 100 mg/kg et la nifédipine 10 mg/kg ont réduit (par rapport aux contrôles traités uniquement au D-glucose) de façon significative la fréquence cardiaque, respectivement de 13,5% et de 15,26%.

**Tableau XV.** Effets préventifs de l'extrait aqueux de *T. superba* sur la pression artérielle des rats traités au glucose (RHG)

Paramètres cardiovasculaires	RNT	RHG	RHG + extrait (50 mg/kg)	RHG + extrait 100 mg/kg/jr	RHG + nifédipine 10 mg/kg/jr
PAS (mmHg)	123,4 ± 0,2	148,5 ± 2,7***	107,4 ± 0,7***####	91,2 ± 1,4 ***####	100,7 ± 1,6 ***####
PAD (mmHg)	105,0 ± 3,0	130,0 ± 3,7***	90,0 ± 2,1 ***####	85,8 ± 3,8 ***####	89,0 ± 1,3 ***####
Fc (bats/min)	365,8 ± 5,7	402,1 ± 7,9 **	393,0 ± 4,5*	347,8 ± 3,8 ##	340,7 ± 12,1 ###

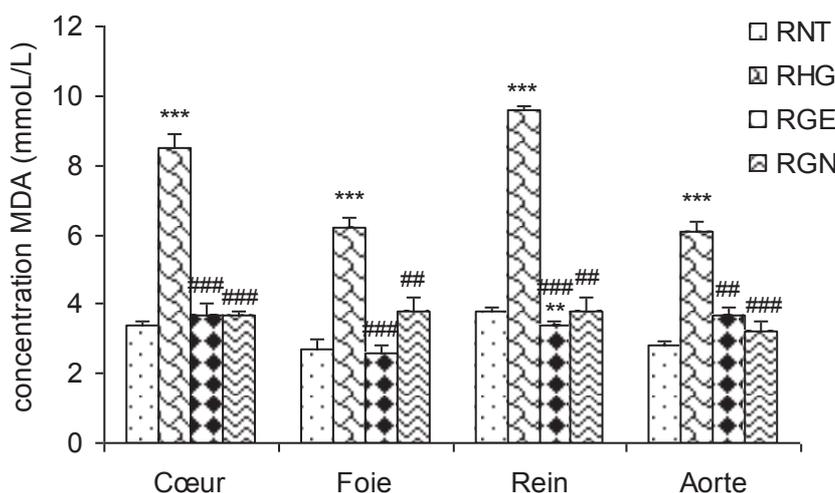
Chaque valeur représente la moyenne ± E.S.M n=5 \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$  par rapport au groupe de rats normotendus (RNT) ; ## $P < 0,01$  ; #### $P < 0,001$  par rapport au groupe de rats traités au glucose (RHG). PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique ; Fc : fréquence cardiaque.

#### III.1.2.2 Effets de *T. superba* sur quelques paramètres du stress oxydatif chez les rats hypertendus au D-glucose

Les effets de l'extrait aqueux de *T. superba* ont été évalués à la suite du traitement préventif sur la concentration tissulaire de plusieurs marqueurs du stress oxydatif.

### III.1.2.2.1 Effets sur la concentration tissulaire de malondialdéhyde et de glutathion réduit

La détermination du taux de malondialdéhyde (MDA) tissulaire a révélé une augmentation significative de la concentration en MDA dans différents tissus des rats traités au glucose. Les concentrations sont passées de 0,034 ; 0,0027 ; 0,0061 et 0,0028 mol/L respectivement dans le cœur, le foie, le rein et l'aorte chez les R.N.T à 0,0085 ; 0,0062 ; 0,0096 et 0,0061 mol/L chez les rats traités au glucose. L'extrait (100 mg/kg) a entraîné par rapport aux contrôles traités uniquement au glucose une réduction de la concentration de MDA respectivement de 56,47%, 58,06%, 64,58% et de 39,34% dans le cœur, le foie, le rein et l'aorte. La nifédipine a également diminué de façon significative la concentration de MDA dans ces différents tissus (Figure 19). La réduction du taux de MDA par rapport aux RHG induite par la nifédipine était de 56,47% dans le cœur, 61,29%, dans le foie, 61,29% dans les reins et de 47,54% dans l'aorte.

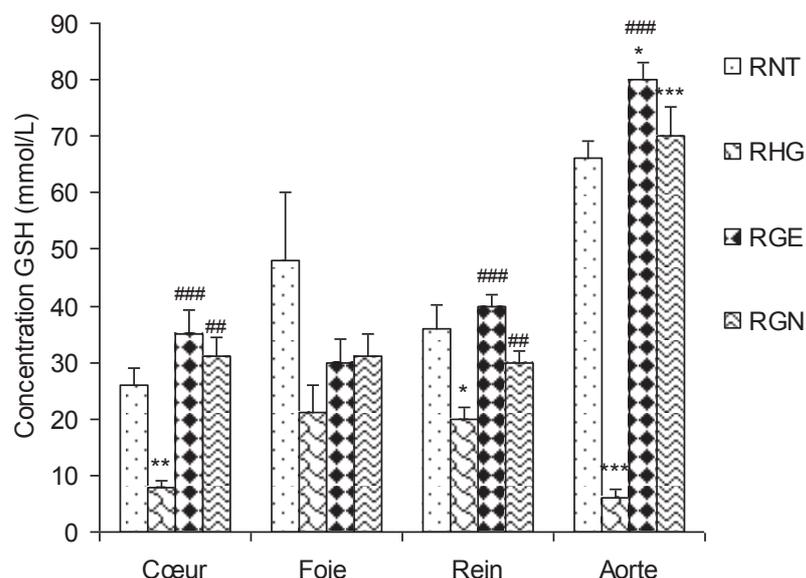


**Figure 19.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur la concentration de malondialdéhyde.

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). ## $P < 0,01$  ; ### $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats rendus hypertendus au glucose (RHG). RGN = rats traités au glucose (10 %) combiné à la nifédipine (10 mg/kg), RGE = rats traités au glucose combiné à l'extrait (100 mg/kg).

La concentration de GSH a significativement diminué dans le cœur, le rein et l'aorte des rats traités au glucose (10%) (Figure 20). Cette diminution était respectivement de 69,23%, 44,44% et de 90,9% par rapport aux R.N.T. L'extrait (100 mg/kg) a provoqué par rapport aux contrôles traités uniquement au glucose une augmentation de la concentration de GSH dans ces tissus. Les concentrations en GSH, respectivement de 0,008 ; 0,02 et 0,006 mol/L dans le cœur, le rein et l'aorte

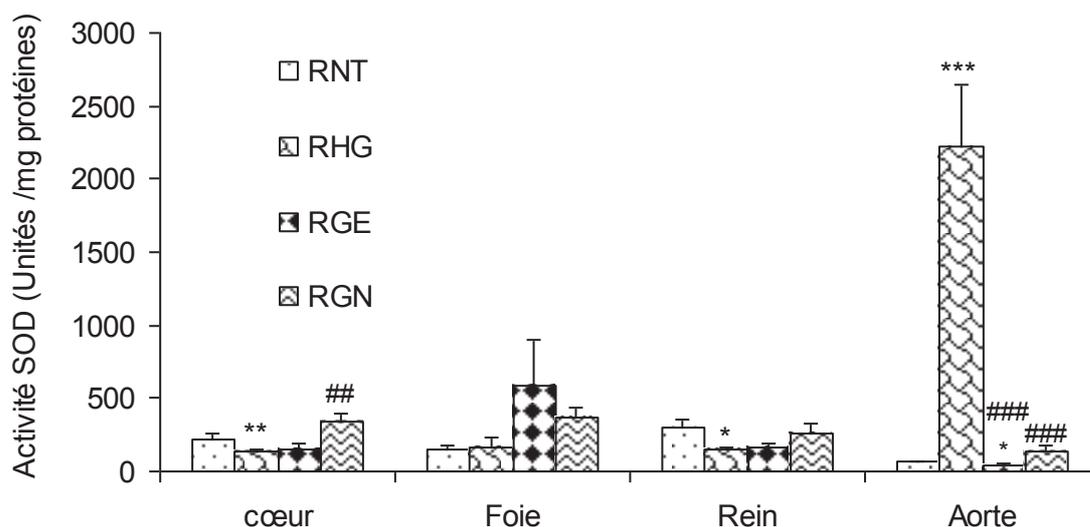
des RHG étaient de 0,035 ; 0,04 et 0,008 mol/L chez les traités au glucose et à l'extrait. La figure 20 montre également que la nifédipine (10 mg/kg), au même titre que l'extrait de la plante a empêché de façon significative la diminution de la concentration en GSH induite par le glucose.



**Figure 20.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur la concentration de glutathion. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  ESM, n = 5. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (R.N.T). #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats traités au glucose (RHG). RGN = rats traités au glucose (10 %) combiné à la nifédipine (10 mg/kg), REG = rats traités au glucose combiné à l'extrait (100 mg/kg).

### III.1.2.2.2 Activité tissulaire de l'enzyme superoxyde dismutase

Le dosage de la SOD dans les tissus des rats traités au glucose (10%) pendant 3 semaines montre une diminution significative de l'activité de SOD de 37,90% et de 49,67%, respectivement dans le cœur et le rein. Au niveau de l'aorte, l'activité de SOD de  $65 \pm 6,22$  unités/mg protéines chez les R.N.T a augmentée jusqu'à la valeur de  $2222,80 \pm 417,21$  unités/mg de protéines chez les R.H.G. *T. superba* a provoquée par rapport aux R.H.G une réduction du taux de SOD dans l'aorte de 98,24%. La figure 21 montre que la nifédipine utilisée dans les mêmes conditions que l'extrait a induit une augmentation significative de l'activité de la SOD dans le cœur par rapport aux RHG. L'activité de la SOD a diminuée de 93,79% dans l'aorte par rapport aux RHG.



**Figure 21.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'activité spécifique de la superoxyde dismutase.

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (R.N.T). #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,001$  différence significative par rapport aux rats traités au glucose (R.H.G). R.G.N = rats traités au glucose (10 %) combiné à la nifédipine (10 mg/kg), R.G.E = rats traités au glucose combiné à l'extrait (100 mg/kg).

### III.1.2.2 Effets préventifs de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'HTA induite par l'alcool

#### III.1.2.2.1 Effets sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque

Le tableau XVI montre que l'administration chronique de l'alcool éthylique aux rats normotendus pendant 8 semaines entraîne une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS), de la pression artérielle diastolique (PAD) et de la pression artérielle moyenne (PAM). La PAS et la PAD des rats traités à l'alcool éthylique (3 g/kg) ont significativement augmenté de 42,65% et de 45,91% respectivement par rapport aux rats normotendus. La PAM de  $110,61 \pm 1,40$  mmHg chez les rats normotendus contrôles a augmenté jusqu'à  $160,12 \pm 1,23$  mmHg chez les rats traités à l'alcool, soit une augmentation de la pression artérielle moyenne de 44,76%. Chez les rats normotendus traités de façon concomitante avec l'alcool (3 g/kg) et l'extrait de plante, les résultats montrent que l'extrait aqueux de *T. superba* provoque par rapport aux contrôles traités uniquement à l'alcool, une diminution dose-dépendante de la pression artérielle. La PAS, de  $167,92 \pm 1,13$  mmHg chez les rats traités uniquement à l'alcool est de  $149,83 \pm 1,73$  mmHg chez ceux ayant reçu en même temps l'extrait à la dose de 100 mg/kg et de  $120,37 \pm 1,71$  mmHg à la forte dose de 200 mg/kg, soit respectivement une réduction de la PAS de 9,30 % ( $P < 0,01$ ) et de 26,51 % ( $P < 0,001$ ). Chez les rats traités à l'alcool (3 g/kg) et à la

nifédipine (5 mg/kg), la PAS était de  $143,56 \pm 1,65$  mmHg, soit une inhibition de 14,50 % ( $P < 0,001$ ) par rapport aux rats traités uniquement à l'alcool.

La fréquence cardiaque moyenne de  $420 \pm 2$  battements par minutes (BPM) chez les rats normotendus contrôles a augmenté jusqu'à  $434 \pm 2$  BPM chez les rats rendus hypertendus par consommation chronique d'alcool, soit une augmentation non significative de 3,33%. L'administration concomitante de l'alcool et de l'extrait de plante a réduit de façon significative ( $P < 0,001$ ) la fréquence cardiaque de 16,12 % à la dose de 100 mg/kg et de 14,51 % à la dose de 200 mg/kg par rapport aux rats traités exclusivement à l'alcool éthylique. La nifédipine (5 mg/kg) utilisée dans les mêmes conditions que l'extrait n'a pas provoqué de modification significative de la fréquence cardiaque par rapport aux rats traités exclusivement à l'alcool éthylique (tableau XVI).

**Tableau XVI.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque moyenne des rats rendus hypertendus par ingestion chronique de l'alcool éthylique 35°

Paramètres cardiovasculaires	Traitements				
	Eau distillée (10 mL/kg)	Ethanol 35° (3 g/kg)	Ethanol 35° (3 g/kg) + Extrait AQU (100 mg/kg)	Ethanol 35° (3 g/kg) + Extrait AQU (200 mg/kg)	Ethanol 35°(3 g/kg) + Nifédipine (5mg/kg)
PAD (mmHg)	107,06±1,5	156,22±1,28 <sup>***</sup>	139,61±1,82 <sup>***###</sup>	117,36±1,90 <sup>***###</sup>	133,69±1,70 <sup>***###</sup>
PAM (mmHg)	110,61 ± 1,40	160,12± 1,23 <sup>***</sup>	143,01 ± 1,79 <sup>***###</sup>	120,37 ± 1,81 <sup>***###</sup>	136,98 ± 1,68 <sup>***###</sup>
PAS (mmHg)	117,71 ± 1,35	167,92± 1,13 <sup>***</sup>	149,83 ± 1,73 <sup>***###</sup>	126,40 ± 1,65 <sup>***###</sup>	143,56 ± 1,65 <sup>***###</sup>
FC (BPM)	420,00 ± 2,00	434,00 ±2,00 <sup>***</sup>	364 ± 4 <sup>***###</sup>	371,00 ± 2,00 <sup>***###</sup>	435,00 ± 3,00 <sup>***</sup>

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, n = 5. <sup>\*\*\*</sup>P < 0,001, différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). <sup>###</sup>P < 0,001 ; <sup>#</sup>P < 0,01 différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg). BPM : Battement par minute, FC : Fréquence cardiaque moyenne.

### III.1.2.2.2 Effets de *T. superba* sur les paramètres biochimiques sériques des rats hypertendus à l'alcool

Le tableau XVII montre que l'administration de l'alcool éthylique 35° à la dose de 3 g/kg aux rats normotendus pendant une période de 8 semaines a provoqué par rapport aux contrôles normotendus une augmentation significative du taux sérique de

cholestérol total (+105,51 %), des triglycérides (+83,31 %), de l'ALAT (+51,20 %) et de l'ASAT (68,32 %). L'administration concomitante de l'alcool (3 g/kg) et de l'extrait (200 mg/kg) a provoqué une réduction significative du taux de cholestérol total de 52,50 %, de l'ALAT de 34,44 % et de l'ASAT de 41,62 % par rapport aux rats traités exclusivement à l'alcool. L'extrait, contrairement à la nifédipine n'a pas réduit de façon significative la concentration en triglycérides. Dans notre étude, la nifédipine (5 mg/kg) utilisée dans les mêmes conditions que l'extrait aqueux de *T. superba* a provoqué par rapport aux rats traités exclusivement à l'alcool une diminution du taux de cholestérol total de 38,56 %, de triglycérides de 27,45 % et de l'ASAT de 44,81 %. La nifédipine n'a pas affecté significativement le taux d'ALAT.

Le taux de créatinine chez les rats traités par l'alcool a diminué significativement de 26 % ( $P < 0,001$ ) par rapport aux rats normotendus. L'extrait aqueux de *T. superba* (200 mg/kg) tout comme la nifédipine (5mg/kg) a augmenté par rapport aux animaux traités exclusivement à l'alcool éthylique, le taux de créatinine sérique respectivement de 23,42 % ( $P < 0,001$ ) et de 17,11 % ( $P < 0,01$ ).

La prise chronique de l'alcool par les rats normotendus a entraîné une augmentation non significative de la concentration sérique de bilirubine de 14,87 %, par rapport aux rats contrôles. L'administration concomitante de l'alcool et de l'extrait (200 mg/kg) a induit par rapport aux rats traités exclusivement à l'alcool une diminution non significative du taux sérique de bilirubine de 12,23 %. Chez les rats ayant reçu de la nifédipine (5 mg/kg) à la place de l'extrait de plante la concentration de bilirubine a diminué de 11,51 % ( $P > 0,05$ ) par rapport aux rats traités à l'alcool seul.

**Tableau XVII:** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur quelques paramètres sériques des rats rendus hypertendus par ingestion chronique de l'alcool éthylique 35°

Paramètres biochimiques	Traitements			
	Eau distillée (10mL/kg)	Ethanol 35° (3g/kg)	Ethanol 35° (3g/kg) + Extrait AQU (200mg/kg)	Ethanol 35° (3g/kg) + Nifédipine (5mg/kg)
ALAT (UI)	183,20±3,12	277,00±3,92 <sup>***</sup>	181,60±2,16 <sup>###</sup>	267,00±3,38 <sup>***#</sup>
ASAT (UI)	92,20 ± 3,72	155,20±3,06 <sup>***</sup>	90,60 ± 3,01 <sup>###</sup>	85,64±1,58 <sup>***###</sup>
Triglycérides (mg/dL)	58,08 ± 0,34	106,47±2,10 <sup>***</sup>	107,76 ± 2,16 <sup>***</sup>	77,24±2,48 <sup>***###</sup>
Cholesterol (mg/dL)	79,61 ± 3,00	163,61±3,06 <sup>***</sup>	77,7 ± 1,66 <sup>###</sup>	100,52 ± 2,31 <sup>***</sup>
Créatinine (mg/mL)	0,150±0,005	0,111±0,003 <sup>***</sup>	0,137±0,003 <sup>###</sup>	0,130±0,003 <sup>***#</sup>
Bilirubine (mg/mL)	1,21 ± 0,01	1,39 ± 0,13	1,22 ± 0,01	1,23 ± 0,03

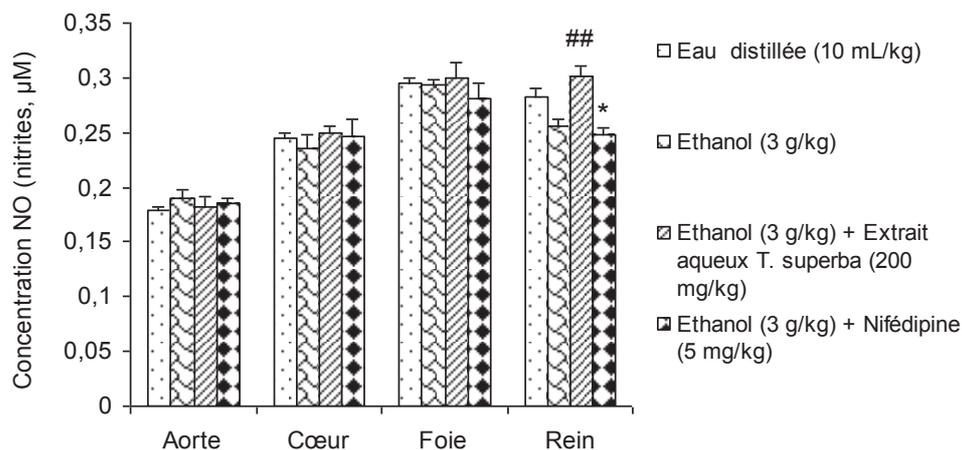
Chaque valeur représente la moyenne ± ESM, n = 5. \**P* < 0,05 ; \*\**P* < 0,01 ; \*\*\**P* < 0,001, différence significative par rapport aux rats normotendus (eau distillée). #*P* < 0,05 ; ##*P* < 0,01 ; ###*P* < 0,001, différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg).

### III.1.2.2.3 Effets de *T. superba* sur quelques paramètres du stress oxydatif des rats rendus hypertendus par l'alcool

#### III.1.2.2.3.1 Effets sur la concentration en monoxyde d'azote (nitrite)

Le taux de monoxyde d'azote exprimé en µM était de 0,170 ± 0,003 dans l'aorte, 0,240 ± 0,003 dans cœur, 0,290 ± 0,004 dans le foie et de 0,280 ± 0,07 dans les reins chez les rats traités à l'eau distillée. Chez les rats traités à l'alcool (3 g/kg) pendant 8 semaines ce taux a augmenté de 11,76 % (*P* > 0,05) dans l'aorte. La concentration de NO a diminuée de 4,16 % dans le cœur (*P* > 0,05), 0,40% dans le foie (*P* > 0,05) et de 10,71% dans le rein (*P* < 0,05) par rapport aux rats traités à l'eau distillée. L'administration de l'alcool éthylique (3 g/kg) et de l'extrait aqueux de *T. superba* (200 mg/kg) pendant 8 semaines n'a pas provoqué de modification

significative du taux de monoxyde d'azote dans l'aorte, le cœur et le foie. Au niveau des reins, le taux de NO a augmenté significativement de 17,57% par rapport aux rats rendus hypertendus par consommation chronique de l'alcool. La nifédipine (5 mg/kg) utilisée dans les mêmes conditions que l'extrait n'a pas affecté significativement la concentration de NO dans le rein par rapport aux rats contrôles traités à l'alcool (figure 22).



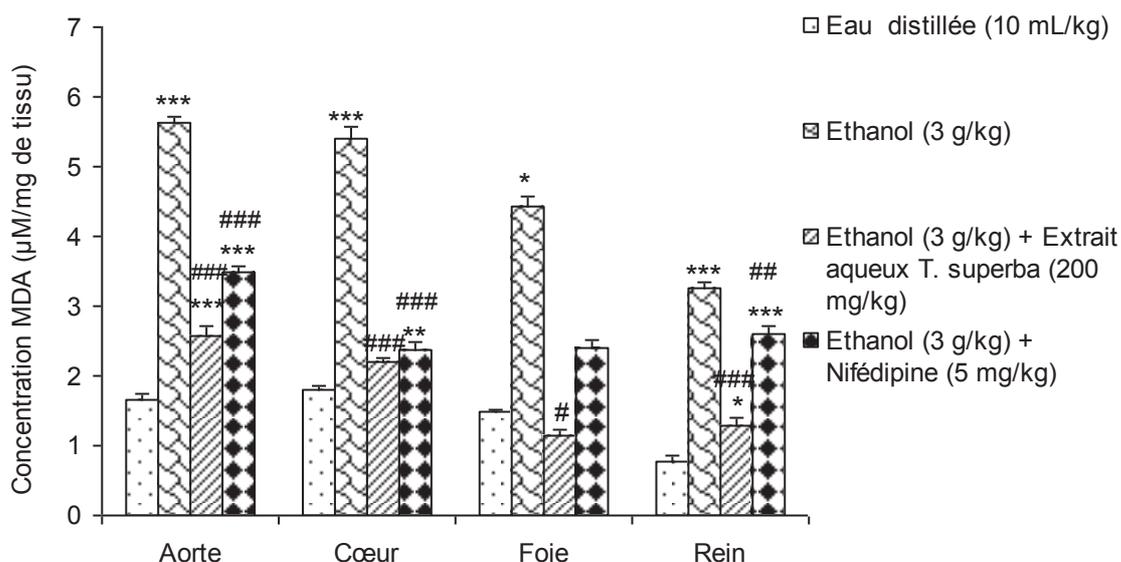
**Figure 22.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur le taux de monoxyde de d'azote.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \* $P < 0,05$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). ## $P < 0,01$ , différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3 g/kg).

### III.1.2.2.3.2 Effets sur la concentration en malondialdéhyde

Le taux de malondialdéhyde exprimé en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de tissu était de  $1,65 \pm 0,10$  dans l'aorte,  $1,81 \pm 0,04$  dans cœur,  $1,48 \pm 0,05$  dans le foie et de  $0,78 \pm 0,07$  dans les reins des rats traités à l'eau distillée. Chez les rats traités à l'alcool (3 g/kg) pendant 8 semaines ce taux a augmenté significativement de 243,29 % dans l'aorte, 178,45 % dans le cœur, 202,04 % dans le foie et de 320,77% dans le rein par rapport aux rats traités à l'eau distillée. Dans les organes des rats traités à l'alcool (3 g/kg) et à l'extrait aqueux de *T. superba* (200 mg/kg), le taux de malondialdéhyde était significativement inférieur à celui obtenu dans les tissus des rats ayant reçu uniquement de l'alcool. L'extrait aqueux de *T. superba* a provoqué une diminution du taux de malondialdéhyde de 54,52% dans l'aorte, 59,44% dans le cœur, 74,09% dans le foie et de 60,49% dans le rein par rapport aux rats rendus hypertendus par consommation chronique d'alcool. La nifédipine (5 mg/kg) a également réduit par rapport aux rats traités uniquement à l'alcool le taux de malondialdéhyde de 38,36%

dans l'aorte, 56,29% dans le cœur, 46,17% dans le foie et de 19,44% dans le rein (figure 23).

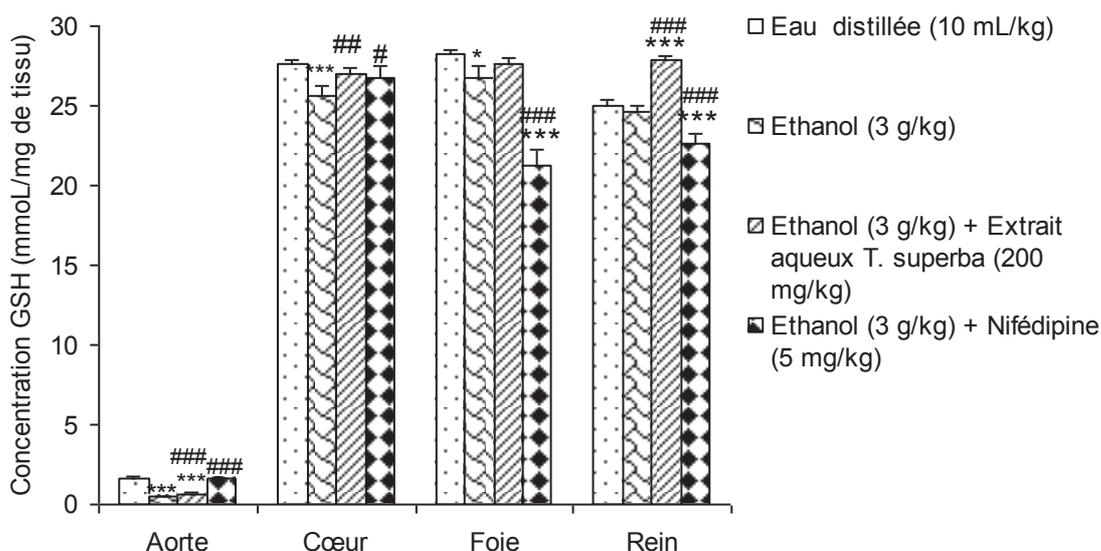


**Figure 23.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur le taux de malondialéhyde. Chaque valeur représente à la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). #  $P < 0,05$  ; ##  $P < 0,01$  ; ###  $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg).

### III.1.2.2.3.3 Effets sur la concentration en glutathion réduit

Le taux de glutathion réduit exprimé en mmol/mg de tissu est étai de  $1,64 \pm 0,06$  dans l'aorte,  $27,58 \pm 0,25$  dans le cœur,  $28,26 \pm 0,27$  dans le foie et de  $25,04 \pm 0,34$  dans le rein chez les rats traités à l'eau distillée. Chez les rats traités à l'alcool (3 g/kg) pendant 8 semaines le taux de glutathion réduit a diminué de 70,73 % ( $P < 0,001$ ) dans l'aorte, 6,92 % ( $P > 0,05$ ) dans le cœur, 5,48 % ( $P > 0,05$ ) dans le foie et de 1,63 % ( $P > 0,05$ ) dans le rein par rapport aux rats traités à l'eau distillée. Dans les organes des rats traités à l'alcool (3 g/kg) et à l'extrait aqueux de *T. superba* (200 mg/kg), le taux de glutathion réduit était supérieur à celui des rats ayant reçu uniquement de l'alcool. L'extrait aqueux de *T. superba* a provoqué une augmentation du taux de glutathion réduit de 39,58 % ( $P < 0,001$ ) dans l'aorte, 5,25 % ( $P < 0,01$ ) dans le cœur, 3,44 % ( $P > 0,05$ ) dans le foie et de 13,27 % ( $P < 0,001$ ) dans le rein par rapport aux rats rendus hypertendus par consommation chronique d'alcool. La nifédipine (5 mg/kg) a également entraîné une augmentation du taux de glutathion réduit de 231,25 % ( $P < 0,001$ ) dans l'aorte et de 4,40 % ( $P < 0,05$ ) dans le cœur. Au niveau du foie et du rein, le taux de glutathion réduit chez les rats traités à l'alcool et à la nifédipine était réduit respectivement de 20,36 % ( $P < 0,001$ ) dans le foie et de

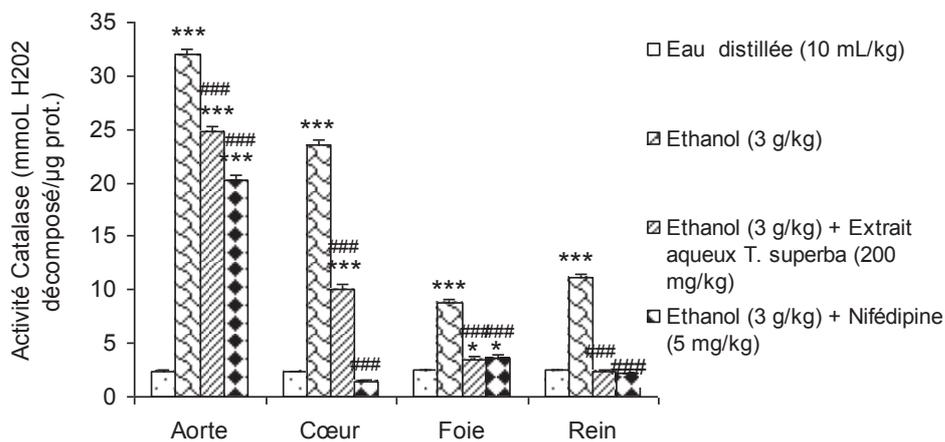
7,30 % ( $P < 0,001$ ) dans le rein par rapport au rats contrôles traités à l'alcool (figure 24).



**Figure 24.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur le taux de glutathion réduit. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \* $P < 0,05$  ; \*\*\* $P < 0,001$  différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). # $P < 0,05$  ; ## $P < 0,01$  ; ### $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg).

#### III.1.2.2.3.4 Effets sur l'activité de la catalase

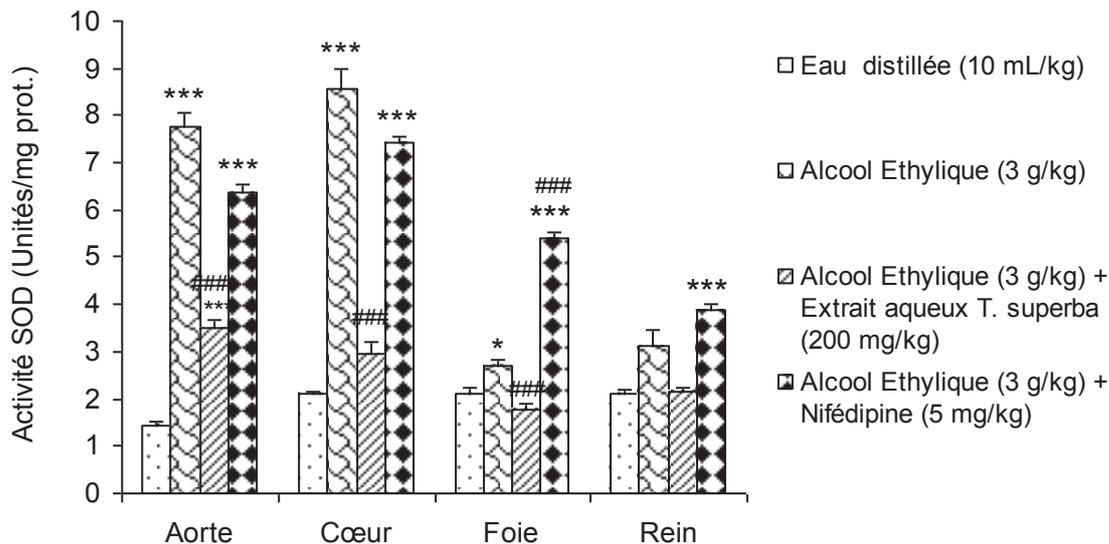
Le taux de catalase exprimé en mmol de  $H_2O_2$  décomposé/min/ $\mu g$  de protéines de  $2,43 \pm 0,13$  dans l'aorte,  $2,32 \pm 0,10$  dans le cœur,  $2,52 \pm 0,06$  dans le foie et de  $2,49 \pm 0,09$  dans le rein des rats normotendus a augmenté de 1218,93 % dans l'aorte, 918,18 % dans le cœur, 252,19 % dans le foie et de 347,79% dans le rein des rats normotendus traités à l'alcool pendant 8 semaines. L'administration concomitante de l'alcool éthylique et de l'extrait aqueux de *T. superba* (200 mg/kg) a réduit par rapport aux rats traités uniquement à l'alcool le taux de catalase de 22,80% ( $P < 0,001$ ) dans l'aorte, 56,97% ( $P < 0,001$ ) dans le cœur, 60,29% ( $P < 0,001$ ) dans le foie et de 78,29% ( $P < 0,001$ ) dans le rein. L'utilisation de la nifédipine (5mg/kg) dans les mêmes conditions que l'extrait a également induit une réduction du taux de catalase par rapport aux rats traités exclusivement à l'alcool éthylique de 36,75% dans l'aorte, 93,87% dans le cœur, 59,27% dans le foie et de 80,89% dans le rein (figure 25).



**Figure 25.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'activité de la catalase. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \*\*\* $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). ### $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg).

#### III.1.2.2.3.4 Effets sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Le taux de SOD exprimé en U/mg de protéines de  $1,40 \pm 0,06$  dans l'aorte,  $2,11 \pm 0,06$  dans le cœur,  $2,12 \pm 0,10$  dans le foie et  $2,12 \pm 0,09$  dans le rein des rats traités à l'eau distillée (10 mL/kg) pendant une période de 8 semaines a augmenté de 437,50 % ( $P < 0,001$ ) dans l'aorte, 305,68 % ( $P < 0,001$ ) dans le cœur, 27,48 % ( $P < 0,01$ ) dans le foie et de 48,11 % ( $P < 0,01$ ) dans le rein des rats rendus hypertendus par l'alcool (figure 26). L'administration concomitante de l'alcool éthylique et de l'extrait aqueux de *T. superba* (200mg/kg) a réduit par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique exclusivement le taux de SOD de 54,90 % dans l'aorte, 65,77 % dans le cœur, 34,57 % dans le foie et de 32,16 % le rein. La nifédipine (5mg/kg) a également réduit le taux de SOD dans l'aorte et le cœur respectivement de 17,70 % et de 13,20 % par rapport aux rats rendus hypertendus par consommation chronique de l'alcool éthylique. Au niveau du foie et des reins, la nifédipine a plutôt entraîné une augmentation du taux tissulaire de SOD respectivement de 186,80 % et de 23,88 % par rapport aux rats traités à l'alcool seul.



**Figure 26.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'activité de la superoxyde dismutase.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, n = 5. \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). ### $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg).

### III.1.3 Effets curatifs de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'HTA induite par l'alcool

Les effets de l'extrait aqueux de *T. superba* ont été évalués en traitement curatif pendant 4 semaines chez les rats rendus expérimentalement hypertendus par administration chronique d'alcool éthylique (3 g/kg) pendant 8 semaines.

#### III.1.3.1 Effets sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque

Le tableau XVIII montre que l'administration d'alcool éthylique pendant 12 semaines aux rats normotendus entraîne une élévation de la pression artérielle. La PAS est passée de  $115,20 \pm 5,28$  mmHg chez les rats normotendus à  $162,20 \pm 3,70$  mmHg chez les rats traités à l'alcool, ce qui représente une augmentation de 40,79%. La PAD est passée de  $103,80 \pm 4,11$  mmHg chez les rats normotendus à  $154,40 \pm 4,36$  mmHg chez les rats traités à l'alcool, ce qui représente une augmentation de 48,74%. L'extrait aqueux de *T. superba* administré concomitamment avec l'alcool éthylique après installation de l'hypertension artérielle a réduit de façon dose dépendante la pression artérielle chez les rats. L'extrait aqueux de *T. superba* a entraîné une réduction de la PAS de 23,30% ( $P < 0,001$ ) et de 35,88% ( $P < 0,001$ ) respectivement aux doses de 100 et de 200 mg/kg. L'extrait de plante a entraîné une réduction de la PAD de 21,89% ( $P < 0,01$ ) à la dose de 100 mg/kg et de 38,73% ( $P < 0,001$ ) à la dose de 200 mg/kg.

L'alcool éthylique a entraîné une augmentation significative de la fréquence cardiaque chez les rats. La fréquence cardiaque est passée de  $344,20 \pm 8,98$  BPM à  $380,00 \pm 12,07$  BPM ( $P < 0,05$ ). L'extrait de plante administré concomitamment avec l'alcool éthylique n'a pas modifié de façon significative la fréquence cardiaque chez les rats. Il faut cependant remarquer que, avec l'extrait de plante ou la nifédipine, la fréquence cardiaque était légèrement inférieure à celle observée chez les rats traités exclusivement à l'alcool.

