

# REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Année Académique  
2021-2022

## MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

## MASTER

En Biologie Santé et Substances Naturelles d'Intérêt

**Option :** Phytothérapie et Pharmacologie des Substances Naturelles  
d'intérêt  
Par

Numéro d'ordre :  
004/2022

**SYLLA Zainab**

---

### THEME :

Triphytochimie et évaluation des effets hémostatique  
et antihémolytique de l'extrait aqueux des graines de  
*Garcinia kola* (Glusiaceae)

---

Soutenu publiquement le mercredi 08 juin 2022 devant le Jury composé de :

#### Jury

<b>M. OKOU Obou Constantin,</b>	Maître de Conférences, UJLoG,	<b>Président</b>
<b>M. ACKAH Jacques Auguste A. B.,</b>	Maître de Conférences, UJLoG	<b>Directeur Scientifique</b>
<b>M. KPAHE Ziéhi Fidèle,</b>	Maître-Assistant, UJLoG	<b>Encadreur</b>
<b>M. GBOGBO Moussa</b>	Maître-Assistant, UJLoG	<b>Examineur</b>



## **DEDICACE**

Je dédie ce travail,

A DIEU qui par sa Miséricorde m'a donné le souffle de vie, la santé et le courage pour effectuer ce travail. A lui soit la gloire éternelle.

## **AVANT PROPOS**

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Santé de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) de Daloa et de l'Université Félix Houphouët-Boigny (UFHB) d'Abidjan. Il a pour but de valoriser les substances naturelles d'intérêt. Il vise à mettre en évidence, les propriétés biochimiques, pharmacologiques et toxicologiques des médicaments issus des plantes médicinales afin de trouver sûrement d'autres nouvelles séries de médicaments.

## REMERCIEMENTS

Un mémoire de Master est avant tout un travail de réflexion collective, d'initiation à la recherche et aux activités professionnelles. Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

-Je remercie la Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé, Madame **TIDOU Abiba Sanogo Epouse KONÉ**, Professeur Titulaire Eco-toxicologie, pour son dévouement à la bonne marche de cette institution qu'elle a la lourde charge de diriger.

-Je remercie le Vice-président chargé de la Pédagogie, de la Vie Universitaire, de la Recherche et de l'Innovation Technologique de l'Université Jean Lorougnon Guédé, Monsieur **KONÉ Tidiani**, Professeur Titulaire d'Hydrobiologie, pour les efforts qu'il déploie au sein de cette structure pour encourager les étudiants à la recherche et la rigueur dans le travail.

-Je remercie également le Vice-Président de l'Université Chargé de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures, Monsieur **AKAFFOU Douffou Sélastique**, Professeur Titulaire de Génétique pour les efforts qu'il déploie au sein de cette structure pour la meilleure formation des étudiants.

-Je remercie vivement Docteur **TONESSIA Dolou Charlotte**, Maître de Conférences en Physiopathologie, pour ses efforts consentis au bon fonctionnement de l'UFR à travers les facilitations administratives et la formation dont j'ai bénéficié durant mon parcours dans ladite UFR.

-Monsieur **BEUGRE Grah Avit Maxwell**, Professeur Titulaire de Biochimie-Nutrition, Directeur du laboratoire d'Agrovalorisation, pour son soutien et ses conseils aux étudiants.

-Je tiens aussi à adresser mes remerciements à Docteur **ACKAH Jacques Auguste Alfred Bognan**, Maître de Conférences de Biochimie pharmacologique, Responsable de la Filière Biologie Santé et Directeur Scientifique de ce mémoire pour sa disponibilité, ses conseils et efforts pour créer les conditions favorables au bon déroulement de ce travail et surtout sa promptitude à résoudre les problèmes.

-Monsieur **KPOROU Kouassi Elisée**, Maître de Conférences de Pharmacologie, enseignant en Biologie Santé et Substances Naturelles d'Intérêt, pour tout son effort qu'il a mené et continue de mener pour notre formation.

Je remercie également le Responsable de parcours Biologie Santé et des Substances naturelles d'Intérêt, Monsieur **OBOUAYEBA Abba Pacôme** Maître-Assistant de Biochimie-Microbiologie ainsi qu'à toute l'équipe pédagogique.

-J'exprime ma profonde reconnaissance à Docteur **KPAHE Ziéhi Fidèle**, Maitre-Assistant de l'Université Jean Lorougnon Guédé, pour l'encadrement de ce travail. Vous avez été pour moi une source de motivation et de courage. Merci de m'avoir confié ce travail et d'avoir œuvré pour sa réalisation. Vous m'avez donné la confiance en soi, l'envie d'avancer et la volonté de faire encore mieux. Vos qualités intellectuelles et humaines, votre amour pour le travail bien fait m'ont marqué.

- J'adresse nos vifs remerciements aux membres du jury, qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps à l'examen notre travail :

•Au Président du Jury, Docteur **OKOU Obou Constantin** Maître de Conférences de Biochimie-Pharmacologie, Responsable de la Filière Sciences de la Vie et de la Terre (SVT) à l'Université Jean Lorougnon Guédé Daloa et président du jury, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury, malgré ses nombreuses occupations universitaires.

•À l'examineur Docteur **GBOGBO Moussa** Maître-Assistant, à l'Université Jean Lorougnon Guédé Daloa, pour la célérité et le professionnalisme avec lesquelles il a analysé ce mémoire.

-De plus, je remercie tous les enseignants-chercheurs des UFR Agroforesterie et Environnement, en particulier ceux de la filière biologie-santé pour la richesse, la qualité de leur enseignement et les grands efforts qu'ils déploient pour assurer une formation actualisée à tous leurs étudiants.

Je remercie mon père pour ses prières, mon oncle SYLLA Bakary, merci pour la confiance, les prières et surtout le soutien moral et financier. Et aussi mes frères et sœurs pour leurs encouragements. Sans oublier ma famille d'accueil dans la ville de Daloa, la famille TRAORE pour son hospitalité et son soutien.

Ma grand-mère et ma mère, que leurs âmes reposent en paix.

- Mes remerciements vont également à l'endroit de Monsieur **COULIBALY Doh Lamissa** pour sa disponibilité, ses conseils surtout ses encouragements tout au long de mes études. - Enfin à tous nos camarades doyens, de promotion qui m'ont soutenu d'une manière ou d'une autre durant mes études. Que toutes les personnes que j'ai oubliées de citer trouvent dans ce dernier paragraphe mes sincères reconnaissances et mes remerciements distingués.

## **TABLE DES MATIÈRES**

.....	i
DEDICACE .....	i
AVANT PROPOS .....	ii

REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
I.1. <i>Garcinia kola</i> .....	3
I.1.1. Position systématique .....	3
I.1.2. Phytochimie .....	4
I.1.3. Données toxicologiques .....	4
I.2. Hémostase .....	4
I.2.1. Hémostase primaire .....	4
I.2.2. Hémostase secondaire ou coagulation .....	5
I.2.3. Fibrinolyse .....	5
I.2.4. Hémostase .....	5
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	9
II.1 Matériel .....	9
II.1.1 Matériel .....	9
.....	9
.....	9
.....	9
II.1.2 Matériel .....	9
.....	9
.....	9
.....	9
II.2 Méthodes .....	10
II.2.1 Préparation de l'extrait aqueux de noix de <i>Garcinia kola</i> .....	10
II.2.2 Étude du tri-phytochimique .....	10
II.2.3 Étude du pouvoir antioxydant de <i>Garcinia kola in vitro</i> .....	13
II.2.4 Étude de l'activité protectrice des globules rouges.....	14
II.2.5 Test de l'hémostase .....	15
.....	15
II.2.6 Toxicité aiguë de l'extrait aqueux des graines de <i>Garcinia kola</i> .....	17
II.2.7 Évaluation de l'extrait aqueux des graines de <i>Garcinia kola</i> sur le temps de	

saignement .....	17
II.2.8 Analyse hématologique .....	17
II.2.9 Analyse statistique .....	18
III.1 RESULTATS .....	20
III.1.1 Criblage phytochimique de l'extrait .....	20
III.1.2 Activité hémolitique de l'extrait .....	20
III.1.3 Activité anti hémolitique de l'extrait .....	21
III.1.4 Activité antiradicalaire de l'extrait en présence de DPPH .....	22
III.1.5 Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux en présence de peroxyde d'hydrogène. .....	23
III.1.6 Activité hémostatique de l'extrait aqueux.....	23
III.1.7 Toxicité aigüe de l'extrait aqueux .....	25
III.1.8 Effets de l'extrait aqueux des graines de <i>Garcinia kola</i> sur le temps de saignement .....	25
III.1.9 Effets de l'extrait aqueux sur le taux de plaquettes sanguines .....	26
III.2. DISCUSSION .....	27
.....	29
ANNEXES .....	35
Annexe 1 : Matériel animal .....	35
Annexe 2 : Matériel technique.....	35

#### LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

<b>%</b>	:	pourcentage
<b>°C</b>	:	degré Celsius
<b>µg</b>	:	microgramme
<b>µl</b>	:	microlitre
<b>AAPH:</b>		2,2-Azobis(2-Amidino-Propane-diHydrochloride)
<b>ADP :</b>		Adésine DiPhosphate
<b>CaCl<sub>2</sub> :</b>		dichlorure de calcium

<b>Cm</b>	:	centimètre
<b>dl</b>	:	décilitre
<b>DL50</b>	:	Dose Létale à 50 %
<b>DO</b>	:	Densité Optique
<b>DPPH</b>	:	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>EA</b>	:	Extrait Aqueux
<b>EAgk</b>	:	Extrait Aqueux des graines de <i>Garcinia kola</i>
<b>FeCl3</b>	:	Chlorure Ferrique
<b>g</b>	:	gramme
<b>G6PD</b>	:	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
<b>GB1</b>	:	Biflavonoïde 1
<b>GB2</b>	:	Biflavonoïde 2
<b>GR</b>	:	Globules rouges
<b>Hb</b>	:	Hémoglobine
<b>HCl</b>	:	Acide Chlorhydrique
<b>IC50</b>	:	Concentration inhibitrice à 50 %
<b>Kg</b>	:	Kilogramme
<b>L</b>	:	Litre
<b>M</b>	:	mètre
<b>Mg</b>	:	milligramme
<b>min</b>	:	minute
<b>ml</b>	:	millilitre
<b>mm</b>	:	millimètre
<b>OCDE</b>	:	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
<b>Nacl</b>	:	chlorure de Sodium
<b>Nm</b>	:	Nanomètre
<b>P.C</b>	:	Poids Corporel
<b>PBS</b>	:	Tampon Phosphate Salin
<b>PK</b>	:	Protéine Kinase

- PPP** : Plasma Pauvre en Plaquettes  
**PTA** : Plasma Thromboplastine Antécédent chlorure ferrique  
**Rpm** : tour par minute  
**S** : Seconde  
**TCA** : Temps de Céphaline Activée  
**TP** : Temps de Prothrombine

#### **LISTE DES TABLEAUX**

- Tableau I:** Facteurs de coagulation .....7  
**Tableau II:** Résultat du criblage phytochimique de l'extrait aqueux de *Garcinia kola* ..... 20

<b>LISTE DES FIGURES</b>	
<b>Figure 1:</b> Diagramme récapitulatif dégradation des globules rouges .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 2:</b> A : Gousses de <i>Garcinia kola</i> B : Noix de <i>Garcinia kola</i> .....	9
<b>Figure 3:</b> Effets hémolytiques de l'EAgk, de l'eau distillée et de la solution saline (NaCl 0,9 %).....	19
<b>Figure 4:</b> Effets anti hémolytiques de l'EAgk et de l'acide ascorbique sur l'hémolyse induite par l'AAPH. ....	20
<b>Figure 5:</b> Effets anti radicalaires de l'EAgk et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH .....	20
<b>Figure 6:</b> Effets antiradicalaires de l'EAgk et de l'acide ascorbique vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. ....	21
<b>Figure 7:</b> Effets de l'EAgk et de la phytoménadione sur le temps de céphaline activée (TCA) <i>in vitro</i> . ....	22
<b>Figure 8:</b> Effets de l'EAgk et de la phytoménadione (vitamine K1) sur le temps de prothrombine <i>in vitro</i> ....	22
<b>Figure 9:</b> Effets de l'EAgk et de la phytoménadione (vitamine K1) sur le temps de saignement <i>in vivo</i> . ....	23
<b>Figure 10:</b> Effets de l'EAgk et de la phytoménadione sur la numération plaquettaire <i>ex vivo</i> .....	24

# INTRODUCTION

L'hémostase est un processus physiologique qui permet de limiter les pertes sanguines. Ce mécanisme physiologique dépend d'un équilibre des processus pro-coagulant et anticoagulant (**Maureen, 2012**). Lorsqu'un vaisseau sanguin est lésé, les plaquettes et la fibrine jouent un rôle essentiel pour former un caillot sanguin et arrêter la perte de sang du vaisseau endommagé (**Son et al., 2017**). Cependant, les saignements incontrôlés restent la principale cause de décès dans de nombreux cas d'hémorragie. Ainsi, au cours des 15 dernières années, les industries pharmaceutiques ont développé de nouveaux agents hémostatiques (**Vyas & Saha, 2013**). En outre, plusieurs études ont démontré l'activité hémostatique de nombreuses plantes médicinales dans l'espoir de trouver de nouveaux agents plus efficaces (**Pandit et al., 2012 ; Totuk et al., 2020**).

Aujourd'hui, 80 % des populations des pays en développement s'en remettent à la médecine traditionnelle pour leurs soins de santé primaire, par tradition culturelle ou faute d'autres alternatives. Pour des raisons différentes, on observe dans nos sociétés un intérêt grandissant pour les thérapeutiques naturelles et en particulier la phytothérapie (**Christian, 2011**).

Par ailleurs, de nombreuses recherches ne cessent de démontrer que, non seulement, les plantes médicinales renferment de nombreux principes biologiquement actifs qui exercent différentes activités pharmacologiques (**Candan et al., 2003, Lagnika et al., 2012 ; Dinzedi, 2015**), mais encore qu'elles restent la source la plus importante des molécules entrant dans la composition des médicaments pharmaceutiques (**Marin & Chrestin, 2007**). Parmi ces espèces figurent petit kola, qui est largement connu sous le nom de « Petit kola » et appartenant à la famille des plantes appelées *Clusiaceae*. En effet, les graines de petit kola jouent un rôle important dans la phytothérapie traditionnelle (**Dalziel, 1937**). Parfois, elles sont utilisées comme aphrodisiaque ou pour soigner la toux, la dysenterie, les angines de poitrine, les troubles hépatiques, la diarrhée, la laryngite, la bronchite et la gonorrhée (**Adesina et al., 1995**). *Garcinia kola* est également utilisé pour prévenir et soulager les coliques, pour traiter les maux de tête, les maux d'estomac et les gastrites (**Adaramoyé & Adeyemi, 2006 ; Mathew & Blessing, 2007**). Pour certains auteurs, les graines de *Garcinia kola* possèdent plusieurs propriétés pharmacologiques telles que des activités antioxydantes, hépato-protectrices,

antidiabétiques, antimicrobiennes et antipyrétiques (Tebekeme, 2009 ; Penduka *et al.*, 2011 ; Nwangwa, 2012).

1

Selon Igwegbe *et al.* (2021), les graines avec ses polysaccharides peuvent former un gel dans une solution de sorte à agir comme coagulant pour prétraiter les eaux usées d'aquaculture. Cependant, les effets des graines de *Garcinia kola* sur la coagulation sanguine restent encore inconnus.

Ainsi, l'objectif général de ce travail est d'étudier les effets hémostatiques *in vitro* et *in vivo* de l'extrait aqueux de *Garcinia kola* en vue de confirmer la présence de composés coagulants. De cet objectif général découlent les objectifs spécifiques suivants :

- 1-Tester l'extrait sur la coagulation sanguine *in vivo* et *in vitro* ;
2. Évaluer les activités anti-hémolytique et antiradicalaire de l'extrait *in vitro* ;
3. Déterminer l'effet de l'extrait sur le taux de plaquettes sanguines ;
4. Révéler les principaux composés chimiques présents dans les graines fraîches de *Garcinia kola* par le criblage phytochimique.

