

Formulation des gélules à base d'extrait aqueux de feuilles de *Catharentus roseus* et évaluation de leur activité sur l'hypertension induite chez le rat par le L-NAME.

DJOKO Ernest¹, Steve ASAH BAH Tabi¹, MECTHI Mireille²,
DIMO Théophile²

1- Laboratoire de Pharmacie Galénique ; Université des Montagnes - BP 208 Bangangté, Cameroun

2- Laboratoire de Physiologie - Université de Yaoundé 1 – Yaoundé, Cameroun

Received 25 August 2023; Accepted 11 September 2023

RESUME

L'hypertension est une des principales causes de décès dans le monde. De nombreuses molécules et plantes sont utilisées avec succès dans sa prise en charge. *Catharentus Roseus* est une plante de la famille des apocynacées habituellement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de nombreuses pathologies dont l'hypertension.

L'objectif de la présente étude était de mettre au point des gélules à base de l'extrait aqueux de *Catharentus Roseus* et d'en évaluer l'activité anti hypertensive.

Les feuilles de *Catharentus Roseus* ont été broyées dans l'eau et le jus obtenu a été filtré sur papier wattman N° 1 puis séché à l'étuve à 50° C ; les caractères physicochimiques de l'extrait sec ont été établis puis l'extrait a été utilisé comme principe actif pour la fabrication de gélules conformes aux exigences de la pharmacopée européenne.

Pour l'évaluation de l'activité anti hypertensive, l'hypertension a été induite à des rats de souche Wistar par administration du L-Nitroarginine méthylester (L-NAME) à 25mg/kg en intrapéritonéal pendant 10 jours. Puis certains rats ont reçu par gavage le contenu des gélules équivalent à 200mg / kg /j extrait, d'autres 100 mg/Kg/j pendant 10 jours. Un lot témoin positif à reçu en parallèle 25 mg/Kg/j de Captopril pendant 10 jours pendant qu'un lot témoin négatif recevait aussi de l'eau dans le même temps.

A la fin du traitement la tension artérielle, la fréquence cardiaque, le profil lipidique, les marqueurs de la toxicité rénale et hépatique, les marqueurs du stress oxydatif et la microstructure de certains organes ont été évalués.

Le traitement des rats par L-Name a provoqué une augmentation significative de la pression sanguine, une dyslipidémie (hypertriglycéridémie), un stress oxydatif (augmentation du taux de transaminases, d'acide urique, de bilirubine et de créatinine). L'extrait à 100 mg/Kg et à 200 mg/Kg ainsi que le Captopril ont corrigé les effets de L-NAME.

Ces résultats permettent de comprendre le bienfondé de l'utilisation de *Catharentus roseus* dans le traitement de l'hypertension en médecine traditionnelle. Les gélules préparées pourraient être améliorées et évoluer vers un médicament traditionnel amélioré (MTA) utile pour la prise en charge de l'hypertension artérielle.

Mots clés: *Catharentus roseus*, Hypertension, L-NAME, rats, Formulation, MTA.

I. Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès dans le monde. L'hypertension artérielle occupe la première place parmi ces maladies et demeure un problème majeur de santé publique aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement [1]. En 2010, 31% d'adultes dans le monde souffraient d'hypertension. Ceci représentait une augmentation de 5 % de la prévalence mondiale entre 2000 et 2010 [2]. *Catharentus roseus* est une plante de la famille des apocynacées et qui est très utilisée en médecine traditionnelle pour la prise en charge de nombreuses pathologies. Les recherches scientifiques ont montré qu'elle possède des propriétés anti tumorales [3], anti diurétiques [4] hypoglycémiant [5] anti bactériennes [6], anti hypertenseur [7], antifongique [8,9]. La présente étude avait pour objectif de mettre au point des gélules à base de l'extrait aqueux de *Catharentus roseus* et d'en évaluer l'activité sur l'hypertension induite au rat par le L-NAME.

II. Methodologie

1- Préparation de l'extrait

Les feuilles fraîches de *Catharentus Roseus* ont été lavées et broyées. Après décoction dans l'eau pendant 30 mn, le jus a été séparé, et filtré sur papier whatmann N° 1, puis l'extrait aqueux a été lyophilisé et le rendement déterminé.

2- Propriétés physicochimiques de l'extrait.

Les caractères physicochimiques (couleur, odeur, solubilité) ont été déterminés puis sur 50 ml d'une solution aqueuse à 1mg / ml les principaux groupes phytochimiques ont été déterminés à l'aide des réactifs usuels [10]. Par ailleurs, les alcaloïdes à structure indolique ont été mis en évidence puis dosés par la méthode décrite par Sreevidya et Mehrotra en 2003 [11]. En effet, en milieu nitrique et en présence de bismuth, la thio-urée forme un complexe jaune dont l'intensité obéit à la loi de Beer Lambert dans les concentrations de 0,06 à 50 mg/ml, avec une absorption maximale à 435 nm.

3- Fabrication et contrôle des gélules

a) Stabilisation de l'extrait

Le lyophilisat obtenu était très hygroscopique et ne se prêtait pas à la fabrication des formes galéniques sèches. Pour améliorer la stabilité de l'extrait, il a été intimement mélangé avec de la silice colloïdale, suivant le modèle de Gallo et al [12].

b) Détermination de la dose unitaire

La préparation administrée par le tradipraticien était obtenue par décoction de 80 g de feuilles fraîches dans 2 litres d'eau chaude pendant 30 minutes. A la fin de sa préparation, le tradipraticien obtenait 1,5 litres de solution et donnait au malade un verre (250 ml) 3 fois par jour.

Sur cette base nous avons lyophilisé 1,5 l de soluté du tradipraticien et divisé la masse obtenue par 6 pour avoir la masse de lyophilisat à administrer à chaque prise.

c) Mise en gélules et contrôles sommaires.

La stabilisation de l'extrait de *Catharentus roseus* par la silice a été suivi de la détermination de la taille des gélules et du remplissage suivant le protocole de la pharmacopée européenne XI^e édition; l'opération était réalisée sur un gélulier semi-automatique de 100 et était suivie du contrôle.