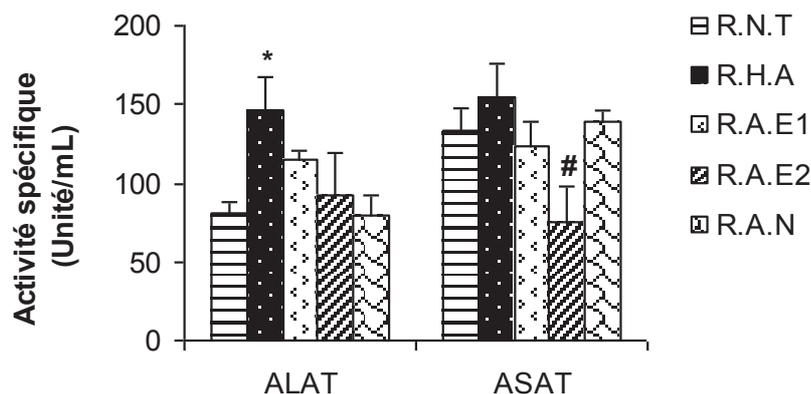
**Tableau XVIII** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* en traitement curatif sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque des rats rendus hypertendus par ingestion chronique de l'alcool éthylique 35°

	Contrôle	Alcool (3g/kg)	Alcool (3g/kg) + + extrait AQU (100 mg/kg)	Alcool (3g/kg) + + extrait AQU (200 mg/kg)	Alcool (3g/kg) + Nifedipine (10 mg/kg)
PAS (mmHg)	$115,20 \pm 5,28$	$162,20 \pm 3,70^{***}$	$124,40 \pm 6,16^{###}$	$104,00 \pm 5,30^{###}$	$118,40 \pm 1,69^{###}$
PAD (mmHg)	$103,80 \pm 4,11$	$154,40 \pm 4,36^{***}$	$120,60 \pm 6,92^{##}$	$94,60 \pm 6,44^{###}$	$111,60 \pm 3,04^{###}$
Fc (BPM)	$344,20 \pm 8,98$	$380,00 \pm 12,07^*$	$364,40 \pm 20,29$	$355,00 \pm 12,10$	$358,40 \pm 11,21$

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, n = 5. \* $P < 0,05$  ; \*\*\* $P < 0,001$ , différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). ## $P < 0,01$  ; ### $P < 0,001$  différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg). BPM : Battement par minute, FC : Fréquence cardiaque moyenne.

### III.1.3.2 Effets sur le taux de transaminases hépatiques

La figure 27 illustre le taux de transaminases hépatiques des rats après traitement à l'alcool et à l'extrait de plante aux doses de 100 et de 200 mg/kg. Il ressort de cette figure que, l'alcool (3 g/kg) administré seul pendant 12 semaines a entraîné une augmentation significative du taux d'ALAT hépatique. Le taux d'ALAT est passé de  $80,92 \pm 6,85$  (U/L) chez les rats normotendus à  $146,28 \pm 20,70$  (U/L) chez les rats ayant reçu uniquement l'alcool ; Ce qui représente une augmentation de 80,77%. Le traitement à l'extrait aqueux de *T. superba* a provoqué une diminution non significative du taux d'ALAT dans le foie de 21,48% ( $P > 0,05$ ) à la dose de 100 mg/kg et de 36,62 % ( $P > 0,05$ ) à la dose de 200 mg/kg. L'alcool administré seul a entraîné une augmentation non significative du taux d'ASAT de 15,97%. L'extrait aqueux de *T. superba* à la dose de 200 mg/kg a entraîné une diminution significative ( $P < 0,05$ ) du taux d'ASAT de 51,52%.



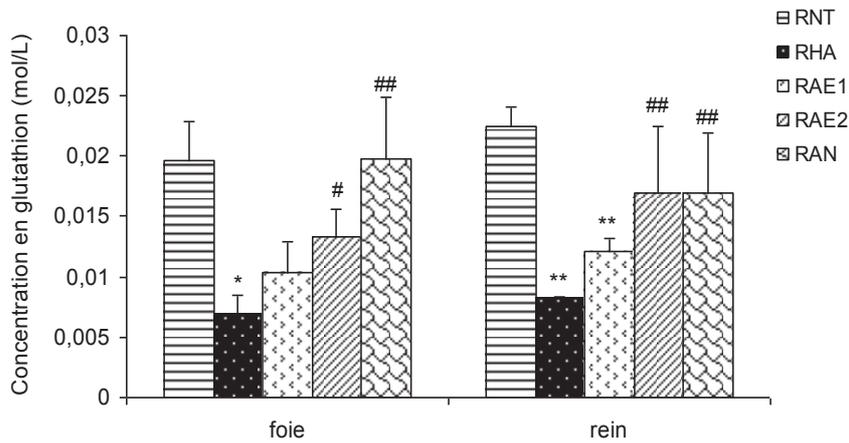
**Figure 27.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'activité des transaminases hépatiques.

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  E.S.M, n=5. \* $P < 0,05$  par rapport aux rats normotendus (RNT) ; # $P < 0,05$  par rapport aux rats rendus hypertendus par l'alcool éthylique 35° (3g/kg) RHA : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) RAE1 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 100 mg/kg ; RAE2 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg ; RAN : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) et à la nifédipine (10 mg/kg).

### III.1.3.3 Effets curatifs de *T. superba* sur quelques paramètres du stress oxydatif des rats rendus hypertendus par l'alcool

#### III.1.3.3.1 Effets sur la concentration en glutathion

La figure 28 présente les effets du traitement curatif à l'extrait aqueux de *T. superba* sur la concentration tissulaire en glutathion. L'alcool administré seul a entraîné une diminution significative de 64,88% de la concentration en glutathion dans le foie, par rapport aux rats normotendus. Le traitement à l'extrait aqueux de *T. superba* a augmenté la concentration en glutathion de 51,22% à la dose de 100 mg/kg et de 94,43% à la dose de 200 mg/kg. L'administration d'alcool 35° a entraîné une diminution significative du taux de glutathion dans le rein ( $P < 0,001$ ) par rapport aux rats normotendus. L'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a entraîné une augmentation significative du taux de glutathion de 107,92% dans le rein, par rapport aux rats hypertendus traités à l'alcool seul.

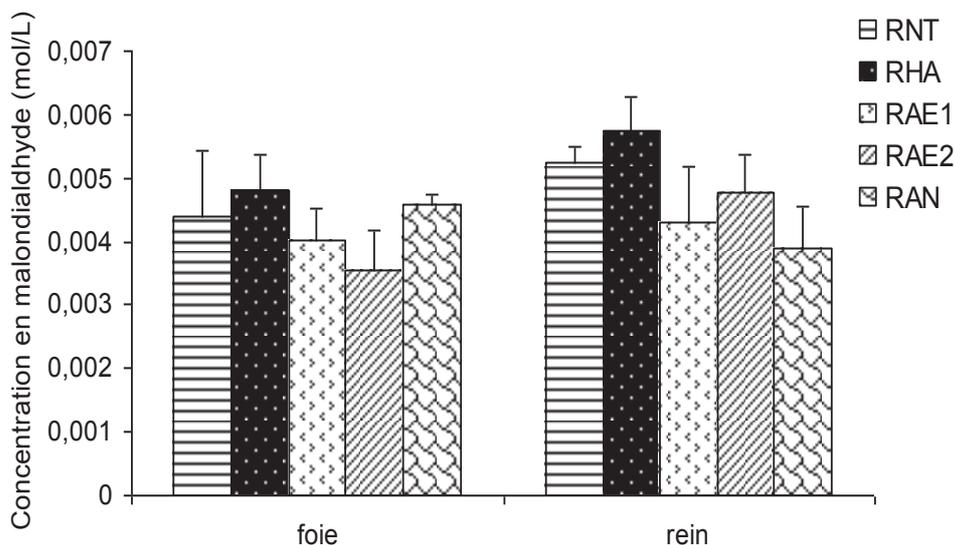


**Figure 28.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur le taux de glutathion réduit en traitement curatif sur les rats hypertendus à l'alcool.

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). # $P < 0,05$  ; ## $P < 0,01$  ; différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg). RHA : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) ; RAE1 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 100 mg/kg ; RAE2 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg ; RAN : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) et à la nifédipine (10 mg/kg).

### III.1.3.3.2 Effets sur la concentration en malondialdéhyde

La figure 29 présente le taux de malondialdéhyde dans les tissus des rats traités à l'extrait aqueux de *T. superba*. L'alcool a entraîné une augmentation non significative du taux de malondialdéhyde dans le foie et les reins des rats par rapport aux rats normotendus. L'extrait de plante aux différentes doses étudiées a entraîné une diminution non significative du taux de MDA par rapport aux rats traités à l'alcool seul.

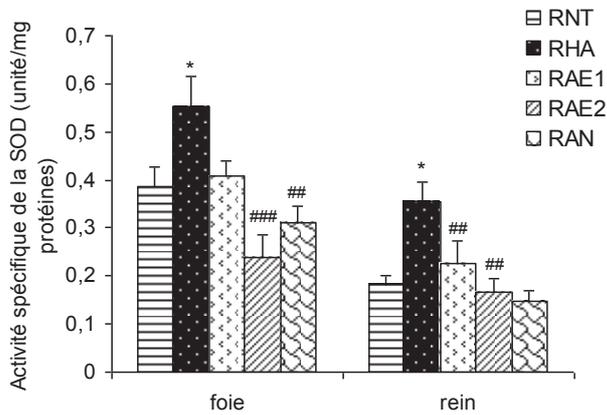


**Figure 29.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur le taux de malondialéhyde en traitement curatif chez les rats hypertendus à l'alcool.

Chaque barre représente à la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . R.H.A : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) ; R.A.E1 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 100 mg/kg ; R.A.E2 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg ; R.A.N : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) et à la nifédipine (10 mg/kg).

### III.1.3.3.3 Effets sur l'activité de la superoxyde dismutase

La figure 30 présente l'effet de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'activité de la superoxyde dismutase chez les rats hypertendus à l'alcool. L'alcool a induit une augmentation significative de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) de l'ordre de 43% et de 96,13% dans le foie et les reins des rats. Au niveau du foie, l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg a entraîné une diminution significative ( $P < 0,001$ ) de l'activité de la SOD de l'ordre de 56,52%. La nifédipine a également diminué l'activité de la SOD de 43,47% chez les rats hypertendus à l'alcool. Cette diminution entraînée par la plante a été significative aux doses de 100 et de 200 mg/kg au niveau des reins, avec un pourcentage de diminution de 36,33% et de 52,95% respectivement aux deux doses.

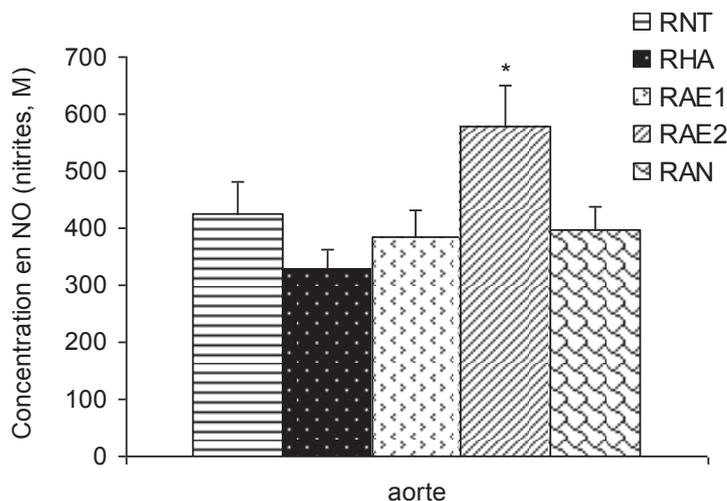


**Figure 30.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur l'activité de la superoxyde dismutase en traitement curatif chez les rats hypertendus à l'alcool.

Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \* $P < 0,05$  ; différence significative par rapport aux rats normotendus (R.N.T). ## $P < 0,01$  ; ### $P < 0,001$  ; différence significative par rapport aux rats traités à l'alcool éthylique 35° (3g/kg). R.H.A : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) ; R.H.A : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) ; R.A.E1 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 100 mg/kg ; R.A.E2 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg ; R.A.N : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) et à la nifédipine (10 mg/kg).

#### III.1.3.3.4 Effets sur la concentration en monoxyde d'azote

L'alcool a entraîné une diminution du taux de monoxyde d'azote (NO) de 22,37% ( $P > 0,05$ ) dans l'aorte des rats hypertendus à l'alcool (figure 31). L'extrait aqueux de *T. superba*, à la dose de 200 mg/kg a augmenté le taux de NO de 36,5% ( $P < 0,05$ ) dans l'aorte des rats hypertendus à l'alcool.



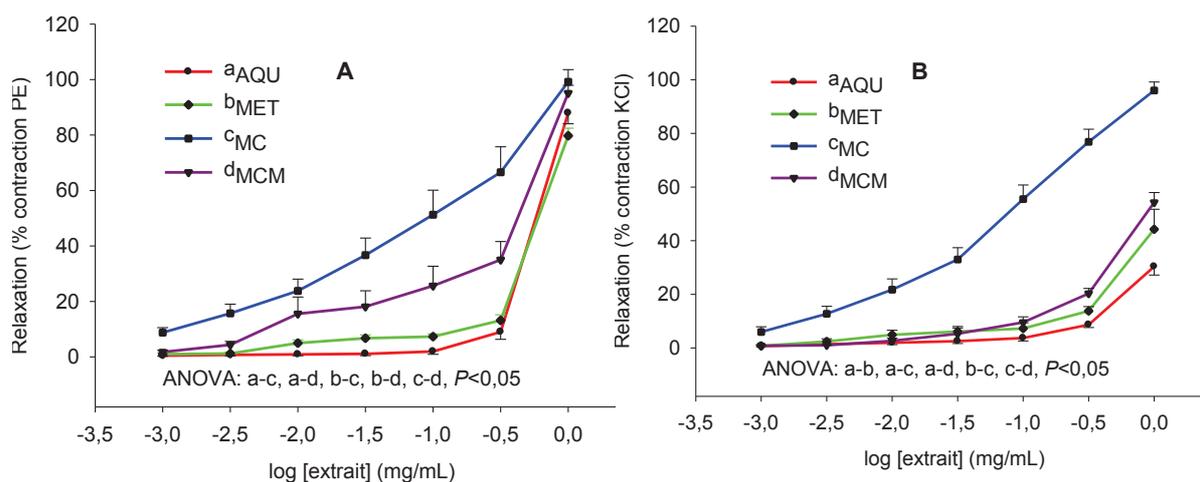
**Figure 31.** Effets de l'extrait aqueux de *T. superba* sur la concentration en monoxyde d'azote en traitement curatif chez les rats hypertendus à l'alcool.

Chaque barre représente à la moyenne  $\pm$  ESM,  $n = 5$ . \* $P < 0,05$  ; différence significative par rapport aux rats normotendus (RNT). RHA : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) ; RAE1 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 100 mg/kg ; RAE2 : rats traités à l'alcool et à l'extrait de plante à la dose de 200 mg/kg ; RAN : rats traités à l'alcool 35° (3 g/kg) et à la nifédipine (10 mg/kg).

### III.1.4 Effets vasorelaxants de *T. superba* : étude *in vitro*

#### III.1.4.1 Effets vasorelaxants de différents extraits de *T. superba* et rôle de l'endothélium vasculaire

La figure 32 représente les effets des quatre extraits de *T. superba* sur la contraction provoquée par la phényléphrine (PE,  $10^{-6}$  M) ou le chlorure de potassium (KCl,  $6 \times 10^{-2}$  M) : Tous les extraits ont induit une vasorelaxation concentration-dépendante, à la fois sur les anneaux d'aorte précontractés à la PE (figure 32 A) et au KCl (figure 32 B). L'extrait au chlorure de méthylène (MC) a exercé l'effet vasorelaxant le plus important, tant sur les anneaux contractés à la PE qu'au KCl avec une  $CE_{50}$  de 0,1 mg/mL. Ainsi, en terme d'efficacité, l'effet de l'extrait MC est suivi de celui de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol (MCM). L'extrait au MCM exerce un effet relaxant important sur les anneaux précontractés à la PE, par rapport à ceux contractés au KCl. Les effets des extraits aqueux (AQU) et au méthanol (MET) ont été similaires sur les anneaux contractés à la PE (figure 32 A). Sur les anneaux contractés au KCl, les effets de MCM ont été supérieurs à ceux des extraits MET et AQU (figure 32 B). Ainsi, sur les anneaux d'aorte contractés à la PE les pourcentages de relaxation maximale ( $E_{max}$ ) ont été de  $99 \pm 4\%$ ,  $95 \pm 3\%$ ,  $88 \pm 3\%$  et  $79 \pm 2\%$  respectivement pour les extraits MC, MCM, MET et AQU. Sur les anneaux contractés au KCl, les  $E_{max}$  ont été respectivement de  $96 \pm 3\%$ ,  $54 \pm 3\%$ ,  $44 \pm 7\%$  et  $30 \pm 3\%$ . Les solvants utilisés n'ont pas affectés de façon significative la vasomotricité des anneaux.

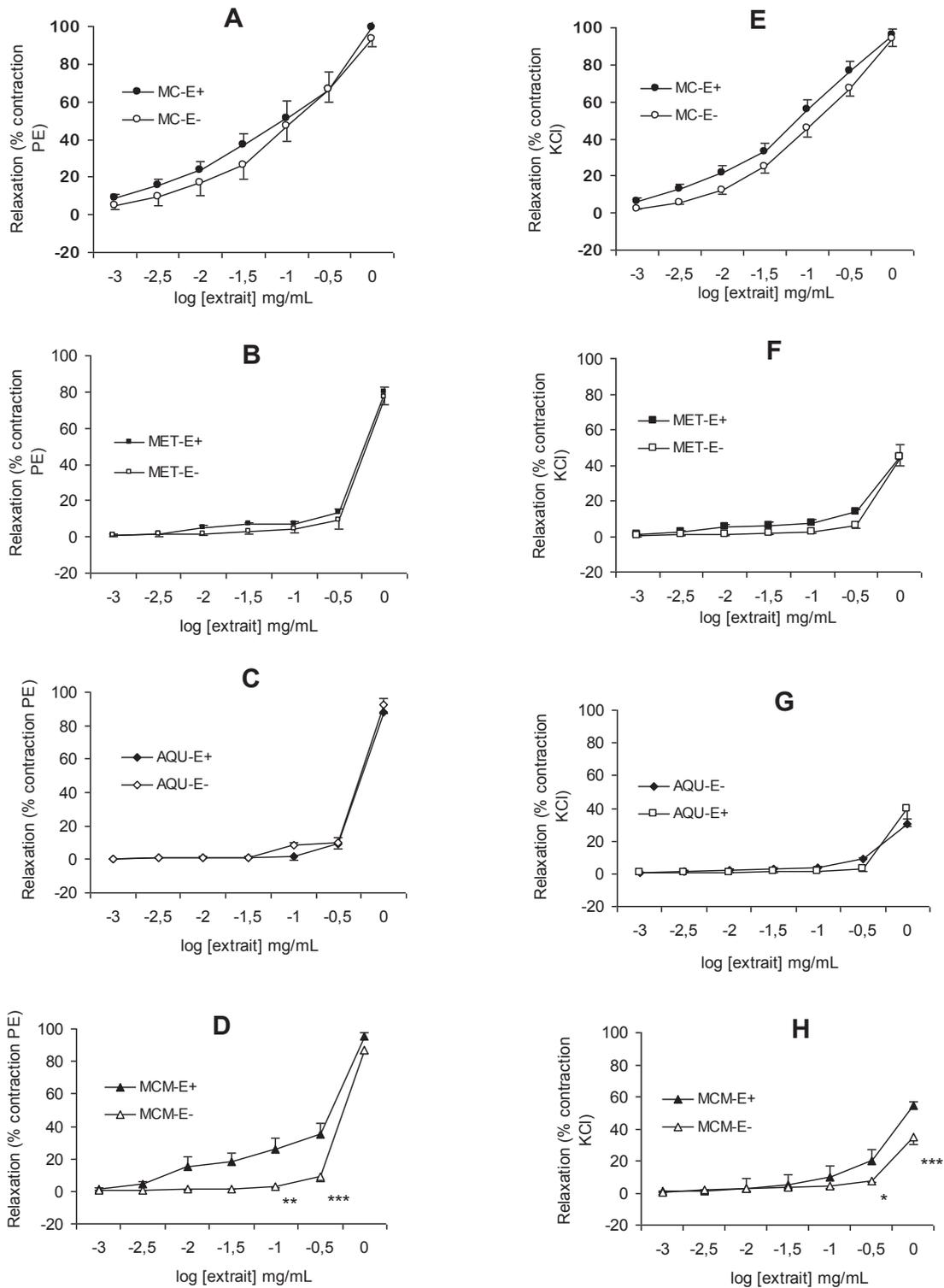


**Figure 32.** Effets des différents extraits sur la contraction induite par la phényléphrine (PE,  $10^{-6}$  M) (A) ou par le chlorure de potassium (KCl,  $6 \times 10^{-2}$  M) (B) sur anneaux intacts.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  E.S.M. (n=8-10 anneaux).

Le test ANOVA *two way*, suivi du test de Bonferroni a permis de comparer l'action des différents extraits entre eux, et les lettres indiquent les différences significatives entre les extraits. AQU (a) : extrait aqueux ; MET (b) : extrait au méthanol ; MC (c): extrait au chlorure de méthylène ; MCM (d) : extrait au chlorure de méthylène/ méthanol.

Les effets relaxants des différents extraits ont été étudiés sur des anneaux avec et sans endothélium. Comme le montre la figure 33, les effets de MC (figure 33 A et 12 E), MET (figure 33 B et 12 F) et AQU (figure 33 C et 12 G) n'ont pas été affectés par le retrait de l'endothélium sur les anneaux contractés à la PE et au KCl. En revanche, l'ablation de l'endothélium diminué de façon significative l'effet vasodilatateur de l'extrait MCM quel que soit l'agent contractant utilisé (figure 33 D et 33 H). L'*E<sub>max</sub>* obtenu avec l'extrait MCM à la concentration de  $3 \times 10^{-1}$  mg/mL est de  $35,03 \pm 6,57\%$  sur anneaux intacts contre  $9,21 \pm 3,59\%$  ( $P < 0,001$ ) sur anneaux dénudés précontractés à la PE. Sur les anneaux précontractés au KCl, l'*E<sub>max</sub>* a été de  $20,29 \pm 1,94\%$  sur anneaux intacts, contre  $7,63 \pm 1,17\%$  sur anneaux sans endothélium ( $P < 0,05$ ).



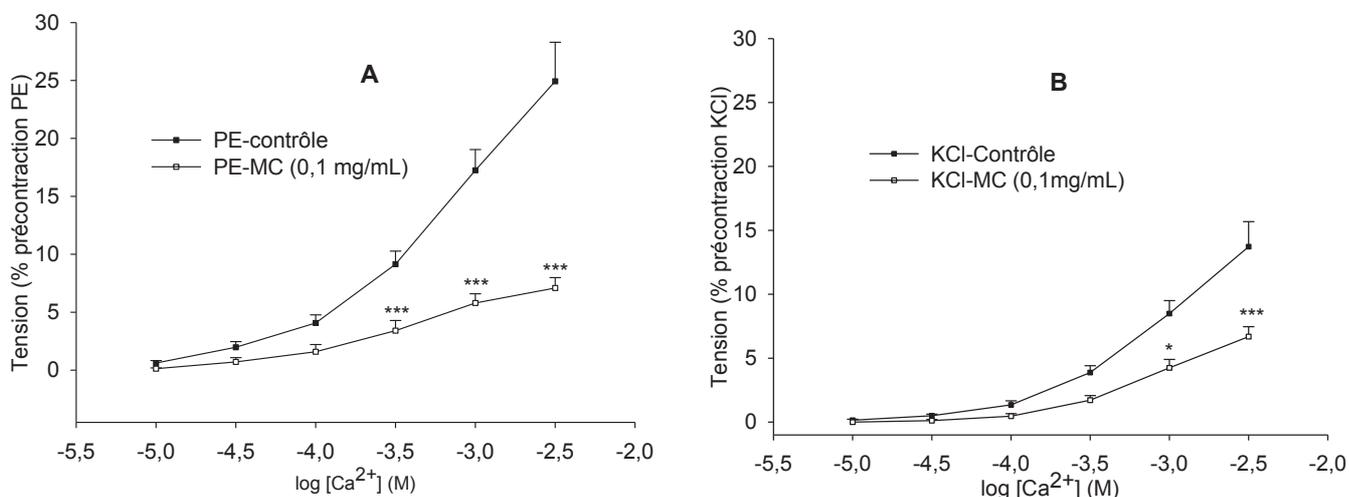
**Figure 33.** Rôle de l'endothélium vasculaire sur les effets relaxants des différents extraits.

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  E.S.M. (n=8-11 anneaux). \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  par rapport aux anneaux avec endothélium (E+).

Les figures A, B, C et D présentent respectivement les effets des extraits aqueux (AQU), au méthanol (MET), au chlorure de méthylène (MC), et au chlorure de méthylène/méthanol (MCM) sur les anneaux avec endothélium (E+) ou sans endothélium (E-) précontractés à la phényléphrine (PE,  $10^{-6}$  M) ; les figures E, F, G et H présentent les effets des mêmes extraits sur les anneaux avec endothélium (E+) ou sans endothélium (E-) précontractés au KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M).

### III.1.4.2 Effets de l'extrait chorométhylénique sur la contraction induite par le calcium sur anneaux précontractés au KCl et à la phényléphrine

La figure 34 montre que l'ajout cumulatif de calcium dans un milieu sans calcium a induit une contraction concentration-dépendante, sur des anneaux précontractés au KCl ou à la PE. La tension induite par le calcium par rapport à la contraction induite par la PE ( $10^{-6}$  M) va de  $0,61 \pm 0,21\%$  à la concentration de  $10^{-5}$  M à  $24,93 \pm 3,37\%$  à la concentration de  $3 \times 10^{-3}$  M (figure 34 A). Par rapport à la contraction induite par le KCl, le calcium induit une tension de  $0,15 \pm 0,07\%$  à la concentration de  $10^{-5}$  M et de  $13,72 \pm 1,95\%$  à la concentration de  $3 \times 10^{-3}$  M (figure 34 B). La préincubation des anneaux avec la  $CE_{50}$  (0,1 mg/mL) de l'extrait MC, a diminué de façon significative la contraction induite par le calcium tant sur les anneaux précontractés à la PE (figure 34 A) qu'au KCl (figure 34 B). La tension maximale induite par le calcium à la concentration de  $3 \times 10^{-3}$  M de  $24,93 \pm 3,37\%$  sur les anneaux contrôles est passée à  $7,09 \pm 0,88\%$  ( $P < 0,001$ ) sur les anneaux préincubés avec l'extrait et précontractés à la PE. De même sur des anneaux précontractés au KCl, la tension maximale induite par le calcium à la concentration de  $3 \times 10^{-3}$  M de  $13,72 \pm 1,95\%$  sur les anneaux contrôles est passée à  $6,68 \pm 0,78\%$  ( $P < 0,001$ ).

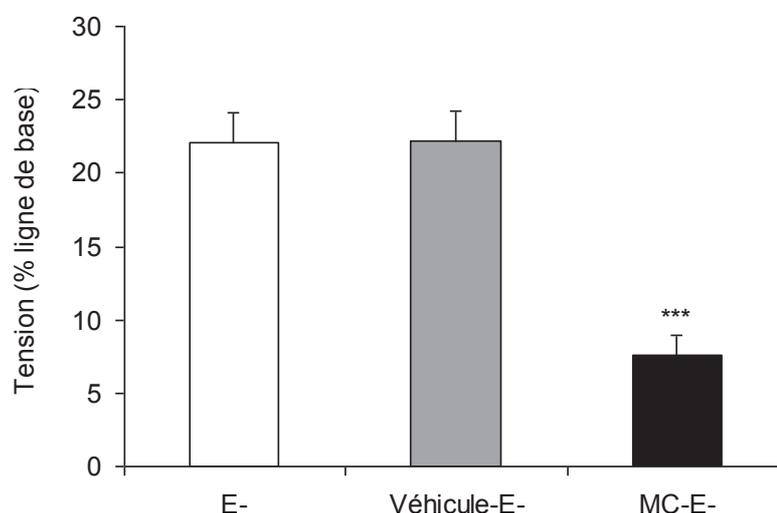


**Figure 34.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène (MC, 0,1 mg/mL) sur la contraction induite par le calcium sur anneaux intacts précontractés à la phényléphrine (PE) (A) ou au chlorure de potassium (KCl) (B).

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  ESM (n=8-12 anneaux). \*  $P < 0,05$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  par rapport au contrôle. Certains anneaux ont été incubés à l'extrait MC (0,1 mg/mL).

### III.1.4.3 Rôle du calcium intracellulaire dans la vasorelaxation induite par l'extrait au chlorure de méthylène

En milieu sans calcium contenant le vérapamil, la PE  $10^{-6}$ M a induit par rapport au milieu Krebs normal une contraction des anneaux d'aortes de  $22,4 \pm 2,9\%$ . Le véhicule de l'extrait ajouté dans le milieu d'incubation après le plateau de contraction induit par la PE ne modifie pas de façon significative cette tension induite par la PE. La tension maximale induite par la PE ( $10^{-6}$ M) était de  $22,1 \pm 2,0\%$  après introduction du véhicule à une concentration correspondant à la  $CE_{50}$  de l'extrait, soit  $0,1$  mg/mL. Comme le montre la figure 35, l'extrait MC ( $0,1$  mg/mL) induit une diminution significative de l'effet contractant de la PE en milieu sans calcium contenant le vérapamil. En effet, la tension des anneaux après ajout de l'extrait dans le milieu d'incubation n'est plus que de  $7,6 \pm 1,4\%$ , comparés aux anneaux témoins (E-) où la tension est de  $22,4 \pm 2,9\%$  ( $P < 0,001$ ).

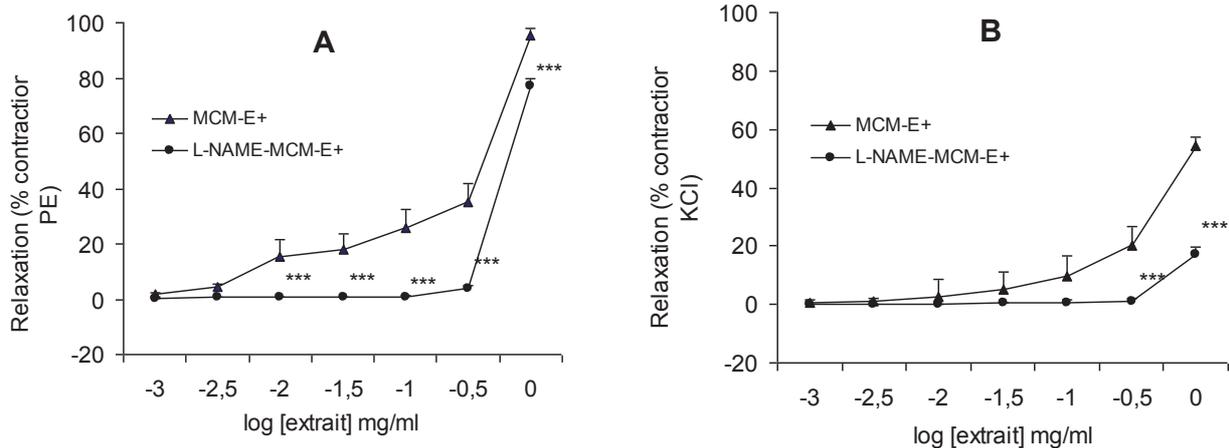


**Figure 35.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène (MC) de *T. superba* sur la libération du calcium intracellulaire.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  ESM ( $n=8-12$  anneaux), \*\*\* $P < 0,001$  par rapport au contrôle (E-). Les résultats sont présentés sous forme de tension (% à la ligne de base) suite à la contraction à la phényléphrine (PE,  $10^{-6}$  M) sur les anneaux sans endothélium préincubés au vérapamil ( $10^{-6}$  M) pendant 30 min. Suite à l'application de la PE, certains anneaux ont été exposés à l'extrait au chlorure de méthylène ( $0,1$  mg/mL) (MC-E-) ou au véhicule (Véhicule-E-).

### III.1.4.4 Rôle du NO dans les effets vasorelaxants de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol

La figure 36 montre que l'inhibition de l'activité de la NOS a été associée à une diminution significative ( $P < 0,001$ ) de l'effet vasodilatateur de l'extrait MCM à la fois sur les anneaux contractés à la PE (figure 36 A) et au KCl (figure 36 B).



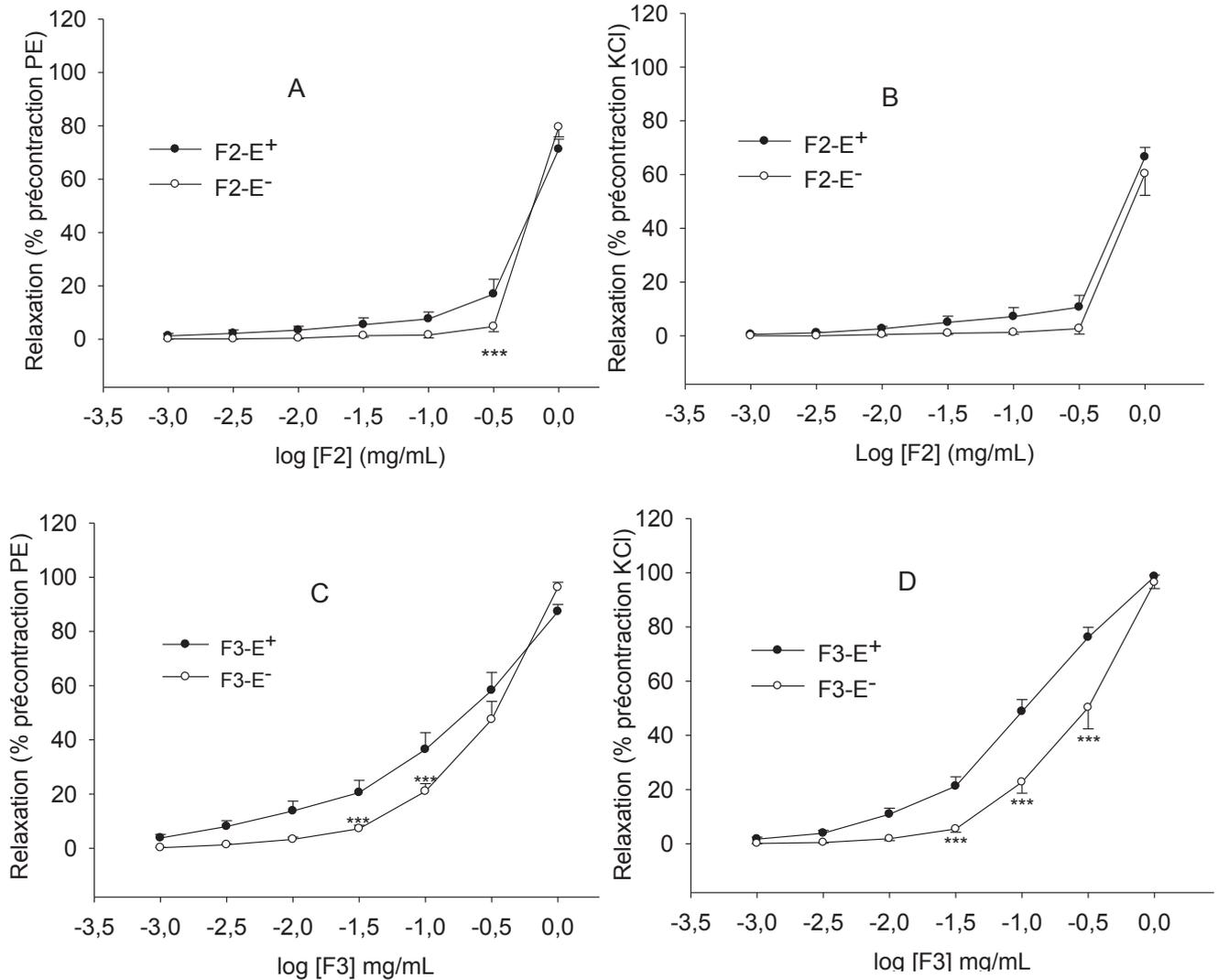
**Figure 36.** Effets du L-NAME ( $10^{-4}$  M) sur l'activité vasorelaxante de l'extrait au chlorure de méthylène/méthanol de *T. superba* (MCM) sur les anneaux intacts précontractés à la phényléphrine (PE,  $10^{-6}$  M) (A) ou au chlorure de potassium (KCl,  $6 \times 10^{-2}$  M) (B).

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  ESM,  $n=9-10$ ), \*\*\*  $P < 0,001$  par rapport aux valeurs en milieu sans L-NAME. MCM-E+ : action de l'extrait MCM sur anneaux d'aorte en milieu sans L-NAME ; L-NAME-MCM-E+ : action de l'extrait MCM sur anneaux d'aorte en milieu contenant le L-NAME.