Outre l'introduction et une conclusion suivie de perspectives et des références bibliographiques, le présent travail est scindé en trois grandes parties. La première partie est consacrée aux généralités portant sur *Garcinia kola* et la physiologie de l'hémostase. Dans la deuxième partie est trouvée le matériel et les méthodes de travail utilisées et enfin la troisième partie est consacrée aux résultats et discussion.

# **PREMIERE PARTIE : GENERALITES**

## I.1. *Garcinia kola*

*Garcinia kola* communément appelé « petit kola » est une plante dicotylédone appartenant à la famille des plantes appelées Clusiaceae. *Garcinia kola* est rencontré dans toute l'Afrique de l'Ouest et du Centre (Iwu, 1993). Il est également présent dans la zone forestière de la Sierra Leone, du Ghana, du Cameroun et d'autres pays d'Afrique de l'Ouest. Au Nigeria, il est courant dans les États du Sud-Ouest et l'État d'Edo (Otor *et al.*, 2001). C'est un arbre à feuilles persistantes de taille moyenne, d'environ 15 à 17 m de haut et avec une cime assez étroite. Les feuilles sont simples, longues de 6 à 14 cm et larges de 2 à 6 cm, brillantes sur les deux faces et tachetées de glandes à résine. Les petites fleurs sont couvertes de courts poils rouges (Iwu, 1993). Le fruit est une drupe de 5 à 10 cm de diamètre et pèse 30 à 50 g. Il est généralement lisse et contient une pulpe jaune-rouge. Le fruit change de couleur pendant la maturation, du vert à l'orange, et chaque fruit contient 1 à 4 graines (Juliana *et al.*, 2006).

### I.1.1. Position systématique

La position systématique ci-dessous a été établie par Eseigwu *et al.* (2014).

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
Sous-classe	: Dialypétales
Ordre	: <i>Malpighiales</i>
Genre	: <i>Garcinia</i>
Espèce	: <i>Garcinia kola</i>

### I.1.2. Phytochimie

*Garcinia kola* est une plante médicale riche en substances naturelles. Elle contiendrait des oléorésines, des saponines, des tanins, des alcaloïdes, des glycosides cardiaques et des polyphénols (Farombi *et al.*, 2005 ; Adaramoye *et al.*, 2005 ; Houmènou *et al.*, 2018). Les études d'Ebana *et al.* (1991) ont montré que les noix de *Garcinia kola* comporteraient des

saponines, des tanins, des alcaloïdes, des anthraquinones, des terpènes, des stéroïdes, des glycosides cardiaques. Les graines contiendraient également des flavonoïdes dont le kolaviron, un complexe chimique de biflavonoïde 1 (GB1), biflavonoïde 2 (GB2) et de kolaflavone.

### **I.1.3. Données toxicologiques**

Les études toxicologiques réalisées avec les graines de *Garcinia kola* n'ont révélé aucune toxicité (Udenze *et al.*, 2012 ; Atsukwei D., *et al.*, 2015). En effet, Udenze *et al.* (2014) ont obtenu une DL50 s'élevant à environ 6741 mg/kg de P.C chez le rat mâle traité avec l'extrait aqueux de graines de *Garcinia kola*. De même, Atsukwei., *et al.* (2015) ont obtenu une DL50 supérieure à 5000 mg/kg de P.C suite au traitement avec des doses comprises entre 10 et 5000 mg/kg de P.C chez le rat. Ces auteurs ont aussi montré qu'une administration quotidienne de l'extrait éthanolique de graines de *Garcinia kola* aux doses respectives de 100 et de 200 mg/kg de P.C n'entraîne pas de mortalité et n'affecte pas les organes vitaux chez les rats au bout de 21 et 42 jours. Par ailleurs, ces doses entraînent une augmentation significative du sodium sérique chez ces rats.

## **I.2. Hémostase**

C'est un ensemble de phénomènes permettant l'arrêt de l'hémorragie. En effet, le sang circule sous pression à l'état liquide, composé du plasma et d'éléments figurés, dans les vaisseaux. En cas de lésion d'un vaisseau les plaquettes se mettent en place et forment un caillot pour arrêter l'hémorragie : Hémostase primaire. La coagulation qui transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble vient consolider les caillottes formés par les plaquettes : Hémostase secondaire. Cette masse fibrino-plaquettaire sera dissous les jours suivant après cicatrisation de la lésion vasculaire : Fibrinolyse (De Revel & Dogmi, 2004).

### **I.2.1. Hémostase primaire**

C'est un ensemble de mécanismes permettant la formation du clou plaquettaire. Qui se déroule en deux temps. Temps vasculaire ou pariétal, qui intervient dès la blessure d'un vaisseau et la modification de la paroi du vaisseau et des plaquettes afin de réduire le flux sanguin. Le temps plaquettaire, qui se traduit par une agrégation plaquettaire au niveau des tissus conjonctifs due à la libération de l'ADP (Adésine DiPhosphate) par les cellules lésées et s'en suit la libération de la sérotonine par l'amas plaquettaire : la vasoconstriction (De Revel & Dogmi, 2004).

### **I.2.2. Hémostase secondaire ou coagulation**

C'est l'étape de la coagulation proprement dite aboutissant à la formation d'un réseau de fibrine qui consolide le clou plaquettaire ou thrombus. Elle fait intervenir de nombreux facteurs de coagulation (des protéines) numérotées de I à XIII (**Tableau I**). La coagulation est due à la transformation de la fibrine (protéine), transformé par le fibrinogène lui-même transformé par la thrombine (enzyme) activée par la prothrombine (foie) activée par la thromboplastine (dans le foie) : c'est une réaction en chaîne. C'est la cascade de la coagulation. (**De Revel & Dogmi, 2004**). Elle est aussi composée de deux voies qui sont : intrinsèques et extrinsèques. Le terme intrinsèque fait référence à une série de réactions séquentielles impliquant les protéines plasmatiques et les facteurs VIII, IX, XI tandis que la voie extrinsèque consiste en le facteur tissulaire du récepteur transmembranaire (TF) et le facteur plasmatique VII/VIIa (FVII/FVIIa). (**Nigel et al., 2007 ; Wheeler et al., 2016**).

### **I.2.3. Fibrinolyse**

La fibrinolyse est l'ensemble des mécanismes cellulaires et plasmatiques permettant la destruction du thrombus ou du caillot 72 heures après la coagulation sous l'action d'une enzyme, la plasmine (la fibrinolysine). Elle participe aussi au développement des tissus. La fibrinolyse est un phénomène en équilibre constant avec la circulation, la coagulation. Elle dissout donc les caillots sans provoquer d'hémorragie. La plasmine est une protéase hydrolysant la fibrine et d'autres facteurs de la coagulation, tel que le fibrinogène. Son dérèglement provoque des pathologies thrombotiques et hémorragiques (**De Revel & Dogmi, 2004 ; Michel, 2012**).

### **I.2.4. Hémostase**

L'hémolyse physiologique est un phénomène irréversible de destruction des globules rouges (GR) vieillissants (âgés de 120 jours). Les hématies âgées subissent des modifications importantes avec plusieurs conséquences, la baisse de nombreuses activités enzymatiques (apo et coenzymes), le déficit de la glycolyse anaérobie privant l'organisme d'énergie. Cette dégradation des hématies âgées à deux sièges, à l'intérieur des tissus (hémolyse en intratissulaire) à 85 % ou des vaisseaux (hémolyse en intravasculaire) à 15 %. Elle a des conséquences au niveau du macrophage, au niveau des hépatocytes et l'élimination de la Bilirubine conjuguée (**Figure 1**).

En générale l'hémolyse est d'origine normale, mais elle devient pathologique par deux mécanismes principaux : hémolyse corpusculaire et extra corpusculaire. Ces mécanismes provoquent un déséquilibre entre la production et les pertes physiologiques d'hématies entraînant une hyperhémolyse.