4- Evaluation de l'activité anti hypertensive

a) Protocole.

Un ensemble de 25 rats normo tendus de souche Wistar ont été choisis au hasard et divisés en 5 groupes de 5 rats (tableau 1). Du 1^{er} au 10^e jour, le premier groupe Témoin Neutre (TN) a reçu en injection 0,1ml d'eau / kg de poids pendant que les 20 autres recevaient en intra péritonéal L-NAME à 25mg / kg de poids corporel. Du 11^e au 24^e jour le groupe TN a continué à recevoir l'eau à 0,1ml / kg avec en plus par voie orale une solution de gélule vide à raison de 1ml / 100gr de poids corporel. Dans le même temps (11^e au 24^e jour) les autres rats ont continué à recevoir L-NAME à 25mg / kg, avec en complément de l'eau distillée à 1ml / kg pour le groupe Témoin Positif (TP), du Captopril à 25mg / kg pour le groupe Captopril (CP), de la poudre de gélule équivalent à 100mg d'extrait par kg de poids pour le groupe Catharenrus100 (CT100), de la poudre de gélule équivalent à 200mg d'extrait / kg de poids pour le groupe Catharenrus200 (CT200).

Tableau 1: Protocole d'administration des produits aux animaux.

Groupe	Nombre de Rats	J ₀	J ₁₁	J ₂₄
T N	5	Eau 0,1ml / kg	Eau 0,1ml /kg + Sol. Gélules 1ml / 100gr	
TP	5	L-Name 25mg / kg	L-NAME 25mg / kg + Eau distillée 1ml / 100gr	
CP	5	L-Name 25mg / kg	L-Name 25mg / kg + Captopril 25mg / kg	
CT100	5	L-Name 25mg / kg	L-Name 25mg / kg + Extrait 100mg/kg	
CT200	5	L-Name 25mg / kg	L-Name 25mg / kg + Extrait 200mg / kg	

A la fin du traitement, des échantillons de sang étaient prélevés au niveau des carotides dans des tubes secs puis laissés 30 minutes à la température du laboratoire ; le sérum formé était séparé et conservé à -20° C ; le cœur, le foie, l'aorte, les reins et le cerveau étaient rapidement prélevés et débarrassés de tissu adipeux avant d'être pesés. Pour chaque organe une partie du prélèvement était conservée dans du formol pour les lames histologiques. Par ailleurs, pour les analyses biochimiques, le cœur et l'aorte étaient transformés en homogénat à 20% dans la solution de Mac Even alors que le foie et les reins étaient mis dans le tampon tris. Après centrifugation à 3000 g pendant 30 minutes le surnageant était recueilli et conservé à -20 °C pour les analyses biochimiques.

b) Examens biologiques

Les échantillons de sérum ont été utilisés pour doser les marqueurs hépatiques (bilirubine, alanine aminotransferase ou ALAT, aspartate aminotransferase ou ASAT,), les marqueurs rénaux (créatinine, acide urique) et le profil lipidique, en utilisant les kits de test Biolab. Le stress oxydatif a été évalué en mesurant les niveaux de malonyldiadhehyde (MDA), de catalase (CAT), super oxyde dismutase (SOD) et d'oxyde d'azote (NO).

c) Examens histopathologiques

Les reins, le foie, le cœur et le segment thoracique de l'aorte ont été fixés et traités pour obtenir des sections d'enrobage en paraffine de 4 µm. Les sections ont été colorées à l'hématoxyline-Eosine. L'épaisseur du milieu de la tunique de l'aorte a été mesurée dans 5 sections de l'aorte thoracique dans chaque groupe.

d) Analyse statistique

Toutes les données ont été traitées dans Microsoft Excel Graph Pad. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard. Les niveaux de significativité ont été interprétés à $P \leq 0,05$.

III. RESULTATS

1- L'extrait

La plante utilisée (Figure 1) a été récoltée à Yaoundé et identifiée à l'Herbier National



Figure 1 : *Cathartus roseus*

Les 3328 g feuilles utilisées ont donné 187,2g de lyophilisat, soit un rendement de 5,62%. L'extrait lyophilisé obtenu était brun, d'aspect cristallin fin et très hygroscopique ; il avait un goût amer prononcé et une teneur en eau de 2 %. Comme le montre le tableau 2 L'extrait contenait des alcaloïdes, des terpenoïdes, des phénols, des tanins, des saponines, des flavonoïdes et des protéines.

Tableau 2 : Résultat du criblage phytochimique

	Test	Resultat
Alcaloïdes	Draggendorf / Mayer	+++
Terpenoïdes	H ₂ SO ₄	+++
Phenols and tannins	FeCl ₃	+++
Sucres réducteurs	Réactif de Fehling	-
Saponines	Indice de mousse	+++
flavonoïdes	HCl et Mg	+++
Quinines	NaOH 1%	-
Proteïnes	HgCl ₂	++
Steroïdes	Chloroforme et H ₂ SO ₄	-

La teneur en alcaloïdes était de $67,69 \pm 0,003$ mg équivalent atropine par gramme d'extrait.

Comme le montre le tableau 3, il a fallu atteindre un rapport silice / extrait de 1/2 pour bloquer l'hygroscopicité du lyophilisat. C'est ce rapport qui a été choisi pour traiter l'extrait avant la mise en capsules.

Tableau 3 : Essai de stabilisation de l'extrait

	A	B	C	D	E
Extrait (mg)	500	500	500	500	500
Silice Colloïdale (mg)	0	125	250	300	350
Jour 0	Poudre	Poudre	Poudre	Poudre	Poudre
Jour 1	gomme	Poudre humide	Poudre	Poudre	Poudre
Jour 2		pate	Poudre	Poudre	Poudre
Jour 3			Poudre	Poudre	Poudre
Jour 4			Poudre	Poudre	Poudre
Jour 5			Poudre	Poudre	Poudre
Jour 6			Poudre	Poudre	Poudre
Jour 7			Poudre	Poudre	Poudre

2- Les gélules

La prise de 250 ml du tradipraticien correspondait à 387 mg de lyophilisat. La dose journalière d'extrait (387mg x 3) a donc été arrondie à 1200 mg (soit 400 mg 3 fois par jour). La figure 2 montre les gélules N°0 contenant 200mg d'extrait soit 300mg de poudre stabilisée préparées pour être administrées à l'adulte à raison de 2 unités 3fois par jour.