### III.1.4.5 Effets des fractions isolées de l'extrait au chlorure de méthylène sur la contraction induite par le chlorure de potassium ou la phényléphrine

La figure 37 présente les effets des fractions F2 et F3 isolées de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur les anneaux d'aorte précontractés au KCl ou à la PE. La fraction F3 a présenté une activité vasorelaxante plus marquée sur anneaux intacts ou dénudés précontractés au KCl ou à la PE. Sur anneaux intacts, la fraction F2 a induit à la concentration de  $3 \times 10^{-1}$  mg/mL, une relaxation de  $16,91 \pm 5,60\%$  sur anneaux précontractés à la PE contre  $10,63 \pm 4,40\%$  sur anneaux précontractés au KCl. A cette même concentration ( $3 \times 10^{-1}$  mg/mL), la fraction F3 a induit une vasorelaxation de  $58,25 \pm 6,60\%$  sur anneaux précontractés à la PE et de  $76,17 \pm 3,73\%$  sur anneaux précontractés au KCl. Il faut cependant remarquer qu'il n'existe pas de différence significative entre les *Emax* enregistrés avec la forte concentration de 1 mg/mL. Les *Emax* de la fraction F2 étaient de  $66,52 \pm 3,59\%$  et de  $60,30 \pm 8,02\%$ , respectivement pour les anneaux avec et sans endothélium contractés au KCL ; de  $71,20 \pm 3,81\%$  et de  $79,54 \pm 6,66\%$ , respectivement pour les anneaux intacts et dénudés contractés à la PE. Pour la fraction F3, les *Emax* ont été de  $98,58 \pm 0,60\%$  et de  $96,40 \pm 2,26\%$  pour les anneaux avec et sans endothélium contractés au KCL ; de  $87,34 \pm 2,66\%$  et de  $96,20 \pm 1,97\%$  pour les anneaux intacts et dénudés contractés à la PE. Pour des concentrations comprises entre  $3 \times 10^{-2}$  et

$3 \times 10^{-1}$  mg/mL, les effets vasorelaxants de la fraction F3 sont endothélium-dépendant (figure 37 C et D).



**Figure 37.** Effets des fractions (F2 et F3) isolées de l'extrait au chlorure de méthylène sur la contraction des anneaux avec (E+) ou sans (E-) endothélium précontractés à la phényléphrine (PE,  $10^{-6}$ M, A, C) ou au chlorure de potassium (KCl,  $6 \times 10^{-2}$  M, B, D). Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM,  $n=5-10$ , \*\*\*  $P < 0,001$  par rapport aux anneaux intacts.

### III.1.5 Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* chez les rats spontanément hypertendus

#### III.1.5.1 Effets aigus de l'extrait au chlorure de méthylène sur la pression artérielle des rats spontanément hypertendus

Les effets de l'injection intraveineuse de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* ont été évalués sur la pression artérielle des rats spontanément hypertendus (SHR) et leurs contrôles normotendus, les rats WKY. Avant injection, les valeurs de PAS, PAD et étaient respectivement de  $179,67 \pm 2,02$  mmHg et de  $141,33 \pm 4,67$  mmHg pour les SHR, et de  $129,50 \pm 3,78$  mmHg et de  $88,00 \pm 2,94$  pour les WKY.

L'administration intraveineuse de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* a provoqué une diminution immédiate et dose-dépendante de la PAS et de la PAD des SHR et WKY (Tableau XIX). La réduction de la PAS est passée de  $17,6 \pm 1,0\%$  à la dose de 5 mg/kg à  $52,9 \pm 2,5\%$  à la dose de 30 mg/kg chez les rats WKY et respectivement de  $13,2 \pm 1,0\%$  à  $47,0 \pm 4,8\%$  chez les SHR. La PAD a diminuée de  $30,4 \pm 2,0\%$  à la dose de 5 mg/kg à  $68,8 \pm 2,8\%$  à la dose de 30 mg/kg chez les rats WKY et de  $25,5 \pm 3,1\%$  à  $55,3 \pm 4,7\%$  chez les SHR.

**Tableau XIX.** Effets de l'administration intraveineuse de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur la PAS et la PAD des rats WKY et SHR

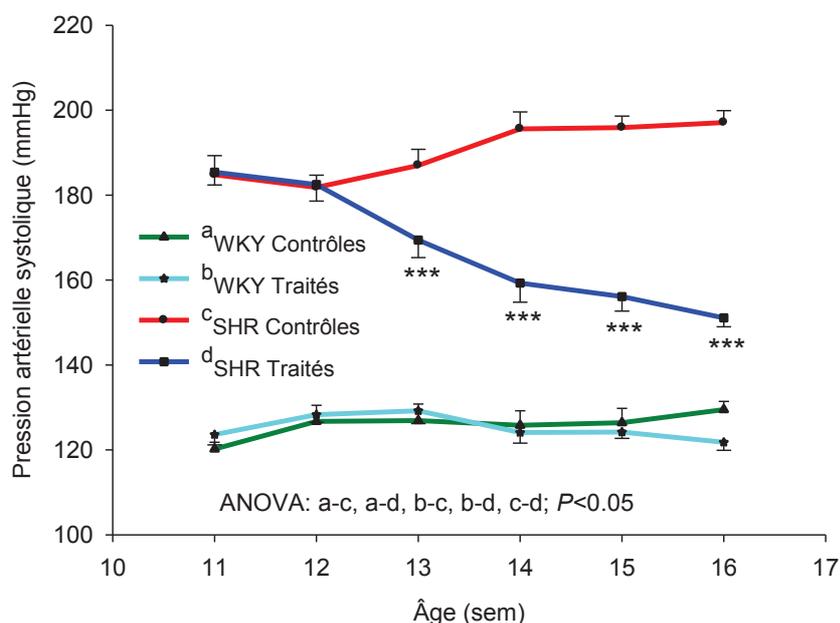
Dose (mg/kg)	WKY	SHR
	PAS (% de réduction)	
5	$17,6 \pm 1,0$	$13,2 \pm 1,0^*$
10	$29,9 \pm 2,5$	$20,2 \pm 1,0^*$
20	$39,3 \pm 2,9$	$26,8 \pm 2,8^*$
30	$52,9 \pm 2,5$	$47,0 \pm 4,8$
PAD (% de réduction)		
5	$30,4 \pm 2,0$	$25,5 \pm 3,1$
10	$45,4 \pm 5,7$	$35,9 \pm 4,1$
20	$60,7 \pm 4,8$	$39,9 \pm 3,6^*$
30	$68,8 \pm 2,8$	$55,3 \pm 4,7$

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ESM, n=5. \* $P < 0,05$ , par rapport aux rats Wistar Kyoto (WKY). SHR : rats spontanément hypertendus.

#### III.1.5.2 Effets curatifs de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque des rats spontanément hypertendus

L'administration quotidienne d'une dose unique de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* chez les SHR a entraîné une diminution significative

( $P < 0,001$ ) de la PAS à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de traitement (figure 38). Cette diminution progressive de la pression a perduré jusqu'à la fin du traitement. La PAS au départ de  $185,4 \pm 3,0$  mmHg chez les SHR a diminué jusqu'à  $151,1 \pm 2,1$  mmHg à la fin du traitement. Chez les SHR contrôles, la PAS a augmentée progressivement de  $184,8 \pm 4,5$  mmHg à  $197,1 \pm 2,8$  mmHg au terme de la période d'étude. Les résultats de cette étude ne montrent pas de modification significative entre la PAS des rats contrôles WKY traités à l'extrait de plante et leurs contrôles. La PAS est passée de  $120,2 \pm 1,6$  mmHg à  $129,5 \pm 1,9$  mmHg chez les rats WKY contrôles; et de  $123,6 \pm 2,4$  mmHg à  $121,8 \pm 1,9$  mmHg chez rats WKY traités à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba*.



**Figure 38.** Effets subchroniques de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur la pression artérielle des rats spontanément hypertendus (SHR) et Wistars Kyoto (WKY).

Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM.  $n=9-10$ . \*\*\*  $P < 0,001$  ; différence significative par rapport aux SHR contrôles. Le test ANOVA suivi du post test de bonferroni a permis d'évaluer la différence entre les différents groupes. Les lettres a, b, c et d désignent respectivement les groupes des rats WKY contrôles, WKY traités, SHR contrôles et SHR traités. Les différences entre les groupes sont notées en dessous des tracés.

Le tableau XX présente l'évolution de la fréquence cardiaque des rats pendant la période expérimentale. Il en ressort que le traitement des SHR et WKY à l'extrait au chlorure de méthylène n'a pas modifié de façon significative la fréquence cardiaque des deux souches de rats.

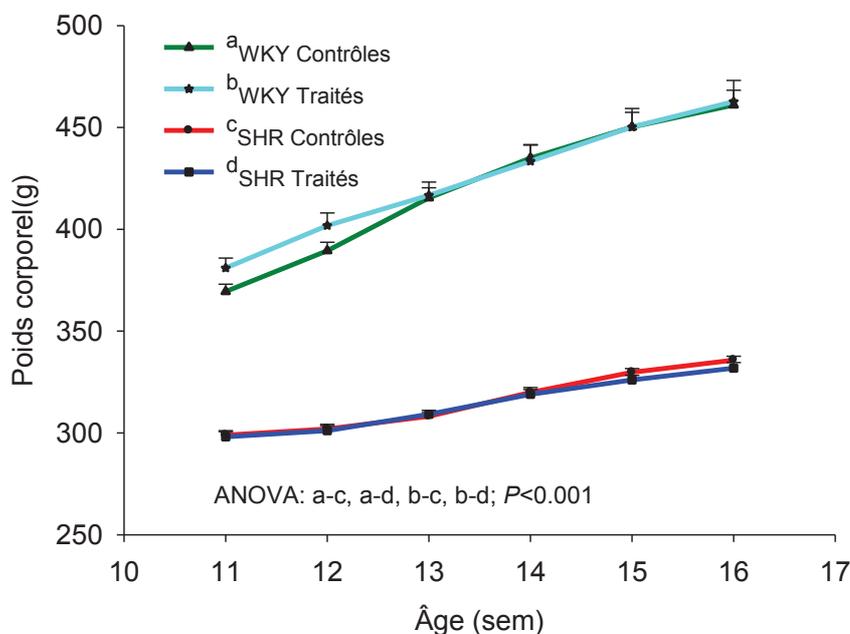
**Tableau XX.** Evolution de la fréquence cardiaque chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et Wistars Kyoto (WKY) traités ou non à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba*

Semaines	WKY Contrôles	WKY Traités	SHR Contrôles	SHR Traités
0	403,7 ± 11,5	397,0 ± 12,4	449,2 ± 9,4 <sup>**&amp;&amp;</sup>	461,8 ± 7,4 <sup>***&amp;&amp;&amp;</sup>
1	403,8 ± 7,8	369,1 ± 8,5	415,2 ± 15,4 <sup>&amp;&amp;</sup>	424,7 ± 12,6 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
2	380,9 ± 9,8	388,7 ± 14,7	388,6 ± 9,2	389,3 ± 9,5
3	384,3 ± 10,7	384,0 ± 10,7	388,0 ± 16,0	398,4 ± 10,4
4	388,4 ± 10,7	391,0 ± 11,7	394,8 ± 12,7	399,6 ± 14,2
5	381,9 ± 11,6	381,5 ± 9,8	414,9 ± 15,0	378,4 ± 11,7

Les valeurs représentent les moyennes ± ESM, n=9-10. \*\*P<0,01 ; \*\*\*P<0,001 par rapport aux rats WKY contrôles ; &&P<0,01 ; &&&P<0,001 par rapport aux rats WKY traités.

### III.1.5.3 Effets sur le poids corporel

Comme le montre la figure 39 le traitement des SHR et WKY à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* n'a pas affecté de façon significative l'évolution pondérale des animaux. Il faut remarquer que la différence de poids corporel qui existe entre les SHR et WKY a persisté pendant toute la durée de l'étude.



**Figure 39.** Effet de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur le poids corporel des rats spontanément hypertendus (SHR) et Wistars Kyoto (WKY). Chaque point représente la moyenne  $\pm$  ESM.  $n=9-10$ . Le test ANOVA suivi du post test de bonferroni a permis d'évaluer la différence entre les différents groupes.

Les lettres a, b, c et d désignent respectivement les groupes des rats WKY contrôles, WKY traités, SHR contrôles et SHR traités. Les différences entre les groupes sont notées en dessous des tracés.

#### III.1.5.4 Effets sur les consommations hydrique et alimentaire, l'élimination urinaire, l'élimination fécale et la glycémie

Le tableau XXI présente les consommations hydrique et alimentaire, l'élimination urinaire, l'élimination fécale et la glycémie des rats de différents groupes, en 24h avant le terme du traitement. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes.

Le traitement à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* n'a pas modifié de façon significative la glycémie des rats. Les SHR présentent une hyperglycémie ( $P<0,05$ ) par rapport aux rats WKY.

**Tableau XXI.** Effets de *T. superba* sur le métabolisme général et glycémie des rats spontanément hypertendus (SHR) et Wistars Kyoto (WKY)

	Paramètres métaboliques (24h/100 g Poids Corporel)				
	Cons. Hydrique (mL)	Cons. alimentaire (g)	Vol. urinaire (mL)	Masse fécale (g)	Glycémie (g/L)
WKY contrôles	9,82 ± 1,57	4,61 ± 0,24	2,74 ± 0,32	1,66 ± 0,12	1,10 ± 0,05
WKY traités	6,07 ± 0,39	5,08 ± 0,24	2,53 ± 0,24	1,68 ± 0,10	1,13 ± 0,04
SHR contrôles	7,01 ± 0,92	5,16 ± 0,31	2,64 ± 0,28	2,27 ± 0,14	1,25 ± 0,03* <sup>&amp;</sup>
SHR traités	6,19 ± 1,35	3,98 ± 0,60	1,82 ± 0,30	1,82 ± 0,31	1,29 ± 0,06*

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM n=9-10. \*  $P < 0,05$  différence significative par rapport aux WKY contrôles ; &  $P < 0,05$  différence significative par rapport aux WKY traités.

### III.1.5.5 Effets de *T superba* sur le poids relatif de quelques organes

Le tableau XXII présente le poids relatif (mg organe/g poids corporel) de certains organes à la fin de l'étude. Il en ressort que, le poids relatif du foie, des reins et du cœur des SHR est significativement supérieur à celui des rats WKY. Cette différence de poids n'a pas été affectée par le traitement.

**Tableau XXII.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène sur le poids relatif des organes (mg/g PC) des rats Wistars Kyoto (WKY) et spontanément hypertendus (SHR)

	Foie	Reins	Cœur	VG+S	VG
WKYC	31,08 ± 0,80	5,43 ± 0,13	2,51 ± 0,03	1,85 ± 0,03	1,11 ± 0,05
WKYT	31,70 ± 0,92	5,48 ± 0,10	2,57 ± 0,05	1,86 ± 0,05	1,11 ± 0,05
SHRC	35,48 ± 0,54*** <sup>&amp;&amp;</sup>	6,88 ± 0,05*** <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	3,62 ± 0,03*** <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	2,81 ± 0,04* <sup>&amp;</sup>	1,51 ± 0,06* <sup>&amp;</sup>
SHRT	35,08 ± 0,60*** <sup>&amp;</sup>	6,93 ± 0,08*** <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	3,59 ± 0,05*** <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	2,67 ± 0,12* <sup>&amp;</sup>	1,36 ± 0,05

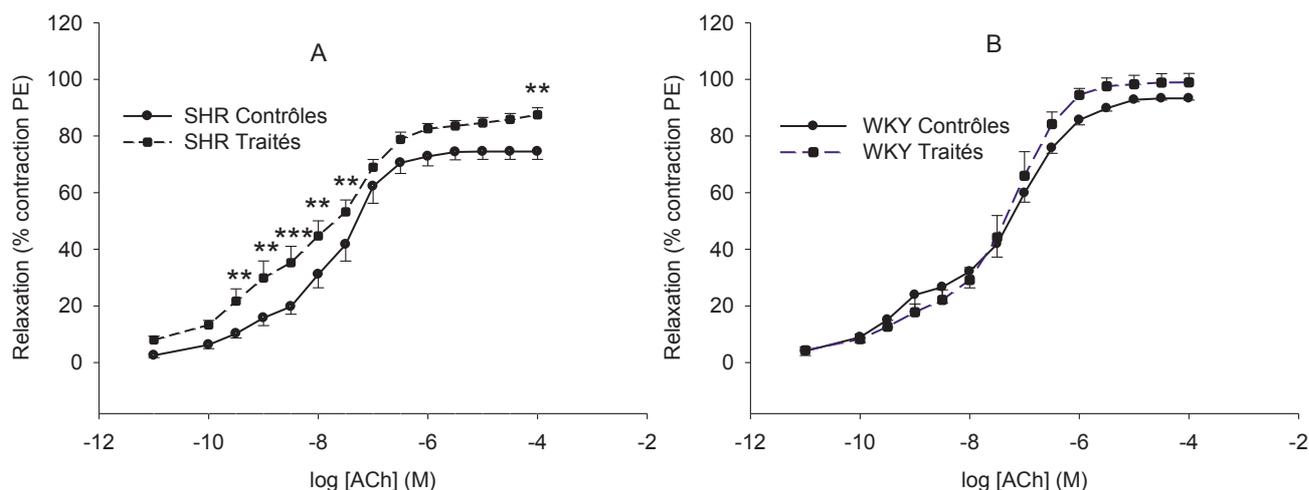
Chaque valeur représente la moyenne ± E.S.M. n=9-10. WKYC : rats Wistar Kyoto contrôles, WKYT : rats Wistar Kyoto traités, SHRC : rats spontanément hypertendus contrôles, SHRT : Rats spontanément hypertendus traités, VG : ventricule gauche, VG+S : ventricule gauche + septum. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  ; \*\*\*  $P < 0,001$  différence significative par rapport aux WKY contrôles, &  $P < 0,05$  ; &&  $P < 0,01$  ; &&&  $P < 0,001$  différence significative par rapport aux WKY traités.

### III.1.5.6 Effets de l'extrait au chlorure de méthylène sur la réactivité vasculaire des SHR

Après 5 semaines de traitement chronique des SHR et WKY par l'extrait de plante, la réactivité vasculaire de ces animaux a été évaluée.

### III.1.5.6.1 Effets sur la relaxation induite par l'acétylcholine

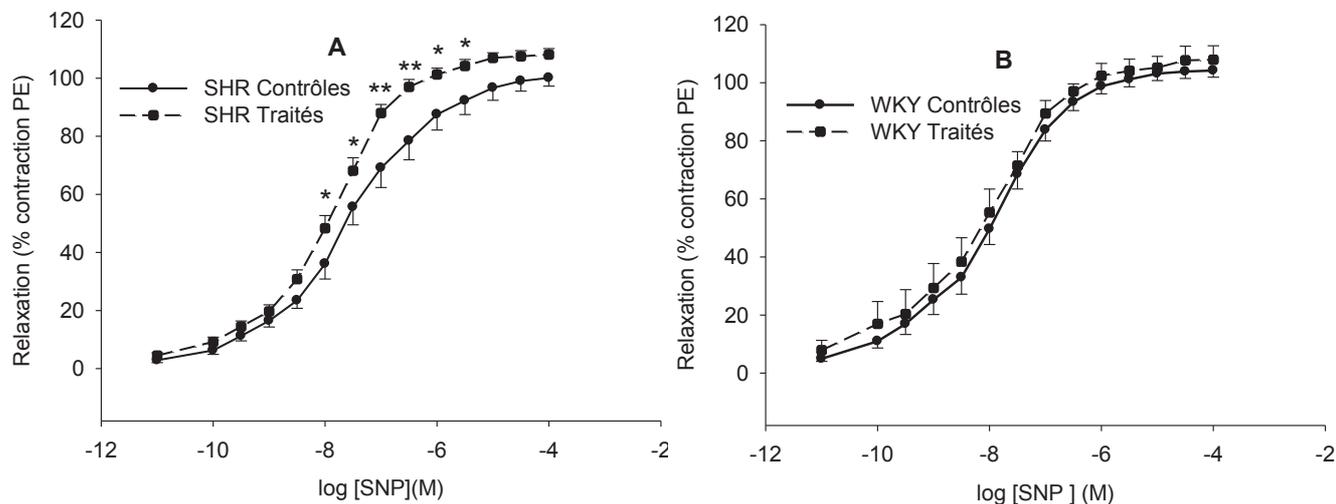
Les effets du traitement à l'extrait au chlorure de méthylène sur la fonction endothéliale ont été évalués sur des anneaux intacts des SHR et WKY précontractés à la PE ( $10^{-6}$ M). La figure 40 montre une amélioration significative de la vasorelaxation induite par l'ACh chez les SHR traités, par rapport aux contrôles non traités. Les pourcentages de relaxations maximums ( $E_{max}$ ) étaient de  $93,28 \pm 0,57$  % chez les rats WKY contrôles; de  $98,94 \pm 3,14$  % chez les rats WKY traités ; de  $74,51 \pm 2,74\%$  chez les SHR contrôles et de  $87,47 \pm 2,52\%$  chez les SHR traités.



**Figure 40.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène sur la relaxation induite par l'acétylcholine (ACh) sur les anneaux d'aorte intacts de SHR (A) et WKY (B) précontractés à la PE ( $10^{-6}$  M). \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$  par rapport au groupe contrôle (n=8-10).

### III.1.5.6.2 Effets sur la relaxation induite par le nitroprussiate de sodium

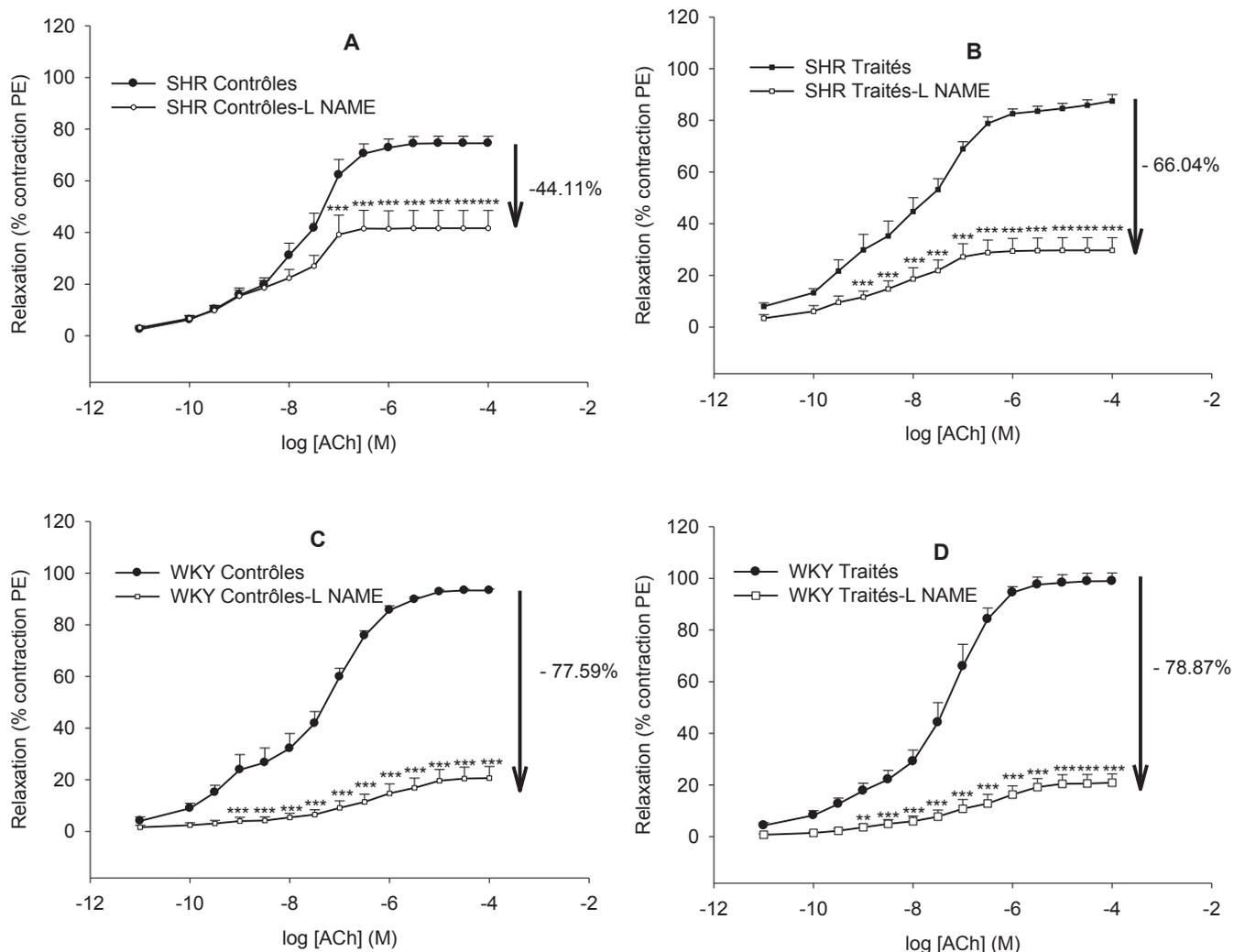
La figure 41 A et B présente les effets de concentrations croissantes de nitroprussiate de sodium (SNP) sur les anneaux d'aorte de SHR et WKY précontractés à la PE ( $10^{-6}$  M). Le traitement à l'extrait au chlorure de méthylène (150 mg/kg) pendant 5 semaines n'a pas modifié de façon significative la relaxation induite par le SNP chez les rats WKY (figure 41 B). Chez les SHR, il a été observé une amélioration significative de la vasorelaxation induite par le SNP chez les SHR traités par rapport aux SHR contrôles (figure 41 A).



**Figure 41.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène sur la relaxation induite par le nitroprussiate de sodium (NPS) sur anneaux d'aorte intacts de SHR et WKY précontractés à la PE ( $10^{-6}$  M). \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  par rapport au groupe contrôle (n=8-10).

### III.1.5.6.3 Effets sur la relaxation NO-dépendante

En vue d'évaluer l'effet du traitement sur la production du NO, des anneaux d'aortes de SHR et WKY avec endothélium ont été incubés avec le L-NAME ( $10^{-5}$ M), inhibiteur non sélectif du NO synthase, précontractés à la PE et relaxés avec concentrations cumulatives d'ACh. La figure 42 montre que l'incubation des anneaux d'aorte en présence de L-NAME diminue de façon significative la vasorelaxation induite par l'ACh. Chez les SHR traités à l'extrait de plante pendant 5 semaines, l'incubation des anneaux en présence de L-NAME a induit par rapport à leurs contrôles une diminution de la relaxation des anneaux d'aorte provoquée par l'ACh. La diminution de la vasorelaxation ( $E_{max}$ ) en présence de L-NAME de 44,11% chez les SHR non traités est passée à 66,04% chez les SHR traités à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* (figure 42 C et D). Chez les rats WKY, le traitement chronique des animaux avec ce même extrait pendant 5 semaines n'a pas entraîné de modification significative de la vasorelaxation induite par l'ACh en présence de L-NAME. (-78,87% chez WKY-Traités et -77,69% chez WKY-Contrôles)

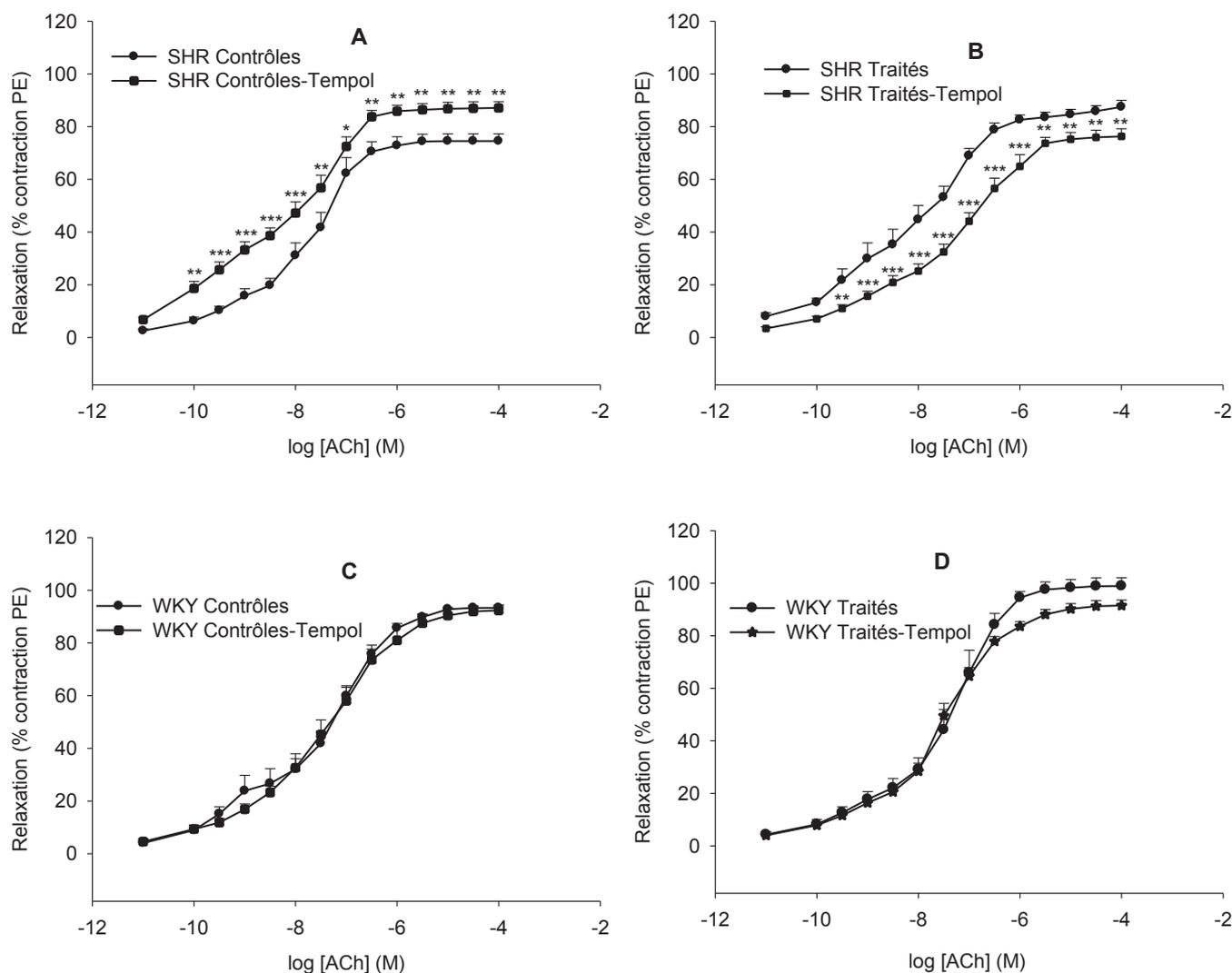


**Figure 42.** Effets du L-NAME ( $10^{-4}$  M) sur la relaxation induite par l'acétylcholine (ACh) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) contrôles (A) et traités par l'extrait MC (B) et les rats wistar Kyoto contrôles (A) et traités par l'extrait MC (B). \*\*\* $P < 0,001$  par rapport aux anneaux sans L NAME ( $n=8-12$ ).

#### III.1.5.6.4 Effets du tempol sur la vasorelaxation induite par l'acétylcholine

Les anneaux d'aorte de SHR et WKY ont été incubés en présence du tempol, un antioxydant SOD-mimétique dans le métabolisme d' $O_2^{\cdot-}$ , précontractés à la PE ( $10^{-6}$  M) et relaxés avec des concentrations cumulatives d'ACh. Comme le présente la figure 43 A, l'incubation des anneaux des SHR avec le tempol a augmenté significativement la relaxation de l'aorte induite par l'ACh. Cet effet se traduit par l'amélioration significative de la relaxation induite par l'ACh. L'effet maximum de l'ACh de  $74,51 \pm 2,74\%$  sur les anneaux contrôles étaient de  $87,12 \pm 2,37\%$  sur les anneaux des SHR en présence du tempol, soit une augmentation de la relaxation de près de 17%. L'effet inverse a été observé chez les SHR traités chez qui le tempol a entraîné une réduction de la relaxation induite par l'ACh (figure 43 B). Chez les SHR traités à l'extrait MC de *T. superba* l'ACh a induit un effet maximal ( $E_{max}$ ) de  $87,47 \pm$

2,52% contre  $76,32 \pm 2,85\%$  sur les anneaux incubés en présence de tempol  
 Aucune modification significative n'a été observée sur la vasorelaxation induite par l'ACh chez les rats normotendus WKY (figure 43 C et D).

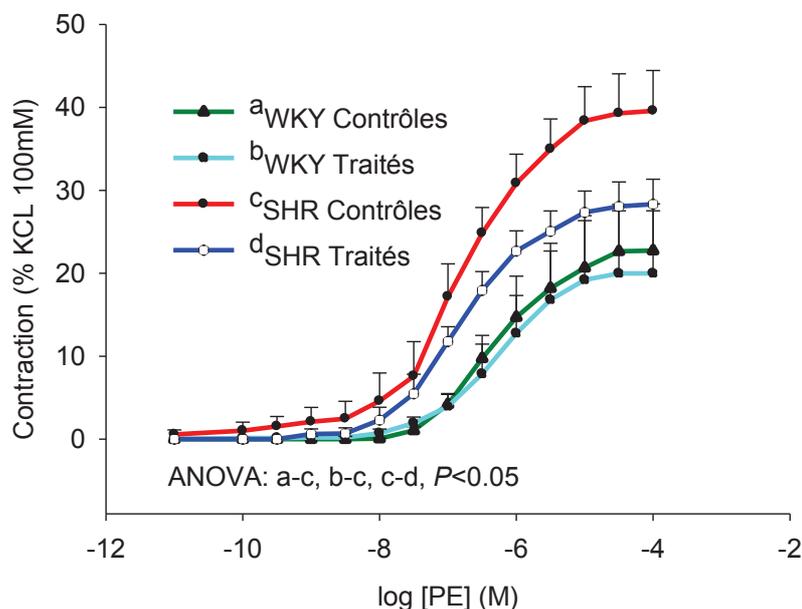


**Figure 43.** Effets du tempol ( $10^{-4}$  M) sur la relaxation induite par l'acétylcholine (ACh) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) contrôles (A) et traités (B) et les rats wistar Kyoto contrôles (C) et traités (D). \* $P<0,05$  ; \*\* $P<0,01$  ; \*\*\* $P<0,001$  par rapport aux anneaux sans L NAME ( $n=8-12$ ).

### III.1.5.6.5 Effets du traitement sur la contraction induite par la phényléphrine

La figure 44 présente les effets de concentrations cumulatives de PE sur la contraction des anneaux d'aorte avec endothélium des rats des différents groupes. Il en ressort que, les effets contractants de la PE, marqués chez les SHR contrôles, ont été significativement diminués par le traitement à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba*. L' $E_{max}$  de la PE, de  $39,58 \pm 4,86\%$  chez les SHR contrôles était seulement de  $28,32 \pm 3,01\%$  chez les SHR traités, soit une réduction

de l'activité contractile maximale de la PE de 28,48%. Chez les rats WKY contrôles, l'*E<sub>max</sub>* était de  $22,73 \pm 5,62$  % contre  $19,98 \pm 7,54$  % chez les WKY traités

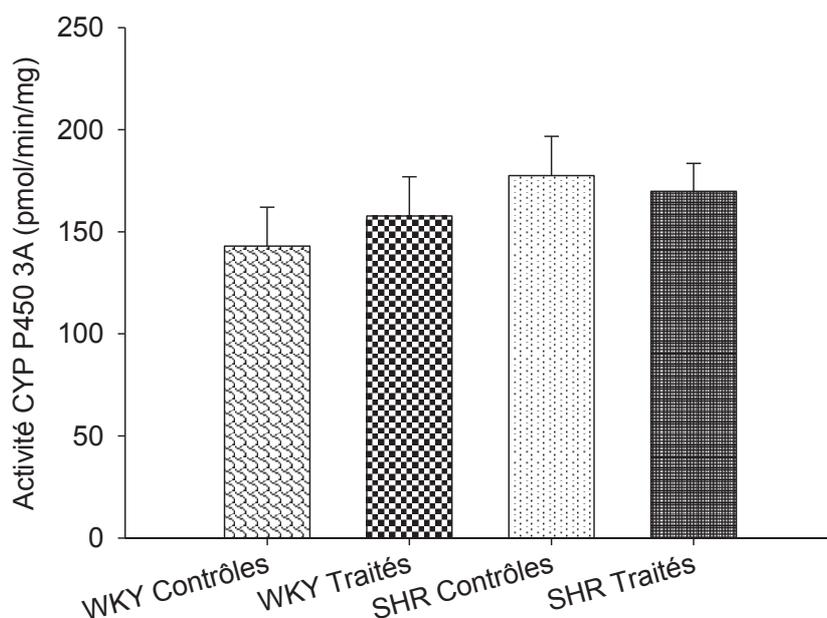


**Figure 44.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène sur la contraction induite par la phénylèphrine (PE) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et wistar kyoto (WKY).