L'hyperhémolyse corpusculaire est due à une anomalie touchant soit la membrane du GR (Sphérocytose héréditaire Stomatocytose héréditaire...), l'hémoglobine (Hb) (Drépanocytose) ou un déficit enzymatique (Déficit en G6PD et en PK) et généralement intratissulaire.

L'hyperhémolyse extra corpusculaire est d'acquise de causes extrinsèques (infections parasitaire ou bactérienne, d'agressions toxiques ou mécaniques des GR ou des causes immunologiques) et souvent intravasculaires. Elle a plusieurs conséquences telles que l'anémie aigüe ou chronique, triade d'hémolyse (pâleur, itère, augmentation modérée du foie), douleur lombaire, augmentation des produits du catabolisme du GR, hémoglobinémie plasmatique plus marquée : le plasma rosit dès que le taux d'Hb libre dépasse 0,05 g/dl, il s'agit de l'hémoglobinurie. Quand l'hémoglobinémie excède la capacité de transport de l'haptoglobine, l'Hb est excrétée dans les urines leur donnant la couleur porto etc. (Hamouda, 2020).

**Tableau I:** Facteurs de coagulation (De Revel & Dogmi, 2004)

N° FACTEUR	NOM	FONCTION	LIEU DE SYNTHÈSE	VITAMINE K-DEPENDANTE
<b>FACTEUR I</b>	FIBRINOGENE	SUBSTRAT	FOIE	
<b>FACTEUR II</b>	PROTHROMBINE	ZYMOGENE	FOIE	+
<b>FACTEUR V</b>	PROACCELERINE	COFACTEUR	FOIE	
<b>FACTEUR VII</b>	PROCONVERTINE	ZYMOGENE	FOIE	+
<b>FACTEUR VIII</b>	ANTI-HEMOPHILIQUE A	COFACTEUR	FOIE	
<b>FACTEUR IX</b>	ANTI-HEMOPHILIQUE B	ZYMOGENE	FOIE	+
<b>FACTEUR X</b>	FACTEUR STUART	ZYMOGENE	FOIE	+
<b>FACTEUR XI</b>	PTA = PLASMA THROMBOPLASTINE ANTECEDENT	ZYMOGENE	FOIE	
<b>FACTEUR XII</b>	FACTEUR HOGEMAN	ZYMOGENE	FOIE	

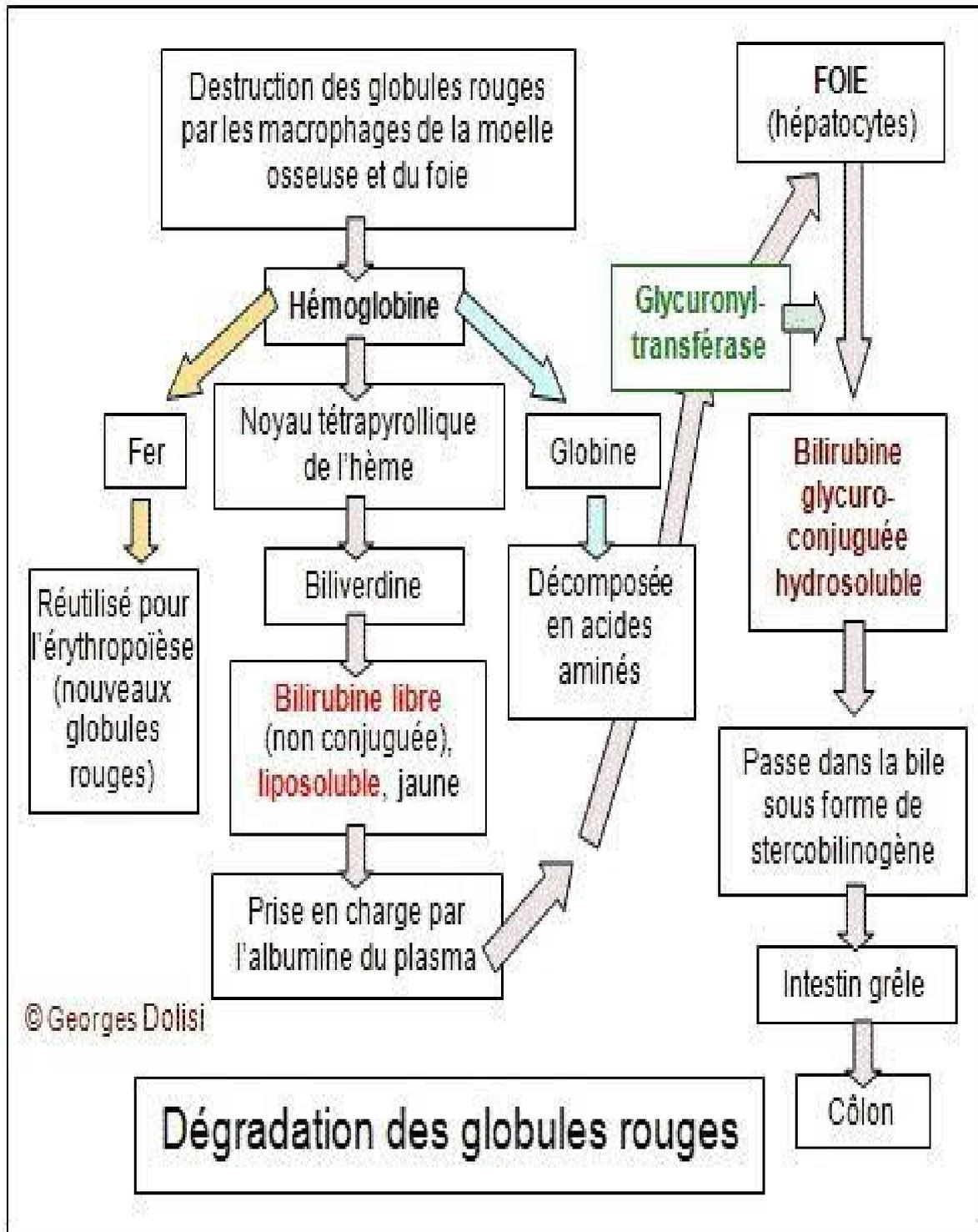


Figure 1: Diagramme récapitulatif dégradation des globules rouges

# DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET METHODES

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### II.1 Matériel

#### II.1.1 Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué de lapins et des rats pesant respectivement 1,5 kg et 200 ± 5g. Les lapins ont été utilisés pour le prélèvement du sang total à l'aide du tube EDTA (tube violet). Tandis que les rats ont servi pour les tests toxicologique et pharmacologique.

A côté de ce matériel animal, le matériel végétal tel que les noix de *Garcinia kola* a été sollicité (**Figure 2A et 2B**). Ainsi, ils ont été collectés au grand marché d'Abobo au Nord d'Abidjan en Mai 2021. Après la récolte, les noix ont été lavées et rincées à l'eau distillée et finement râpées et broyées dans un mortier à l'aide d'un pilon durant 5 à 10 minutes.



B

**Figure 2:** A : Gousses de *Garcinia kola*

B : Noix de *Garcinia kola*

## II.1.2 Matériel technique

Le matériel technique utilisé est :

- ✓ une étuve pour sécher les extraits de cola (Annexes),
- ✓ une balance à précision pour les pesées (Annexes),
- ✓ un ballon à fond plat a permis de conserver la solution durant l'expérience
- ✓ des tubes à essais, tubes à prélèvement du sang pour conserver les différentes solutions
- ✓ des seringues pour prélever les échantillons,
- ✓ des bocaux pour les dilutions,
- ✓ un coagulomètre (CYANCoag) pour le test d'hémostase (Annexes),
- ✓ une centrifugeuse pour séparer les différentes composantes(Annexes),
- ✓ un bain Marie pour l'incubation (Annexes),
- ✓ un spectrophotomètre pour la lecture de l'absorbance ([Gamme : 198 à 1100 : 2 nm]) (Annexes),
- ✓ une lampe xénon - Modèle 7305 Jenway®) qui a permis de déterminer la densitéoptique.