Figure 2 : Gélules de *Catharentus roseus*

Le tableau 4 donne la masse du contenu des gélules prélevées pour le test d'uniformité de masse. La masse moyenne était de 0,402 g et les limites extrêmes de 0,371g et 0,433 g. Aucune valeur n'était hors limites.

Tableau 4: test d'uniformité de masse

Numéro d'échantillon	Masse (g)	Numéro d'échantillon	Masse (g)
1	0,395	11	0,397
2	0,410	12	0,393
3	0,410	13	0,395
4	0,405	14	0,410
5	0,400	15	0,405
6	0,396	16	0,401
7	0,410	17	0,402
8	0,400	18	0,400
9	0,400	19	0,410
10	0,402	20	0,407
Masse moyenne (g)		0,402	
e%		7,5 % (soit 0,031g)	
Intervalle Acceptable (g)		0,371 - 0,433	

3) Effet de *Catharentus roseus* sur la tension et le rythme cardiaque

Le tableau 5 montre l'effet du lyophilisat sur les paramètres hémodynamiques. Par rapport au groupe TN, le groupe TP a présenté des paramètres plus élevée de 60 % (P<0,001) pour la pression diastolique, de 34,93 % (P<0,001) pour la pression systolique, de 49,46 % (P<0,001) pour la Pression Arterielle Moyenne (PAM), et une augmentation non significative de la fréquence cardiaque. L'administration des produits actifs (*Catharentus roseus* et captopril) à différentes doses a réduit ces paramètres par rapport au groupe TP. Pour le captopril la réduction était significative : 46,15 % (P<0,001) pour la pression diastolique, 30,92 % (P<0,001) pour la pression systolique et 40,24 % (P<0,001) la PAM. Le captopril n'a pas réduit la fréquence cardiaque de façon significative.

Formulation des gélules à base d'extrait aqueux de feuilles de *Cathartus roseus* et évaluation ..

Chez les rats ayant reçu l'extrait à 100 mg/Kg la réduction était de 23,68 % (P<0,001) pour la pression diastolique, 28,43 % (P<0,001), pour la pression systolique, 25,52 % (P<0,001) pour la PAM et 13,78 % (P<0,001) pour la fréquence cardiaque.

Tableau 5 : Effet des capsules sur les paramètres hémodynamiques

Parametres	TN	TP	CP	CT100	CT200
Pression systolique (mmHg)	105,49±1,22	142,34±0,52 ^c	98,33±1,11 ³	101,87±2.96 ³	106.49±2.67 ³
Pression diastolique (mmHg)	70.02±1.61	112.31±0.88 ^c	60.49±1.25 ³	85.72±2 ³	59.11±0.61 ³
Pression Arterielle Moyenne (mmHg)	81.84±1.25	122.32±0.60 ^c	73.10±1.05 ³	91.10±1.72 ³	74.91±1.22 ³
Battements cardiaques (BPM)	395.13±1.57	400.67±5.91	382.04±1.58	345.47±8.29 ³	369.64±6.53 ¹

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type, n=5; ^a P< 0.05, ^b P< 0.01, ^c P< 0.001 différence significative comparée au témoin neutre TN; ¹ P< 0.05, ² P< 0.01, ³ P< 0.001 différence significative comparée au TP

Chez les rats traités par 200 mg d'extrait / Kg, la réduction était de 47,37 % (P<0,001) pour la pression diastolique, 25,19 % (P<0,001) pour la pression systolique, 38,76 % (P<0,001) pour la MAP et 7,75 % (P<0,001) pour la fréquence cardiaque.

4) Effet de *Cathartus roseus* sur le profil lipidique.

Les effets de *Cathartus roseus* sur le profil lipidique sont présentés dans le tableau 6, le Témoin positif TP comparé au Témoin neutre TN a eu une augmentation des taux de cholestérol LDL (147,73 % et P<0,001), Triglycérides (72,98 % et P<0,001) cholestérol total (41,05 % et P<0,001), et une diminution du taux de cholestérol HDL (19,21 % et P<0,05). Chez les rats traités par le captopril 'groupe CP) et les capsules test (CT100 et CT200) les taux de cholestérol LDL, triglycérides et cholestérol total ont diminué tandis que les taux de cholestérol HDL ont augmenté chez le contrôle positif (groupe TP) par rapport au contrôle positif (TP). Chez les rats traités par le captopril (groupe C) les taux de LDL cholestérol et de cholestérol total ont diminué respectivement de 50,82 % (P< 0,01) et 17,54 % (P<0,01) tandis que le taux de TG a diminué de façon non significative. Par ailleurs le taux de HDL cholestérol a augmenté de 52,3 % (P<0,001) par rapport au contrôle positif (groupe C). Chez les rats traités avec les capsules tests à 100 mg d'extrait / Kg (groupe CT100) les taux de LDL cholestérol et cholestérol total ont diminué respectivement de 54,69 % (P<0,001) et 24,42 % (P<0,001). Chez les rats traités avec les capsules test à 200 mg d'extrait / Kg les taux de LDL cholestérol, T.G. et C.T. ont diminué de 56,67 % (P<0,001) 27,37 % (P<0,01) et 23,36 % (P<0,001) ; parallèlement le taux de HDL cholestérol a augmenté de façon non significative par rapport au contrôle positif.