Chaque point représente la moyenne  $\pm$  E.S.M, n=5-10. Le test ANOVA *two way*, suivi du test de bonferroni a permis de comparer les différents groupes entre eux, et les lettres en dessous des tracés indiquent les différences significatives entre les rats Wistar Kyoto contrôles (<sup>a</sup>WKY contrôles), les rats Wistar Kyoto traités (<sup>b</sup>WKY traités), les rats spontanément hypertendus contrôles (<sup>c</sup>SHR contrôles) et les rats spontanément hypertendus traités (<sup>d</sup>SHR traités). Il apparaît clairement une différence significative d'activité contractile entre les SHR contrôles (<sup>c</sup>SHR contrôles) et les rats spontanément hypertendus traités (<sup>d</sup>SHR traités)

### III.1.5.6.6 Effets sur le métabolisme hépatique : activité des cytochromes P450 3A

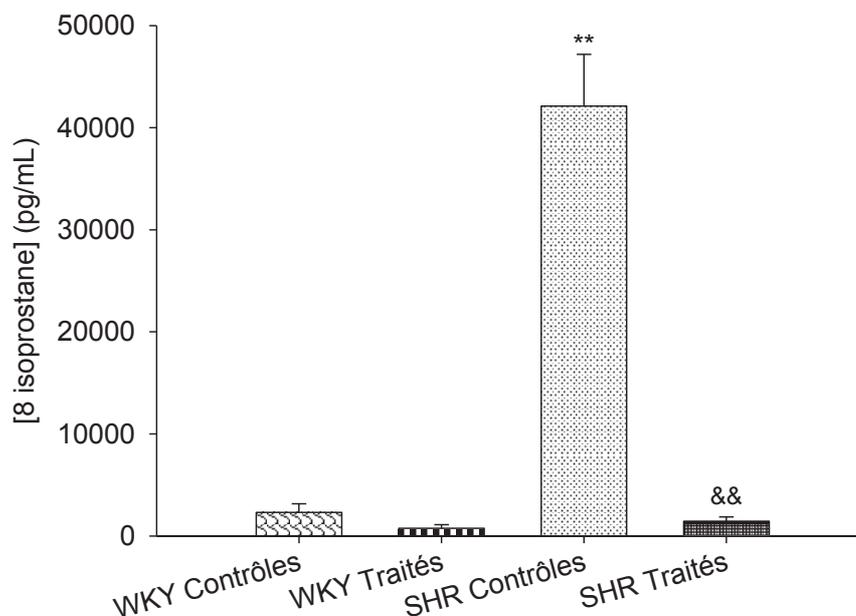
La figure 45 montre l'activité des CYP 3A dans les microsomes hépatiques de rats à la fin de la période expérimentale, soit à 16 semaines d'âge. L'activité des CYP dans les microsomes des SHR n'était pas significativement différente de celle des rats WKY. Le traitement par l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* n'a pas modifié de façon significative l'activité des CYP 3A chez les SHR et WKY.



**Figure 45.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* (150 mg/kg) sur l'activité des cytochromes P450 3A (CYP 3A) chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et wistar kyoto (WKY). Chaque barre représente la valeur  $\pm$  E.S.M, n=8-10.

### III.1.5.6.7 Effets sur le statut oxydatif *in vivo* : concentration urinaire de 8-iso-PGF2 $\alpha$

La concentration en 8-iso-PGF2 $\alpha$  urinaire était significativement élevée chez les SHR contrôles, par rapport aux rats normotendus WKY (figure 46). Le traitement par l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* a significativement réduit ( $P < 0,01$ ) la concentration en 8-iso-PGF2 $\alpha$  chez les SHR. Le taux de 8-iso-PGF2 $\alpha$  urinaire de  $42120,00 \pm 5068,96$  pg/mL dans les urines SHR contrôles était seulement de  $1444,74 \pm 426,33$  pg/mL chez les SHR traités à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* pendant 5 semaines. Chez les rats WKY, le traitement à l'extrait de plante n'a pas affecté significativement la concentration de 8-iso-PGF2 $\alpha$  par rapport aux contrôles WKY.



**Figure 46.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* (150 mg/kg) sur la concentration de la 8-isoprostane urinaire chez les rats spontanément hypertendus (SHR) et wistar kyoto (WKY). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  ESM,  $n=5-8$ ,  $**P<0,01$  par rapport aux rats WKY contrôles ;  $\&\&P<0,01$  par rapport aux SHR contrôles.

### III.1.6 Toxicité des extraits *T. superba*

#### III.1.6 1 Toxicité aiguë des extraits aqueux et au chlorure de méthylène de *T. superba*

L'extrait aqueux de *T. superba* aux doses étudiées (0, 1000, 1500, 2000 et 5000 mg/kg) n'a pas entraîné de mortalité chez les souris. Aucun signe de toxicité externe n'a été observé pendant la semaine d'observation, ni aucune anomalie macroscopique des organes internes à la fin de la période d'observation. Le poids corporel et le poids relatif des organes des souris traitées à l'extrait aqueux n'ont pas été significativement modifiés par rapport au groupe contrôle.

L'extrait au chlorure de méthylène, jusqu'à la dose de 2000 mg/kg, tout comme l'extrait aqueux n'a pas provoqué de décès ou de signe de toxicité externe. L'observation macroscopique des organes internes des souris ayant reçu l'extrait au chlorure de méthylène à la fin de la période d'observation a révélé des plaques rougeâtres sur la plèvre pulmonaire et à l'intérieur des poumons de souris femelles.

L'évaluation du poids relatif du foie, des reins, du cœur et de la rate n'a révélé aucune différence significative entre les groupes contrôles et traités. Il a été observé chez les souris femelles traitées à l'extrait au chlorure de méthylène aux doses de

1000 et 2000 mg/kg une augmentation significative du poids relatif des poumons (Tableau XXIII).

**Tableau XXIII.** Poids relatifs de certains organes chez les souris ayant reçu une dose de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba*

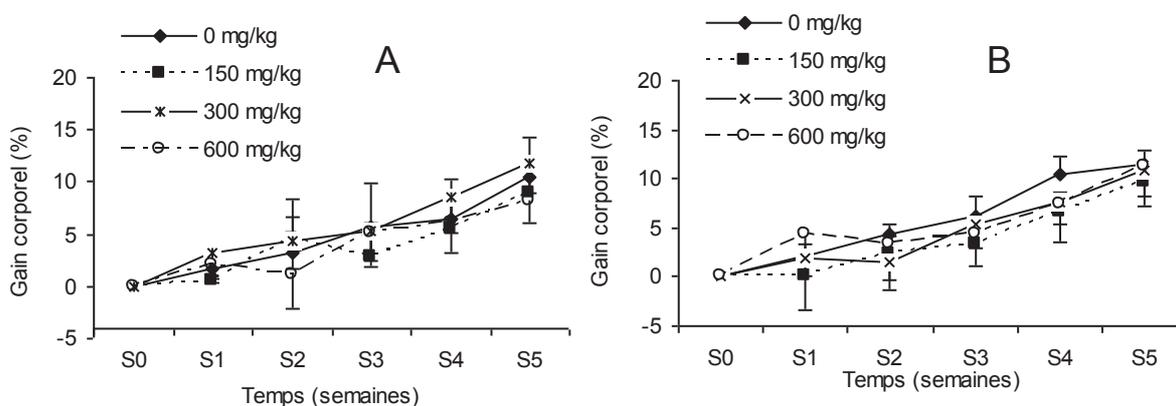
Poids relatifs (mg/g de Poids Corporel)					
Groupes	Foie	Reins	Cœur	Poumons	Rate
<b>Mâles</b>					
Contrôle	55,7 ± 2,46	18,25 ± 0,84	6,02 ± 0,12	5,71 ± 0,07	3,65 ± 0,10
1000 mg/kg	49,12 ± 1,19	18,46 ± 0,47	5,65 ± 0,18	6,93 ± 0,71	3,76 ± 0,53
1500 mg/kg	54,97 ± 2,20	16,18 ± 0,47	5,33 ± 0,22	5,68 ± 0,51	3,45 ± 0,26
2000 mg/kg	52,16 ± 0,91	17,3 ± 0,90	5,56 ± 0,14	7,54 ± 0,77	3,84 ± 0,14
<b>Femelles</b>					
Contrôle	50,99 ± 2,11	14,04 ± 0,46	6,12 ± 0,13	6,59 ± 0,33	5,11 ± 0,19
1000 mg/kg	54,32 ± 0,91	14,81 ± 0,22	6,07 ± 0,12	12,51 ± 1,78*	5,15 ± 0,10
1500 mg/kg	55,16 ± 0,91	13,59 ± 0,78	5,58 ± 0,30	9,14 ± 0,85	5,37 ± 0,42
2000 mg/kg	52,62 ± 1,84	15,35 ± 0,10	6,22 ± 0,17	11,26 ± 1,40*	5,09 ± 0,19

Chaque valeur représente la moyenne ± E.S.M, n= 5. \*P<0,05 par rapport au groupe contrôle. P.C : poids corporel.

### III.1.6.2 Toxicité subchronique de l'extrait au chlorure de méthylène

#### III.1.6.2.1 Effets sur l'évolution pondérale

La figure 47 présente l'évolution du poids corporel des souris mâles (A) et femelles (B) au cours des 5 semaines de traitement à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba*. Il en ressort que, à toutes les doses étudiées l'extrait au chlorure de méthylène n'a pas modifié de façon significative l'évolution de la masse corporelle des souris par rapport aux animaux témoins.



**Figure 47.** Effets de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur l'évolution pondérale des souris mâles (A) et femelles (B). Chaque point représente la moyenne ± E.S.M, n= 5.

### III.1.6.2.2 Effets sur les paramètres hématologiques

Le tableau XXIV présente les valeurs hématologiques des souris mâles et femelles traitées pendant 5 semaines à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba*. Il ressort que, le taux des globules blancs et rouges et des plaquettes chez les souris mâles n'a pas significativement varié par rapport aux souris contrôles. L'indice de répartition des globules rouges chez les souris mâles traités à la dose de 300 mg/kg a augmenté significativement ( $P < 0,05$ ). Il a été observé chez les souris du même groupe une diminution ( $P < 0,05$ ) de la teneur moyenne d'un globule rouge en hémoglobine.

Chez les souris femelles traitées à l'extrait à la dose de 150 mg/kg, nos résultats montrent une diminution du taux de globules blancs, des lymphocytes ( $P < 0,01$ ) et du volume globulaire moyen ( $P < 0,05$ ). L'hématocrite a augmenté significativement ( $P < 0,05$ ). La dose de 300 mg/kg a induit chez les souris femelles une augmentation significative de la déviation standard de l'indice de répartition des globules rouges ( $P < 0,01$ ).

**Tableau XXIV.** Effets subchroniques de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* sur quelques paramètres hématologiques

Traitement (mg/kg)	GB (x 10 <sup>-3</sup> µL)	Lym (x 10 <sup>-3</sup> µL)	Mon (x 10 <sup>-3</sup> µL)	Gra (x 10 <sup>-3</sup> µL)	GR (x10 <sup>-6</sup> µL)	Ht (%)	Vgm (fL)	Irgr (%)	Tmgrh <sub>i</sub> (pg)	Cgrh (g/dL)	Hgb (g/dL)	Dslrgr (fL)	Plt (x10 <sup>-3</sup> µL)	Vpm(fL)	Pct (%)	Irp (%)
<b>Souris mâles</b>																
Contrôle	11,7±1,7	8,4±1,3	2,0±0,3	1,3±0,2	6,6±0,3	22,8±1,4	43,6±1,4	16,7±0,4	17,4±0,2	40,0±0,6	11,4±0,6	28,2±0,6	365,4±56,3	7,8±0,4	0,3±0,0	43,7±2,9
150	7,2±0,6	5,6±0,4	1,1±0,1	0,6±0,2	5,7±0,6	25,2±2,3	44,6±1,5	19,4±0,9	17,1±0,6	38,6±0,7	9,7±1,0	32,2±0,6	451,6±71,0	8,0±0,4	0,4±0,1	40,1±1,9
300	13,4±2,2	9,3±1,3	2,5±0,5	1,7±0,5	6,3±0,3	26,2±1,4	41,6±1,6	21,2±1,5*	15,9±0,2*	37,9±0,8	9,9±0,4	32,4±2,3	445,2±66,3	7,6±0,2	0,3±0,1	41,5±0,7
600	14,8±1,5	10,2±0,9	2,9±0,4	1,8±0,2	6,0±0,3	25,0±0,5	43,4±1,2	19,1±1,1	16,9±0,2	38,8±0,8	9,7±0,4	31,8±1,5	457,8±43,3	7,6±0,1	0,3±0,0	39,8±2,8
<b>Souris femelles</b>																
Contrôle	13,1±1,9	8,5±1,4	3,0±0,8	1,6±0,4	6,7±0,5	30,4±2,2	45,6±0,9	16,9±0,7	17,2±0,7	38,4±0,7	11,6±0,7	29,8±0,7	528,0±37,6	8,5±0,1	0,4±0,0	42,6±1,6
150	4,6±0,9**	2,5±1,0**	3,1±1,3	6,7±3,9	4,7±1,2	19,5±4,9*	41,0±1,3*	19,6±0,3	15,2±1,0	36,7±1,9	7,5±1,9	29,6±1,1	487,0±60,4	7,7±0,3	0,3±0,1	42,4±1,5
300	12,0±1,9	9,4±1,6	1,7±0,3	0,9±0,2	6,0±0,4	27,1±1,6	45,2±1,1	18,7±1,0	17,2±0,6	38,3±0,7	10,4±0,7	36,5±1,5**	537,8±53,3	7,9±0,3	0,4±0,1	40,8±2,8
600	7,9±1,7	7,1±0,7	1,5±0,2	0,7±0,1	5,9±0,3	25,5±0,7	43,6±0,9	17,9±1,0	17,0±0,6	38,8±0,5	9,9±0,2	29,6±1,0	452,8±62,7	8,0±0,2	0,4±0,0	38,9±1,9

Les valeurs sont des moyennes ± E.S.M ; n=5 souris/groupe/sexe \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  différence significative par rapport au groupe Contrôle. GR= globules blancs, Lym= lymphocytes, Mon= monocytes, Gra=granulocytes, GR =globules rouges, Ht= hématocrite, Vgm= volume globulaire moyen, Irgr=indice de répartition des globules rouges, Tmgrh= teneur moyenne d'un globule rouge en hémoglobine, Cgrh= concentration des globules rouges en hémoglobine, Hgb=hémoglobine, Dslrgr=déviatoin standard de l'indice de répartition des globules rouges, Plt= volume plaquettaire moyen, Pct=procalcitonine, Irp= indice de répartition des plaquettes.

### III.1.6.2.3 Effets sur quelques paramètres biochimiques hépatiques et rénaux

Le tableau XXV montre que le taux de protéines a augmenté ( $P<0,05$ ) dans le foie des souris traitées pendant 5 semaines à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* à toutes les doses et à la dose 150 mg/kg dans les reins. Le taux de glutathion (GSH) a significativement augmenté ( $P<0,05$ ) dans le foie des souris traitées à la dose 600 mg/kg. L'évaluation du taux de transaminases dans le foie des souris traitées avec l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* en dose quotidienne unique pendant 5 semaines a montré une diminution significative de l'activité de l'ALAT de 5,46% à la dose de 150 mg/kg et du taux d'ASAT de 5,94% à la dose 600 mg/kg par rapport aux souris contrôles. L'administration de l'extrait de plante aux souris pendant 5 semaines n'a pas entraîné de modification notable du taux de bilirubine hépatique ou du taux de créatinine rénal.

**Tableau XXV.** Effets du traitement subchronique (5 semaines) sur quelques paramètres biochimiques tissulaires des souris

Traitement (mg/kg)	Prot (mg/mL)	GSH (mg/g org.) $\times 10^{-6}$	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	Bil (mg/mL)	Créat (mg/dL) $\times 10^{-3}$
<b>Foie</b>						
Contrôle	47,1 $\pm$ 5,4	6,7 $\pm$ 0,8	153,6 $\pm$ 1,8	247,1 $\pm$ 4,4	0,8 $\pm$ 0,2	-
150	98,1 $\pm$ 14,1*	6,1 $\pm$ 0,4	145,2 $\pm$ 3,3*	238,4 $\pm$ 4,0	1,1 $\pm$ 0,2	-
300	106,6 $\pm$ 9,5*	6,2 $\pm$ 0,6	151,6 $\pm$ 1,7	240,4 $\pm$ 3,6	1,2 $\pm$ 0,1	-
600	98,5 $\pm$ 18,6*	11,2 $\pm$ 1,9*	147,0 $\pm$ 1,3	232,4 $\pm$ 2,8*	1,3 $\pm$ 0,1	-
<b>Reins</b>						
Contrôle	54,9 $\pm$ 13,8	13,3 $\pm$ 1,5	-	-	-	1,8 $\pm$ 0,4
150	118,4 $\pm$ 11,5*	19,1 $\pm$ 2,7	-	-	-	2,8 $\pm$ 0,3
300	83,6 $\pm$ 6,8	17,5 $\pm$ 1,8	-	-	-	2,4 $\pm$ 0,4
600	73,1 $\pm$ 4,8	17,4 $\pm$ 2,5	-	-	-	5,0 $\pm$ 1,8

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$ ESM ; n=10 souris/groupe, \*  $P<0,05$  par rapport au groupe Contrôle.

Prot= protéines ; GSH= glutathion réduit ; ALAT= alanine aminotransférase ; ASAT=aspartate aminotransférase ; Bil=bilirubine ; Créat=créatinine.

### III.1.6.2.4 Effets sur le profil lipidique, la glycémie et le taux de protéines sériques

Les taux de triglycérides, de cholestérol total et de protéines sériques des souris traitées pendant 5 semaines à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* n'ont pas été modifiés significativement par rapport aux animaux contrôles. L'extrait de plante en 5 semaines d'administration aux souris a entraîné une augmentation significative du taux de cholestérol HDL ( $P<0,01$ ) de 15,35 % à la dose de 300 mg/kg et de 14,07 % à la dose de 600 mg/kg. L'extrait de plante a entraîné une diminution significative du taux de cholestérol LDL de 44,83 % ( $P<0,05$ ) à la dose de 300 mg/kg et de 54,00 % ( $P<0,01$ ) à la dose de 600 mg/kg. *T. superba* à la dose de 150 mg/kg a induit une diminution significative ( $P<0,05$ ) du taux de glucose sérique de 54,70 % par rapport aux souris contrôles (tableau XXVI).

**Tableau XXVI.** Effets de *T. superba* sur le profil lipidique, la glycémie et le taux de protéines sériques des souris après 5 semaines

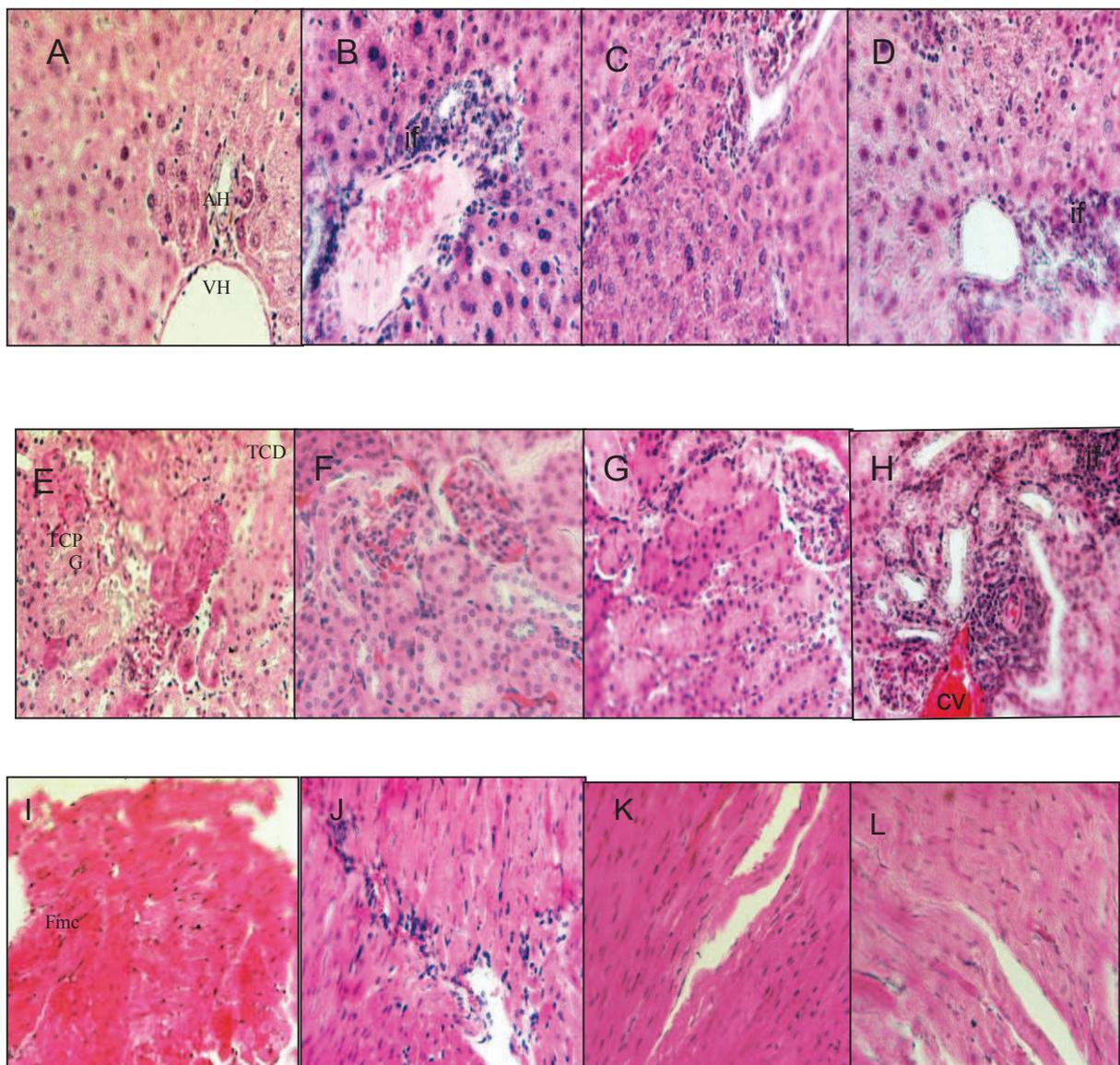
Traitement (mg/kg)	TG (mg/dL)	Chol (mg/dL)	HDL chol (mg/dL)	LDL chol (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Prot (mg/mL)
Contrôle	248,2±40,2	155,7±9,4	54,7±1,2	60,0±5,1	96,7±6,3	195±8,5
150	239,1± 38,2	142,3±11,1	56,8±2,1	45,1±6,9	43,8±1,2*	182±8,9
300	268,1±23,4	138,8±7,8	63,1±1,3**	33,1±7,4*	102,8±4,3	198±11,5
600	241,3±16,3	129,4±5,6	62,4±0,8**	27,6±6,4**	1066,6±2,2	187±7,9

Les valeurs sont des moyennes ± E.S.M ; n=10, \*  $P<0,05$  ; \*\*  $P<0,01$  différence significative par rapport au Contrôle.

TG= Triglycérides ; Chol= cholestérol total ; HDL chol=HDL cholestérol ; LDL chol= LDL cholestérol Prot= protéines.

### III.1.6.2.5 Histologie du foie, des reins et du cœur

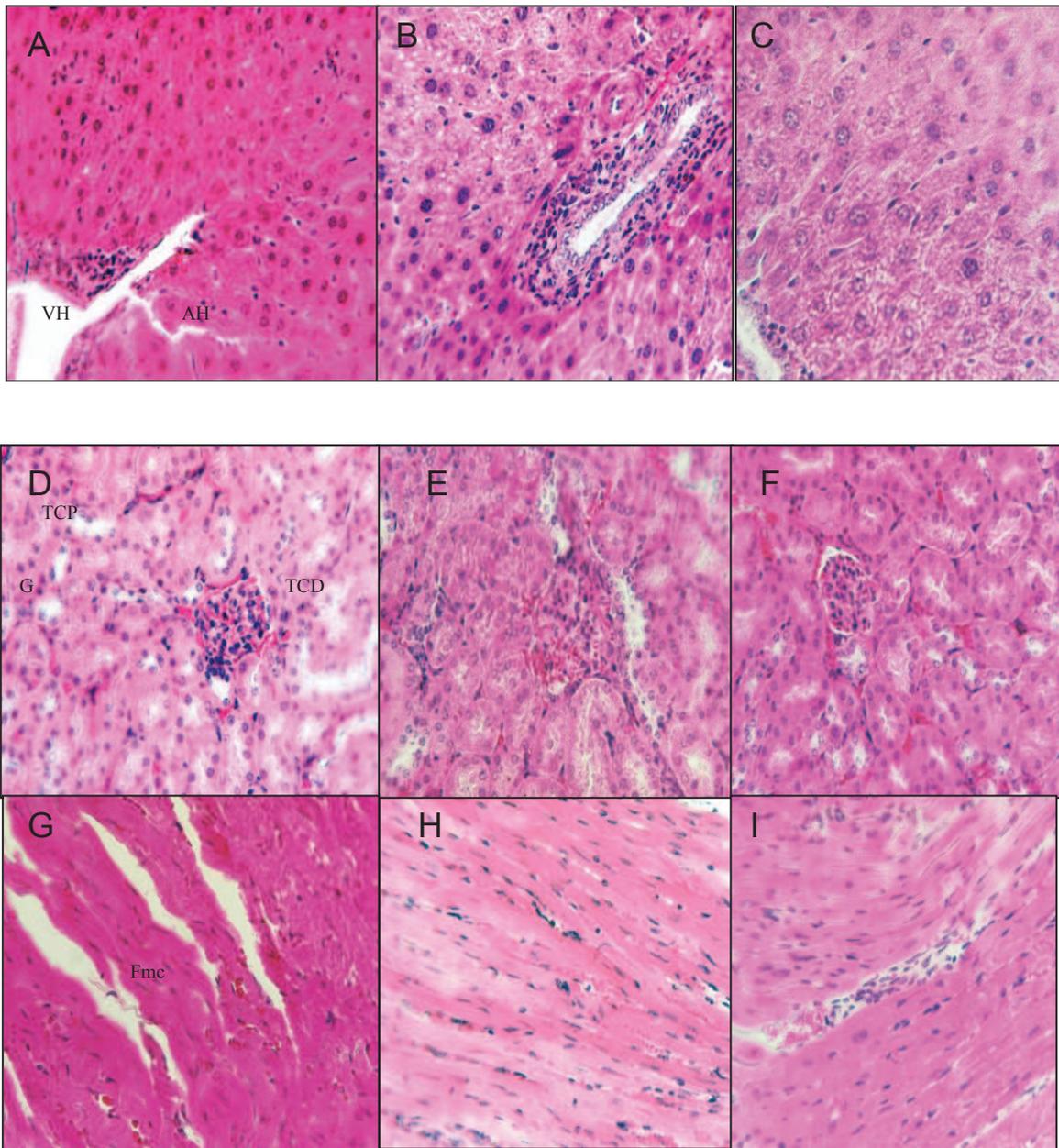
L'examen histologique des organes de souris traitées pendant 5 semaines à l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* révèle que, le foie des souris ayant reçu l'extrait à la dose de 150 et 600 mg/kg présentent des cellules inflammatoires (figure 48 B et D) et des congestions vasculaires à la dose de 300 mg/kg (figure 48 D) par rapport aux souris contrôles. Il a été observé au niveau des reins des souris traitées à l'extrait à la dose 600 mg/kg des cellules inflammatoires et des congestions vasculaires (figure 48 H). Les cœurs des souris traitées à l'extrait de plante pendant la même durée expérimentale présentent une architecture comparable à celle des souris témoins (figure 48 I, J, K, L)



**Figure 48** Coupes histologiques du foie (A, B, C, D) des reins (E,F,G,H) et du cœur (I,J,K,L) des souris contrôles ( A,E,I), et traitées à l'extrait au chlorure de méthylène aux doses de 150 (B,F,J), 300 (C,G,K) et 600 mg/kg (D,H,L).

Coloration à l'Hématoxyline-Eosine, x400).if : inflammation ; cv : congestion vasculaire. AH : artère hépatique ; VH : veine hépatique ; G : glomérule ; TCP : tube contourné proximal ; TCD : tube contourné distal ; Fmc : fibre musculaire cardiaque.

Deux semaines après l'arrêt de l'administration de l'extrait une amélioration de l'architecture générale des différents organes (Figure 49 M à U), signe d'un effet réversible des anomalies produites par l'extrait.



**Figure 49.** Coupes histologiques du foie (A, B, C) des reins (D,E,F) et du cœur (G, H,I) des souris contrôles ( A,D,G), et deux semaines après arrêt de l'administration de l'extrait au chlorure de méthylène aux doses de 300 mg/kg (B,E,H) et 600 mg/kg (C,F,I).

Coloration à l'Hématoxyline-Eosine, x400. AH : artère hépatique ; VH : veine hépatique ; G : glomérule ; TCP : tube contourné proximal ; TCD : tube contourné distal ; Fmc : fibre musculaire cardiaque.

## III.2 DISCUSSION

### Effets de l'extrait aqueux dans des modèles d'HTA secondaires : modèle d'HTA induite par le glucose et par l'éthanol

Les effets hypotensifs et antihypertenseurs de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *T. superba* ont été évalués chez des rats normotendus et rendus expérimentalement hypertendus par le glucose. Le métabolisme anormal du glucose (en particulier le stade précoce du métabolisme anormal du glucose) s'accompagne souvent d'hypertension, et cette association est aussi bien documentée que le syndrome de résistance à l'insuline (Ferrannini et al., 1987). Chez les patients à hypertension modérée, l'hypertension associée à l'intolérance au glucose est étroitement liée à une dysfonction endothéliale. (Tomiyama et al., 2000). Les études expérimentales ont démontré que le glucose et le fructose contribue à l'augmentation de la pression artérielle (Hwang et al., 1987; El Midaoui et De Champlain, 2002) par plusieurs mécanismes tels que la dyslipidémie (Reaven et Ho, 1991) la rétention sodique, l'augmentation de la volémie (Baum, 1987), la stimulation du système nerveux sympathique (Bunag et al., 1983), la dysfonction endothéliale (Tomiyama et al., 2000) ou l'augmentation du stress oxydatif (Cai et Harisson, 2000). Dans notre étude, l'administration de la solution à 10% de glucose pendant 3 semaines dans l'eau de boisson chez les rats normotendus a induit une augmentation significative de la pression artérielle systolique et diastolique, comme précédemment décrit par El Midaoui et De Champlain, (2002). Nos résultats démontrent que l'injection i.v de l'extrait aqueux de *T. superba* aux RNT et rendus expérimentalement hypertendus par le D-glucose conduit à une diminution immédiate de la pression artérielle suivie d'une deuxième phase de réduction de la pression artérielle qui persiste au moins une heure. Cette phase ultérieure de réduction de la PA est observée à la dose de 15 mg/kg chez les RNT et à toutes les doses étudiées chez les RHG (15, 20 et 40 mg / kg). Dans cette étude, il a été démontré chez les RNT que le prétraitement des animaux à l'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques n'affecte pas significativement les effets hypotenseurs de l'extrait de plante. Les effets de *T. superba* n'ont pas été significativement modifiés après prétraitement des RNT au propranolol, un antagoniste des récepteurs  $\beta$ . Ces résultats suggèrent que, les effets hypotenseurs de l'extrait aqueux de *T. superba* ne seraient pas médiés par les récepteurs muscariniques ou  $\beta_2$  adrénergiques. Les effets de l'extrait aqueux de *T.*

*superba* ont été également évalués en présence de la yohimbine, un antagoniste des récepteurs alpha-2 adrénergiques et de la réserpine. La réserpine entraîne la déplétion des catécholamines et par conséquent la réduction de leur libération (Mandela, 2010). Les résultats montrent que ces antagonistes réduisent à la fois la baisse immédiate et tardive de la PA induites par l'extrait. A la dose utilisée dans cette étude (0,1 mg/kg), la yohimbine est capable de bloquer le récepteur pré-synaptique alpha-2 adrénergique. L'effet de la yohimbine a été étudié à une petite dose car de fortes doses de yohimbine augmentent le tonus sympathique et diminuent le tonus vagal (Andréjak, 1983). La diminution de l'effet hypotenseur de l'extrait aqueux de *T. superba* par la yohimbine ou la réserpine suggère que cet extrait est capable d'activer les récepteurs alpha-2, et d'inhiber la libération de norépinéphrine par les terminaisons nerveuses périphériques sympathiques. En outre, les résultats obtenus après prétraitement à la réserpine, qui a la capacité de diminuer la libération des catécholamines par le nerf sympathique (Mandela et al., 2010) suggère qu'une inhibition de l'activité du système nerveux orthosympathique pourrait être l'un des mécanismes contribuant à la réduction de la pression artérielle par cet extrait de plante. Néanmoins, un effet vasodilatateur direct ne peut être exclu puisque une étude précédente a démontré que l'extrait au méthanol a une activité vasorelaxante (Dimo et al., 2006). Ainsi, la baisse durable de la PA observée aussi bien chez les RNT et RHG pourrait bien s'expliquer par une diminution des résistances vasculaires périphériques.

Les effets de cet extrait ont été évalués sur l'HTA induite par le D-glucose en traitement préventif, après administration par voie orale pendant 3 semaines. Les résultats de cette étude ont montré que l'administration de l'extrait aqueux de *T. superba* (50 et 100 mg/kg) a empêché l'élévation de la pression artérielle des rats soumis à un régime riche en glucose, de façon dose-dépendante et avec une efficacité comparable à celle induite par la nifédipine, un inhibiteur des canaux calciques. Les mécanismes impliqués dans cet effet bénéfique pourraient impliquer l'inhibition de l'activité orthosympathique comme suggéré par les résultats de l'étude intraveineuse. Toutefois, d'autres mécanismes pourraient également y participer, notamment une diminution du stress oxydant. En effet, il est bien établi que la consommation excessive de sucre est associée à l'augmentation de la production des formes réactives de l'oxygène dans les tissus (El Midaoui et De Champlain, 2002). En outre, chez les patients hypertendus, la baisse des défenses antioxydantes est bien documentée (Rodrigo et al., 2007). Nos résultats ont montré

dans ce modèle d'HTA que plusieurs biomarqueurs du stress oxydatif sont altérés chez les rats soumis au glucose. Le glutathion réduit (GSH) est l'antioxydant endogène le plus abondant dans les cellules eucaryotes qui interagit avec des espèces oxygénées activées, empêchant ainsi l'oxydation des substrats organiques (protéines, ADN, acides gras). Il est utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase (GPx). Le GSH est également un piègeur de radicaux superoxydes et il protège les groupes thiol des protéines contre l'oxydation (Stein et al., 1989). Nos résultats ont montré une diminution des taux de GSH dans le coeur, les reins, le foie et l'aorte des rats hypertendus. La détermination de l'activité spécifique de la superoxyde dismutase (SOD), enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) en eau et peroxyde d'hydrogène (Faraci et Didion, 2004) révèle une baisse d'activité de la SOD dans le coeur et les reins des rats hypertendus au D-glucose et au contraire un accroissement de l'activité dans l'aorte. En réponse au stress oxydatif, la SOD est régulée de deux manières différentes. En cas de stress oxydatif modéré on observe une surexpression de la SOD (exercice physique par exemple). Si le stress oxydatif persiste la SOD est détruite et son expression diminue. Paradoxalement, une concentration excessive de la SOD peut être dangereuse parce que, dans ce cas, elle est la base d'une surproduction de peroxyde d'hydrogène (effet paradoxal d'antioxydants) (Levesque, 2006). L'augmentation de l'activité de la SOD a déjà été rapportée dans l'aorte de rats dans le même modèle de l'hypertension (El Midaoui et De Champlain, 2002) et serait secondaire à l'augmentation de la production d' $O_2^-$ , (El Midaoui et De Champlain, 2002). Nos résultats suggèrent que dans ce modèle, le coeur et les reins seraient plus touchés par le stress oxydatif.

Le malondialdéhyde (MDA) est utilisé comme indice de la peroxydation lipidique résultant de la réaction des espèces oxygénées actives avec les acides gras membranaires (Nayeemunisa et Kumuda, 2003). Dans notre étude, il a été observé chez les RHG une augmentation significative des taux de MDA dans le coeur, les reins, le foie et l'aorte. En traitement préventif, l'extrait aqueux de *T. superba* a sensiblement empêché la chute de GSH et l'augmentation des niveaux de MDA. Le traitement a réduit l'activité de la SOD aortique, mais n'a pas affecté significativement le taux de SOD dans le coeur, le foie et le rein. Cette différence d'effet serait due au fait que, comme précédemment signalé le glucose n'a pas agit dans le même sens au niveau de l'aorte que dans les organes précités. Les polyphénols présents dans l'extrait aqueux de *T. superba* (Momo et al., 2009),

pourraient également expliquer l'activité antioxydante de cet extrait de plante. Ces résultats globaux permettent de vérifier les propriétés antioxydantes de *T. superba* comme facteur contribuant à ses effets bénéfiques sur l'hypertension. Puisque qu'aucune différence n'a été observée entre la nifédipine et l'extrait de plante pour ce qui concerne la réduction de la pression artérielle et des biomarqueurs du stress oxydatif, les effets bénéfiques de *T. superba* pourrait être liés à la réduction de la pression artérielle. Toutefois, l'extrait peut également exercer ses effets bénéfiques grâce à une amélioration de la sensibilité à l'insuline comme suggéré par l'effet antidiabétique de *T. superba* dans chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine (Kamtchouing et al., 2005). Enfin, des données récentes indiquent que la nifédipine exerce des effets antioxydants et diminue l'accumulation de produits de glycation avancée (Yamagishi, 2010).