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Préparation de l'extrait aqueux de noix de *Garcinia kola*

Deux cent grammes (200 g) de broyat de noix de kola, ont été macérés dans un ballon à fond plat contenant 1,5 L d'eau distillée durant 12 heures sous un agitateur magnétique. Le mélange obtenu, a été filtré sur du coton hydrophile. Le filtrat a été séché à l'étuve à 55 °C-65 °C durant 48 heures, afin d'éliminer le solvant. L'extrait obtenu après séchage a été l'extrait aqueux de *Garcinia kola*. L'extrait a été conservé à 5 °C dans un réfrigérateur et employé pour les différentes manipulations.

### II.2.2 Étude du tri-phytochimique

La mise en évidence des métabolites secondaires consiste en des essais de caractérisation des grands groupes de composés chimiques contenus dans l'extrait aqueux de *Garcinia kola* (EAgk). La détection de ces composés est basée sur le principe qu'ils induisent des réactions

chimiques en présence de réactifs appropriés (**Wagner & Blatt, 2001**). Ces tests ont été réalisés par les techniques analytiques décrites dans les travaux de **Lazureski et al. (2007)** ; **Abo (2013)** ; **Mea et al. (2017)**.

Pour ces tests, une solution de l'extrait aqueux a été préparée en dissolvant 5 g de l'extrait dans 50 mL d'eau distillée (100 mg/mL).

#### **II.2.2.1 Recherche des stéroïdes et polyterpènes**

Pour mettre en évidence les stéroïdes et les polyterpènes, un volume de 5 mL de solution de l'extrait a été évaporé à sec, sans carboniser le résidu, dans une capsule sur bain de sable. Le résidu a été ensuite dissous à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique puis il a été ajouté avec précaution 0,5 mL d'acide sulfurique concentré le long de la paroi du tube à essai contenant la solution. L'apparition d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive. Un essai témoin a été réalisé avec une solution chloroformique de cholestérol.

#### **II.2.2.2 Recherche des polyphénols**

Dans deux millilitres de solution aqueuse, il a été ajouté une goutte d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 % ( $\text{FeCl}_3$  2 %). Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques, l'apparition d'une coloration bleue-noirâtre ou vert plus ou moins foncée qui témoigne de la présence des dérivés polyphénoliques.

#### **II.2.2.3 Recherche des flavonoïdes**

Dans une capsule, deux millilitres (2 mL) de solution de l'extrait aqueux (EAgk) ont été évaporés à sec et le résidu a été repris par cinq millilitres (5 mL) d'alcool chlorhydrique. La solution a été versée dans un tube à essai et 2 à 3 copeaux de magnésium y ont été ajoutés. La coloration rose orangée ou violacée obtenue a indiqué une réaction positive. La coloration a été comparée à celle du quercétol standard (0,05 mg/mL) traité avec la même quantité de réactif pour témoigner de la présence des flavonoïdes.

#### **II.2.2.4 Recherche des alcaloïdes**

La caractérisation des alcaloïdes débute avec l'évaporation à sec de 6 mL de solution de l'EAgk dans une capsule. Le résidu a été repris par 6 mL d'alcool à 60°. La solution alcoolique obtenue a été répartie dans deux tubes à essai. Dans le premier tube, il a été ajouté deux gouttes de réactifs de Dragendorff. L'apparition d'un précipité d'une coloration brun-rougeâtre a indiqué une réaction positive. Dans le deuxième tube, deux gouttes de réactifs de Bouchardât ont été

ajoutées. L'apparition d'un précipité d'une coloration brun-rougeâtre a indiqué une réaction positive. Dans ces deux tests, un essai témoin a été réalisé avec de la quinine.

### **I.2.2.5 Recherche de saponosides**

Cette recherche est basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses contenant des saponosides de mousser après agitation. Ainsi, un volume de 1,5 mL de la solution aqueuse a été introduit dans un tube à essai de 16 mm de diamètre et de 16 cm de hauteur. Le tube a été bouché avant de l'agiter verticalement et vigoureusement, pendant 10 secondes, puis laissé reposer pendant 10 minutes. Si après ce temps de repos la hauteur de la mousse est supérieure à 1 cm, alors il y a présence de saponosides.

### **II.2.2.6 Recherche de tanins**

Les tanins existent sous deux formes :

- les tanins catéchiques, de nature non hydrolysable, formés de polymères de catéchol sous forme condensée.
- les tanins galliques, dérivés de l'acide gallique et combinés sous forme d'hétérosides hydrolysables.

Ainsi, leur mise en évidence va se faire par deux réactions différentes

#### **➤ Recherche de tanins catéchiques**

Au résidu de 5 mL de la solution de l'EAgk évaporée, il a été ajouté 15 mL du réactif de Stiasny (formol 30 %, HCl concentré).

Le mélange a été maintenu au bain-Marie à 80 °C pendant 30 minutes, puis refroidi. L'observation de précipité en gros flocons caractérise la présence de tanins catéchiques. La catéchine sert de témoin.

#### **➤ Recherche de tanins galliques**

Encore 5 mL de solution précédente de l'EAgk a été filtré et saturé avec l'acétate de sodium. L'addition de trois gouttes de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$  à 2 %) a provoqué l'apparition d'une coloration bleu noire intense indiquant la présence de tanins galliques dans le milieu. Un essai témoin a été réalisé avec l'acide gallique.

### II.2.2.7 Recherche des composés quinoniques

Les composés quinoniques libres ou combinés sont mis en évidence grâce à la réaction de Borntraeger. Pour sa réalisation, un volume de 2 mL de la solution de l'EAgk a été évaporé à sec dans une capsule puis le résidu a été repris avec 5 mL d'acide chlorhydrique dilué au 1/5. La solution obtenue a été versée dans un tube à essai puis maintenue pendant 30 minutes au bain-Marie bouillant. Après refroidissement total, un volume de 20 mL de chloroforme a été ajouté. Ensuite à la phase chloroformique, il a été ajouté 0,5 mL d'ammoniaque dilué au demi (réactif de Borntraeger). L'apparition d'une coloration allant du rouge au violet a été la preuve de la présence des composés quinoniques. Un témoin a été réalisé avec de la vitamine E.

### II.2.3 Étude du pouvoir antioxydant de *Garcinia kola in vitro*

#### II.2.3.1 Tests de piégeage du radical DPPH

Cette méthode utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), un radical libre, coloré, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs, et présentant un maximum d'absorption à 517 nm. En présence d'un antioxydant, le DPPH<sup>+</sup> est réduit en DPPH et sa réduction traduit par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune. Ceci conduit à la diminution de l'absorbance du radical libre à 517 nm.

La capacité de piégeage du DPPH est déterminée suivant la méthode décrite par **Brandwilliams *et al.* (1995)**. Pour sa réalisation, un volume 2 mL d'une solution de DPPH (0,1 Nm dans de l'éthanol) a été ajouté à 20 µL des composés à tester à différentes concentrations. Le mélange a été par la suite agité. La cinétique de diminution de la quantité du radical DPPH a été déterminée jusqu'à atteindre l'état stationnaire.

L'activité de piégeage du radical DPPH a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de piégeage du radical DPPH} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

**A0** : l'absorbance du contrôle à temps t=0

**A1** : l'absorbance de l'échantillon à temps (temps nécessaires pour atteindre l'état stationnaire), elle varie suivant la substance testée et sa concentration.

### II.2.3.2 Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Cette méthode consiste à évaluer la capacité de piégeage de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par une substance. Ceci a été réalisé par simple incubation de la substance à tester en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La quantité en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> résiduelle dans le milieu réactionnel a été déterminée par la mesure de son absorbance à 230 nm.