Tableau 6 : Effet sur le profile lipidique

Parametres	groupe TN	groupe TP	groupe CP	groupe CT100	groupe CT200
HDL-Chol mg/dl)	38.73±1.23	31.29±2.3 ^a	47.66±1.59 ³	33.39±1.36	34.05±0.71
TG (mg/dl)	39.94±1.41	69.09±4.2 ³	60.77±1.18	62.15±3.62	50.18±1.96 ²
Chol T (mg/dl)	50.72±1.37	71.54±2.42 ³	58.97±2.33 ²	54.07±0.81 ³	54.83±2.15 ³
LDL-Chol mg/dl)	6.65±0.09	16.47±1.26 ³	8.10±1.2 ²	7.46±0.58 ³	7.14±1.74 ³

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type, n=5; ^a P< 0.05, ^b P< 0.01, ^c P< 0.001 différence significative comparée au Témoin neutre (TN); ¹ P< 0.05, ² P< 0.01, ³ P< 0.001 différence significative comparée to the témoin positif (TP).

HDL-Chol: HDL cholesterol, TG: triglycerides, CT: Total Cholesterol, LDL-Chol: LDL Cholesterol.

5- Effet des capsules de l'extrait de *Cathartus roseus* sur certains paramètres du stress oxydatif dans les tissus.

La figure 3 montre que par rapport au contrôle neutre (TN) le L-Name a provoqué une diminution significative du glutathion réduit (GSH) dans tous les organes à l'exception du cerveau. Cette diminution a été évitée par l'administration de captopril et de l'extrait à 100 et à 200 mg/Kg. Comparativement au témoin positif (groupe TP),

Formulation des gélules à base d'extrait aqueux de feuilles de *Cathartus roseus* et évaluation ..

le groupe CP a montré des taux de glutathion réduit (GSH) plus élevé dans l'aorte, le cœur, le foie, les reins respectivement de 99,46 % (P<0,001), 112,23 % (P<0,001), 32,88 % (P<0,05), 52,70 % (P<0,001). A 100 mg/Kg l'extrait a augmenté le GSH de manière significative dans le cœur et le foie respectivement de 34,34 % (P<0,01) et 94,74 % (P<0,001). L'extrait à 200 mg/Kg a augmenté le GSH de manière significative dans l'aorte le cœur, le foie et les reins respectivement de 65,11 % (P<0,001), 105,26 % (P<0,001), 119,21 % (P<0,001) et 34,06 % (P<0,001).

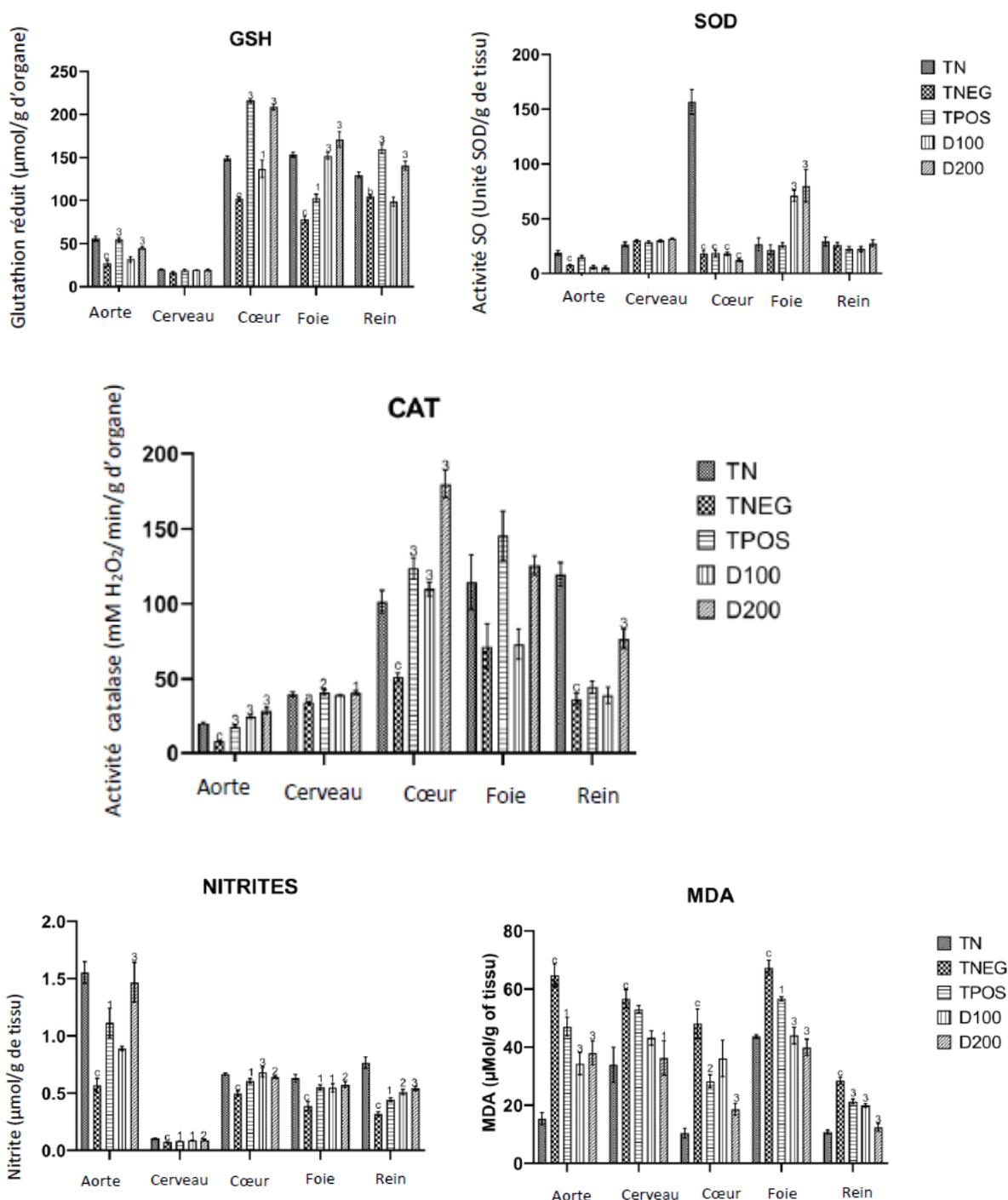


Figure 1: Effect des capsules sur les paramètres du stress oxydatif

TN: Témoin neutre; TNEG: Contrôle négatif; TPOS: Contrôle positif; D100: rats traités avec les capsules de 100 mg/kg; D200: rats traités avec les capsule à 200 mg/kg; MDA: malondialdéhyde; SOD: superoxyde dismutase; GSH: glutathion réduit; CAT: catalase

Formulation des gélules à base d'extrait aqueux de feuilles de Catharentus roseus et évaluation ..