La consommation excessive d'alcool est un facteur qui contribue à l'élévation de la PA et est une cause importante d'HTA secondaire (Luther, 1985). Dans cette étude, il a été montré que l'administration chronique de l'alcool éthylique 35° à la dose de 3 g/kg/ jour pendant 8 semaines entraîne une augmentation significative de la pression artérielle systolique (PAS) et de la pression artérielle diastolique (PAD) respectivement de 43% et de 46%. Dans notre étude, l'augmentation de pression artérielle induite par l'alcool est en accord avec les travaux de Leonardo et al. (2006). Pour ces auteurs, l'installation de l'hypertension suite à une consommation chronique d'éthanol serait due à une augmentation de la sécrétion d'hormones et neurotransmetteurs stimulant le système nerveux sympathique, de mécanismes myogéniques impliquant l'altération des propriétés contractiles du muscle lisse vasculaire et l'altération de l'activité des barorécepteurs des rats. Dans notre étude, il a été observé une augmentation significative de la pression artérielle diastolique des rats traités à l'alcool par rapport aux animaux ayant reçus de l'eau distillée. D'après Salvador et Amar (1995), l'élévation de la PAD est due à l'augmentation de la résistance vasculaire au niveau des petites artères et artérioles, et à la distensibilité soutenue de l'aorte et des gros troncs artériels. L'administration concomitante de l'alcool et de l'extrait aqueux de *T. superba* (200 mg/kg) a permis de maintenir la valeur de la pression artérielle moyenne (PAM) autour de la normale ( $120,37 \pm 1,81$  mm Hg). Nos résultats montrent que l'extrait est capable d'inhiber la hausse de la PAS, de la PAD et de la PAM induite par l'alcool. Cette réduction de la pression provoquée par l'extrait aqueux de *T. superba* serait due à l'action vasodilatatrice de cet extrait, comme démontré *in vitro* sur aortes isolées. Chez les rats traités

concomitamment avec l'alcool et l'extrait, la fréquence cardiaque moyenne a diminué de façon significative ( $P < 0,001$ ) par rapport aux rats traités exclusivement à l'alcool. L'extrait aqueux de *T. superba* pourrait avoir une action directe sur le muscle cardiaque provoquant un effet chronotrope négatif, contribuant également à l'activité antihypertensive de *T. superba*

Cette étude a montré que la consommation chronique de l'alcool conduit à divers désordres métaboliques impliquant une perturbation des enzymes hépatiques, du profil lipidique et une perturbation de la balance prooxydants/antioxydant dans divers tissus comme initialement signalé par Kasdallah-Grissa (2006). L'administration chronique de l'éthanol aux rats est source d'hépatotoxicité, marquée entre autres par une élévation du taux sérique des transaminases (Yun et al., 2007). Nos résultats ont montré que la consommation chronique de l'alcool éthylique entraîne effectivement un dysfonctionnement de l'activité hépatique se traduisant par une élévation du taux des transaminases (ALAT et ASAT), en accord avec les résultats de Yun et al. (2007) sur le même modèle. L'administration concomitante de l'alcool et de l'extrait a permis de réduire significativement ( $P < 0,001$ ) le taux de transaminases sériques par rapport aux animaux traités exclusivement à l'alcool éthylique, suggérant que l'extrait aqueux de *T. superba* protégerait le foie de la toxicité due à l'éthanol. L'administration chronique de l'alcool éthylique a induit dans cette étude une diminution significative du taux de créatinine sérique, suggérant ainsi que l'alcool dans cette étude n'a pas affecté la filtration glomérulaire car la créatininémie aurait alors augmenté. L'alcool éthylique n'a pas causé de variation significative du taux de bilirubine sérique suggérant une absence de la dégradation des globules rouges et/ou de glycation de l'hémoglobine. Le traitement des rats normotendus avec l'alcool éthylique pendant 8 semaines a entraîné une élévation significative du taux de triglycérides et de cholestérol sérique. Selon You et Grabb (2004), l'éthanol détériore l'oxydation des graisses, stimule la lipogenèse et contribue au développement des graisses hépatiques. La dyslipidémie observée peut s'expliquer par une réduction de la sensibilité à l'insuline avec changement de la tolérance au glucose (Panza et al, 1990). L'extrait aqueux de *T. superba* a protégé les animaux contre l'hypercholestérolémie et non l'hypertriglycéridémie induite par l'alcool. A ce stade de notre étude, nous ne pouvons dire dans ce modèle d'HTA si notre extrait diminue le HDL ou le LDL cholestérol. Nos résultats montrent au moins que l'extrait aqueux de *T. superba* pourrait contenir des substances capables de protéger les animaux contre l'hypercholestérolémie causée par l'alcool éthylique. Un

effet bénéfique de *T. superba* sur le profil lipidique a néanmoins été clairement démontré dans cette étude lors de l'évaluation de la toxicité subchronique de l'extrait au chlorure de méthylène avec une augmentation du taux sérique de HDL cholestérol et une diminution de la concentration de LDL chez les souris saines. Ces observations viennent montrer l'impact bénéfique de cette plante sur la variation du taux de cholestérol sérique. Dans les perspectives de ce travail, il serait intéressant d'étudier l'effet de *T. superba* sur un modèle de souris athérosclérotiques (apo E -/-) ou chez le rat avec un syndrome métabolique.

L'alcool éthylique dans cette étude a induit une augmentation significative de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase dans l'aorte, le coeur, le foie et les reins par rapport aux rats normotendus. L'augmentation de l'activité de la SOD serait indicatrice de l'augmentation de la production de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et donc du stress oxydatif. Il est connu que l'augmentation de la production de l'anion superoxyde est impliquée dans la pathogenèse de l'HTA (Juan et al., 1998). Le taux de glutathion réduit a diminué significativement dans l'aorte des rats hypertendus, diminution corrigée le traitement avec l'extrait. L'alcool éthylique a induit une augmentation significative de la peroxydation lipidique matérialisée dans cette étude par une augmentation du taux de MDA dans tous les organes, en accord avec les résultats des études réalisées sur ce modèle (Panchenko et al., 1987 ; Ribière et al., 1992 ; Albano et al., 1999). L'extrait aqueux de *T. superba* a exercé un effet bénéfique sur les paramètres tissulaires du stress oxydatif ; à savoir une réduction du taux de SOD, de catalase et de MDA et une augmentation du taux de glutathion réduit. Ces résultats suggèrent que l'extrait de *T. superba* serait capable d'empêcher la peroxydation lipidique induite par l'éthanol chez le rat. Chez les animaux soumis au régime alcoolisé, le taux de monoxyde d'azote (nitrites) est diminué dans le rein des rats en traitement préventif et dans l'aorte des rats en traitement curatif par rapport aux rats normotendus. Par ailleurs, il a été rapporté que la synthèse excessive de NO au niveau aortique et la génération des espèces réactives d'oxygène subséquente après ingestion chronique d'éthanol peuvent contribuer à une dysfonction endothéliale (Zima et al., 2001). La baisse du taux rénal de NO chez les animaux rendus hypertendus par consommation chronique d'alcool éthylique dans cette étude est conforme avec les résultats de Powers et al. (1996). Il a été également rapporté que la dysfonction endothéliale due à l'éthanol peut modifier les capacités relaxantes de l'endothélium en réduisant la libération de monoxyde d'azote (Panza et al., 1990 ; De Cort, 2004). Dans l'HTA, la dysfonction

endothéliale est observée lorsque l'expression du NO synthase d'origine endothéliale (eNOS) et la production de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) sont simultanément augmentées, menant ainsi à la formation du peroxyde d'azote (Boulimie et al., 1997). L'extrait aqueux de *T. superba* a ramené le taux de NO autour de la valeur normale au niveau aortique et a provoqué une augmentation significative de NO au niveau rénal par rapport aux rats prenant uniquement de l'alcool. Ces résultats suggèrent que l'extrait aurait un rôle protecteur contre la dysfonction endothéliale induite par l'éthanol.

Les études réalisées sur l'hypertension artérielle induite par le glucose et l'alcool montrent que *T. superba* possède des effets bénéfiques sur l'hypertension artérielle secondaire.

### **Effets vasodilatateurs des différents extraits de *T. superba* sur le modèle d'anneaux aortiques isolés de rat**

Dans cette étude ont été évalués les effets vasorelaxants de différents extraits de *T. superba* sur les anneaux d'aorte de rats normotendus précontractés au KCl ou à la PE ainsi que les mécanismes impliqués dans les effets relaxants *in vitro* de l'extrait le plus actif. Les résultats ont démontré que tous les extraits (aqueux, au méthanol, au chlorure de méthylène et au chlorure de méthylène-méthanol) de *T. superba* exercent une activité vasorelaxante sur les anneaux d'aortes thoraciques de rat. Cependant, l'importance de l'activité vasorelaxante des extraits étaient fonction du solvant d'extraction. Ainsi, les extraits au chlorure de méthylène et au chlorure de méthylène-méthanol ont des effets plus marqués que les extraits au méthanol et aqueux. L'évaluation de l'*E<sub>max</sub>* des extraits a montré que sur les anneaux d'aorte contractés à la PE les *E<sub>max</sub>* ont été de 99±4%, 95±3%, 88±3% et 79±2% respectivement pour les extraits au chlorure de méthylène, au chlorure de méthylène-méthanol, au méthanol et aqueux et respectivement de 96±3%, 54±3%, 44±7% et 30±3% sur les anneaux précontractés au KCl. La *CE<sub>50</sub>* de l'extrait au chlorure de méthylène était de 0,1 mg/mL (après la contraction induite par la PE ou le KCl). Les résultats de cette étude ont clairement montré que l'activité vasorelaxante des extraits aqueux, au méthanol et au chlorure de méthylène n'était pas affectée par le retrait de l'endothélium vasculaire tant sur les anneaux précontractés à la PE qu'au KCl. L'extrait au mélange chlorure de méthylène-méthanol a induit une activité relaxante qui était réduite par la destruction de l'endothélium à certaines doses. Ces résultats suggèrent que les extraits au chlorure

de méthylène et au chlorure de méthylène-méthanol de *T. superba* auraient respectivement des effets vasorelaxants endothélium-indépendant et endothélium-dépendant. La fraction F3 isolée de l'extrait au chlorure de méthylène a induit une activité vasorelaxante été la plus active, avec une *E<sub>max</sub>* de 96±2% et de 99±1% respectivement sur anneaux intacts contractés à la PE ou au KCl. Aussi, les perspectives de ce travail viseront à déterminer les composés purs présents dans F3 qui jouent un rôle dans l'activité vasodilatatrice de l'extrait MC. Les données obtenues avec l'extrait au méthanol sont en accord avec une étude précédente qui a révélé qu'une dose unique de cet extrait possède un effet vasodilatateur indépendant de l'endothélium (Dimo et al., 2006). En revanche, l'effet de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol est réduit par la destruction de l'endothélium, indiquant que cet extrait interfère avec la production de facteurs qui jouent un rôle important dans la vasodilatation endothélium-dépendante (Wu et al., 1993). Nos résultats montrent également que le L-NAME réduit de façon significative l'effet relaxant de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol, ce qui suggère que l'effet de cet extrait est médié au moins en partie par une augmentation de l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS). Il reste à déterminer si cet effet est dû à un impact sur les récepteurs endothéliaux par différents agonistes tels que l'adénosine, l'acétylcholine, la bradykinine et la disponibilité de la sérotonine ou par une amélioration du substrat ou de la disponibilité du co-facteur pour le NOS. L'effet de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol est plus important sur les anneaux contractés à la PE que ceux contractés au KCl. L'utilisation du KCl comme agent contractant inhibe la contribution de l'EDHF, puisque les effets de l'EDHF sont principalement dépendants de l'activation des canaux potassiques (Lukska et al., 2009). En conséquence, la contribution de la vasodilatation NOS- et cyclooxygénase-dépendante devient dominante après l'épreuve au KCl (McGuire et al., 2001). Ainsi, le fait que l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol induise un effet moins puissant lorsque le KCl est utilisé comme agent contractant suggère fortement que ses effets vasodilatateurs sont partiellement médiés par l'amélioration de la libération de l'EDHF. Ces effets de l'extrait au chlorure de méthylène-méthanol sur la fonction endothéliale sont particulièrement intéressants, car l'hypertension artérielle est associée à une dysfonction endothéliale qui contribue à la fois au développement et à la persistance de l'hypertension artérielle, ainsi qu'au développement des complications de la maladie (Higashi et Chayama, 2002). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que, au-delà de son effet sur la diminution de la pression artérielle, *T. superba* pourrait

aussi avoir des effets bénéfiques sur l'atteinte des organes cibles induite par l'hypertension. Cette étude montre que l'extrait au chlorure de méthylène est le plus puissant des quatre extraits et, agirait directement sur les CMLV. L'activité vasorelaxante de l'extrait au chlorure de méthylène est évidente après contraction à la PE ou au KCl. La phényléphrine est un agoniste alpha-adrénergique qui induit des contractions des cellules musculaires lisses par l'influx de calcium par le biais des récepteurs-canaux calciques et par la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique (McFadzean et Gibson, 2002). L'activation des récepteurs alpha conduit à la production de diacylglycérol et de l'inositol-triphosphate (IP3) ; ce dernier messenger provoquant la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique après activation des récepteurs IP3 (Thorneloe et Nelson, 2005). En revanche, la contraction provoquée par le KCl résulte principalement de l'influx de calcium extracellulaire induite par la dépolarisation de la membrane cellulaire et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (Nelson et Quayle, 1995). C'est ainsi qu'il a été suggéré à la suite de nos observations que la vasorelaxation indépendante de l'endothélium de l'extrait au chlorure de méthylène serait liée à son effet sur l'homéostasie calcique. Pour vérifier si l'extrait au chlorure de méthylène modifie l'influx calcique, des expériences ont été menées sur des anneaux précontractés au KCl ou à la PE dans une solution sans calcium, et le calcium a été ajouté par la suite. Les données montrent que l'extrait réduit les contractions induites par le calcium après précontraction au KCl ou à la PE, ce qui indique que, le blocage des canaux calciques récepteurs et voltage-dépendants serait impliqué dans les effets vasodilatateurs de cet extrait. En outre, les résultats montrent que l'extrait au chlorure de méthylène diminue la contraction induite par la PE en présence de vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendant, et dans une moindre mesure de canaux calciques récepteurs-dépendants (Striggow et Bohnensack, 1993 ; Shin et al., 2005), ce qui démontre que l'extrait au chlorure de méthylène inhiberait aussi la libération de calcium des réserves intracellulaires IP3-sensibles du réticulum sarcoplasmique dans les anneaux aortiques. En conclusion, cette partie de notre travail montre que quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, *T. superba* contient des composés vasodilatateurs qui pourraient être impliqués dans les effets antihypertenseurs de la plante.

## Effet de l'extrait au chlorure de méthylène sur le modèle d'HTA génétique (rat SHR)

Compte tenu des effets vasodilatateurs très importants de l'extrait au MC par rapport aux autres extraits, il nous a paru nécessaire d'étudier *in vivo*, l'impact d'un tel extrait chez les rats hypertendus. Nous avons choisi de travailler dans cette étude sur le modèle du rat SHR, modèle prédictif de l'HTA essentielle chez l'Homme, et caractérisé par le développement d'une HTA plus sévère que celle développée dans les modèles d'HTA induite par le glucose ou par l'éthanol. Chez les RSH et WKY anesthésiés, l'administration intraveineuse en dose cumulative de l'extrait au chlorure de méthylène de *T. superba* a induit une diminution immédiate et dose dépendante de la pression artérielle systolique et diastolique. Il est connu que l'installation de l'HTA chez le rat spontanément hypertendu résulte en partie d'une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium dans le muscle lisse vasculaire (Hsu et al., 1987 ; Kundu et Rao, 2008). En traitement subchronique, l'extrait a exercé des effets antihypertenseurs à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de traitement et, à la fin du traitement, la réduction de PA a atteint -23% par rapport aux SHR non traités, réduction importante qui témoigne d'une grande efficacité de l'extrait MC. L'existence d'un délai pour obtenir l'effet antihypertenseur suggère que l'effet ne met probablement pas en jeu un effet vasodilatateur direct dû à une modification rapide du métabolisme calcique dans les CMLV mais induirait plutôt des modifications physiopathologiques plus complexes, incluant une amélioration de la fonction endothéliale par exemple. Ceci est confirmé par nos études sur vaisseaux isolés rapportant une amélioration de la réponse à l'acétylcholine, alors que *in vitro* cet extrait avait un effet endothélium-indépendant. Afin d'évaluer si un effet diurétique pourrait contribuer à la baisse de pression artérielle, nous avons collecté les urines à l'issue du traitement. Nos résultats ont montré que l'extrait ne modifiait pas la diurèse, ni chez les SHR ni chez les WKY. Ces données devront néanmoins être complétées par le dosage de l'élimination urinaire du Na<sup>+</sup>, du K<sup>+</sup> et du Chlore.

Nos résultats obtenus sur vaisseaux isolés confirment l'existence d'une dysfonction endothéliale chez les rats SHR, comme l'atteste la différence de réaction à l'ACh observée entre SHR et WKY en accord avec de nombreuses études (Su et Miao, 2005 ; Zoccali, 2007 ; Hernández-Abreu et al., 2009). Le traitement par l'extrait a significativement amélioré la vasodilatation ACh-dépendante chez les rats SHR mais pas chez les rats WKY qui ne présentent pas de dysfonction endothéliale. Afin de préciser les mécanismes mis en jeu, les anneaux ont été incubés avec le L-

NAME, inhibiteur de NOS synthase. Chez les rats SHR, les résultats qui montrent un effet plus important du L-NAME chez les SHR traités que chez les non traités traduisent l'amélioration de la production de NO induite par le traitement. Afin de déterminer l'impact sur le stress oxydant vasculaire, les anneaux ont également été incubés avec le tempol, composé SOD-mimétique qui dismute les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène. En effet, de nombreuses études ont montré que les rats SHR présentaient une surproduction vasculaire d'anion superoxydes. Ces derniers sont produits majoritairement par le NADPH oxydase et la chaîne de respiration mitochondriale (Griendling et al., 2000 ; Ragheb et al., 2003). Chez les rats WKY, le tempol n'a pas modifié la vasorelaxation à l'ACh, témoignant de l'absence de stress oxydant pathologique. En revanche, le tempol a significativement augmenté la réponse vasodilatatrice de l'ACh chez les rats SHR, témoignant ainsi de l'effet délétère des anions superoxydes sur la fonction endothéliale. De façon surprenante, nos résultats obtenus chez les rats SHR traités par l'extrait montrent que le tempol n'améliore pas mais au contraire réduit l'effet vasodilatateur de l'ACh. Ce résultat suggère que le traitement a modifié la balance redox intravasculaire vers une production d'anions superoxydes bénéfiques et non délétère à la vasodilatation. En effet, il est désormais établi que les ROS sont d'importants médiateurs physiologiques de la signalisation intracellulaire (Droge, 2002). Outre les effets bénéfiques sur la fonction endothéliale, le traitement par l'extrait a également exercé des effets au niveau du muscle lisse vasculaire. En accord avec les données de la littérature (Nyborg et Bevan, 1988 ; Villalobos et al., 1999 ; Ortega Mateo et al., 2001 ; Kalea et al., 2010), nos résultats montrent que les rats SHR présentent une réponse excessive à la PE, réponse diminuée par le traitement par l'extrait. Ces résultats sont en accord avec nos données obtenues *in vitro* qui rapportent un effet inhibiteur de l'extrait MC sur les flux calciques intra- et extracellulaires induit par la PE. De plus, nos expériences conduites avec le nitroprussiate de sodium, un donneur de NO qui active directement la guanylate cyclase du muscle lisse vasculaire indique que le traitement par l'extrait améliore la sensibilité du muscle lisse au NO. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour évaluer si cet effet provient d'une augmentation d'expression/activité de la guanylate cyclase ou de phénomènes en aval de la production de GMPc. L'ensemble de ces résultats indique que l'extrait a exercé des effets vasculaires bénéfiques, à la fois endothélium-dépendants et endothélium-indépendants.

Pour mieux comprendre l'impact de l'extrait sur le stress oxydant, nous avons mesuré la teneur en 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  urinaire. Les F2 isoprostanes sont une famille d'eicosanoïdes produit par oxydation de l'acide arachidonique. Leur dosage dans l'urine et en particulier celui de la 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , est considéré comme un reflet de la peroxydation lipidique systémique (Morrow et al., 1994 ;Yoshida et al., 2009). Nos résultats ont montré que les rats SHR présentaient des taux très élevés de 8-iso-PGF<sub>2</sub> comparativement aux rats WKY, en accord avec des données de la littérature rapportant une peroxydation lipidique excessive chez les rats SHR (Yen et al., 2010). Le traitement par l'extrait a normalisé le taux de 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , indiquant le puissant effet antioxydant du traitement. Ces données sont en accord avec nos résultats obtenus dans le modèle glucose et éthanol qui montraient une réduction du taux de MDA tissulaire par l'extrait aqueux de *T. superba*. Il sera désormais intéressant d'identifier les principes actifs responsables des effets de la plante pour identifier le ou les composés responsables de cet effet antioxydant puissant.

Afin d'évaluer l'éventuelle toxicité du traitement par l'extrait MC, plusieurs paramètres ont été mesurés : poids des rats, poids relatif des organes, prise alimentaire et prise d'eau de boisson. Nos résultats ont montré qu'aucun de ces paramètres n'était modifié par l'extrait, ni chez le SHR ni chez les WKY. Nous avons ensuite recherché l'impact potentiel du traitement sur le métabolisme des xénobiotiques par les cytochromes P450 (CYP). En effet, il est désormais bien établi que le traitement par les plantes peut conduire à des inductions ou des inhibitions des CYP et être ainsi à l'origine d'interactions médicamenteuses graves (Brazier et Levine, 2003 ; Kelly et al., 2005 ; Pekthong et al., 2009). De nombreux agents thérapeutiques sont lipophiles et nécessitent une transformation métabolique avant d'être éliminés par l'organisme, grâce à leur transformation en métabolites hydrosolubles. Parmi les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, la famille des CYP possède une place importante. Dans notre étude, nous avons évalué l'activité du CYP 3A dans les microsomes hépatiques des rats SHR et WKY traités ou non par l'extrait. Nos résultats montrent que l'activité du CYP 3A n'est pas différente entre les WKY et les SHR non traités, en accord avec les résultats de Ghosh et al (1995). De façon importante, le traitement n'a pas modifié l'activité du CYP 3A, ni chez les WKY ni chez les SHR. Ces données sont rassurantes vis-à-vis du potentiel d'interactions médicamenteuses de *T. superba* avec les médicaments fortement métabolisés par le CYP 3A, soit plus de 50% des médicaments de médecine occidentale actuels (Michaud et al., 2006).

En conclusion, cette partie de notre travail montre que l'extrait au MC de *T. superba* possède un effet antihypertenseur sur le modèle d'HTA essentielle des rats SHR et ne provoquerait pas d'interaction médicamenteuse. En comparaison avec l'extrait aqueux, l'extrait MC de *T. superba* est plus efficace, car son administration intraveineuse provoque une hypotension dès la dose de 5 mg/kg, tandis que l'effet de l'extrait aqueux se manifeste à partir de la dose de 10 mg/kg. Quoique cette voie d'administration ne soit pas celle couramment utilisée chez le patient hypertendu, l'extrait MC se révélerait plus bénéfique dans la prise en charge clinique chez des patients en état de choc dans la mesure où les composés actifs contenus dans cet extrait pourraient être administrés en perfusion intraveineuse après des études plus poussées.

### **Etude toxicologique des extraits aqueux et au chlorure de méthylène de *T. superba***

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses publications ont décrit la grande importance que les produits naturels ont dans le développement de nouveaux produits pharmaceutiques ou produits phytopharmaceutiques (Gilani et Rahman, 2005; Patwardhan, 2005). Cependant, de nombreux travaux ont été publiés signalant de potentiels effets toxiques de ces produits (Pak et al., 2004 ; Marcus et Snodgrass, 2005). Nos travaux ainsi que les travaux d'autres équipes de recherche qui ont été menées sur *T. superba* indiquent que cette plante possède des propriétés pharmacologiques qui justifient son développement comme nouveau composé de phytothérapie. De ce fait il est nécessaire de caractériser son effet sur les systèmes biologiques, y compris ses effets toxicologiques. Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude toxicologique de l'extrait aqueux de *T. superba*, extrait utilisé en médecine traditionnelle, et à celui de l'extrait au chlorure de méthylène, extrait le plus efficace au niveau cardiovasculaire démontré *in vitro* et *in vivo*. L'étude de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux révèle que la DL<sub>50</sub> est supérieure à 5000 mg/kg. Selon Delongas et al. (1983), tout produit dont la DL<sub>50</sub> est supérieure à 5 g/kg est considéré comme non toxique. Ainsi, la marge de sécurité de l'extrait aqueux de *T. superba* est importante, compte tenu des doses utilisées en médecine traditionnelle qui sont largement inférieures à cette marge (100-200 mg/kg). L'extrait au chlorure de méthylène a fait l'objet d'une étude de toxicité aiguë avec une dose maximale de 2000 mg/kg, compte tenu de sa limite de solubilité. Les preuves expérimentales dans cette étude permettent de localiser la DL<sub>50</sub> de l'extrait au

chlorure de méthylène comme supérieure à 2000 mg/kg de poids corporel, ce qui correspond à la classe «Non classée » c'est-à dire non toxique (Monteagudo, 2006). L'observation macroscopique des poumons des souris femelles ayant reçu cet extrait indique l'existence de plaques rouges, qui semblent expliquer l'augmentation du poids relatif des poumons chez ces souris aux doses de 1000 et de 2000 mg/kg. Cette augmentation pourrait être liée à des oedèmes pulmonaires, car les oedèmes peuvent induire l'augmentation de la masse d'un organe (Costa-Silva, 2008). L'étude de la toxicité subchronique de l'extrait au chlorure de méthylène montre qu'il possède un effet bénéfique sur le profil lipidique se traduisant par une augmentation du cholestérol HDL et une diminution du cholestérol LDL aux doses de 300 et de 600 mg/kg. Ces données complètent les données obtenues sur le modèle d'HTA induite par l'éthanol. Ces effets sur le profil lipidique constitueraient ainsi un effet appréciable de l'administration subchronique, sur le risque athérogène. L'augmentation du taux de protéines hépatiques observé en traitement subchronique aux doses de 150 et de 600 mg/kg pourrait s'expliquer par les foyers inflammatoires observés sur les coupes histologiques. L'administration subchronique de l'extrait n'a pas entraîné de modification significative du taux de bilirubine et de créatinine, ce qui suggère entre autre que l'extrait ne modifie pas le métabolisme hépatique ni au moins en partie la fonction rénale. Il est intéressant de noter que les anomalies histologiques observées chez les souris traitées pendant 5 semaines ont été en majeure partie réversibles 2 semaines après arrêt du traitement.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

## Conclusion et perspectives

L'ensemble de ce travail a apporté de nombreux arguments pharmacologiques en faveur de l'utilisation de *Terminalia superba* comme traitement alternatif de l'hypertension artérielle (HTA).

Une partie de ce travail s'est consacrée à l'étude de l'extrait aqueux (AQU) de *T. superba*, afin de mimer au mieux les conditions d'utilisation de la plante en médecine traditionnelle. Nos résultats ont permis d'attester de l'efficacité anti-hypertensive de cet extrait, aussi bien en conditions préventives que curatives, sur 2 modèles mimant des HTA fréquentes dans la population africaine ; l'HTA secondaire à l'excès de glucose et l'HTA secondaire à l'excès d'alcool. Nos travaux ont également montré les bénéfices de l'extrait aqueux sur le stress oxydant et sur les paramètres lipidiques. Nos études conduites *in vitro* sur vaisseaux isolés ont permis de mettre en évidence un effet vasodilatateur direct de l'extrait, et endothélium-indépendant. Dans les deux études conduites *in vivo* avec l'extrait aqueux nous n'avons pas étudié l'impact sur la dysfonction endothéliale, facteur prédictif du risque cardiovasculaire en cas d'HTA. Ce point devra être étudié dans des études futures. Cependant, il est connu que la baisse de pression artérielle elle-même et la réduction du stress oxydatif permettent d'améliorer la fonction endothéliale. Enfin, l'étude de la toxicité aiguë de cet extrait est très rassurante avec une absence de mortalité jusqu'à la dose de 5g/kg. Cependant, il conviendra de compléter ces travaux par des études de toxicité plus poussées, et notamment à long terme, réalisées en accord avec les lignes directrices établies par l'OMS.

Une autre partie du travail a été consacrée à l'étude d'autres extraits de *T. superba*, dans le but de définir quel solvant permettait d'obtenir la meilleure activité et d'optimiser ainsi l'utilisation médicinale de *T. superba*. L'extrait chlorométhylénique s'est révélé le plus actif. Nos travaux ont démontré son efficacité anti-hypertensive en cas d'HTA essentielle (modèle SHR), son impact bénéfique sur le stress oxydant et sur la dysfonction endothéliale. Dans la mesure où des études préliminaires, non présentées dans ce manuscrit, ont rapporté un effet dépresseur cardiaque *in vitro* sur cœur isolé perfusé, l'étude plus complète des effets cardiaques de cet extrait permettra peut-être d'élargir les indications thérapeutiques de *T. superba*. Cependant, il est important de noter que cet extrait chlorométhylénique, plus actif, est

aussi probablement plus toxique, puisque des effets pulmonaires ont été remarqués pour la dose de 2 g/kg.

Néanmoins, si cet extrait ne peut être directement utilisable chez l'homme, nous pouvons le considérer comme une source potentielle de principe(s) actif(s) vasoactif(s), d'origine naturelle, valorisables chez l'homme. Le fractionnement de cet extrait a déjà permis d'identifier une fraction plus active, sur laquelle une étude phytochimique pourra être menée afin d'isoler et d'identifier les composés purs responsables de l'activité.

## **Recommandations**

*Terminalia superba* est une plante dont les propriétés vasorelaxantes et antihypertensives justifierait l'usage en médecine traditionnelle. Cependant, l'extrait aqueux utilisé usuellement en médecine traditionnelle s'est révélé moins efficace que les extraits obtenus avec des solvants d'extraction moins polaires. Ceci suggère que les composés peu polaires ou apolaires de *T. superba* auraient de meilleures activités sur la pression artérielle. Nous recommandons à cet effet l'usage d'un extrait alcoolique à partir du vin de palme, et des mesures régulières de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque au cours du traitement afin d'éviter des risques d'hypotension liés à la prise de l'extrait.

## REFERENCES

- Abdel-Rahman, A.R., Dar, M.S., Wooles, W.R. 1985. Effect of chronic ethanol administration on arterial baroreceptor function and pressor end depressor responsiveness in rats. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 232: 194-201.
- Adaramoye, O.A., Anjos, R.M., Almeida, M.M., Robson C. Veras, R.C., Silvia, D.F., Oliveira, F.A., Cavalcante, K.V., Araújo, I.G., Oliveira, A.P., Medeiros, A.A. 2009. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 124: 457-462.
- Adjanohoun, E.J., Ake Assi, E., Floret, T., Guinko, S., Koumare, M., Ahyi, A.M.R., Raynal, J., 1979. Médecine traditionnelle et Pharmacopée, contribution aux études ethnobotaniques et floristique du Mali, pp. 39–40.
- Adjanohoun, E.J., Ake Assi, E., Floret, T., Guinko, S., Koumare, M., Ahyi, A.M.R., Raynal, J., 1980. Médecine traditionnelle et Pharmacopée, contribution aux études ethnobotaniques et floristique du Mali, pp. 64–65.
- Adjanohoun, J.E., Aboukakar, N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekpere, J.A., Enow-Orock, E.G., Focho, D., Gbile, Z.O., Kamanyi, A., Kamsu, K.J., Keita, A., Mbenkum, T., Mbi, C.N., Mbiele, A.L., Mbome, I.L., Mubiru, N.K., Nancy, W.L., Nkongmeneck, B., Satabu, B., Sofowora, A., Tamze, V., Wirmum, C.K., 1996. Traditional medicine and pharmacopoeia. In: Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon. Centre de Production de Manuels Scolaires, Porto-Novo (Rep. Du Benin), p. 133.
- Aduragbenro, D.A.A., Yeside, O.O., Adeolu, A A., Olanrewaju, J.M., Ayotunde, S.A., Olumayokun, A.O., Makinde, J.M. 2009. Blood Pressure Lowering Effect of *Adenantha pavonina* Seed Extract on Normotensive Rats. *Records of Natural Products* 3: 82-89.
- Ahmad, M., Asmawi, M.Z. 1993. Some pharmacological effects of aqueous extract of *Andrographis paniculata* Nees. The International Conference on the Use of Traditional Medicine & Other Natural Products in Health-Care (Abstracts). P122.
- Akpanabiatu, M.I., Umoh, I.B., Udosen, E.O., Udoh, A.E., Edet E.E. 2005. Rat serum electrolytes, lipid profile and cardiovascular activity on *Nauclea Latifolia* leaf extract administration. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 20: 29-34.
- Albano, E., French, S., Ingelmen-Sundberg, M. 1999. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Frontiers in Bioscience* 4: 533–540.
- Anderson D.M. 2003. Moby's Medical, Nursing, and Allied Health Dictionary 6<sup>th</sup> edition. St Louis, MO: Mosby .pp 223-228.
- Andréjak, M., Ward, M., Schmitt, M. 1983. Cardiovascular effects of yohimbine in anesthetized dogs. *European Journal of Pharmacology* 94: 219-228.
- Asmar, R. 2007. Pression artérielle. Régulation et épidémiologie: Mesures et valeurs normales. *Néphrologie & Thérapeutique* 3:163-184.

- Atta-ur-Rahman, Seema, Z., Iqbal, C.M, Ngounou, F.N, Amsha, Y., Masood P. 2002. Terminalin A, a novel triterpenoid from *Terminalia glaucescens* *Tetrahedron Letters* 43: 6233–6236.
- Badyal, D.K., Lata, H., Dadhich A.P. 2003. Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian Journal of Pharmacology* 35: 349-362.
- Bakris, G.L., Mensah, G.A. 2003. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Current Problems in Cardiology* 28:137-155.
- Balde, M.D., Kaba, M.L., Diallo, M.M., Camara, A. 2006. Hypertension artérielle : Epidémiologie et anomalies métalogiques au Foutah-Djallon en Guinée. *Mali Médecine. Tropicale XXI N°3*.
- Balls, M. 1994. The three Rs: development in laboratory animal science. *Laboratory Animals* 28:193-231.
- Bangalore, S., Sawhney, S., Messerli, F.H. 2008. Relation of beta-blocker-induced heart rate lowering and cardioprotection in hypertension. *Journal of American College Cardiology* 52:1482–1489.
- Bartels, H., Bohmer, M., Heierli, C. 1972. Serum creatinine determination without protein precipitation. *Clinical Chemistry Acta* 37:193–197.
- Barton, M., Cosentino, F., Brandes, R.P., Moreau, P., Shaw, S., Luscher, T.F. 1997. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelial. *Hypertension* 30: 817–824.
- Baum, M., 1987. Insulin stimulates volumes absorption in rabbit proximal convoluted tubule. *Journal of hypertension* 10: 379-388.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of United States of America* 87: 1620-1624.
- Bianchetti, M.G, Beretta-Piccoli, C., Weidmann, P., Ferrier, C. 1986. Blood pressure control in normotensive members of hypertensive families. *Kidney International* 29:882-888.
- Bianchi, G., Baer, P.G., Fox, U., Dazzi, L., Pagetti, D., Giovannetti, H.M. 1975. Changes in renin, water balance and sodium balance in genetically hypertensive rats. *Circulation Research* 36:153-161.
- Bohr, D., Dominiczak, A.F. 1991. Experimental hypertension *Hypertension* 17:39-44.
- Cervenka, L., Horacek, V., Vaneckova, I. 2002 Essential Role of AT1A Receptor in the Development of 2K1C Hypertension. *Hypertension* 40:735-741.
- Boulimié, A., Bauersachs, J., Linz, W., Schölkens, B.A., Wiemer, G., Fleming, I., Busse, R. 1997. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 30: 934-941.

- Boura, A., Green A.F. 1964. Antihypertensive agents. In: Laurence DR, Bacharach AL, editors. Evaluation of drug activities-pharmacometrics. Vol 1. London : Acaademic Press pp 431-453.
- Bourdon, E., Blache, D. 2001. The Importance of Proteins in Defense Against Oxidation. *Antioxidants and Redox Signaling* 3: 293-311.
- Brazier, N.C., Levine, M.A.H. 2003. Drug–herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals. *American Journal of Therapeutics*. 10: 163–169.
- Brunner, H., Cockcroft, J. R., Deanfield, J., Donald, A., Ferrannini, E., Halcox, J. 2005. Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the working group on endothelins and endothelial factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension* 23: 233–246.
- Bunag, R.D., Butherfield, J., Sasaki, S. 1983. Hypothalamic essor responses in salt-induced hypertension in dahl rats. *Hypertension* 5: 460-467.
- Bunnag, P., Hori, T.M., Ormsby, B., Berger, M.E., Golub, S.M., Tuck, L.M., 1997. Impaired in vitro adrenergic responses in diet-induced hypertensive rats. *Hypertension Research* 20, 17–21.
- Cabell, K.S., Ma, L., Johnson, P. 1997. Effects of Antihypertensive Drugs on Rat Tissue Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation Levels. *Biochemical Pharmacology* 54: 133-141.
- Cai, H., Griending, K. K., Harrison, D. G. 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacological Science* 24: 471–478.
- Cai, H., Harrison, D. G. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research* 87: 840–844.
- Carey, P.A., Sheridan, D.J., de Cordoue, A., Guez, D. 1996. Effect of indapamide on left ventricular hypertrophy in hypertension: a meta-analysis. *American Journal of Cardiology* 77:17–19.
- Carroll, R. T., Galatsis, P., Borosky, S., Kopec, K. K., Kumar, V., Althaus, J. S. 2000. 4- Hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite mediated phenol nitration. *Chemical Research and Toxicology* 13: 294–300.
- Cervenka, L., Horacek, V., Vaneckova, I. 2002. Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension* 40:735-741.
- Chadwick C.C, Saito, A., Fleischer, S. 1990. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 87:2132-2136.
- Chan, T.C. 1982. The effects of chronic ethanol consumption on cardiac function in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 60: 777-782.