La capacité des différents composés à piéger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été déterminée par la méthode de **Ruch et al. (1989)**. Pour ce faire, un volume de 2 mL de substance à tester à différentes concentrations a été ajouté à 1 mL de solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (43 mM), préparé dans un tampon phosphate à pH 7,4. La réaction a été incubée à température ambiante pendant 15 min, et l'absorbance a été mesurée à 230 nm contre le blanc contenant le tampon phosphate sans le peroxyde d'hydrogène. Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les composés testés a été calculé sous la formule ci-dessous :

$$\% \text{ de piégeage du radical H}_2\text{O}_2 = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

*A<sub>0</sub>* : l'absorbance du contrôle en absence de l'échantillon

*A<sub>1</sub>* : l'absorbance en présence l'échantillon

## II.2.4 Étude de l'activité protectrice des globules rouges

### II.2.4.1 Préparation des globules rouges de lapin

Les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie et le sang a été prélevé par ponction cardiaque dans des tubes à héparine. Les érythrocytes ont été isolés et conservés selon la méthode décrite par **Yuan et al. (2005)**. Pour effectuer cette préparation, les échantillons de sang prélevés ont été centrifugés (1000 g, 10 minutes) à 4 °C, les érythrocytes ont été séparés du plasma et du résidu cellulaire. Les globules rouges ont été lavés trois fois par centrifugation (1000 g, 5 min) dans 10 volumes de phosphate 10 mM solution saline tamponnée (pH 7,4). Le surnageant et les couches leucocytaires des globules blancs ont été soigneusement éliminés à chaque lavage. Les érythrocytes lavés ont été conservés à 4 °C et utilisés dans les 6 heures pour d'autres études.

### II.2.4.2 Étude de l'activité hémolytique

Le protocole suivi pour étudier l'activité hémolytique de l'extrait aqueux de *Garcinia kola* a été celui de **d'Okoka & Ere (2012)**. L'extrait a été testé aux concentrations de 1µg/mL et

100 µg/mL. L'évaluation de l'activité hémolytique de l'extrait vis-à-vis des globules rouges de lapin, a été réalisée par la mesure du pourcentage d'hémolyse. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse dans les échantillons témoins (Témoin – (NaCl) et Témoin + (Eau distillée)) et les échantillons traités avec l'extrait comme suite :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{AE}{AC} \times 100$$

*AE* : Absorbance de l'échantillon.

*AC* : Absorbance du contrôle positive (solution hypotonique).

Pour sa réalisation, une solution d'hématie (20 %) a été préparée en mélangeant 0,2 mL d'hématie à 0,8 mL d'extrait. La solution obtenue a été incubée à 37 °C pendant 30 minutes puis centrifugée à 3000 rpm pendant 30 minutes. Après la centrifugation, une lecture de la DO (Densité Optique) à 47 nm a été effectuée.

#### II.2.4.3 Test anti-hémolytique par la méthode d'AAPH

L'effet anti-hémolytique des extraits de kola (*Garcinia kola*) a été évalué *in vitro* par la méthode de l'AAPH (2,2-azobis-2-amidino-propane-dihydrochloride) rapportée par **Zhang et al. (2011)**. Pour démontrer l'effet protecteur des extraits des différentes espèces de *kola* sur la préservation de l'intégrité cellulaire, essentiellement liée aux membranes des globules rouges, les érythrocytes ont été soumis à des conditions du stress oxydant par l'ajout de l'AAPH (2,2-azobis-2-amidino-propane-dihydrochloride). La décomposition thermique de l'AAPH produit des radicaux libres à vitesse constante qui attaquent les membranes des globules rouges et lorsque les antioxydants endogènes sont épuisés, les membranes des globules rouges éclatent et l'hémolyse intracellulaire a été réalisée **Bessada et al. (2015)**. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard. Le suivi de l'hémolyse a été évalué quantitativement par dosage spectrophotométrie du taux d'hémoglobine dans le surnageant à 450 nm.

Pour ce faire, un volume 200 µL d'hématie (20 %) ont été ajouté à 200 µL extrait/standard à 100 µg/mL. Cette solution a été incubée à 37 °C durant 30 minutes. Ensuite,

*AE* : Absorbance de l'échantillon,

*AC* : Absorbance du contrôle positif (hémolyse totale).

il y a été additionné 400 µL d'AAPH (200 mM). Cette dernière solution a été incubée à 37 °C pendant 2 heures. Après cette dernière incubation, il a été ajouté 3 mL de PBS suivie d'une centrifugation à 1200 rpm durant 10 minutes. Enfin la lecture de la densité optique (DO) à 540

$$\% \text{ d'inhibition d'hémolyse} = (1 - \frac{AE}{AC}) \times 100$$

nm a été réalisée. L'effet protecteur des différents extraits a été évalué en pourcentage (%) d'inhibition d'hémolyse selon la formule suivante :

### **II.2.5 Test de l'hémostase**

Les tests d'exploration de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèque de la coagulation sont réalisés par la méthode de **Mao *et al.* (2009)** avec quelques modifications.

#### **II.2.5.1 Préparation du plasma pauvre en plaquettes (PPP)**

La préparation du plasma pauvre en plaquette a été réalisée par la méthode décrite par l'ordre professionnel des techniciens médicaux du **Quebec (OPTMQ, 2017)**. Le plasma pauvre en plaquette doit être obtenu au moins deux (2) heures après le prélèvement. Les tubes citrates contenant du sang ont été centrifugés à 2500 rpm pendant 15 min. Le plasma centrifugé a été prélevé et introduit dans un flacon, en laissant environ un demi-centimètre de plasma au-dessus de la couche cellulaire constituée de globules rouges, de plaquettes et de globules blancs. Le flacon a été centrifugé à 2500 rpm pendant 10 min. Le plasma a été prélevé une seconde fois en évitant de prendre le fond du tube contenant des débris cellulaires.

#### **II.2.5.2 Test d'exploration de la voie intrinsèque ou endogène de la coagulation (TCA)**

Un mélange constitué de 43  $\mu\text{L}$  de plasma et 7  $\mu\text{L}$  d'échantillon à différentes concentrations allant de (0,1 - 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) a été réalisé dans des différents tubes à essai. Ce mélange a été incubé à 37 ° C pendant 5 minutes. Une solution d'un volume de 100  $\mu\text{L}$  de plasma a été incubée à 37 °C pendant 2 minutes puis additionnée au mélange préalablement obtenu. Cet ensemble est ré incubé à 37°C pendant 3 minutes et la coagulation a été déclenchée par l'addition de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de 0,0025 M  $\text{CaCl}_2$ . Le temps de coagulation a été alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre depuis l'addition du calcium (déclenchement du chronomètre) jusqu'à la formation du caillot de fibrine (arrêt du chronomètre). L'eau distillée a été considérée comme le témoin négatif.

#### **II.2.5.3 Test d'exploration de la voie extrinsèque ou exogène de la coagulation (TP)**

Un volume de 43  $\mu\text{L}$  de plasma a été introduit dans une cuvette utilisée pour réaliser les tests de coagulation. A cet aliquote de plasma a été ajouté 7  $\mu\text{L}$  d'échantillon (0 ,001-1 mg/mL) à tester dans un tube à essai. Ce mélange a été incubé à 37 °C pendant 5 minutes. Ensuite, un volume 200  $\mu\text{L}$  de réactif de prothrombine (sang de lapin + chlorure de calcium) préchauffé à

37 °C pendant 30 minutes puis a été additionné et le temps de coagulation a été enregistré à l'aide d'un coagulomètre. Le tube contenant le plasma avec le liquide dans lequel l'échantillon a été dissous (eau distillée) a été considéré comme témoin négatif.

### **II.2.6 Toxicité aiguë de l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola***

La toxicité orale aiguë de l'extrait des graines de *Garcinia kola* a été réalisée conformément à la ligne directrice de l'**OCDE 423**. Ainsi, neuf (9) rattes ont été divisées en trois groupes de trois animaux. Le premier groupe a reçu de l'eau distillée utilisée comme la solution référence (lot témoin), et les deux autres groupes ont été traités avec 2000 et 5000 mg/kg p.c. de l'extrait (lot expérimental). Pour étudier les changements de comportement, les rats traités ont été observés toutes les 30 min pendant une durée de deux (2) heures. La mortalité des animaux a été appréciée après 24 heures et la toxicité de l'extrait a été déterminée **Mandal et al. (2001)**.