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type SE, n=5; ^a P < 0.05, ^b P < 0.01, ^c P < 0.001 Différence significative par rapport au témoin neutre; ¹ P < 0.05, ² P < 0.01, ³ P < 0.001 Différence significative comparée au contrôle.

Par rapport au témoin positif (CP), le témoin neutre a montré une diminution de la superoxyde dismutase (SOD) dans le cœur et l'aorte, respectivement de 58,96 % (P<0,001) et 88,41 % (P<0,001) ; dans les autres organes, le changement n'était pas significatif.

La diminution a été évitée pour le contrôle positif dans l'aorte de 93,45 % (P<0,05) mais elle est restée inchangée dans le cœur. Les capsules n'ont pas empêché la diminution par rapport au contrôle neutre. Elles ont augmenté l'activité de la SOD de manière significative dans le foie de 226,08 % (P<0,01) et 267,82 % (P<0,001) respectivement.

Le L-NAME a entraîné une diminution significative de la Catalase dans l'aorte, le cerveau, le cœur et les reins respectivement de 61,14 % (P<0,001), 13,34 % (P<0,05), 49,55 % (P<0,001) et 69,32 % (P<0,001). La captopril et les capsules de *Catharentus roseus* ont bloqué cette diminution. Chez le contrôle positif le niveau de catalase dans l'aorte, le cerveau et le cœur a été augmenté respectivement de 126,67 % (P<0,001), 19,39 % (P<0,01) et 141,33 % (P<0,001). L'extrait de *Catharentus roseus* à 100 mg/Kg a augmenté la catalase de manière significative dans l'aorte et le cœur de 221,33 % (P<0,001) et 114,78 % (P<0,001) ; à 200 mg/Kg la catalase est augmentée dans l'aorte le cerveau, le cœur et les reins respectivement de 269,33 % (P<0,001), 18,59 % (P<0,05) ; 251,21 % (P<0,001) et 109,22 % (P<0,001).

Le L-NAME (TP) a provoqué une baisse significative des nitrites au niveau de tous les organes. Le captopril et les gélules de *Catharentus roseus* ont empêché cette diminution à différentes doses.

Par rapport au témoin neutre le captopril a augmenté significativement les nitrites au niveau de l'aorte, du cœur, du foie et des reins de 95,37 % (P<0,05), 22,05 % (P<0,05), 42,83 % (P<0,05) et 40,31 % (P<0,05) respectivement. A 100 mg/Kg l'extrait a augmenté le niveau de nitrites dans le cœur, le foie et les reins respectivement de 37,78 % (P<0,001), 41,54 % (P<0,05) et 61,19 % (P<0,001). A la dose de 200 mg d'extrait/Kg les gélules ont augmenté le niveau de nitrites dans l'aorte, le cerveau, le cœur, le foie et reins respectivement de 157,79 % (P<0,001), 23,77 % (P<0,01), 28,97 % (P<0,001), 84,64 % (P<0,01) et 71,54 (P<0,001).

Par rapport au contrôle neutre le L-Name a provoqué une augmentation significative du niveau de Malondialdéhyde (MDA) dans l'aorte, le cerveau, le cœur, le foie et les reins respectivement de 319,83 % (P<0,001), 66,76 % (P<0,001), 363,5 % (P<0,001), 54,03 % (P<0,001), 164,44 % (P<0,001). Cette augmentation a été évitée par le captopril et la gélule de catharentus à différentes doses. Chez le contrôle positif les niveaux de MDA dans l'aorte, le cœur, le foie et les reins sont diminué de façon significative par rapport au témoin neutre respectivement de 27,32 % (P<0,05), 41,17 % (P<0,01), 15,90 % (P<0,05), 25,18 % (P<0,001).

A 100 mg/Kg l'extrait de *Catharentus roseus* a réduit significativement le niveau de MDA dans l'aorte, le cœur, le foie et les reins respectivement de 46,91 % (P<0,001), 34,63 % (P<0,001), et 29,89 % (P<0,001) ; à 200 mg/Kg l'extrait a réduit significativement le niveau de MDA par rapport au contrôle négatif dans l'aorte, le cerveau, le cœur, le foie et les reins respectivement de 41,23 % (P<0,001), 35,90 % (P<0,05), 61,34 % (P<0,001), 40,70 % (P<0,001), 56,38 % (P<0,001).

6- Effet de *Catharentus roseus* sur quelques marqueurs de la fonction rénale.

Les effets des capsules sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale sont résumés dans le tableau 7.

Par rapport au témoin neutre, le témoin *positif* a montré une augmentation d'acide urique de 160,9 % (P<0,001) et une augmentation de créatinine de 21,8 % (P<0,01).

Par rapport au témoin positif, le captopril a diminué l'acide urique de 35,28 % (P<0,001) et la créatinine de 12,35% (P<0,01).

L'extrait à 100 mg/Kg par rapport au témoin positif, a réduit de façon significative l'acide urique de 30 % (P<0,001) et a diminué la créatinine de façon non significative. Dans les mêmes conditions l'extrait à 200 mg/Kg a réduit significativement l'acide urique de 45,62 % (P<0,001) et la créatinine de 9,89 % (P<0,05).