Chan, T.C., Wall, R.A., Sutter, M.C. 1985. Chronic ethanol consumption, stress and hypertension. *Hypertension* 7: 519-524.

Cheftel, J.C., Cheftel, H., Besançon, R. 1989. Aspect toxicologique : introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Edition.Lavoisier, Paris. pp 137-162.

Chiu, A.T., Bozarth, J.M., Timmermans, P.B. 1987. Relationship between phosphatidylinositol turnover and Ca<sup>++</sup> mobilization induced by alpha-1 adrenoceptor stimulation in the rat aorta. *Journal of Pharmacological Experimentative Therapy* 240:123-127

Cosenzi, A., Sacerdote, A., Seculin, P., Odoni, G., Plazzotta, N., Bernobich, E., Bellini, G., 1999. Lacidipine prevents the hypertension and renal and cardiac changes induced by high-fructose diet in WKY rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33, 485–491.

Costa-Silva , Lima, C.R., Silva, E.J.R., Araújo, A.V., Fraga, M.C.C.A., Ribeiro e Ribeiro, A., Arruda, A.C., Lafayette, S.S.L., Wanderley, A.G. 2008. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil J.H. *Journal of Ethnopharmacology* 116 :495–500

Cooper, R., Rotimic, Ataman, S. 1997. The prevalence of hypertension in seven populations of west African origin. *American Journal of Public health* 87:160-168

Cowley, A.W., Liard, J.F, Guyton, A.C. 1973. Role of the Baroreceptor Reflex in Daily Control of Arterial Blood Pressure and Other Variables in Dogs. *Circulation Research* 32:564-576.

Crankshaw, D. 1995. Effects of the isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, on the contractility of the human myometrium in vitro. *European Journal of Pharmacology* 285: 151–158.

Dahl, L.K. 1960. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. In : Pork KD, Cottier PT, editors. *Essential hypertension-an international symposium*. Berlin : Springer-verlag pp 53-65.

Dahl, L.K., Heine, M., Tassinari, L. 1962. Effects of chronic excess salt ingestion: evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *Journal of Experimental Medecine* 115:1173-1190.

De Cort, P., Phillips, H., Govaerts, F., Van Royen, P. 2004. Recommandations de Bonne Pratique : l'hypertension. Société Scientifique de Médecine Générale. 40 : 28-33

Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, J-P., Cros, G., Azay, J. 2005. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in amodel of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179: 43-49.

Delongas, J.L., Burnel, D., Netter, P., Grignon, M., Mur, J.M., Roger, R.J., Grignon, G. 1983. Toxicité et pharmacocinétique de l'oxychlorure de Zirconium chez la souris et le chat. *Journal of Pharmacology* 14 :437.

- Demougeot, C., Prigent-Tessier, A., Marie, C., Berthelot, A., 2005. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 23, 971–978.
- Deng, A.Y. 1998. Is the nitric oxide system involved in genetic hypertension in Dahl rats? *Kidney International* 53:1501-1511
- Deng-Bryant, Y., Singh, I. N., Carrico, K. M., & Hall, E. D. 2008. Neuroprotective effects of tempol, a catalytic scavenger of peroxynitrite-derived free radicals, in a mouse traumatic brain injury model. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 28:1114–1126
- Diezi J. 1992. Principes de base et répercussions cliniques. Dans Pharmacologie : Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Schorderet M. Editions Frison-Roche, Paris. 2<sup>ème</sup> édition Genève. pp 33-35.
- Di Stasi, L.C., Santos, E.M.G., Santos, C.M., Hiruma, C.A. 1989. Plantas Medicinais da Amazõnia, Ed. UNESP, São Paulo, p.194.
- Dimo, T., Laurent, F., Rakotonirina, S.V., Tan, P.V., Kamtchouing, P., Dongo, E., Cros, G., 2006. Methanol extract of *Terminalia superba* induced endothelium independent relaxation of rat thoracic aorta. *Die Pharmazie* 5 : 470–473.
- Dimo, T., Nguelefack, T.B., Tan, P.V., Yewah, M.P., Dongo, E., Rakotonirina, S.V., Kamanyi, A., Bopelet, M. 2003. Possible mechanisms of action of the neutral extract from *Bidens pilosa* L. Leaves on the Cardiovascular System of anaesthetized rats. *Phytotherapy Research* 17: 1135-1139.
- Dimo, T., Rakotonirina, S., Kamgang, K., Paul V. Tan, P.V., Albert Kamanyi, A., Bopelet, M. 1998. Effects of leaf aqueous extract of *Bidens pilosa* (Asteraceae) on KCl- and norepinephrine-induced contractions of rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 60:179-182.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review* 82: 47-95.
- Dubick, M.A., Zaucha, G.M., Korte, D.W., Wade, C., Wade, J.R. 1993. Acute and subacute toxicity of 7,5% hypertonic saline 6% dextran-70 (HSD) in dogs, biochemical and behavioural responses. *Journal of Applied Toxicology* 13: 49-55.
- El Midaoui, A., de Champlain, J. 2002. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by  $\alpha$ -Lipoic acid. *Hypertension* 39: 303-307.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
- Elsik, M., Krum, H. 2007. Hypertension: How long to go? *Australian Prescriber*, 30: 6.
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspectives* 109: 69-75.
- Faraci, F.M., Didion, S.P., 2004. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 24: 1367-1373.

Farombi, E.O., Ogundipe, O., Moody, J.O 2001. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Mallotus oppositifolium* in model systems. *African Journal of Medicine and Science* 30:213 – 215.

Favier, A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et experimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.

Feletou, M., Vanhoutte, P. M. 2006a. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 26: 1215–1225.

Feletou, M., Vanhoutte, P. M. 2006b. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *American Journal of Physiology and Heart Circulatory Physiology* 291: 985–1002.

Fermor, B., Weinberg, J.B., Pisetsky, D.S., Misukonis, M.A., Banes, A.J., Guilak, F. 2001. The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants. *Journal of Orthopaedic Research*.19:729–737

Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonnadonna, R., Giorico, M.A., Oleggini, M., Graziadei, L., Pedrinelli, R., Brandi, L., Bevilacqua, S. 1987. Insulin resistance in essential hypertension. *National England Journal of Medicine* 317: 350 –357.

Fourcade, L., Paule, P., Mafart, B., 2007. Arterial hypertension in sub-Saharan Africa. nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106: 913-919

Fugh-Berman, A., 2000. Herb–drug interactions. *Lancet* 355 : 134–138.

Fukunaga, M., Yura, T., and Badr, K. F. 1995. Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2 alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 26: S51–S52

Furchgott, R.F., Vanhoutte, P.M., 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal* 3: 2007–2018.

Gauthaman, K., Maulik, M., Kumari, R., Manchanda, S.C., Dinda, A.K., Maulik, S.K., 2001. Effect of chronic treatment with bark of *Terminalia Arjuna*: a study on the isolated ischemic-reperfused rat heart. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 197–201.

Gerbal-Chaloin, S. 2000. Régulation de l'expression des cytochromes P450 de la sous-famille 2C dans des cultures primaires d'hépatocytes humains: implication des récepteurs nucléaires GR et CAR. Thèse Médecine: Université de Montpellier 1.

Ghosh, S.S., Basu, A.K., Ghosh, S., Hagley, R., Lora Kramer, L., John Schuetz, J., W. McLean Grogan, W.M., Guzellan, P., and Watlington, C. 1995. Renal and Hepatic Family 3A Cytochrome P 450 (CYP 3A) in spontaneously hypertensive rats. *Biochemical Pharmacology*. 50: 49-54.

Gilani, A.H., Rahman, A.U., 2005. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100 : 43–49.

- Goldblatt, H. 1960. Direct determination of systemic blood pressure and production of hypertension in rabbit. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 105: 213-216.
- Gorbea-Oppliger, C., Kanagy, N.L., Fink, G.D. 1992. Losartan (DuP753) reverses angiotensin-induced hypertension in conscious rats. *The FASEB Journal* 6:1810.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. 1949. Mise au point d'une méthode quantitative pour doser les protéines avec le biuret. *Journal of Biological Chemistry* 177: 751.
- Goyal D., MacFadyen, R.J. 2006. Perception of symptoms in hypertensive patients and the relevance to the application of anti-hypertensive drug therapy. *Current Pharmaceutical Design* 12:1557–1565.
- Grebla, R.C., Rodriguez, C.J., Borrell, L.N. 2010. Prevalence and determinants of isolated systolic hypertension among young adults: the 1999-2004 US National Health And Nutrition Examination Survey. *Journal of Hypertension* 28:15-23.
- Groulez, J., Wood, P.J. 1984. *Terminalia superba*. A monograph. Centre Technique Forestier Tropical, France and Commonwealth Forestry Institute, England.
- Griendling, K. K.; Sorescu, D.; Ushio-Fukai, M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*. 86:494–501.
- Gryglewski, R.J., Palmer, R.M.J., Moncada, S., 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454–456.
- Guengerich, F.P., Hosea, N.A., Johnson, W.W., Gillam, E.M.J., Shimada, T. 1998. Catalytic properties of cytochrome P450 3A enzymes. In: *Microsomes and Drug Oxidations*. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Symposium, in press.
- Guengerich P.F. 1995. Human cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450/Structure, mechanism and biochemistry*. O.d. Montello. New-York: Plenum Press. pp. 537-574.
- Guerrero, M.F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M.L., San Roman, L., 2004. Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus*. *Journal of Ethnopharmacology* 94:185–189.
- Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y. 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology* 32: 661-667.
- Hakim, Z.S., Goyal, R.K. 2000. Comparative evaluation of different rat models with coexisting diabetes mellitus and hypertension. *Indian Journal of Physiological Pharmacology* 44:125-135.
- Halcox, J. P., Schenke, W. H., Zalos, G., Mincemoyer, R., Prasad, A., Waclawiw, M.A. 2002. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 106: 653–658.

Hall, J.E. 2003. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 41:625-33.

Hall, J.E., Coleman, T.G., Guyton, A.C. 1989. The renin-angiotensin system. Normal physiology and changes in older hypertensives. *Journal of the American Geriatrics Society* 37:801-813.

Halliwell, B. 1996. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society Transactions* 24: 1023–1027.

Halliwell, B. 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Letters* 411: 157–160.

HAS 2005. Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle essentielle actualisation.

Hellstrom, J. K., Shikov, A.N., Makarova, M.N., Pihlanto, A.M., Pozharitskaya, O.N., Ryhänen, E-L., Kivijärvi, P., Makarov, V.G., Pirjo Mattila, H. 2010. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var. Viking). *Journal of Functional Food* 2: 163-169.

Hernández-Abreu. O., Castillo-España, P., León-Rivera, I., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., González-Christen, J., Vergara-Galicia, J., Estrada-Soto, S. 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology* 78: 54–61.

Higashi, Y., Chayama, K., 2002. Renal endothelial dysfunction and hypertension. *Journal of Diabetes Complications* 16 : 103–107.

Hirst, G.D., Edwards, F.R.1989. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiological review* 69:546-604.

Houghton, P.J, Howes, M.J., Lee, C.C., Steventon, G. 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology* 110:391-400.

Husain, K., Mejia, J.,Lalla, J., Kazim, S. 2004. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharmacological Research* 21: 337: 343.

Hsu, C.H., Yang, C.S., Patel, S.R., Stevens, M.G. 1987. Calcium and vitamin D metabolism in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology* 253: 712- 723

Hutchings, A., Scott, A.H., Lewis, G., Cunningham, A. 1996. Zulu Medicinal Plants, An Inventory. University of Natal Press, Pietermarizburg, South Africa.

Hwang, I.S., Ho, H., Hoffman, B.B., Reaven, G.M. 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10 : 512-516.

Ikebe, M., Hartshorne, D.J. 1985. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *Journal of Biological Chemistry* 260:10027-10031.

- Ikebe, M., Hartshorne, D.J., Elzinga, M. 1987. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase : Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 262:9569-73.
- Iqbal, M.C., Tillequin, F., Wandji, J., Fomum, Z.T., 2007.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochemistry* 68: 2096–2100.
- Jiofack, T., I. Ayissi, I., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V. 2009. Ethnobotany and phytomedicine of the upper Nyong valley forest in Cameroon. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3: 144-150
- Jollow, D., Mitchell, L., Zampaglione, N., Gillete, J. 1974. Bromobenze induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3, 4- bromebenzenoxide as the hepatotoxic intermediate. *Pharmacology* 11: 151- 169
- Jourdan, K. B., Evans, T. W., Curzen, N. P., and Mitchell, J. A. 1997. Evidence for a dilator function of 8-iso prostaglandin F2 alpha in rat pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology* 120: 1280–1285.
- Juan, C.C., Fang, V.S., Hsu, Y.P., Huang, Y.P., Hsia, D.B., Kwok, C.F., Ho, L.T. 1998. Over expression of vascular endothelin-1 and endothelin-A receptors in a fructose-induced hypertensive rat model. *Journal of hypertension*. 16: 1775-1782.
- Kalea, A.Z., Clark, K., Schuschke, D.A., Kristo, A.S., Klimis-Zacas, D.J. 2010. Dietary enrichment with wild blueberries (*Vaccinium angustifolium*) affects the vascular reactivity in the aorta of young spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21:14-22.
- Kamata, K., Yamashita, K. 1999. Insulin resistance and impaired endothelium-dependent renal vasodilation in fructose-fed hypertensive rats. *Research in Communal Molecular Pathology and Pharmacology*. 103: 195-210.
- Kamtchouing, P., Mariam, S.K., Dzeufiet, D, P-D., Tédong, L., Asongalem, E.A., Dimo, T. 2005. Anti-diabetic activity of methanol/methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 104:306-309.
- Kandil, F..E, Nassar, M.I. 1998. A tannin anti-cancer promoter from *Terminalia arjuna*. *Phytochemistry* 47:1567–1568.
- Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, G.N., Kamoun, A., El-Fazaa, S. 2006. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol & Alcoholism*, 41: 236–239.
- Karen, S., Lin Ma C., Johnson P. 1997. Effects of Antihypertensive Drugs on Rat Tissue Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation Levels. *Biochemical Pharmacology* 54 : 133-141.

- Kaufman LN, Peterson MM, Smith SM. 1991. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *American Journal of Physiology* 260: 95-100.
- Kawikova, I., Barnes, P. J., Takahashi, T., Tadjkarimi, S., Yacoub, M. H., and Belvisi, M. G. 1996 8-Epi-PGF2 alpha, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 153, 590–596.
- Kawohl, W., Habermeyer, E. 2005. Plant poisonings - a problem extending the scope of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100:138-139.
- Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365: 217–22.
- Kelly, J.P., Kaufman, D.W., Kelley, K., Rosenberg, L., Anderson, T.E., Mitchell, A.A. 2005. Recent trends in use of herbal and other natural products. *Archives of Internal Medicine* 165: 281–286.
- Kim H-S. 2005. Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 100:37-39.
- Komoroski, B.J., Zhang, S., Cai, H., Hutzler, J.M., Frye, R., Tracy, T.S., Strom, S.C., Lehmann, T., Ang, C.Y., Cui, Y.Y., Venkataramanan, R. 2004. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures, *Drug Metabolism. Diapositive* 32 : 512–518.
- Kromer, B. M., and Tippins, J. R. 1996. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *British Journal of Pharmacology* 119: 1276–1280.
- Kundu, S., Rao, J.P. 2008. The story of spontaneously hypertensive rat (SHR): A Review *Al Ameen Journal of Medicine and Science* 1:65-66
- Kurtz, T.W., Castro, R., Simonet, L., Printz, M.P. 1990. Biometric genetic analysis of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 16:718-724.
- Lahlou, S., Tangi, K.C., Lyoussi, B., Morel, N., 2008. Vascular effects of *Tanacetum vulgare* L. leaf extract: *In vitro* pharmacological study. *Journal of Ethnopharmacology* 120: 98–102
- Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. 2004. Endothelial Function A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation* 109: 27-33.
- Latha, R.M., Geentha, T., Varalakshmi, P., 1998. Effect of *Vernonia cinerea* Less. flower extract in adjuvant-induced arthritis. *General Pharmacology* 31 : 601–606.
- Leonardo, B.M.R, Tirapelli, C.R., Lanchote, V.L., Uyemura, S.A., de Oliveira, A.M., Corre, F.M.A. 2006. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. *Life Sciences* 78 : 2179–2187.
- Lerman, L.O., Chade, A.R., Sica, V., Napoli, C. 2005. Animal models of hypertension: An overview. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 146:160-173

- Levesque E. 2006. Les superoxydes dismutases (SOD's). Actualiés Image 2.
- Li H., Wallerath, T., Münzel, T., Ulrich Förstermann U. 2002. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and response to drugs. *Nitric Oxide Biology and Chemistry* 7: 149-164.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A. 2003. Robinson, J. P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry* 278: 8516–8525.
- Loichot, C., Grima, M. 2004. Cours « Métabolisme des médicaments » Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale DCEM1 2005/2006
- Lüscher, T.F.1994. The endothelium in hypertension: bystander, target, or mediator? *Journal of Hypertension* 12: 105–116.
- Luther, T. 1985. Alcohol-induced hypertension : mechanisms, complications and clinical implications. *Journal of the National Medical Association* 77 : 385-389.
- Mandela, P., Chandley, M., Xu, Y-Y., Zhu, M-Y., Ordway, G.A. 2010. Reserpine-induced reduction in norepinephrine transporter function requires catecholamine storage vesicles. *Neurochemistry International* 56: 760-767.
- Manli, X., Lingbo, Q., Xinmei, Z., Qin, G., Iain, C.B., Qiang, X. 2008. Endothelium-independent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of *Morus alba* (L.). *Journal of Ethnopharmacology* 120:442–446.
- Mantena, S.K., King, A.L., Andringa, K.K., Landar, A., Darley-Usmar, V., Bailey, S.M. 2007. Novel interactions of mitochondria and reactive oxygen/nitrogen species in alcohol mediated liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 13: 4967-4973
- Marcus, D.M., Snodgrass, W.R. 2005. Do no harm: avoidance of herbal medicines during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 105: 1119–1122.
- McDonald, T.F., Pelzer, S., Trautwein, W., Pelzer, D.J. 1994. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiological Review* 74:365-507
- Maulik, G., Maulik, N., Bhandari, V., 1997. Evaluation of antioxidant effectiveness of a few herbal plants. *Free Radical Research* 27: 221–228.
- McFadzean, I., Gibson, A., 2002. The developing relationship between receptor operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 135 : 1–13.
- McGaw, L.J., Rabe, T., Sparg, S.G., Jäger, A.K., Eloff, J.N., Van Staden, J. 2001. An investigation of the biological activity of Combretum species. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 45–50.

- McGuire, J.J., Ding, H., Triggle, C.R., 2001. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 79: 443–470.
- McLean, A.J., Morgan, D.J., 1991. Clinical pharmacokinetics in patients with liver disease. *Clinical Pharmacokinetic* 21: 42-69.
- Means, A.R., VanBerkum, M.F., Bagchi, I., Lu, K.P., Rasmussen, C.D. 1991 Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacology Therapy* 50:255-270.
- Michaud, V., Hreiche, R., Turgeon, J. 2006. Les cytochromes P450 et la gestion des interactions médicamenteuses dans la pratique quotidienne. L'actualité pharmaceutique septembre 2006. [www.monportailpharmacie.ca](http://www.monportailpharmacie.ca).
- Misra, Fridovich. 1972 Determination of the level of superoxide dismutase in whole blood. *Yale University.Press New Haven*, 101-109.
- Modena, M. G., Bonetti, L., Coppi, F., Bursi, F., Rossi, R. 2002. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *Journal of American College of Cardiology* 40: 505–510.
- Momo, C.E.N., Ngwa, A.F., Dongmo G.I.F., Oben, T.E. 2009. Antioxidant properties and  $\alpha$ -amylase inhibition of *Terminalia superba*, *Albizia sp.*, *Cola nitida*, *Cola odorata* and *Harungana madagascarensis* used in the management of diabetes in Cameroon. *Journal of Health Science* 55: 732-738.
- Monopoli, A., Ongini, E. 1994. Effects of antihypertensive drugs on cardiac hypertrophy. *Pharmacological Research* 29:197–215.
- Monteagudo, E., Cepero, V., Cordovés, D., Verdecía, B., Blanco, F., Díaz, L., Mollineda, A. 2006. Pharmacotoxicological studies of *Gracylaria cylindrica* Algae. *Pharmacologyonline* 3: 644-649.
- Morrow, J. D., Minton, T. A., Mukundan, C. R., Campbell, M. D., Zackert, W. E., Daniel, V. C., Badr, K., Blair, I. A., and Roberts, L. J. 1994. *Journal of Biology and Chemistry* 269: 4317–4326.
- Mulvany, M. J., Baumbach, G. L., Aalkjaer, C., Heagerty, A. M., Korsgaard, N., Schiffrin, E. L. 1996. Vascular remodeling. *Hypertension* 28 : 505–506.
- Mustofa, M.V., Benoît-Vical, F., Péliissier, Y., Koné-Bamba, D., Mallié, M. 2000. Antiplasmodial activity of plants extracts used in west african traditional medicine. *Journal of. Ethnopharmacology.* 73: 145-151.
- Naseem, K.M. 2005. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 26:33-65.
- Nayeemunisa, Kumuda, M.R., 2003. Cardioprotective effects of *Cichorium intybus* in ageing myocardium of albino rats. *Current Science* 84: 94-943.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J. 1991. The P450 superfamily:

- update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature DNA. *Cellular Biology* 10: 397–398.
- Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology* 268:C799–C822.
- Niki, E. 2009. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects *Free Radical Biology & Medicine* 47: 469–484.
- Nyborg, N.C., Bevan, J.A. 1988. Increased alpha-adrenergic receptor affinity in resistance vessels from hypertensive rats. *Hypertension* 11: 635–638.
- OECD. 2001. Test Guideline 414. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Prenatal developmental toxicity study.
- Ohtani, H., Gotoh, N., Tanaka, J., Higa, T., Gyamfi, M.A., Aniya, Y. 2000. Thonningianins A and B a new antioxidants from the African medicinal herb *Thonningia sanguinea*. *Journal of Natural Products* 63:676-679.
- Okamoto, K., Aoki, K. 1973. Establishment of stroke prone spontaneously hypertensive rats (SHR). *Circulation Research* 34:143-153.
- Oparil, S., Zaman, M.A., Calhoun, D.A. 2003. Pathogenesis of Hypertension. *Annals of Internationnal Medecine* 139:761-76.
- Ortega Mateo, A., Amaya, M., Aleixandre de Artiñano. 2001. Effect of high extracellular Ca<sup>2+</sup> levels in spontaneously hypertensive rat aorta. *European Journal of Pharmacology* 432:177-185.
- OMS. 1993. Research guidelines for the evaluation of the safety and efficacy of herbal , Manille, Bureau régional de l’OMS pour le Pacifique occidental.
- OMS. 2000 : Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l’évaluation relatives à la médecine traditionnelle
- OMS. 2002. Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002–2005.
- OMS. 2003. Stratégie de coopération de l’OMS avec les pays - Cameroun 2003-2007.
- OMS 2008. Stratégie mondiale de lutte contre les maladies non transmissibles 2008-2013.
- Pak, E., Esrason, K.T., Wu, V.H., 2004. Hepatotoxicity of herbal remedies: an emerging dilemma. *Progress in Transplantation* 14: 91–96.
- Panchenko, L.F., Pirozhkov, S.V., Popova, S.V. 1987. Effect of chronic ethanol treatment on peroxidation acyl-CoA oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart. *Experientia* 43: 580–581.

- Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E.J., Epstein, S.E. 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *Natural England Journal of Medecine* 323: 22-7.
- Patwardhan, B. 2005. Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology* 100 : 50–52.
- Paul, M., Jurgen, W. 1994. Transgenic rats: new experimental model for the study of candidate genes in hypertension research. *Annual Review of physiology* 56:811-829.
- Pauwels, L .1993. Trees and shrubs guide of the Kinshasa-Brazzaville region, Belgium National Botanical Garden European community commission. ISBN. 495.
- Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A.J., Bullock, P.L., Cook, D.C., Burton, A.L., Jason Latham, J., Nevins, C., Parkinson, A. 1996. Effects of Freezing, Thawing, and Storing Human Liver Microsomes on Cytochrome P450 Activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 331:145–169.
- Pelletier, A. 1998. «Origine, métabolisme et effets des nucléotides et nucléosides extracellulaires sur le système circulatoire du cobaye ». mémoire de maîtrise. Faculté Des Sciences De L'Université De Sherbrooke (Canada) 81 : 1-12.
- Pekthong, D., Blanchard, N., Abadie, C., Bonet, A., Heyd, B., Manton, G., Berthelot, A., Richert, L., Martin, H. 2009. Effects of *Andrographis paniculata* extract and Andrographolide on hepatic cytochrome P450 mRNA expression and monooxygenase activities after in vivo administration to rats and in vitro in rat and human hepatocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* 179: 247–255.
- Phillipson, J.D. 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* 68:2960-2972.
- Pinto, Y.M., Paul, M., Ganten, D. 1998. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research* 39:77-88
- Powers, D.R., Li, H., Giles, T.D., Greeberg, S.S. 1996. Decreases kidney amino acid levels after acute alcohol ingestion in the rat. *Journal of American Society of Nephrology* 7 : 130A.
- Pratico, D., Smyth, E. M., Violi, F., and Fitzgerald, G. A. 1996. Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *Journal of Biology and Chemistry* 271:14916–14924
- Prisant, L.M. 2008. Management of hypertension in patients with cardiac disease: use of renin–angiotensin blocking agents. *American Journal of Medecine* 121:S8–S15.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griendling, K. K. 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *Journal of Clinical Investment* 97: 1916–1923.

- Rathod, S.P., Shah, N., Balaraman, R. 1997. Antihypertensive effect of dietary calcium and diltiazem, a calcium channel blocker on experimentally induced hypertensive rats. *Indian Journal of Pharmacology* 29: 99-104.
- Reaven, G.M., Ho, H., 1991. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *American journal of Hypertension* 4: 610-614.
- Rees, D.D., Palmer, R.M.J., Moncada, S. 1989. Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Regulation of Blood Pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:3375-3378.
- Reitman, S., Frankel, S. 1957. A colorimetric determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *American Journal of Clinical Pathology* 28: 56-63.
- Rendic, S., Di Carlo, F.J. 1997. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metabolism Review* 29: 413-580.
- Resstel, L.B.M., Tirapelli, C.R., Lanchote, V.L., Uyemura, S.A., de Oliveira, A.M., Corre. F.M.A. 2006. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. *Life Sciences* 78 : 2179-2187.
- Ribière, C., Hininger, I., Rouach, H. 1992. Effects of chronic ethanol administration on free radical defence in rat myocardium. *Biochemical Pharmacology* 44: 1495-1500.
- Richert, L., D. Binda, D., Hamilton, G., Viollon-Abadiea, C., Alexandre, E., Bigot-Lasserred, D., Barsd, R., Coassoloe, P., LeCluyse E. 2002. Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 16: 89–99.
- Rico, I., Alonso, M.J., Salaices, M., Marin, J., 1990. Pharmacological dissection of Ca<sup>2+</sup> channels in the rat aorta by Ca<sup>2+</sup> entry modulators. *Pharmacology* 40 : 330–342.
- Romero-Isart N, Vasak M. advances in the structure and chemistry of methallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002; 88: 388-396
- Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., Guichard, C., Bachlet, J.P. 2007. Relationship between Oxidative Stress and Essential Hypertension. *Hypertension Research* 30: 1159-1167.
- Sabu, M.C., Kuttan, R. 2002. Antidiabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of. Ethnopharmacology* 81: 155-160
- Salvador, M., Amar, J. 1995. Que penser de l'hypertension diastolique? *Annale de cardiologie et d'Angiologie* 44 : 543-546.
- Savineau, J.P. 2008. La régulation de la pression artérielle. Diapositive 17.

- Schachinger, V., Britten, M. B., Zeiher, A. M. 2000. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101: 1899–1906.
- Schmitt, C.A., Dirsch, V.M. 2009. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide* 21: 77–91
- Schnackenberg, C.G., Wilcox, C.S. 2001. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney International* 59: 1859–1864.
- Schobel, H.P., Langenfeld, M., Gatzka, C., Schmieder, R.E. 1996. Treatment and post-treatment effects of [alpha]- versus [beta]-receptor blockers on left ventricular structure and function in essential hypertension. *American Heart Journal* 132:1004–1009.
- Schorderet, M. 1998. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Editions Frison – Roche. (Paris) et Slatkine (Genève). 3ème édition pp 569 -589.
- Schuhmann, K., Groschner, K. 1994. Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Letters* 341:208-212.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P. 2003. Anatomy & Physiology. McGraw-Hill Boston, pp 123-150
- Simon-Lestang, A.-C. 2003. Le pamplemousse: *Citrus paradisi* – Interaction avec les médicaments. Thèse de Pharmacie.: Université de Franche-Comté.
- Shin, I.W., Sohn, J.T., Kim, H.J., Kim, C., Lee, H.K., Chang, K.C., Chung, Y.K., 2005. Etomidate attenuates phenylephrine-induced contraction in isolated rat aorta. *Canadian Journal of Anaesthesia* 52 : 927–934.
- Simonsen, U., Christensen, F. H., Buus, N. H. 2009. The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. *Pharmacology Therapy* 122: 109–124.
- Stein, H.J., Esplugues, J., Whittle, B.J.R. 1989. Direct cytotoxic effect of oxygen free radicals on the gastric mucosa. *Surgery* 106: 318-24.
- Stevens, A., Lowe, J. 1997. Histologie humaine. Paris, DeBoeck Université, pp 50-101.
- Strigrow, F., Bohnensack, R., 1993. Verapamil and diltiazem inhibit receptoroperated calcium channels and intracellular calcium oscillations in rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 222: 229–234.
- Su, D.F., Miao, C.Y., 2005. Reduction of blood pressure variability: a new strategy for the treatment of hypertension. Trends. *Pharmacological Science* 26:388–390.
- Sun, L., Zheng, Z. 2007. Effect of *Salvia Miltiorrhiza* Bge on Left Ventricular Hypertrophy and the Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Spontaneously

Hypertensive Rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 27: 245-247.

Suwaidi, J. A., Hamasaki, S., Higano, S. T., Nishimura, R. A., Holmes, D. R., Jr., Lerman, A. 2000. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101: 948–954.

Tabopda, T.K., Ngoupayo, J., Khan Tanoli, S.A., Mitaine-Offer, A.C., Ngadjui, B.T., Ali, M.S., Luu, B., Lacaille-Dubois, M.A. 2009. Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. *Planta Medica* 75: 522–527.

Tabopda, T.K., Ngoupayo, J., Liu, J., Ali, M.S., Khan, S.N., Ngadjui, B.T., Luu, B. 2008.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors ellagic acid derivatives with immunoinhibitory properties from *Terminalia superba*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 56: 847–850.

Takahashi, K., Nammour, T. M., Fukunaga, M., Ebert, J., Morrow, J. D., Roberts, L. J., 2nd, Hoover, R. L., and Badr, K. F. 1992. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *Journal of Clinical Investigation* 90:136–141.

Takahashi, N., Smithies, O. 2004. Human genetics, animal models and computer simulations for studying hypertension. *Trends Genetics* 20:136–145.

Tawada, Y., Furukawa, K., Shigekawa, M. 1987. ATP-induced calcium transient in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 102:1499-1509.

Thorneloe, K.S., Nelson, M.T., 2005. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 83: 215–242.

Thresher, J.S., Podolin, D.A., Wei, Y., Mazzeo, R.S., Pagliassotti, M.J. 2000. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *American Journal of Physiology Regretive Integrative and Complementary Physiology* 279: 1334-1340.

Thummel, K.E., Kunze, K.L., Shen, D.D., 1997. Enzyme-catalysed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Advanced Drug Delivered Review* 27: 99-127.

Tohme, R.A., Jurjus, A., Estephan, A.R. 2005. The prevalence of hypertension and its association with other cardiovascular disease risk factors in a representative sample of the Lebanese population. *Journal of Human Hypertension* 19:861–868.

Tomiya, H., Kimura, Y., Okazaki, R., Kushiro, T., Abe, M., Kuwabara, Y., Yoshida, H., Kuwata, S., Kinouchi, T., Doba, N. 2000. Close Relationship of abnormal glucose tolerance with endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension* 36: 245-249.

Török, J., 2000. Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Physiological Research* 49:107–114.

- Tortora, G.J., Grabowski, S.R. 1994. Principes d'anatomie et de physiologie. 2<sup>e</sup> édition française De Boeck University, pp 630-663.
- Toure, S., Balde, M.D., Fofana, M. 1993. Les complications de l'hypertension artérielle chez 392 Noirs Africains. *Cardiologie Tropicale* 19: 91-95.
- Tsien, R.W., Ellinor, P.T., Horne, W.A. 1991. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacological Sciences* 12:349-354.
- USDA. 2005. Natural resources conservation service. Plants classification. T.S Engler et Diels. [http:// plants.usda.gov/classification.html/](http://plants.usda.gov/classification.html/)
- Van Epps, H.L. 2005. Harry Goldblatt and the discovery of renin. *Journal of Experimental Medecine* 201:1351-1357
- Van Vliet, B.N., Chafe, L.L., Vladan, L.A., Schnyder-Candrian, S., Montani, J-P. 2000. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. *Journal of Pharmacology and Toxicology Method* 44: 361-373.
- Van Wyk, B.E., Van Oudtshoorn, B., Gericke, N. 1997. Medicinal plants of South Africa. Briza Publications, Pretoria, South Africa Update and perspectives. *Médecine Tropicale* 67 : 559–567.
- Vanhoutte, P.M., Boulanger, C.M. 1995. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertension Research in Clinical Experiments* 18:87
- Vasdez S, Ford CA, Parai S, Longerich L, Gadag V. 2000. Dietary lipoic acid supplementation prevents fructose-induced hypertension in rats. *Nutrition and Metabolism in Cardiovascular Diseases* 10: 339-346.
- Verma, S., Buchanan, M.R., Anderson, T.J. 2003. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation* 108: 2054-2059.
- Verma, S., Wang, C.H., Li, S.H. 2002. A selffulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates
- Waller DP. 1993. Methods in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 38:189-195.
- Villalobos-Molina, R., Lopez-Guerrero, J.J., Ibarra, M. 1999. Functional evidence of [alpha]1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* 126:1534–1536.
- Vincent, M., Bornet, H., Berthezene, F., Dupont, J., Sassard, J. 1980. Thyroid function and blood pressure in two new strains of spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clinical Science of Molecular Medecine* 54:391-395.
- Vora, C.K., Mansoor, G.A. 2005. Herbs and alternative therapies: relevance to hypertension and cardiovascular diseases. *Current Hypertension Reports* 7 : 275- 80

Walinjorn, F.T.M. 1999. Hypertension : un fléau pour le 21ème siècle en afrique Sub-saharienne? - Quelles sont les actions nécessaires? *Médecine d'Afrique Noire* 46 :12

Wang, D., Chabrashvili, T., Wilcox, C. S. 2004. Enhanced contractility of renal afferent arterioles from angiotensin-infused rabbits: roles of oxidative stress, thromboxane-prostanoid receptors and endothelium. *Circulation Research* 94: 1436–1442.

Wang, D., Chen, Y., Chabrashvili, T., Aslam, S., Borrego, L., Umans, J. 2003. Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to Ang II of afferent arterioles from rabbits infused with Ang II. *Journal of American Society of Nephrology* 14: 2783–2789

Wansi, J.D., Lallemand, M.-C., Chiozem, D.D., Toze, F.A.A., Mbaze, L.M., Naharkhan, S., Iqbal, M.C., Tillequin, F., Wandji, J., Fomum, Z.T., 2007. Alpha-Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochemistry* 68: 2096–2100.

Webb, R.C. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advanced Physiology Educative* 27:201-206.

Welch.J.W., Wilcox, C.S. 2001.AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney International*. 59: 1257–1263.

Wilbur, K.M., Bernheim, F., Shapiro, O.W., 1949. Determination of lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 24, 305–310.

Wilcox, C.S. 2010. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacology & Therapeutics* 126:119–145.

World Health Organization/International Society of Hypertension Guidelines Subcommittee. 1999. Guidelines for the Management of Hypertension. *Journal of Hypertension* 17: 151-83.

World Health Organization, 2002. The World Health Report: Risks to Health. World Health Organization, Geneva.

Wu, C.C., Chen, S.J., Yen, M.H., 1993. Different responses to acetylcholine in the presence of nitric oxide inhibitor in rat aorta and mesenteric arteries. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 20: 405–412.

Xiong, Y., Hall, E. D. 2009. Pharmacological evidence for a role of peroxynitrite in the pathophysiology of spinal cord injury. *Experimental Neurology* 216: 105–114.

Yamagishi S. 2010. Calcium antagonists: current and future applications based on new evidence. Calcium antagonists and diabetes. *Clinical Calcium* 20: 77-82.

Yamori, Y., Nara, Y., Mizushima, S. 1992. Gene-environment interaction in hypertension, stroke and atherosclerosis in experimental models and supportive findings from a world-wide cross-sectional epidemiological survey: a WHO-cardiac study. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology Supplement* 20.