### **II.2.7 Évaluation de l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* sur le temps de saignement**

Le modèle d'hémorragie de la queue de rat est l'un des modèles les plus couramment utilisés pour les études précliniques d'efficacité des agents hémostatiques **Broekema et al. (2016)** ; **Sogut et al. (2020)**. L'activité hémostatique *in vivo* de l'extrait de graines de *Garcinia kola* a été étudiée comme décrit par **Broekema et al. (2016)**. A cet effet, vingt (20) rats de sexe mâle et femelle ont été répartis en cinq (5) groupes de quatre animaux. De l'eau distillée a été administrée par voie orale au groupe témoin. Le deuxième groupe a reçu de la phytoménadione (15 mg/kg de poids corporel, témoin positif). Les trois autres groupes (groupes expérimentaux) ont été prétraités par voie orale avec 250, 500 et 1000 mg/kg de poids corporel de l'extrait pendant quatre jours. Les rats traités ont été anesthésiés avec de la kétamine (100 mg/kg de poids corporel) et le bout de leur queue a été coupé pour induire un saignement. Le site du saignement a été doucement tamponné avec du papier filtre toutes les 30 s, jusqu'à l'arrêt du saignement. Le temps d'arrêt du saignement a été de 20 minutes. Ainsi, des précautions ont été prises pour qu'aucune pression ne soit exercée sur les extrémités de la queue qui pourrait affecter l'hémostase.

### **II.2.8 Analyse hématologique**

Les échantillons de sang ont été prélevés sur des rats utilisés pour réaliser l'étude du temps de saignement, dans des tubes à héparine. Un analyseur d'hématologie (Sysmex XN1000, Japon) a été utilisé pour déterminer la numération plaquettaire. Cet automate était capable de mesurer plusieurs autres paramètres tels que le nombre de globules blancs, le nombre de globules rouges etc. Le sang a été prélevé, dilué puis, se déplacé à travers un tube suffisamment fin pour que les cellules passent une à la fois. Les caractéristiques de la cellule ont été mesurées à l'aide de lasers (cyrtométrie en flux de fluorescence) ou d'impédance électrique.

### **II.2.9 Analyse statistique**

Le traitement statistique des données a été réalisé avec les logiciels Microsoft Excel Office version 2016, GraphpadPrism version 7 (Microsoft, San Diégo Californie, USA). Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne plus erreur standard sur la moyenne (moyenne  $\pm$  esm).

# TROISIÈME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

## III.1 RESULTATS

### III.1.1 Criblage phytochimique de l'extrait

Le tri phytochimique de l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* a montré la présence de stérols et de polyterpènes, de polyphénols, d'alcaloïdes dans l'extrait. Le résultat de cette étude est consigné dans le **tableau II**.

**Tableau II:** Résultat du criblage phytochimique de l'extrait aqueux de *Garcinia kola*

COMPOSE RECHERCHE	TEST OU REACTIFS	RESULTAT
STEROLS ET POLYTERPENES	LIEBERMANN	+
POLYPHENOLS	CHLORURE FERRIQUE	+
FLAVONOÏDES	CYANIDINE	-
SAPONOSIDES	AGITATION VIGOUREUSE	-
COMPOSE QUINONIQUES	BORNTRAESGER	-
	DRAGENDORFF	+
ALCALOÏDES	BOUCHARDAT	+
TANINS	CATECCHIQUE STIASNY ACIDE CHLORHYDRIQUE	-
	GALLIQUES	-

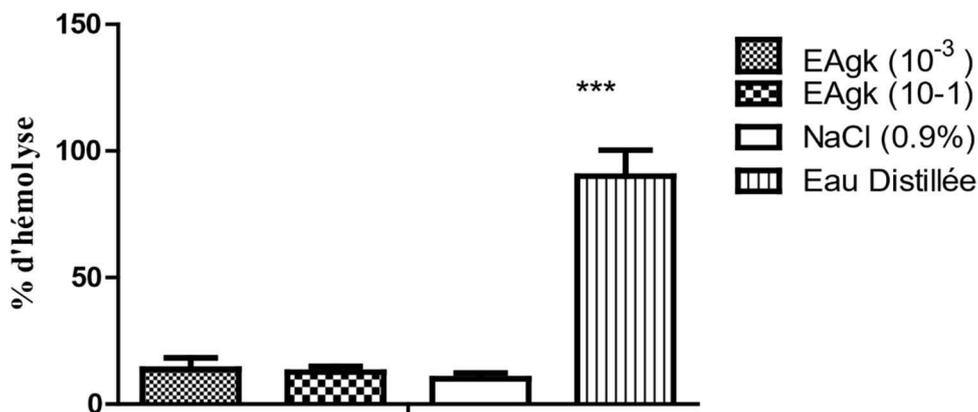
(+) : Présence du composé

(-) : Absence du composé

### III.1.2 Activité hémolytique de l'extrait

Des globules rouges de lapin ont été utilisés pour évaluer l'activité hémolytique de l'extrait aqueux de *Garcinia kola* (EAgk). Les résultats de cette expérience révèlent que l'EAgk a induit aux concentrations respectives de  $10^{-1}$  et  $10^{-3}$  mg/ mL. Des pourcentages d'hémolyse de  $12,66 \pm 2,3$  % et  $13,85 \pm 4,5$  %. Tandis que l'eau distillée (témoin positif) et la solution saline NaCl 0,9 % (solution isotonique ou eau physiologique) ont permis d'avoir des

pourcentages d'hémolyse respectifs de  $90,1 \pm 10,2$  % et de  $10,04 \pm 2,26$  %. Ces résultats montrent ainsi que l'EAgk aux 2 concentrations ont une activité protectrice proche de celle de la solution saline NaCl 0,9 % car n'ayant pas produit aucun effet nocif sur les érythrocytes. Contrairement à ces résultats, l'eau distillée (solution hypotonique) qui a été utilisée comme solution de référence a montré une activité hémolytique significative ( $p < 0,001$ ,  $n = 4$ ) (**Figure 3**).



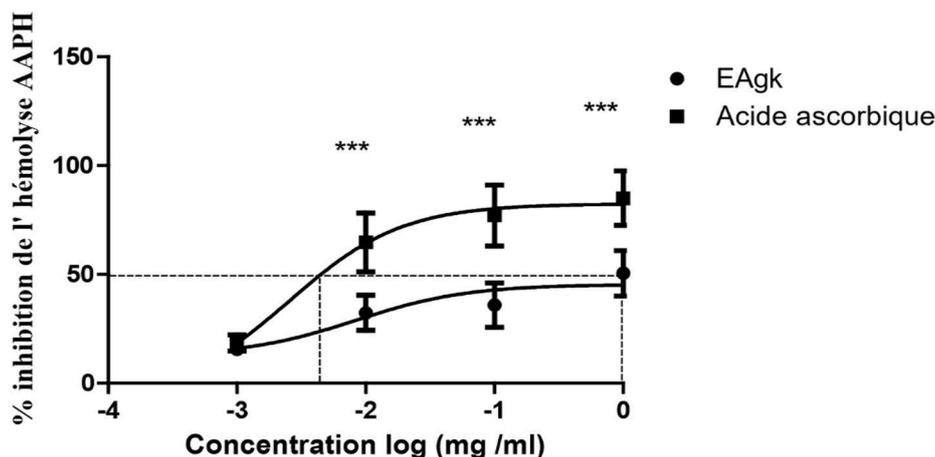
**Figure 3:** Effets hémolytiques de l'EAgk, de l'eau distillée et de la solution saline (NaCl 0,9 %).

*L'activité hémolytique de l'EAgk était très proche de celle de la solution saline (témoin négatif).*

*L'eau distillée (témoin positif) a montré des effets d'hémolyse significatifs (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ,  $n=4$ ).*

### III.1.3 Activité anti hémolytique de l'extrait

Les résultats de ces tests ont permis d'avoir un pourcentage d'inhibition de l'hémolyse dose-dépendante de l'EAgk et l'acide ascorbique (témoin positif) avec des valeurs de  $CI_{50}$  respectives de  $1,02 \pm 0,2$  mg/mL contre  $0,65 \cdot 10^{-2} \pm 0,5$  mg/mL. Ces résultats révèlent ainsi que tout comme l'acide ascorbique, l'EAgk a un effet de protection de l'intégrité membranaire des hématies par la résistance aux conditions de stress oxydant des érythrocytes. Cependant, l'acide ascorbique (antioxydant de référence) a un meilleur pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par l'AAPH ( $p < 0,001$ ,  $n = 4$ ). Ces résultats montrent ainsi que ces deux produits utilisés ont une activité anti-hémolytique avec un meilleur potentiel pour l'acide ascorbique (**Figure 4**).