Tableau 7 : Effet des capsules sur les paramètres rénaux

Parametre	Contrôle TN	Contrôle TP	Contrôle CP	CT100 mg/kg	CT200 mg/kg
Acide urique (mg/L)	24.75 \pm 0.68	64.6 \pm 4.5 ^c	41.8 \pm 2.75 ³	45.2 \pm 0.85 ³	35.13 \pm 1.36 ³
Créatinine (mg/L)	10.07 \pm 0.08	12.27 \pm 0.19 ^c	10.76 \pm 0.14 ²	11.65 \pm 0.40	11.06 \pm 0.33 ¹

Chaque valeur est la moyenne \pm écart type, n=5; ^a P < 0.05, ^b P < 0.01, ^c P < 0.001 différence significative comparée au témoin positif.

7- Effet de Catharentus roseus sur les marqueurs de la fonction hépatique

En effets de l'extrait sur les marqueurs de la fonction hépatique sont rassemblés dans le tableau 8

Tableau 8: Effet sur les marqueurs de la fonction hépatique

Paramètres	TN	TP	Controle CP	CT100 mg/kg	CT 200 mg/kg
ALAT UI/l)	28.56±1.1	59.91±6.11 ^c	34.03±1.46 ³	37.22±2.82 ³	34.83±1.21 ³
ASAT UI/l)	92.85±2.81	134.03±6.4 ^c	112.17±2.31 ²	110.77±4.39 ²	103.36±3.22 ³
Bilirubine T (µg/dl)	40.76±1.1	118.18±18.41 ^c	45.03±8.45 ³	63.08±1.98 ²	52.16±4.61 ³

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type, n=5; ^a P < 0.05, ^b P < 0.01, ^c P < 0.001 différence significative comparée au témoin neutre to the neutral; ¹ P < 0.05, ² P < 0.01, ³ P < 0.001 différence significative comparée au témoin positif. ASAT: Aspartate aminotransferase, ALAT: Alanine aminotransferase

Par rapport au témoin neutre, le témoin positif (L-NAME) a provoqué une augmentation de l'ALAT, d'ASAT et de bilirubine totale respectivement de 109,78 % (P<0,001), 44,36 % (P<0,001) et 189,98% (P<0,001).

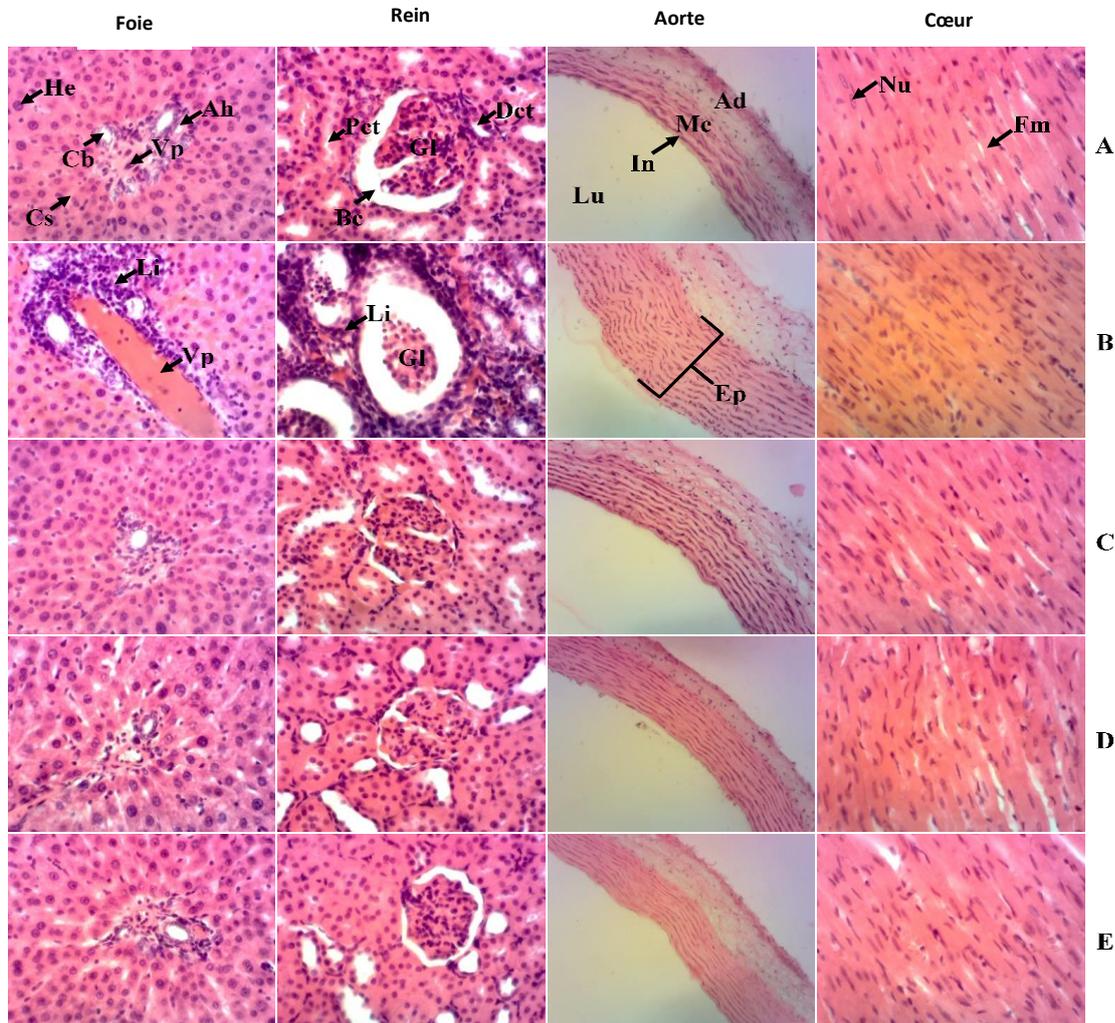
Par rapport au témoin positif, le captopril a réduit les taux d'ALAT, d'ASAT et bilirubine totale respectivement de 43,2 % (P<0,001), 16,31 % (P<0,001) et 61,9 % (P<0,001).