- Yeh C-T., Huang, W-H., Yen, G-C. 2009. Antihypertensive effects of Hsian-tsao and its active compound in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 11 : 866-875 .
- Yen, P-L., Chen, B-H., Yang, F.L., and Lu, Y-Fa. 2010. Effects of deep-frying oil on blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Nutrition* 26 : 331–336.
- Yoshida, S-I., Hashimoto, T., Kihara, M., Hiroaki, N.I., Nomura, Y.K., Kiuchi, Y., Tamura, K., Ishigami, T., Hirawa, N., Toya, Y., Kitamura, H., Umemura, S. 2009. Urinary Oxidative Stress Markers Closely Reflect the Efficacy of Candesartan Treatment for Diabetic Nephropathy. *Nephron Experimental Nephrology* 111:e20–e30
- You, M., Grabb, D.W. 2004. Recent advances in alcoholic liver disease. II. Minireview: molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *American Journal of Physiology Gastrology Intestine and Liver physiology* 287: G1-G6
- Yuan, S-H., Dai, G.D., Dai, L., Yin, J.M. 2006. CPUO 507, an endothelial receptor antagonist, improves rat hypoxic pulmonary artery and constriction in vivo and in vitro. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 33:1066-1072.
- Yun, J.W., Kim, Y.K., Lee, B.S., Kim, C.W., Hyun, J.S., Baik, J.H., Kim, J.J., Kim, B.H. 2007. Effect of Dietary Epigallocatechin-3-gallate on cytochrome P450 2E1-Dependent Alcoholic liver Damage: Enhancement of Fatty Acid Oxidation. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 71: 2999-3006.
- Zhang, C., Kuroyangi, M., Tan, B.K. 1998. Cardiovascular activity of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide in the anaesthetised rat and isolated right atria. *Pharmacological Research* 38:413-417.
- Zhang, C.Y., Tan, B.K.1996. Hypotensive activity of aqueous extract of *Andrographis paniculata* in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 23:675-678.
- Zhang, Y., Cao, Y.J., Zhan, Y.Z., Duan, H.J., He, L.C. 2010. Furanocoumarins-imperatorin inhibits myocardial hypertrophy both *in vitro* and *in vivo*. *Fitoterapia* doi:10.1016/j.fitote.2010.07.023
- Zima, T., Fialova, L., Mestek, O., Janebova, M., Crkovska, J., Malbohan, I., Stipek, S., Mikulikova, L., Popov, P. 2001. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *Journal of Biomedical Science* 8: 59– 70.
- Zoccali C. 2007. The endothelium as a target in renal diseases. *Journal of Nephrology* 20:39–44.

## Liste des publications

- **Tom, E.N.L.**, Girard, C., Dimo, T., Mbafor, T.J., Berthelot, A., Demougeot, C. 2010. Vasorelaxant effects of extracts of the stem bark of *Terminalia superba* Engler & Diels (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 127 : 335-340.
- **Tom, E.N.L.**, Demougeot, C., Bopda Mtopi, O., Dimo, T., Dzeufiet Djomeni, P-D., Bilanda, D.C., Girard, C., Berthelot, A. 2011 The aqueous extract of *Terminalia superba* (Combretaceae) prevents glucose-induced hypertension in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 133 : 828-833.

**TIRÉS À PART DES PUBLICATIONS**



## Vasorelaxant effects of extracts of the stem bark of *Terminalia superba* Engler & Diels (Combretaceae)

Esther Ngo Lemba Tom<sup>a,b</sup>, Corinne Girard<sup>a</sup>, Théophile Dimo<sup>b</sup>, Joseph Tanyi Mbafor<sup>c</sup>, Alain Berthelot<sup>a</sup>, Céline Demougeot<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences, B.P. 812 Yaoundé, Cameroon

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie Organique, Faculté des Sciences, B.P. 812 Yaoundé, Cameroon

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 October 2009

Accepted 29 October 2009

Available online 6 November 2009

#### Keywords:

*Terminalia superba* extracts

Rat

Aorta

Vasodilation

Calcium

Nitric oxide

### ABSTRACT

**Aim of the study:** The stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae) (TS) is used in traditional Cameroonian medicine as antihypertensive remedy. In the present study, we investigated the vasorelaxant properties of different extracts of TS and their underlying mechanisms.

**Materials and methods:** Activities of aqueous (AQU), methanolic (MET), methylene chloride (MC), and methylene chloride–methanol (MCM) extracts of TS were evaluated on isolated rat aortic rings precontracted with phenylephrine (PE) or high KCl.

**Results:** All extracts induced a vasodilating effect both on KCl- and PE-induced contractions. The effects of MC and MCM extracts were greater than those of AQU or MET extracts ( $P < 0.05$ ). MC had an endothelium-independent effect and reduced  $Ca^{++}$ -induced contraction following PE or KCl challenge ( $P < 0.05$ ). After incubation with verapamil, MC induced a relaxation in rings precontracted by PE ( $P < 0.001$ ). By contrast, the effect of MCM was endothelium-dependent and decreased by the nitric oxide synthase inhibitor  $N_W$ -nitro-L-arginine methyl ester ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** These data demonstrate that the MC extract exhibits vasorelaxant effects that are partly due to inhibition of extracellular  $Ca^{++}$  influx and/or inhibition of intracellular  $Ca^{++}$  release in vascular smooth muscle cells. By contrast, the effect of the MCM extract was found to be endothelium- and nitric oxide dependent.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cardiovascular diseases are the principal cause of death in all developed countries accounting for 50% of all deaths and are also emerging as a prominent public health problem in developing countries, ranking third with nearly 16% of all deaths (Chockalingam, 2008). Arterial hypertension is the most common cardiovascular disease as well as an independent but modifiable risk factor for cardiovascular and cerebrovascular diseases (Law et al., 2009). Lowering blood pressure reduces the risk for developing arterial coronary disease, heart failure, cerebral vascular disease and renal damage (Law et al., 2009). Moreover, hypertension represents a major public health problem because of its high prevalence, its underdiagnosis, the poor compliance of patients and the high percentage of patients that do not reach the blood pressure targets (Inkster et al., 2005). The problem of hypertension is of great impor-

tance in black Africa because of its high prevalence in urban areas, its frequent underdiagnosis, and the severity of its complications (Addo et al., 2007). There were approximately 80 million patients with hypertension in sub-Saharan Africa in 2000 and projections based on current epidemiologic data suggest that this figure will rise to 150 million by 2025 (Fourcade et al., 2007).

Prevention or treatment of hypertension can be achieved by means of pharmacological, non-pharmacological therapies such as body weight reduction, alcohol intake reduction, moderation of dietary sodium, increasing physical activity and by means of medicinal plants. In Africa, the use of phytomedicine has been extensively used for centuries to prevent and treat various diseases including cardiovascular diseases. In the south of Cameroon, numerous species of *Terminalia* are used in traditional medicine for the treatment of gastroenteritis, female infertility, abdominal pain, or bronchial infections (Adjanohoun et al., 1996) and some species also exhibited anti-diabetic (Raghavan and Kumari, 2006) and cardioprotective activities (Singh et al., 2008). In some parts of the center province of Cameroon, the decoction of *Terminalia superba* is considered as a useful remedy against hypertension. The genus *Terminalia* belongs to the family of Combretaceae and more than

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 81 66 56 68; fax: +33 3 81 66 56 91.

E-mail address: [cdemouge@univ-fcomte.fr](mailto:cdemouge@univ-fcomte.fr) (C. Demougeot).

a half of the species appears throughout the dense humid forests, semi-deciduous forests and in easily flooded and secondary forests (Burkill, 1985). Phytochemical investigations of various species of *Terminalia* revealed the presence of many classes of chemical constituents such as tannins, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids (Eloff et al., 2008). Recent studies conducted on *Terminalia superba* led to the identification of ellagic and gallic acid derivatives, phytoosterols, lignans and triterpenoids compounds (Wansi et al., 2007; Tabopda et al., 2008; Tabopda et al., 2009).

In the present study, in order to provide pharmacological basis for the traditional use of *Terminalia superba* as antihypertensive therapy and to discover novel vasodilators from natural resources, we investigated the direct vasoactive effects of different extracts from the stem bark of *Terminalia superba*. For this purpose, the effects of aqueous, methanolic, methylene chloride and methylene chloride–methanol extracts of *Terminalia superba* were determined on their ability to vasodilate isolated rat aortas. Moreover, we investigated the potential mechanisms underlying the effects of the most potent extracts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of the plant extracts

Fresh pieces of *Terminalia superba* stem bark were harvested in Djoum (South Cameroon) on May 2005 and authenticated at the National Herbarium Yaounde by comparison with herbarium voucher specimen No. 19652/HNC earlier collected by Leeuwenberg. The sample was dried in the shade and ground into powder. The dried stem bark powder (120 g) was boiled in distilled water (3 L) for 20 min, cooled and filtered according to the traditional method preparation.

The filtrate was evaporated in an oven at 50 °C. This produced a yield of 27.82 g (23.18%) of the aqueous extract (AQU). Three kilograms of *Terminalia superba* brown powder stem bark were macerated in 6 L methanol for 2 days, then filtered and evaporated in Rotavapor, giving 317.3 g of methanolic extract (MET), representing a return of 10.57%. In the same way, 3.250 kg and 500 g were respectively soaked in methylene chloride/methanol (7 L, 1:1, v/v) (MCM) and methylene chloride (MC) (1.5 L) giving 326.2 g and 11.2 g, with extractions yield of 10.03% and 2.24%, respectively.

### 2.2. Animals

The study was conducted on male Wistar rats weighting 250–350 g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept

under a 12–12 h light:dark cycle and allowed free access to food and water. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85–23, revised 1996).

### 2.3. Vascular reactivity

After anaesthesia with pentobarbital (60 mg/kg, ip), the thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue, and cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in organ baths containing Krebs solution (NaCl 118 mM, KCl 4.65 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24.9 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.18 mM, glucose 12 mM, pH 7.4), maintained at 37 °C and continuously aerated with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, for isometric tension recording, as previously described (Demougeot et al., 2005). After a 90-min-equilibration period under a resting tension of 2 g, the presence of functional endothelium was verified by the ability of acetylcholine (ACh, 10<sup>-6</sup> mol/L) to induce more than 80% relaxation in rings precontracted with phenylephrine (PE) 10<sup>-6</sup> mol/L. In some rings, endothelium was mechanically removed. The completeness of endothelial denudation was confirmed by a >90% obliteration of the vasorelaxant response to the endothelial-dependent agonist ACh (10<sup>-6</sup> mol/L).

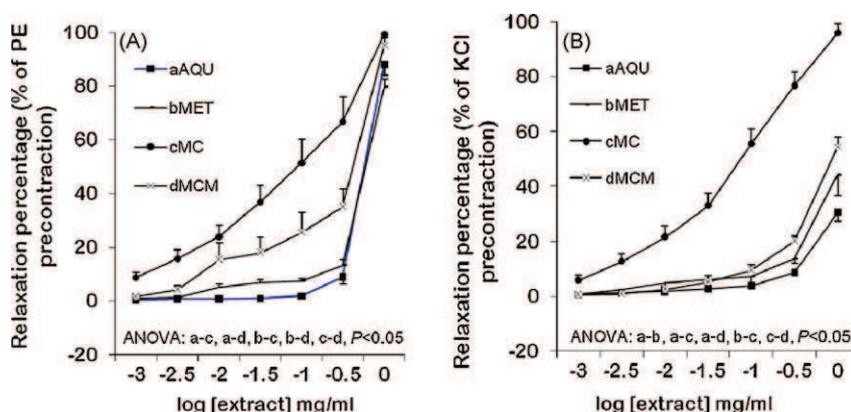
### 2.4. Experimental protocols

#### 2.4.1. Effects of the extracts on aortic contraction induced by PE and KCl

The aim of this protocol was to investigate and to compare the vasodilating effects of the four extracts of *Terminalia superba*. The contraction of aortic rings was achieved by PE (10<sup>-6</sup> mol/L) or KCl (6 × 10<sup>-2</sup> mol/L). When the contraction reached a plateau, the extracts were added cumulatively (10<sup>-3</sup> to 1 mg/mL) to rings with intact endothelium as well as to endothelium-denuded rings. The relaxation effect was calculated as the percentage of the contraction in response to PE or KCl. For each extract, the effect of the solvent alone was evaluated in the same conditions.

#### 2.4.2. Determination of the role of calcium-channels in the vasorelaxant effect

To assess the role of the extracellular calcium (Ca<sup>++</sup>) influx in the extract-induced relaxation, endothelium-denuded rings were washed 4–5 times with a Ca<sup>++</sup>-free Krebs solution (containing 5 × 10<sup>-5</sup> mol/L of ethylene glycol-bis [β-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)) before PE (10<sup>-6</sup> mol/L) or KCl (6 × 10<sup>-2</sup> mol/L) was applied to induce a stable contraction. Then, Ca<sup>++</sup> (CaCl<sub>2</sub>) was added cumulatively (10<sup>-5</sup> to 3 × 10<sup>-3</sup> mol/L)



**Fig. 1.** Concentration-dependent effects of *Terminalia superba* extracts on phenylephrine (PE) 10<sup>-6</sup> mol/L (A) and KCl 6 × 10<sup>-2</sup> mol/L (B) precontracted aortic rings with endothelium. The experiment investigated the effects of an aqueous (AQU), methanolic (MET), methylene chloride (MC) and methylene chloride–methanol (MCM) extract of the stem bark of *Terminalia superba*. Values are means ± S.E.M. (n = 8–10 rings).

to obtain a concentration–response curve. In some rings, the  $EC_{50}$  of the extract was applied for 30 min before the addition of PE or KCl.

To determine the role of the intracellular  $Ca^{++}$  release in the extract-induced relaxation, endothelium-denuded rings were incubated with the L-type voltage-dependent  $Ca^{++}$  channel inhibitor, verapamil ( $10^{-6}$  mol/L) for 30 min. Then, PE  $10^{-6}$  mol/L was added to the bath to induce a steady contraction. Subsequently, the  $EC_{50}$  of the extract was added.

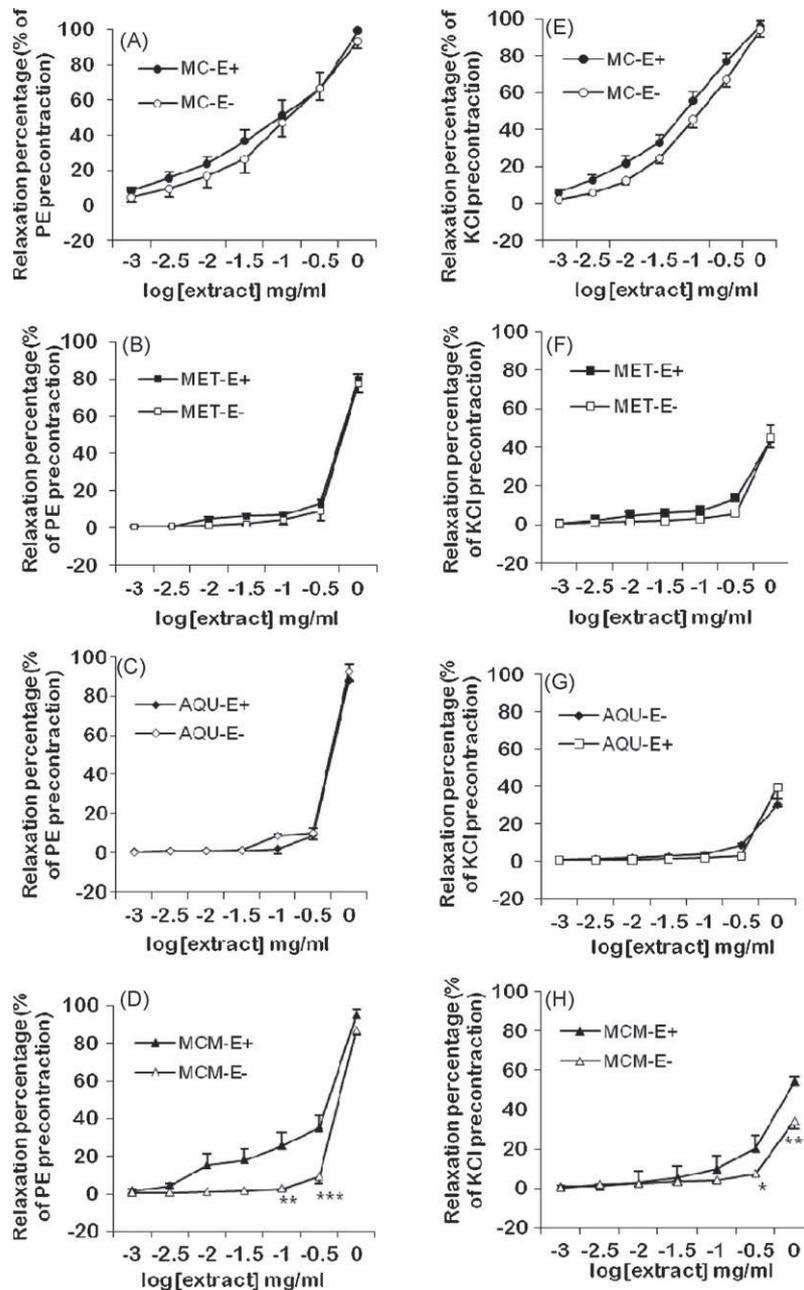
#### 2.4.3. Determination of the role of nitric oxide in the vasorelaxant effects

To investigate the role of nitric oxide (NO) in the endothelium-dependent effects of the extracts, rings with intact endothelium

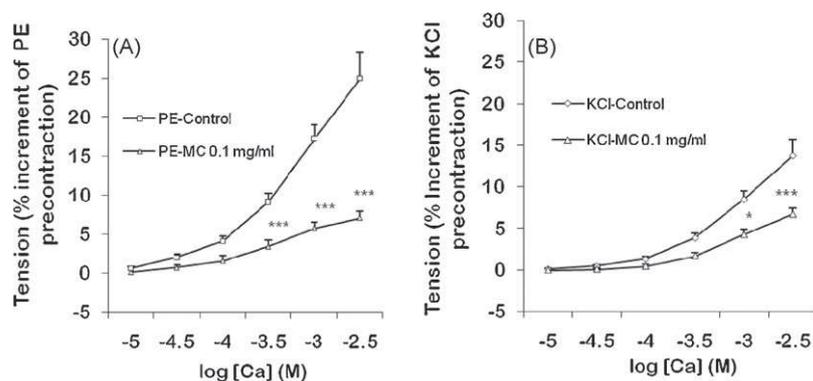
were incubated with the non-selective NO synthase inhibitor,  $N_{\omega}$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME,  $10^{-4}$  mol/L) for 30 min prior to the exposure to PE ( $10^{-6}$  mol/L) or KCl ( $6 \times 10^{-2}$  mol/L). Then, the extract was added cumulatively as described above.

#### 2.5. Data and statistical analysis

Values are given as means  $\pm$  S.E.M. The  $EC_{50}$  values (defined as the concentration of extract that induced 50% of the maximal relaxation) and  $E_{max}$  values (values of maximal relaxation) were determined by fitting the original dose–response curves determined by fitting the original dose–response curves using Sigma Plot Software (Systat Software Inc., San Jose, USA). Dose–response relationships were analysed using two-way ANOVA followed by



**Fig. 2.** Vasodilating effects of *Terminalia superba* extracts on aortic rings with (E<sup>+</sup>) or without (E<sup>-</sup>) endothelium contracted with phenylephrine (PE)  $10^{-6}$  mol/L (A–D) or KCl  $6 \times 10^{-2}$  mol/L (E–H). The experiment investigated the effects of methylene chloride (MC) (A and E), methanolic (MET) (B and F), aqueous (AQU) (C and G), and methylene chloride–methanol (MCM) (D and H) extract of the stem bark of *Terminalia superba* on rings with (E<sup>+</sup>) or without (E<sup>-</sup>) endothelium. Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8–11$  rings). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. E<sup>+</sup>.



**Fig. 3.** Effect of methylene chloride extract of *Terminalia superba* on calcium-induced vasoconstriction. Endothelium-denuded rings were incubated in a  $\text{Ca}^{++}$ -free Krebs solution and contracted with PE  $10^{-6}$  mol/L (A) or KCl  $6 \times 10^{-2}$  mol/L (B) before addition of cumulative concentration of  $\text{Ca}^{++}$  ( $10^{-5}$  to  $3.10^{-3}$  mol/L). In some rings, before addition of PE or KCl, rings were incubated for 30 min with methylene chloride (MC) extract at 0.1 mg/mL. Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=8-12$  rings). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. control.

Student's *t* test. Comparison between two values was assessed by unpaired Student's *t* test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Vasorelaxant effects of the different extracts of *Terminalia superba*

Fig. 1 represents the effects of the four extracts of *Terminalia superba* on the contraction evoked by PE ( $10^{-6}$  mol/L) and KCl ( $6 \times 10^{-2}$  mol/L). All kinds of extracts induced a dose-dependent vasodilation both in PE-constricted rings (Fig. 1A) and in KCl-constricted rings (Fig. 1B). The effect of MC was significantly higher than that of MCM, MET and AQU, both in PE and in KCl-constricted rings. As compared to MET and AQU, MCM exhibited a significantly higher relaxation in PE-constricted rings (Fig. 1A). In KCl-constricted rings, the effect of MCM was greater than that of AQU but not different from that of MET (Fig. 1B). Finally, the effects of AQU and MET were similar in PE-constricted rings (Fig. 1A) whereas the MET exhibited a greater vasodilating effect than AQU in KCl-constricted rings (Fig. 1B). The solvents used (distilled water and dimethyl sulfoxide) did not affect the vasodilatory responses in the aortic rings (data not shown).

In order to precise the mechanisms involved in the vasodilating effect of the different extracts, their effects were investigated on endothelium-denuded preparations. As shown in Fig. 2, the effects of MC (Fig. 2A and 2E), MET (Fig. 2B and 2F) and AQU (Fig. 2C and 2G) were not affected by endothelium removal both in PE and KCl-constricted rings. By contrast, endothelium removal significantly decreased the vasodilating effect of MCM in rings constricted with both PE (Fig. 2D) and KCl (Fig. 2H).

#### 3.2. Effect of MC on calcium-induced contractile response to PE and KCl

To investigate further the mechanisms responsible for the endothelium-independent effects of the most potent extract, i.e. MC extract, we studied the role of extracellular  $\text{Ca}^{++}$  influx in endothelium-denuded rings. As shown in Fig. 3, the cumulative addition of  $\text{Ca}^{++}$  in a  $\text{Ca}^{++}$ -free medium containing PE or KCl induced a concentration-dependent contraction of aortic rings. Pre-incubation of rings with MC at the  $\text{EC}_{50}$  (0.10 mg/mL) significantly decreased the  $\text{Ca}^{++}$ -induced contraction in both PE- (Fig. 3A) and KCl-constricted rings (Fig. 3B).

Next, in order to determine whether the relaxation afforded by MC is related to a decrease in intracellular  $\text{Ca}^{++}$  release,

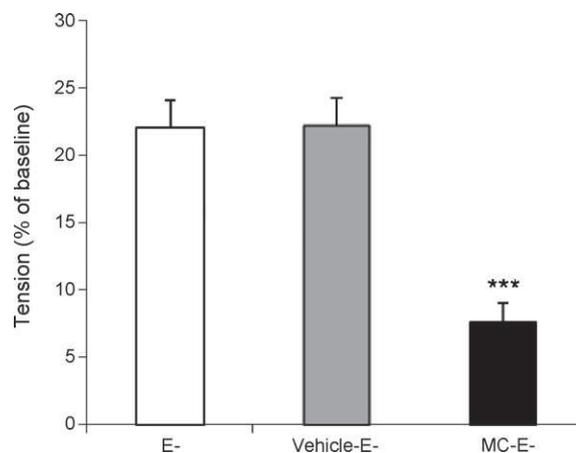
endothelium-denuded rings were incubated with the L-type  $\text{Ca}^{++}$  channel inhibitor verapamil prior to the application of PE. As shown in Fig. 4, as compared to PE alone or to vehicle, the addition of MC (0.10 mg/mL) at the plateau of PE-induced contraction significantly decreased the constrictive effect of PE ( $P < 0.001$ ).

#### 3.3. Role of nitric oxide in the relaxant effects of the methylene chloride-methanol extract of *Terminalia superba*

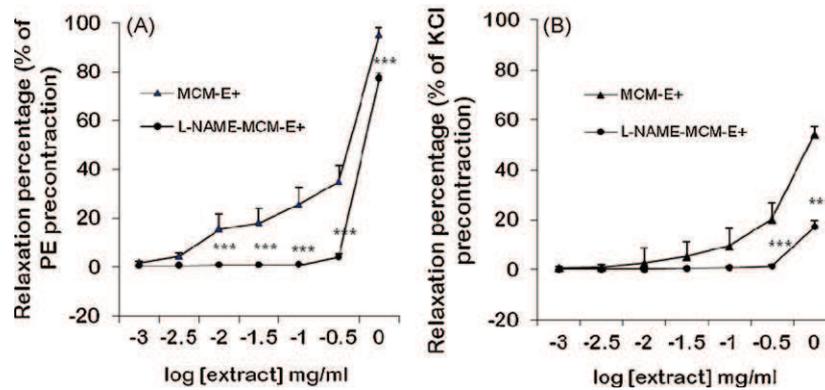
To assess whether the endothelium-dependent effect of MCM was mediated by the NO signalling pathway, endothelium-intact aortic rings were incubated with the non-selective NOS inhibitor L-NAME. As shown in Fig. 5, inhibition of NOS activity was associated with a significant decrease in the vasodilating effect of MCM both in PE-constricted (Fig. 5A) and in KCl-constricted rings (Fig. 5B) ( $P < 0.001$ ).

### 4. Discussion

The present study was designed to investigate the vasorelaxant effect of different extracts of the stem bark of *Terminalia superba* and to understand the mechanisms involved in the effects of the most potent extracts. The results demonstrate that all kinds of extracts of *Terminalia superba* evoke a vasodilating activity in



**Fig. 4.** Effect of methylene chloride extract of *Terminalia superba* on intracellular calcium release. Results are represented as the tension (% of baseline) resulting to the exposure to phenylephrine (PE)  $10^{-6}$  mol/L ( $\text{E}^-$ ) in aortic rings pre-incubated with verapamil ( $10^{-6}$  mol/L) for 30 min. Subsequently to the application of PE, some rings were exposed to the methylene chloride extract (0.1 mg/mL) (MC- $\text{E}^-$ ) or vehicle (Vehicle- $\text{E}^-$ ). Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=8-12$  rings). \*\*\* $P < 0.001$  vs.  $\text{E}^-$ .



**Fig. 5.** Effect of L-NAME ( $10^{-4}$  M) on the vasorelaxant effect of methylene chloride–methanol (MCM) extract of *Terminalia superba* in endothelium-intact rings contracted with PE  $10^{-6}$  mol/L (A) or KCl  $6 \times 10^{-2}$  mol/L (B). Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=9-10$ ). \*\*\* $P < 0.001$ .

aortic rings. Moreover, the methylene chloride and the methylene chloride–methanol extracts exhibit the most potent activities, which are endothelium-independent and endothelium-dependent, respectively.

The decoction of stem bark of *Terminalia superba* is used in Cameroonian folk medicine for its antihypertensive properties, but the scientific bases of this traditional use are scarce. The present results show that all extracts induce dose-dependent vasodilating effects, thus indicating that whatever the method used for extraction, *Terminalia superba* contains compounds capable of inducing vasorelaxation that could be involved in the antihypertensive effects of the plant. Vascular tone and hence blood pressure are determined by the contractile state of vascular smooth muscle cells (VSMC) within the blood vessel wall, which is regulated by intracellular calcium concentration. The endothelium regulates vascular smooth muscle tone in conduit and resistance vessels by the secretion of vasoactive substances, which include nitric oxide (NO), prostacyclin and an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Luksha et al., 2009). In our study, endothelium removal did not reduce the effects of AQU, MET and MC on vasodilation, thus suggesting that these extracts act at the smooth muscle cells level rather than at the endothelium level. Our data obtained with MET are consistent with a previous study reporting that the time-dependent vasodilating effect of a single dose of MET is endothelium-independent (Dimo et al., 2006). By contrast, the effect of MCM was blunted by endothelium removal indicating that this extract interferes with the endothelium-dependent production of relaxing factors.

In large vessels including aortas, NO is thought to play a major role in the endothelium-dependent vasodilation (Wu et al., 1993). Our results showing that L-NAME blunted the relaxing effect of MCM demonstrates that the MCM effect is – at least partly – mediated by an increase in endothelial NO synthase (NOS) activity. Whether this effect is due to an impact on endothelial receptors to different agonists such as adenosine, acetylcholine, bradykinin, and serotonin, or by an improvement of substrate or co-factor availability for NOS remains to be determined. Of note, the relaxing effect of MCM was greater in PE-constricted rings than in KCl-constricted rings. The use of raising extracellular KCl to vasoconstrict rings inhibits the EDHF contribution since the effects of EDHF are mainly dependent on  $K^+$  channels activation (Luksha et al., 2009). Consequently, the contribution of NOS and cyclo-oxygenase dependent vasodilation becomes dominant after KCl challenge (McGuire et al., 2001). Thus, the fact that MCM induces a less potent effect when KCl is used as the contractile agent strongly suggests that its vasodilating effects are partly mediated by the improvement of EDHF release. These effects of MCM on endothelial function are particularly interesting because hypertension is associated with

endothelial dysfunction that contributes to both development and persistence of high blood pressure as well to the development of the complications of the disease (Higashi and Chayama, 2002). Overall data suggest that, beyond its effect on blood pressure lowering, *Terminalia superba* might also have beneficial effects on hypertension-induced target organ damage. Further experiments will be needed to verify this hypothesis.

The present study reports that the MC extract is the most potent of the four extracts and that contrary to MCM, its relaxing effects are unaffected by the removal of the endothelium. These data suggest that MC does not modulate the synthesis of endothelium-derived relaxing factors but rather directly acts on the VSMC activity. The relaxing activity of MC is evident after both PE- and KCl-induced contraction. Phenylephrine is an alpha-adrenergic agonist that induces smooth muscle cells contractions by  $Ca^{++}$  influx through receptor-operated  $Ca^{++}$  channels (ROCCs) and by release of  $Ca^{++}$  from the sarcoplasmic reticulum (McFadzean and Gibson, 2002). The activation of the alpha receptor leads to the production of diacylglycerol and inositol tri-phosphate (IP<sub>3</sub>), this latter messenger inducing the release of  $Ca^{++}$  from sarcoplasmic reticulum after activation of IP<sub>3</sub> receptors (Thorneloe and Nelson, 2005). By contrast, the contraction elicited by KCl mainly results from the influx of extracellular  $Ca^{++}$  induced by depolarization of cell membrane and subsequent opening of voltage-dependent  $Ca^{++}$  channels (VDCCs) (Nelson and Quayle, 1995). Therefore, we hypothesized that the vasorelaxant endothelium-independent effect of MC is linked to its effect on smooth muscle  $Ca^{++}$  homeostasis. To assess whether MC modified the extracellular  $Ca^{++}$  influx, experiments were conducted on rings contracted with PE or KCl in a  $Ca^{++}$ -free Krebs solution in which  $Ca^{++}$  was added subsequently. The data showing that MC reduced  $Ca^{++}$ -induced contractions after both PE- or KCl-induced contraction indicate that the blockade of both ROCCs and VDCCs is involved in the vasodilating effects of this extract. Moreover, our results showing that MC decreases the contraction induced by PE in the presence of verapamil, an inhibitor of VDCCs and in a lesser extent of ROCCs (Striggo and Bohnensack, 1993; Shin et al., 2005), demonstrate that the MC extract also inhibits the intracellular  $Ca^{++}$  release from the IP<sub>3</sub>-sensitive stores of sarcoplasmic reticulum in aortic rings.

## 5. Conclusions

This study demonstrates the vasodilating effects of methylene chloride and methylene chloride–methanol extracts of the stem bark of *Terminalia superba*. The data identifies an endothelium-independent and  $Ca^{++}$ -dependent effect of the methylene chloride extract whereas the methylene chloride–methanol extract effect was endothelium- and NO-dependent. The difference between the

two extracts regarding the involvement of endothelium suggests that the vasodilating activity is supported by chemically different compounds. These data validate the empirical use of *Terminalia superba* as antihypertensive therapy in Cameroon. Further phytochemical and pharmacological experiments are from now required to isolate and identify the active principle(s) and to determine the effects of *Terminalia superba* on clinically relevant animal models of hypertension.

### Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Agence Universitaire de la Francophonie.

### References

- Adjanooun, J.E., Aboukakar, N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekpere, J.A., Enow-Orock, E.G., Focho, D., Gbile, Z.O., Kamanyi, A., Kamsu, K.J., Keita, A., Mbenkum, T., Mbi, C.N., Mbiele, A.L., Mbome, I.L., Mubiru, N.K., Nancy, W.L., Nkongmeneck, B., Satabu, B., Sofowora, A., Tamze, V., Wirmum, C.K., 1996. Traditional medicine and pharmacopoeia. In: Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon. Centre de Production de Manuels Scolaires, Porto-Novo (Rep. Du Benin), p. 133.
- Addo, J., Smeeth, L., Leon, D.A., 2007. Hypertension in sub-saharan Africa: a systematic review. *Hypertension* 50, 1012–1018.
- Burkill, H.M., 1985. *The Useful Plants of West Tropical Africa*, vol. 1, second ed. Royal Botanic Garden, Kew Great Britain, pp. 425–426.
- Chockalingam, A., 2008. World Hypertension Day end global awareness. *Canadian Journal of Cardiology* 24, 441–444.
- Demougeot, C., Prigent-Tessier, A., Marie, C., Berthelot, A., 2005. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 23, 971–978.
- Dimo, T., Laurent, F., Rakotonirina, S.V., Tan, P.V., Kamtchouing, P., Dongo, E., Cros, G., 2006. Methanol extract of *Terminalia superba* induced endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. *Die Pharmazie* 5, 470–473.
- Eloff, J.N., Katerere, D.R., McGaw, L.J., 2008. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 686–699.
- Fourcade, L., Paule, P., Mafart, B., 2007. Arterial hypertension in sub-Saharan Africa. Update and perspectives. *Médecine Tropicale* 67, 559–567.
- Higashi, Y., Chayama, K., 2002. Renal endothelial dysfunction and hypertension. *Journal of Diabetes Complications* 16, 103–107.
- Inkster, M., Montgomery, A., Donnan, P., MacDonald, T., Sullivan, F., Fahey, T., 2005. Organisational factors in relation to control of blood pressure: an observational study. *British Journal of General Practice* 55, 931–937.
- Law, M.R., Morris, J.K., Wald, N.J., 2009. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *British Medical Journal* 191, b1665.
- Luksha, L., Agewall, S., Kublickiene, K., 2009. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 202, 330–344.
- McFadzean, I., Gibson, A., 2002. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 135, 1–13.
- McGuire, J.J., Ding, H., Triggle, C.R., 2001. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 79, 443–470.
- Nelson, M.T., Quayle, J.M., 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology* 268, C799–C822.
- Raghavan, B., Kumari, S.K., 2006. Effect of *Terminalia arjuna* stem bark on antioxidant status in liver and kidney of Alloxan Diabetic Rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 50, 133–142.
- Shin, I.W., Sohn, J.T., Kim, H.J., Kim, C., Lee, H.K., Chang, K.C., Chung, Y.K., 2005. Etomidate attenuates phenylephrine-induced contraction in isolated rat aorta. *Canadian Journal of Anaesthesia* 52, 927–934.
- Singh, G., Singh, A.T., Abraham, A., Bhat, B., Mukherjee, A., Verma, R., Agarwal, K.S., Jha, S., Mukherjee, R., Burman, A.C., 2008. Protective effects of *Terminalia arjuna* against Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 123–129.
- Striggow, F., Bohnensack, R., 1993. Verapamil and diltiazem inhibit receptor-operated calcium channels and intracellular calcium oscillations in rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 222, 229–234.
- Tabopda, T.K., Ngoupayo, J., Liu, J., Ali, M.S., Khan, S.N., Ngadjui, B.T., Luu, B., 2008.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors ellagic acid derivatives with immunoinhibitory properties from *Terminalia superba*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 56, 847–850.
- Tabopda, T.K., Ngoupayo, J., Khan Tanoli, S.A., Mitaine-Offer, A.C., Ngadjui, B.T., Ali, M.S., Luu, B., Lacaille-Dubois, M.A., 2009. Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. *Planta Medica* 75, 522–527.
- Thorneloe, K.S., Nelson, M.T., 2005. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 83, 215–242.
- Wansi, J.D., Lallemand, M.-C., Chiozem, D.D., Toze, F.A.A., Mbaze, L.M., Naharkhan, S., Iqbal, M.C., Tillequin, F., Wandji, J., Fomum, Z.T., 2007.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochemistry* 68, 2096–2100.
- Wu, C.C., Chen, S.J., Yen, M.H., 1993. Different responses to acetylcholine in the presence of nitric oxide inhibitor in rat aorta and mesenteric arteries. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 20, 405–412.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

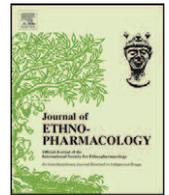
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## The aqueous extract of *Terminalia superba* (Combretaceae) prevents glucose-induced hypertension in rats<sup>☆</sup>

Esther Ngo Lemba Tom<sup>a,c</sup>, Céline Demougeot<sup>c</sup>, Orelie Bopda Mtopi<sup>a</sup>, Théophile Dimo<sup>a,\*</sup>, Paul Désiré Dzeufiet Djomeni<sup>a</sup>, Danielle Claude Bilanda<sup>a</sup>, Corinne Girard<sup>b</sup>, Alain Berthelot<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, PO Box 812, Yaounde, Cameroon

<sup>b</sup> Pôle Substances Naturelles, EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Place St Jacques, 25030 Besançon, France

<sup>c</sup> Pôle Dysfonction endothéliale, EA 4267 Sciences Séparatives, Biologiques et Pharmaceutiques, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Place St Jacques, 25030 Besançon, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 August 2010

Received in revised form 3 November 2010

Accepted 4 November 2010

Available online 11 November 2010

## Keywords:

*Terminalia superba*

D-Glucose

Rat

Blood pressure

Antihypertensive

Antioxidant

## ABSTRACT

**Aim of the study:** The stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae) (TS) is used in traditional Cameroonian medicine as antihypertensive remedy. The aim of this study was to investigate the hypotensive and the antihypertensive effects of the aqueous extract of the stem bark of *Terminalia superba*.