Par rapport au contrôle positif, l'extrait à 100 mg/Kg a réduit de façon significative les ALAT, ASAT et la bilirubine totale respectivement de 37,87 % (P<0,001), 17,35 % (P<0,01) et 46,62 % (P<0,00) ; à 200 mg/Kg l'extrait a réduit les ALAT, ASAT et la bilirubine respectivement de 41,56 % (P<0,001), 22,88 % (P<0,001), 55,87 % (P<0,001).

8-Effets de Catharentus roseus sur la microarchitecture de quelques organes

La figure 4 montre les effets de l'extrait sur l'architecture du foie, des reins, de l'aorte et de cœur.

Figure 4. Effets du catharentus roseus sur l'architecture des organes



Formulation des gélules à base d'extrait aqueux de feuilles de *Catharentus roseus* et évaluation ..

Microphotographie du foie (X200), du rein (X200), de l'aorte (X100) et du cœur (X200) ; coloration hématoxyline-éosine.

A = contrôle neutre ; B = contrôle négatif ; C = Contrôle positif ; D, E = groupes recevant les gélules aux doses respectives 100 et 200 mg/kg ; Foie : Vp = Veine porte hépatique ; He = Hépatocyte ; Cs = capillaire sinusoidal ; Ah = artère hépatique ; Cb = Canalicules biliaires ; Li = infiltration leucocytaire ; Rein : Gl = Glomérule ; Bc = capsule de Bowman ; Dct = tubule convulvé distal ; Pct = tubule contourné proximal ; Aorte : Lu = lumière de l'aorte ; Dans = Intima ; Moi = Média ; Ad = Adventice ; Ep = épaissement du média ; Cœur : Nu = Noyau des fibres musculaires cardiaques ; Fm = fibre musculaire cardiaque ;

Pour le témoin neutre l'architecture de ces organes était normale. Comparativement à ce témoin neutre, le témoin positif (captopril) présentait de nombreuses altérations histopathologiques, notamment des infiltrations leucocytaires pour le foie et les reins et un épaissement de l'aorte. Tout comme le témoin positif captopril l'extrait à 100 et à 200 mg/Kg a provoqué une restructuration de tous ces organes. Aucune altération n'a été constatée dans le tissu cardiaque.

IV. DISCUSSION

La dose recommandée par le guérisseur traditionnel pour l'adulte correspondait à 387 mg d'extrait sec administré 3 fois. Au vu de la non toxicité de la plante nous avons arrondi cette dose à 400 mg [13].

L'humidité résiduelle de 2 % de l'extrait est inférieure à la limite de 5 % recommandé par la pharmacopée européenne 9^{ème} Edition ; il a été cependant nécessaire d'ajouter la silice colloïdale anhydre pour stabiliser cet extrait très hygroscopique.

Le L-Name à 25 mg/Kg en intrapéritonéale pendant 10 jours a induit une augmentation significative de la tension artérielle et du rythme cardiaque ; en 2015, Kamsiah et al avaient fait la même observation [14]. Le mécanisme impliqué dans l'augmentation de la pression artérielle est principalement l'inhibition de la synthèse de l'oxyde d'azote [15]. Le L-Name qui est un analogue structurel de l'arginine, inhibe la formation de NO; il s'en est suivi une réduction des niveaux de guanosine monophosphate cyclique (GMPC) dans les parois des artères, ce qui a entraîné l'inhibition de la relaxation des muscles des vaisseaux, et une augmentation de la pression sanguine [15].

L'extrait de *Catharentus roseus* n'as pas réduit de manière significative le rythme cardiaque ; les effets hypotenseurs observés seraient liés à la diminution des résistances périphériques.

Les travaux de Nejat et al [16] avaient montré que les feuilles de *Catharentus roseus* contiennent un alcaloïde indolique, l'ajmalicine. C'est un antagoniste alpha-adrenergique sélectif et à propriétés vasodilatatrices [17]. C'est ce mécanisme qui est mis en jeu dans l'activité anti hypertensive de *Catharentus roseus*. Ceci en accord avec les travaux de Ara et al [18]. L'hypertrophie de la paroi de l'aorte chez le témoin neutre est due au stress mécanique induit par l'hypertension couplé à un dysfonctionnement endothélial. Ces résultats sont en accord avec ceux de Nyadjeu et al [19]. Cette anomalie a été largement corrigé par l'extrait de *Catharentus roseus* et le captopril.

Le L-Name administré pendant 10 jours a provoqué une diminution du cholestérol HDL, une augmentation de TG, de LDL-Cholestérol et de Cholestérol Total. Ceci est en accord avec les travaux de Ramanathan et al [20]. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'une diminution des niveaux de NO dans le foie réduit sa micro vascularisation, modifie la fonction hépatique et provoque des perturbations dans le métabolisme des lipides [21]. La dyslipidémie a été bien gérée par le captopril et les extraits de *Catharentus roseus*. Ceci avait déjà été observé dans les travaux de Patel et al [22].

Le L-Name administré pendant 10 jours a provoqué une réduction de la SOD, de la catalase, des niveaux de GSH, avec une augmentation de MDA, des études antérieures [23] l'avaient déjà montré. Le captopril et les extraits de *Catharentus roseus* ont maintenu l'activité de la SOD, de la catalase et les niveaux de GSH dans l'aorte, le cœur, le foie et les reins, tout en réduisant les niveaux de MDA par rapport au contrôle positif. Les travaux de Soon et al [24] avaient conduit à des résultats similaires.

Chez le contrôle positif, l'altération du foie et des reins a conduit à une élévation de la bilirubine totale, de l'acide urique, des transaminases. Ces résultats confirment ceux de Ramanathan [20]. Le captopril et les extraits ont réduit de manière significative l'activité des transaminases et le niveau de bilirubine totale, de la créatinine et d'acide urique ; ils ont aussi corrigé les anomalies histologiques observées chez le contrôle neutre. Ceci confirme le fait que l'extrait contient des antioxydants et des vasorelaxants qui améliorent le fonctionnement des organes.

V. CONCLUSION

La présente étude avait pour objectif la formulation de gélules à base d'un extrait aqueux de *Catharentus roseus* et l'évaluation des effets anti hypertenseurs des capsules contenant l'extrait des feuilles de *Catharentus roseus* sur les rats rendus hypertendus par le L-NAME.