**Materials and methods:** Hypertension was obtained in rats by oral administration of 10% D-glucose for 3 weeks. The acute effects of *Terminalia superba* were studied on blood pressure (BP) and heart rate (HR) after intravenous administration in normotensive rats (NTR) and glucose hypertensive rats (GHR). The antihypertensive effects were studied after oral administration of the extract (50 and 100 mg/kg/day) or nifedipine (10 mg/kg/day) for 3 weeks. At the end of the experiment, BP and HR were measured and reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activity levels were measured in heart, aorta, liver and kidney.

**Results:** Intravenous administration of the aqueous extract of *Terminalia superba* induced a significant hypotensive response without any change in HR. The hypotensive effect of the extract was unaffected by atropine or propranolol but decreased by reserpine (5 mg/kg) and yohimbine (0.1 mg/kg). In addition, the oral administration of the extract significantly prevented the rise in BP in glucose-hypertensive rats. Finally, the treatment with plant extract significantly blunted the decrease in GSH and the increase in MDA levels associated with hypertension, and significantly prevents the increase in aortic SOD activity.

**Conclusions:** The present study demonstrates that the aqueous extract of the stem bark of *Terminalia superba* exhibits hypotensive and anti-hypertensive properties that are, at least in part, related to a withdrawal of sympathetic tone and to an improvement of the antioxidant status, respectively. Overall data validate the use of *Terminalia superba* as antihypertensive therapy in traditional medicine.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hypertension is an important public health world-wide because of its commonness and concomitant risks of cardiovascular disease (Kearney, 2005). Also known as the “silent killer”, hypertension is estimated to cause 4.5% of current global disease burden and is as prevalent in many developing countries, as in

**Abbreviations:** BP, Blood pressure; DBP, Diastolic blood pressure; GHR, Glucose hypertensive rats; GSH, Reduced glutathione; HR, Heart rate; MDA, Malondialdehyde; NTR, Normotensive rats; SBP, Systolic blood pressure; SOD, Superoxyde dismutase.

<sup>☆</sup> Supported by the Academy of Science for Developing World (TWAS) research grant No 06 020/RG/BIO/AF/AC awarded to Théophile Dimo.

\* Corresponding author. Tel.: +237 77 65 74 42.

E-mail addresses: [dimo59@yahoo.com](mailto:dimo59@yahoo.com), [tdimo@uycdc.uninet.cm](mailto:tdimo@uycdc.uninet.cm) (T. Dimo).

0378-8741/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jep.2010.11.016

the developed world (Whitworth, 2003). Hypertension in 2000 was 972 million. Of these, 333 million were estimated in economically developed countries and 639 million in economically developing countries. By 2025, the number will increase by about 60% to a total of 1.56 billion as the proportion of elderly people will increase. Some reasons are the changes in population lifestyle, which include a diet rich in sugar and high fat processed foods and sedentary behaviour. Since the proportion of hypertensive people will increase dramatically worldwide, the prevention, detection, treatment and control of this condition should be a top priority (Kearney, 2005). However, most people in developing countries have poor access to modern health care which consist in the large number of antihypertensive drugs and combinations. Furthermore, management of hypertension without any side effect is still a challenge to the medical system. Medicinal plants are used for treating pathologies based on a folk tradition that has been perpetuated along sev-

eral generations. Therefore, pharmacological validation of medicinal plants or ethno medical treatment method could greatly benefit.

The genus *Terminalia* belongs to family Combretaceae and possesses tremendous medicinal value. It is used as astringent, brain tonic, for cough, asthma, stomach pain, liver disorders, piles, leprosy and fever (Adjanohoun et al., 1996). Phytochemical investigations of various species of *Terminalia* have revealed the presence of many classes of chemical constituents such as saponins, glycosides, flavonoids and chalcones (Vankatesk et al., 2002). The present report is focused on *Terminalia superba* (Engler & Diels), a tree of about 30–50 m high, found in the upper in the most forests of West and Central Africa (Groulez and Wood, 1985). The folk medical practice of some parts of the Centre Province of Cameroon considers *Terminalia superba* as a useful remedy against hypertension. It is also locally used in the treatment of various ailments, including diabetes mellitus, gastroenteritis, female infertility and abdominal pains (Adjanohoun et al., 1996). The stem bark methanol/methylene chloride extract was previously reported to have anti-diabetic activity (Kamtchouing et al., 2005). The aqueous extract revealed hypoglycemic and hypolipidemic activity (Momo et al., 2008). The methanol/methylene chloride extract possessed  $\alpha$ -glucosidase inhibitors constituents (Wansi et al., 2007). We have recently demonstrated that the aqueous extract of *Terminalia superba* induced endothelium-independent vasorelaxation of isolated rat aorta (Tom et al., 2010). It is well documented that chronic intake of high simple sugars such as fructose and glucose are known to cause insulin resistance, hyperinsulinemia and moderate hypertension associated to increased oxidative stress (Hwang et al., 1987; El Midaoui and De Champlain, 2002). The present investigation was undertaken to examine the hypotensive and antihypertensive activities of the stem bark aqueous extract of *Terminalia superba* in normal Wistar rats (NTR) and in glucose-induced hypertensive rats (GHR). For that purpose, we analyzed the mechanisms of the hypotensive effect of the crude aqueous extract of *Terminalia superba* in NTR, and the effect of subchronic administration of the extract on blood pressure and on oxidative stress induced by high-glucose feeding diet.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Three months old male albinos Wistar rats, weighting between 150 and 250 g were used. Animals were raised in the Animal House of the Faculty of Science, University of Yaounde I in plastic cages, under standard light (12-hour day/night natural cycle) and temperature (25 °C). Rats were fed with standard diet and water *ad libitum*. Prior authorization for the used of laboratory animals was obtained from the Cameroon National Ethical Committee (Ref n° FW-IRB00001954).

Glucose-induced hypertension was induced from normotensive Wistar rats which received 10% D-glucose in drinking water *ad libitum* for 3 weeks as described by El Midaoui and De Champlain (2002). Ordinary tap water was given to control normotensive animals throughout the whole experimental period. At the end of this experimental period, only rats with systolic blood pressure level of at least 140 mm Hg and/or diastolic blood pressure level of at least 90 mm Hg were considered hypertensive.

### 2.2. Plant material and extraction

Fresh pieces of *Terminalia superba* stem bark were harvested in Djoum (South Cameroon) and authenticated at the National Herbarium, Yaounde where voucher specimen N° 19652/HNC was deposited. The sample was dried in the shade and ground. The

dried stem bark powder (120 g) was boiled in distilled water (3 L) for 20 min, cooled and filtered according to the traditional method preparation. The filtrate was evaporated in an oven at 50 °C, giving 27.82 g (yield of 23.18%) of a dried powder. The aqueous extract was dissolved in a given volume of physiological solution Mc Even (NaCl 147 mM, KCl 5.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.66 mM, NaCO<sub>3</sub>H 11.6 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.24 mM, glucose 11 mM) for intravenous subsequent use.

### 2.3. Effects of *Terminalia superba* on blood pressure and heart rat

#### 2.3.1. Acute effect of *Terminalia superba*

The rats were anaesthetized using an intraperitoneal injection of 15% urethane (1.5 g/kg). The trachea was exposed and cannulated to facilitate spontaneous respiration. A polyethylene catheter (PE 50) was inserted into the right femoral vein and a bolus injection of 10% heparin (0.1 mL/100 g body weight) was immediately administered. Another catheter was inserted into the left carotid aorta and connected to a pressure transducer (Biopac Student Lab MP 35) recording system for systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) measurement. The animals were allowed to stabilize for at least 30 min before administration of any test substances (Dimo et al., 2003). The test substances were injected through a cannula inserted into the femoral vein.

After equilibration for at least 30 min, the dose–response relationship of the *Terminalia superba* extract was determined on 5 normotensives (NTR, 10, 15 and 20 mg/kg) or 5 glucose-induced hypertensive rats (GHR, 15, 20 and 40 mg/kg). The vehicle (Mc Even) was also administered in a group of rats to ensure that the observed effects were not due to the vehicle action. Cardiovascular parameters (SBP and HR) were recorded for 1 h after the extract administration. In another group of normotensive animals, the effect of *Terminalia superba* extract (15 mg/kg) was examined after administration of the muscarinic receptor antagonist atropine (1 mg/kg) or the  $\beta$ -adrenoceptor antagonist, propranolol (100  $\mu$ g/kg) or a selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, yohimbine (0.1 mg/kg). Atropine and propranolol were injected intravenously, 5 min before administration of the plant extract. An inhibitor of the vesicular monoamine transporter, reserpine (5 mg/kg) was given to another group of 5 animals for 3 days, before the effect of *Terminalia superba* extract (15 mg/kg) was examined.

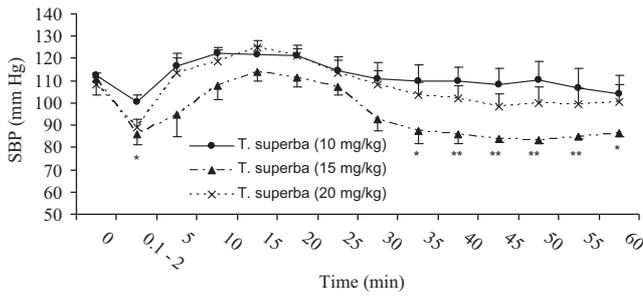
#### 2.3.2. Subchronic effects of *Terminalia superba*

In this study, we evaluated the effect of the aqueous extract of stem bark of *Terminalia superba* on D-glucose induced hypertension. Normotensive rats were randomly divided into five groups of five animals each. One group received tap water and served as normotensive rats (NTR), one group received 10% D-glucose solution in drinking water for 3 weeks (GHR), two groups received 10% D-glucose in drinking water and the plant extract at 50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day by gavage, and one group received 10% D-glucose in drinking water and the calcium channel inhibitor nifedipine at 10 mg/kg of nifedipine by gavage.

At the end of the experiment, systolic arterial blood pressure and heart rate were measured as described above.

#### 2.3.3. Oxidative stress parameters

At the end of the subchronic administration of *Terminalia superba* extract, heart, aorta, liver and kidney were dissected out and homogenized in Mc Even solution for heart and aorta or in Tris–HCl 50 mM buffer solution for liver and kidney (20%, m/v). Tissue levels of reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase activity (SOD) and the end product of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) were assayed using colorimetric method as described by Jollow et al. (1974), Misra and Fridovich (1972) and Wilbur et al. (1949) respectively.



**Fig. 1.** Time-course of the change in systolic blood pressure (SBP) of anaesthetized animals that received intravenous injection of *Terminalia superba* aqueous extract at different concentrations. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of five rats. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. the initial value (at time 0).

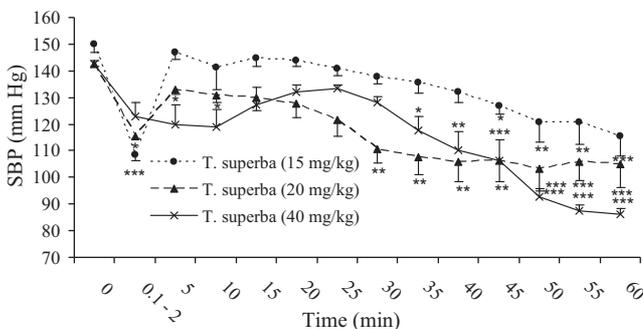
2.4. Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test was used for statistical evaluation.  $P$  values less than 0.05 were considered significant.

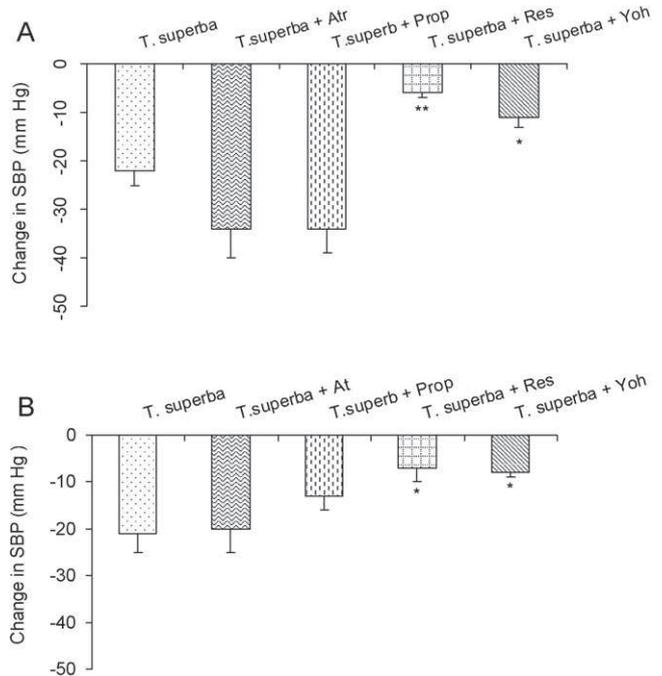
3. Results

3.1. Effect of acute injection of *Terminalia superba* on blood pressure and heart rate

The intravenous administration of the vehicle had no effect on blood pressure and heart rate (data not shown). The injection of the extract of *Terminalia superba* in NTR or in GHR resulted in a significant and rapid reduction of systolic blood pressure (SBP). As shown in Fig. 1, *Terminalia superba* reduced the SBP in NTR by  $11 \pm 3\%$ ,  $23 \pm 4\%$  and  $18 \pm 2\%$  at the doses of 10, 15 and 20 mg/kg, respectively. The first and rapid hypotensive response was followed by a transient increase of SBP, after that, SBP decrease progressively, the reduction being significant until the end of observation period at the dose of 15 mg/kg. Fig. 2 shows that in GHR, the plant extract induced an immediate decrease in SBP of  $28 \pm 2\%$ ,  $19 \pm 1\%$  and  $14 \pm 3\%$ , at the doses of 15, 20 and 40 mg/kg, respectively. The late decrease in SBP was dose-related. Indeed, at the end of the observation period (60 min), the fall in SBP was  $23 \pm 6\%$ ,  $26 \pm 6\%$  and  $39 \pm 1\%$ , at the doses of 15, 20 and 40 mg/kg, respectively. The intravenous administration of the extract did not significantly modified heart rate neither in NTR nor in GHR (data not shown).



**Fig. 2.** Effects of the aqueous extract of *Terminalia superba* on the systolic blood pressure (SBP) of glucose-loaded hypertensive rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of five rats \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. the initial value (at time 0).



**Fig. 3.** The maximal immediate changes (A) and later changes (60 min, after extract injection) (B) in systolic blood pressure (SBP) in anaesthetized animals that received intravenous injection of *Terminalia superba* aqueous extract (15 mg/kg). Some animals received an additional pretreatment of atropine (Atr, 1 mg/kg), propranolol (Prop, 100  $\mu$ g/kg), or yohimbine (Yoh, 0.1 mg/kg) 5 min prior to plant extract administration. Reserpine (Res, 5 mg/kg) were administered 3 days before the plant extract administration. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of five rats \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. the value without antagonisms (*Terminalia superba*).

3.2. Mechanisms of the hypotensive effect of *Terminalia superba*

The effects of two antagonists, atropine and propranolol, on the hypotensive action of the stem bark aqueous extract of *Terminalia superba* (15 mg/kg) were investigated. As shown in Fig. 3, the pre-treatment of anaesthetized NTR with atropine sulphate (1 mg/kg) or propranolol (100  $\mu$ g/kg) did not significantly affected the first and late hypotensive effect of the plant extract. By contrast, pre-treatment with reserpine or yohimbine significantly reduced the immediate hypotensive effect of the extract in NTR. The immediate reduction of blood pressure after reserpine or yohimbine pre-treatment was respectively  $6 \pm 1\%$  and  $11 \pm 2\%$  vs.  $23 \pm 4\%$  in NTR without pre-treatment ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively).

The later reduction of blood pressure induced by *Terminalia superba* (15 mg/kg) was also abolished by reserpine and yohimbine pre-treatment (Fig. 3).

3.3. Antihypertensive effects of *Terminalia superba*

Table 1 shows that subchronic administration of D-glucose for 3 weeks resulted in a significant increase in SBP (+20%) and HR (+10%) as compared to normotensive rats. The aqueous extract of *Terminalia superba* at 50 and 100 mg/kg significantly blunted the increase in SBP in GHR but also reduced the SBP level at a value below to that of NTR. Comparable results were obtained with nifedipine (10 mg/kg). Treatment with *Terminalia superba* significantly blunted the increase in heart rate in GHR at the dose, as well as nifedipine 10 mg/kg.

3.4. Effect of *Terminalia superba* on oxidative stress biomarkers

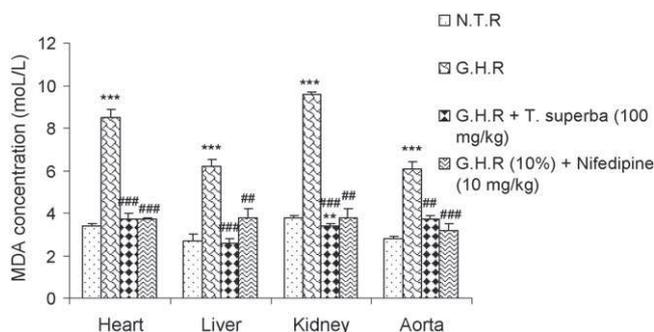
As shown in Fig. 4, MDA levels were significantly higher in heart, liver, kidney and aorta tissues of D-glucose-treated rats as com-

**Table 1**

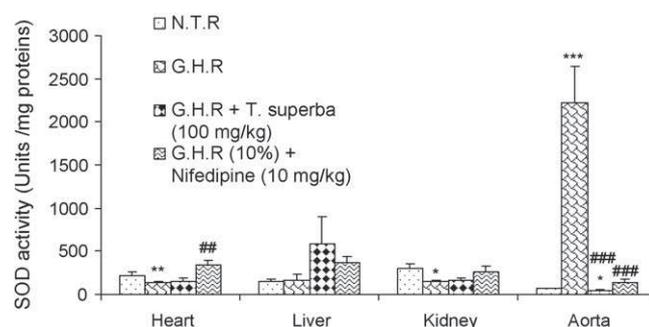
Effects of the aqueous extract of *Terminalia superba* on the heart rate and blood pressure of glucose-fed rats.

	NTR	GHR	GHR + extract 50 mg/kg/day	GHR + extract 100 mg/kg/day	GHR + nifedipine 10 mg/kg/day
SBP (mm Hg)	123.4 ± 0.2	148.5 ± 2.7***	107.4 ± 0.7***,###	91.2 ± 1.4***,###	100.7 ± 1.6***,###
DBP (mm Hg)	105.0 ± 3.0	130.0 ± 3.7***	90.0 ± 2.1***,###	85.8 ± 3.8***,###	89.0 ± 1.3***,###
HR (beats/min)	365.8 ± 5.7	402.1 ± 7.9**	393.0 ± 4.5*	347.8 ± 3.8##	340.7 ± 12.1###

Values are mean ± S.E.M. (n = 5 rats/group). Systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 different from normotensive rats (NTR); #P < 0.05; ##P < 0.01; ###P < 0.001 different from glucose hypertensive rats (GHR). Some rats received glucose (10%) and the aqueous extract of *Terminalia superba* (100 mg/kg/day) or glucose (10%) and nifedipine (10 mg/kg/day) for 3 weeks.



**Fig. 4.** Effects of *Terminalia superba* extract on tissues malondialdehyde levels in different experimental rats. Each bar represents the mean ± S.E.M. of five rats \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 vs. normotensive rats (NTR); ##P < 0.01 ###P < 0.001 vs. glucose hypertensive rats (GHR). Some rats received glucose (10%) and the aqueous extract of *Terminalia superba* (100 mg/kg/day) or glucose (10%) and nifedipine (10 mg/kg/day) for 3 weeks.

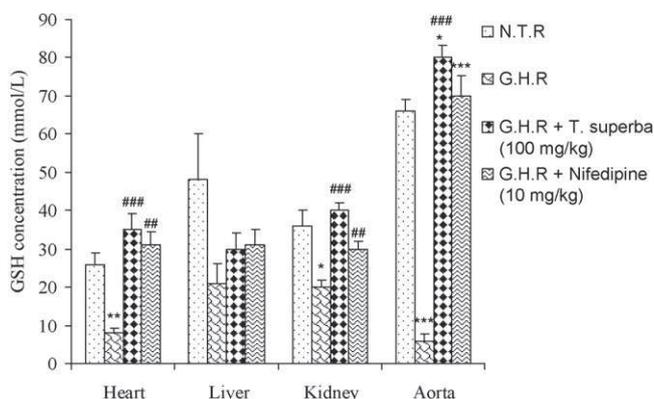


**Fig. 6.** Effects of *Terminalia superba* extract on tissues superoxide dismutase activity in different experimental rats. Each bar represents the mean ± S.E.M. of five rats \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 vs. normotensive rats (NTR); ##P < 0.01; ###P < 0.001 vs. glucose hypertensive rats (GHR). Some rats received glucose (10%) and the aqueous extract of *Terminalia superba* (100 mg/kg/day) or glucose (10%) and nifedipine (10 mg/kg/day) for 3 weeks.

pared to NTR. Treatment with *Terminalia superba* (100 mg/kg/day) for 3 weeks significantly prevented the rise in tissue MDA levels. The same effect was observed with nifedipine (10 mg/kg/day).

Fig. 5 shows that reduced glutathione (GSH) levels were significantly decreased in heart, kidney and aorta of GHR compared to NTR. Likewise, the extract (100 mg/kg) like nifedipine significantly prevented the decrease in GSH levels.

Glucose-fed animals exhibited a significant decrease in heart and kidney SOD activity as compared to NTR (Fig. 6) whereas no difference was observed in the liver. Conversely, glucose-induced hypertension was associated with a dramatical increase in aortic SOD activity, the values (U/mg proteins) rising from 65.00 ± 6.22 in NTR to 2222.80 ± 417.21 in GHR. Treatment with the plant extract prevented the increase in SOD activity in the aorta but had no effects in the heart and kidneys from GHR. Nifedipine treatment



**Fig. 5.** Effects of the aqueous extract of *Terminalia superba* on the reduced glutathione concentration. Each bar represents the mean ± S.E.M. of five rats \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 vs. normotensive rats (NTR); ##P < 0.01; ###P < 0.001 vs. glucose hypertensive rats (GHR). Some rats received glucose (10%) and the aqueous extract of *Terminalia superba* (100 mg/kg/day) or glucose (10%) and nifedipine (10 mg/kg/day) for 3 weeks.

also reduced the increase in aorta SOD activity and significantly blunted the decrease in SOD activity in the heart whereas it had no effect in the kidney.

**4. Discussion**

This study demonstrates for the first time that the aqueous extract of the stem bark of *Terminalia superba* induces an acute hypotensive effect and an antihypertensive effect in glucose-induced hypertension. Moreover, the antihypertensive effect of the extract is associated with antioxidant properties in hypertensive rats.

High blood pressure is a major risk for stroke and for coronary and renal diseases. Abnormal glucose metabolism (especially the early stage of abnormal glucose metabolism) frequently accompanies hypertension, and this association is well documented as the insulin resistance syndrome (Ferrannini et al., 1987). In patients with borderline to moderate hypertension, hypertension associated with impaired glucose tolerance is closely related to endothelial dysfunction (Tomiyama et al., 2000). Accordingly, experimental studies demonstrated that glucose and fructose contributes to the rise in blood pressure (Hwang et al., 1987; El Midaoui and De Champlain, 2002) by several mechanisms such as dyslipidemia (Reaven and Ho, 1991), sodium retention and fluid volume expansion (Baum, 1987), stimulation of the sympathetic nervous system (Buñag et al., 1983), endothelial dysfunction (Tomiyama et al., 2000) or increase in oxidative stress (Cai and Harisson, 2000). In the present study, we used the glucose-induced hypertension model in rats to evaluate the antihypertensive effects of the aqueous extract of *Terminalia superba*. With this experimental model, the administration of 10%-glucose solution in drinking water induced a significant increase in systolic and diastolic blood pressure. The hypertension induced procedure was as described by El Midaoui and De Champlain (2002). These authors induced experimental hypertension in normal rats with a diet of a 10% D-glucose solution as drinking water after a period of 3 weeks. Interestingly, this model that leads to a moderate hypertension as compared

to genetic hypertension and the salt-induced hypertension model is therefore clinically relevant for mimicking borderline to moderate hypertension associated with impaired glucose tolerance in humans (Tomiya et al., 2000).

Our results demonstrated that the acute i.v. injection of the aqueous extract of *Terminalia superba* led to an acute decrease in blood pressure followed by a second decrease in blood pressure that persists at least 1 h. This later phase of the hypotensive effect is observed at the dose of 15 mg/kg in NTR (15 mg/kg) and at all doses studied in GHR (15, 20 and 40 mg/kg). To determine the mechanisms involved in the acute effect of the extract, we pre-treated rats with different drugs. Our data revealed that nor the muscarinic receptor antagonist atropine neither the beta-blocker propranolol influenced the effect of the plant extract. By contrast, the alpha 2 receptor antagonist yohimbine as well as reserpine decreased both the immediate and the late fall in blood pressure. At the dose used in this study (low dose), yohimbine is able to block the pre-synaptic alpha 2 receptor. The effect of yohimbine at a small dose was found to be due to an increase in sympathetic tone and to a decrease in vagal tone. Some data reported suggest that yohimbine could impair central cardiovascular regulation by acting on the baroreceptor reflex pathway. Indeed, intracisternal administration of yohimbine at small doses reduced the tachycardiac and pressor responses to carotid occlusion, reduced the bradycardia produced by intravenous norepinephrine (Andréjak et al., 1983). The fact that yohimbine decreased the hypotensive effect suggests that the extract of *Terminalia superba* is able to activate these receptors thereby inhibiting the release of norepinephrine by peripheral sympathetic nerve endings. In addition, results obtained after reserpine which has the ability to deplete catecholamines from peripheral sympathetic nerve (Mandela et al., 2010) argue for an inhibition of the orthosympathetic nervous system by the plant extract as a contributing mechanism for blood pressure reduction. Nevertheless, a direct vasodilator effect cannot be excluded since we recently demonstrated that the aqueous extract has an endothelium-independent relaxing activity on isolated vessels (Tom et al., 2010).

Our study reports that subchronic oral treatment with the extract prevented the rise in blood pressure of rats subjected to high glucose diet. The effect was more important and significantly different at the dose of 100 mg/kg than at 50 mg/kg and comparable to that induced by the calcium-channel inhibitor nifedipine. The mechanisms involved in this beneficial effect might involve the inhibition of the orthosympathetic activity as suggested by the results of the i.v. study. However, other mechanisms might also participate including the reduction of oxidative stress by the plant extract. Indeed, it is well-established that high sugar consumption is associated to increased tissue production of reactive forms of oxygen (El Midaoui and De Champlain, 2002). Moreover, in hypertensive patients, lower concentrations of antioxidants have been documented (Rodrigo et al., 2007). Accordingly, our results showed that several biomarkers of oxidative stress are impaired in glucose-fed rats. Reduced glutathione (GSH) is the most abundant antioxidant endogenously produced in eukaryotic cells that interacts with activated oxygen species, thereby preventing the oxidation of organic substrates (proteins, DNA, fatty acids). It is used as a substrate of glutathione peroxidase (GPx). GSH is also a superoxide radical scavenger and it protects thiol protein groups required for maintaining the integrity of cell against oxidation (Stein et al., 1989). These actions are responsible for the maintenance of cellular redox state. Consistent with a decrease in the antioxidant defences in glucose-induced hypertensive rats, our data reported a decrease in GSH levels in heart, kidney, liver and aorta. Likewise, we measured the specific activity of superoxide dismutase (SOD), the enzyme that catalyzes the dismutation of the  $O_2^-$  free radical in water and hydrogen peroxide (Faraci and Didion,

2004). Our data revealed decreased SOD activity in heart and kidney from hypertensive rats but conversely increased activity in the aorta. In response to oxidative stress, SOD behaves in two different ways. Initially, the body reacts during a moderate oxidative stress by overexpression of SOD (e.g. exercise). If the stress persists and produces a massive toxic of oxygen active species, SOD will be destroyed and its concentration will drop. Paradoxically, an excessive concentration of SOD may be dangerous because, in this case, it is the basis of an overproduction of hydrogen peroxide (paradoxical effect of antioxidants) (Levesque, 2006). Notably, the increased in SOD activity was previously reported in rats aorta in the same model of hypertension (El Midaoui and De Champlain, 2002). We can hypothesize that the heart and the kidney were more affected by the oxidative stress. However the excessive increase of SOD activity in aorta of glucose hypertensive rats is dangerous and related to an overproduction of hydrogen peroxide. The increase in aortic SOD activity is related to the dramatic increase in  $O_2^{\bullet-}$  production that has been previously demonstrated in glucose-fed rats (El Midaoui and De Champlain, 2002). In addition, we measured malondialdehyde (MDA) levels as indices of lipid peroxidation resulting from the reaction of activated oxygen species with membrane fatty acids are divided into sub-product who is MDA (Nayeemunisa and Kumuda, 2003). The data showed a significant increase in MDA levels in heart, kidneys, liver and aorta. Of importance, the subchronic treatment with the aqueous extract of *Terminalia superba* significantly prevented the fall in GSH and the increase in MDA levels. The treatment reduced the aortic SOD activity but did not affected heart, liver and heart SOD activity. Overall results argue for antioxidative properties of *Terminalia superba* as contributing factors for its beneficial effects in hypertension. Because no difference was observed between nifedipine and the plant extract concerning the reduction of blood pressure and oxidative stress biomarkers, the beneficial effects of *Terminalia superba* might be related to the reduction of blood pressure alone. However, the extract might also exert its beneficial effects through an improvement of insulin sensitivity as suggested by the anti-diabetic effect of *Terminalia superba* in streptozotocin-induced diabetic rats (Kamtchouing et al., 2005). Finally, because recent data indicated that nifedipine exerts anti-oxidative effects and decreases the accumulation of advanced glycation end products (Yamagishi, 2010), an intrinsic antioxidant activity of the extract of *Terminalia superba* is not excluded. Since *Terminalia superba* is rich in polyphenols (Momo et al., 2009), this activity can be explained by the polyphenols contain in this plant extract.

## 5. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates the hypotensive as well as the antihypertensive effects of a crude aqueous extract of the stem bark of *Terminalia superba*. Our data validate the use of this extract as traditional medicine against hypertension in Cameroon. The effect on blood pressure is, at least in part, due to a modulation of the orthosympathetic nervous system and to the improvement of the antioxidant status. Further studies are from now needed to identify the bioactive compounds responsible for the cardiovascular effects of *Terminalia superba*.

## Author contributions

Esther Ngo Lemba Tom performed the experiments and wrote the paper; Danielle Claude Bilanda provided technical assistance in carrying out biochemical assays, Orelie Mtopi Bopda helped in recording of cardiovascular parameters, Désiré Dzeufiet contributed some reagents, Corinne Girard, Alain Berthelot and Céline Demougeot improved the mechanism study and cor-

rected the manuscript, Théophile Dimo designed and supervised the study.

### Acknowledgements

This study was supported by funds from the Academy of Science for Developing World (Grant No 06 020/RG/BIO/AF/AC – UNESCOFR: 3240144852). The authors thank Pr. Pierre Kamtchouing for the provision to carry out a part of this study.

### References

- Adjanohoun, J.E., Aboukakar, N., Dramane, K., Ebot, M.E., Ekpere, J.A., Enow-Orock, E.G., Focho, D., Gbile, Z.O., Kamanyi, A., Kamsu, K.J., Keita, A., Mbenkum, T., Mbi, C.N., Mbiele, A.L., Mbome, I.L., Mubiru, N.K., Nancy, W.L., Nkongmeneck, B., Satabu, B., Sofowora, A., Tamze, V., Wirmum, C.K., 1996. Traditional medicine and pharmacopoeia. In: Contribution to Ethnobotanical and Floristic Studies in Cameroon. Centre de Production de Manuels Scolaires, Porto-Novo (Rep. Du Benin), p. 133.
- Andréjak, M., Ward, M., Schmitt, M., 1983. Cardiovascular effects of yohimbine in anesthetized dogs. *European Journal of Pharmacology* 94, 219–228.
- Baum, M., 1987. Insulin stimulates volumes absorption in rabbit proximal convoluted tubule. *Journal of Hypertension* 10, 379–388.
- Buňag, R.D., Tomita, T., Sasaki, S., 1983. Chronic sucrose ingestion induced mild hypertension and tachycardia in rats. *Hypertension* 5, 218–225.
- Cai, H., Harisson, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. *Circular Research* 87, 840–844.
- Dimo, T., Nguielefack, T.B., Tan, P.V., Yewah, M.P., Dongo, E., Rakotonirina, S.V., Kamany, A., Bopelet, M., 2003. Possible mechanisms of action of the neutral extract from *Bidens pilosa* L. Leaves on the cardiovascular system of anaesthetized rats. *Phytotherapy Research* 17, 1135–1139.
- El Midaoui, A., De Champlain, J., 2002. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by  $\alpha$ -lipoic acid. *Hypertension* 39, 303–307.
- Faraci, F.M., Didion, S.P., 2004. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 24, 1367–1373.
- Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonnadonna, R., Giorico, M.A., Oleggini, M., Graziadei, L., Pedrinelli, R., Brandi, L., Bevilacqua, S., 1987. Insulin resistance in essential hypertension. *National England Journal of Medicine* 317, 350–357.
- Groulez, J., Wood, P.J., 1985. *Terminalia superba*. A Monograph. Centre Technique Forestier Tropical, France and Commonwealth Forestry Institute, England.
- Hwang, I.S., Ho, H., Hoffman, B.B., Reaven, G.M., 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10, 512–516.
- Jollow, D., Mitchell, L., Zampaglione, N., Gillete, J., 1974. Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic intermediate. *Pharmacology* 11, 151–169.
- Kamtchouing, P., Mariam, S.K., Dzeuffiet, D.P.-D., Tédong, L., Asongalem, E.A., Dimo, T., 2005. Anti-diabetic activity of methanol/methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 306–309.
- Kearney, P.M., 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365, 217–223.
- Levesque, E., 2006. Les superoxydes dismutases (SOD's). *Actualités Image*, 2.
- Mandela, P., Chandley, M., Xu, Y.-Y., Zhu, M.-Y., Ordway, G.A., 2010. Reserpine-induced reduction in norepinephrine transporter function requires catecholamine storage vesicles. *Neurochemistry International* 56, 760–767.
- Misra, H., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine to adrenochrome and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biology and Chemistry* 247, 3170–3175.
- Momo, C.E.N., Ngwa, A.F., Dongmo, G.I.F., Oben, T.E., 2009. Antioxidant properties and  $\alpha$ -amylase inhibition of *Terminalia superba*, *Albizia* sp., *Cola nitida*, *Cola odorata* and *Harungana madagascarensis* used in the management of diabetes in Cameroon. *Journal of Health Science* 55, 732–738.
- Momo, E.N., Dongmo, G.F., Oben, J.E., 2008. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the aqueous extract of *Terminalia superba* in alloxan diabetic rats. *Journal of Clinical Lipidology* 2, 122.
- Nayeemunisa, Kumuda, M.R., 2003. Cardioprotective effects of *Cichorium intybus* in ageing myocardium of albino rats. *Current Science* 84, 94–943.
- Reaven, G.M., Ho, H., 1991. Sugar-induced hypertension in Sprague–Dawley rats. *American Journal of Hypertension* 4, 610–614.
- Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., Guichard, C., Bachlet, J.P., 2007. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertension Research* 30, 1159–1167.
- Stein, H.J., Esplugues, J., Whittle, B.J.R., 1989. Direct cytotoxic effect of oxygen free radicals on the gastric mucosa. *Surgery* 106, 318–324.
- Tom, E.N.L., Girard, C., Dimo, T., Mbafor, T.J., Berthelot, A., Demougeot, C., 2010. Vasorelaxant effects of extracts of the stem bark of *Terminalia superba* Engler & Diels (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 127, 335–340.
- Tomiya, H., Kimura, Y., Okazaki, R., Kushi, T., Abe, M., Kuwabara, Y., Yoshida, H., Kuwata, S., Kinouchi, T., Doba, N., 2000. Close relationship of abnormal glucose tolerance with endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension* 36, 245–249.
- Vankatesk, V., Sharma, J.D., Raka, K., 2002. A comparative study of effects of alcoholic extracts of *Sapindus emarginatus*, *Terminalia bellerica*, *Cuminum cyminum* and *Allium cepa* on reproductive organs of male albino rats. *Asian Journal of Experimental Science* 16, 51–63.
- Wansi, J.D., Lallemand, M.-C., Chiozem, D.D., Toze, F.A.A., Mbaze, L.M., Naharkhan, S., Iqbal, M.C., Tillequin, F., Wandji, J., Fomum, Z.T., 2007.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). *Phytochemistry* 68, 2096–2100.
- Whitworth, J.A., 2003. World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension* 11, 1983–1992.
- Wilbur, K.M., Bernheim, F., Shapiro, O.W., 1949. Determination of lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 24, 305–310.
- Yamagishi, S., 2010. Calcium antagonists: current and future applications based on new evidence. *Calcium antagonists and diabetes*. *Clinical Calcium* 20, 77–82.