Formulation des gélules à base d'extrait aqueux de feuilles de Catharentus roseus et évaluation ..

Les capsules formulées étaient dosées à 200 mg d'extrait et étaient prévues pour une posologie de 600mg 3 fois par jour. Sur le plan pharmacotechnique elles étaient conformes aux recommandations de la pharmacopée européenne 11^{ème} édition.

L'administration de L-NAME a provoqué une augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque ainsi qu'une dyslipidémie et un stress oxydatif responsables de lésions hépatiques et rénales avec augmentation de la créatinine, de la bilirubine, d'acide urique et une modification de la microarchitecture des reins et du foie.

L'administration du contenu des gélules à 100 et à 200 mg d'extrait par Kg a contribué à la normalisation de la pression sanguine ainsi qu'à la réduction du stress oxydatif, avec correction des dommages hépatiques et rénaux. Les propriétés anti hypertensives de *Catharentus roseus* pourraient résulter de ses effets vasodilatateurs et anti oxydants. Le rapprochement de ces effets permet de comprendre l'utilisation de *Catharentus roseus* dans le traitement de l'hypertension en médecine traditionnelle.

REFERENCES:

- [1]. Jawaid T, Maddheshiya P, Awasthi A. Hypertension and Herbal Plants. *Int Res J Pharm.* 2011;2:26–30.
- [2]. WHO. High blood pressure -Country experiences and effective interventions utilized across the European Region. *World Heal Organ.* 2013;
- [3]. El-Merzabani MM, El-Aaser AA, Attia MA, El-Duweini AK, Ghazal AM. Screening system for Egyptian plants with potential anti-tumour activity. *Planta Med.* 1979 Jun;36(2):150–5.
- [4]. Neagi N, Bhatia M. Biological investigation of *Vinca rosea*. *Indian J Pharma.* 1956;18:73–
- [5]. Swanston-Flatt S, Day C, Flatt P. Glycaemia effects of traditional European plant treatments for diabetes studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res.* 1989;10:69–73.
- [6]. Rajas M, Cuellar M. Comparative microbiological studies of the alkaloids of *Catharanthus Roseus* and other related compounds. *Rev Cuba Farm.* 1981;15(2):131–8.
- [7]. Chopra I, Jamwal K, Chopra C. Preliminary pharmacological investigations of total alkaloids of *Lochnera rosea* (Rattonjot). *Indian J Med Res.* 1959;47:40–3.
- [8]. Chile SK, Saraf M BA. Efficacy of *Vinca rosea* extract against human pathogenic strains of *Trichophyton rubrum* Sab. *Indian Drugs Pharm Ind.* 1981;16(1):31–3.
- [9]. Aslam J, Khan SH, Siddiqui ZH, Fatima Z, Maqsood M, Bhat MA, et al. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An Important Drug: It's Applications and Production. *Int J Compr Pharm.* 2010;1(4):1–16.
- [10]. Djoko E, Lanty W, Ngantchouko B, Tekam JM. Development of *Garcinia kola* capsules. *Int.j.of biological and pharmaceutical Sciences Archives* 2021.02(01),184-193.
- [11]. Sreevidya N, Mehrotra S. Spectrophotometric method for estimation of Alkaloids precipitable with dragendorff's reagent in plant materials. *J AOAC Int.* 2003;86(6):1124–7.
- [12]. Gallo L, Ramírez-Rigo MV, Piña J, Palma S, Allemandi D, Bucalá V. *Valeriana officinalis* dry plant extract for direct compression: Preparation and characterization. *Sci Pharm.* 2012;80(4):1013–26.
- [13]. Kabubii ZN, Mbaria JM, Mbaabu M. Acute toxicity studies of *Catharanthus roseus* aqueous extract in male Wistar rats. *African J Pharmacol Ther.* 2015;4(4):130–4.
- [14]. Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27.
- [15]. Paulis L, Zicha J, Kunes J, Hojna S, Behuliak M, Celec P, et al. Regression of L-NAME-induced hypertension: The role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res.* 2008;31(4):793–803.
- [16]. Nejat N, Valdiani A, Cahill D, Tan YH, Maziah M, Abiri R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): The two faces of a versatile herb. *Sci World J.* 2015;2015.
- [17]. Barrales-Cureño H. Pharmacological applications and in vitro biotechnological production of anticancer alkaloids of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Apl.* 2015;32(1):1101–10.
- [18]. Ara N, Rashid M, Amran MDS. Comparison of hypotensive and hypolipidemic effects of *Catharanthus roseus* leaves extract with atenolol on adrenaline induced hypertensive rats. *Pak J Pharm Sci.* 2009;22(3):267–71.
- [19]. Nyadjeu P, Nguelefack-mbuyo EP, Atsamo AD, Nguelefack TB, Dongmo AB, Kamanyi A. Acute and chronic antihypertensive effects of *Cinnamomum zeylanicum* stem bark methanol extract in L-NAME-induced hypertensive rats. 2013;
- [20]. Ramanathan V, Rajagopal S. Chrysin ameliorates the lipid profiles in N ω -nitro-L-argininemethylester-induced hypertensive rats. *Am J Biochem Mol Biol.* 2016;6(2):60–6.
- [21]. McCuskey RS. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat Rec.* 2008;291(6):661–71.
- [22]. Patel Y, Vadgama V, Baxi S, Tripathi CB. Evaluation of hypolipidemic activity of leaf juice of *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Donn. in guinea pigs. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2011;68(6):927–35.

Formulation des gélules à base d'extrait aqueux de feuilles de Cathartus roseus et évaluation ..

- [23]. Selamoglu Talas Z. Propolis reduces oxidative stress in l-NAME-induced hypertension rats. *Cell Biochem Funct.* 2014;32(2):150–4.
- [24]. Soon HT, Chung YL, Hazni H, Aditya A, Mohammadjavad P, Won FW, et al. Antidiabetic and Antioxidant Properties of Alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. 2013;9770–84.