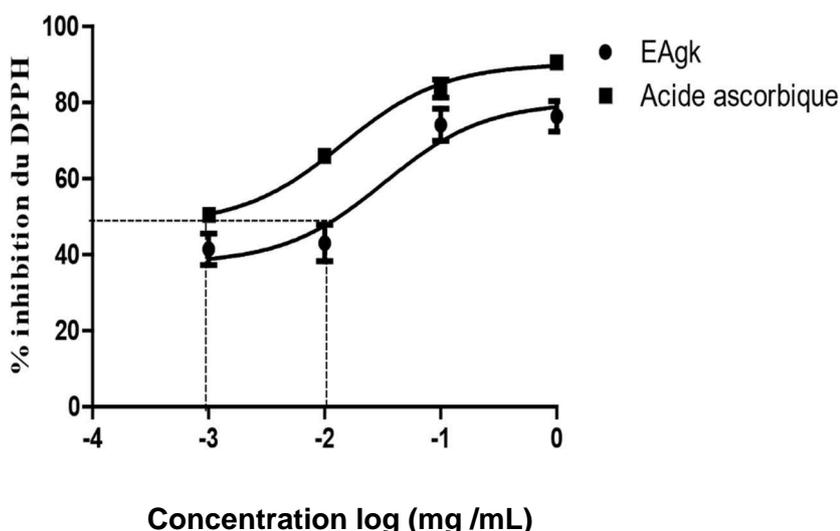


**Figure 4:** Effets anti hémolytiques de l'EAgl et de l'acide ascorbique sur l'hémolyse induite par l'AAPH.

L'EAgl et l'acide ascorbique ont inhibé l'hémolyse avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $1,02 \pm 0,2$  et  $0,65 \cdot 10^{-2}$  mg/ml respectivement. La différence entre les valeurs d'EAgl et d'acide ascorbique est significative ( $***p < 0,001$ ,  $n = 4$ ).

### III.1.4 Activité antiradicalaire de l'extrait en présence de DPPH

Les tests de piégeage du radical DPPH ont permis de montrer que l'EAgl à la concentration de  $10^{-1}$  mg/mL et l'acide ascorbique (antioxydant de référence) ont de bonnes activités de piégeage des radicaux DPPH avec des valeurs de  $CI_{50}$  respectives de  $3,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,12$  mg/mL et  $1,4 \cdot 10^{-3} \pm 0,2$  mg/mL doses-dépendantes. Ces résultats ont aussi révélé que l'acide ascorbique a un meilleur pourcentage d'inhibition du DPPH ( $83,68 \pm 2,36$  %) que celui de l'EAgl ( $74,14 \pm 4,21$  %) (Figure 5)

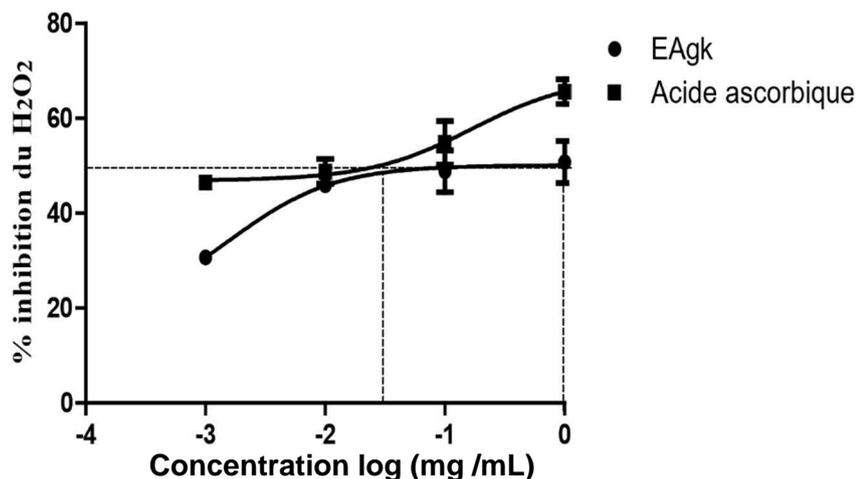


**Figure 5:** Effets anti radicalaires de l'EAgl et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH.

L'EAgl et l'acide ascorbique ont inhibé les radicaux libres DPPH avec des valeurs de  $CI_{50}$  respectivement de  $3,2 \cdot 10^{-2} \pm 0,12$  et  $1,4 \cdot 10^{-3} \pm 0,2$  mg/ml.

### III.1.5 Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux en présence de peroxyde d'hydrogène.

Le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) a révélé que l'EAgk à la concentration de  $10^{-1}$  mg/mL et l'acide ascorbique ont induit des pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène respectifs du  $26,85 \pm 2,41$  % et de  $32,57 \pm 2,3$  % avec des valeurs de  $CI_{50}$  respectives de  $1,01 \pm 0,5$  mg/mL de  $0,52 \cdot 10^{-1} \pm 0,1$  mg/mL doses-dépendantes (**Figure 6**).



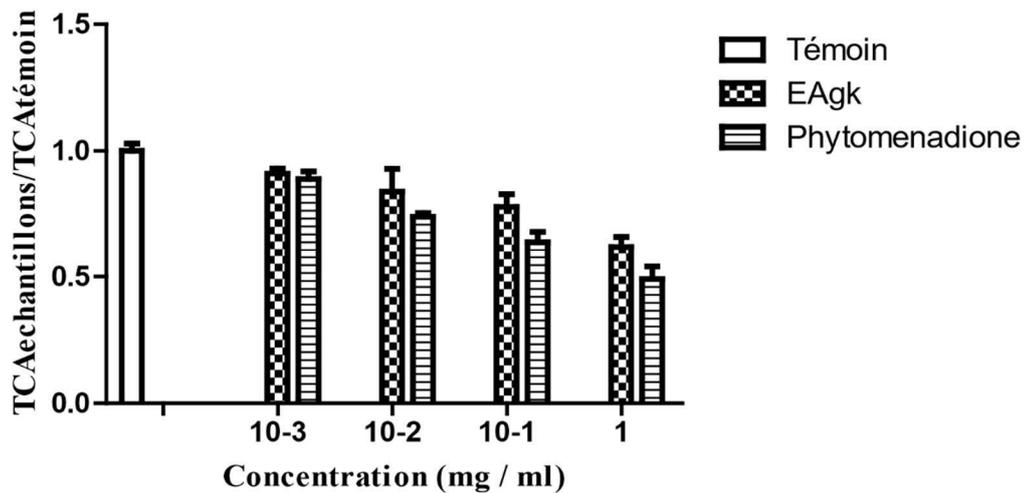
**Figure 6:** Effets antiradicalaires de l'EAgk et de l'acide ascorbique vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

L'EAgk et l'acide ascorbique inhibent le radical peroxyde avec des valeurs  $CI_{50}$  de  $1,01 \pm 0,5$  et  $0,52 \cdot 10^{-1} \pm 0,1$  mg/ml respectivement.

### III.1.6 Activité hémosatique de l'extrait aqueux

#### □ Effets de l'extrait aqueux de *Garcinia kola* sur le temps de céphaline activée (TCA)

Le test d'exploration de la vie intrinsèque ou endogène a permis de voir que l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* (EAgk) et la phytoménadione (vitamine k1) ont provoqué une diminution de dose-dépendante du temps de céphaline activée aux différentes concentrations utilisées. Néanmoins, cette régression est très importante à la concentration de 1 mg/mL. Ces diminutions n'étaient pas significatives par rapport au témoin négatif qui était de l'eau distillée ( $p > 0,05$ ,  $n = 4$ ). Les résultats sont représentés (**Figure 7**).

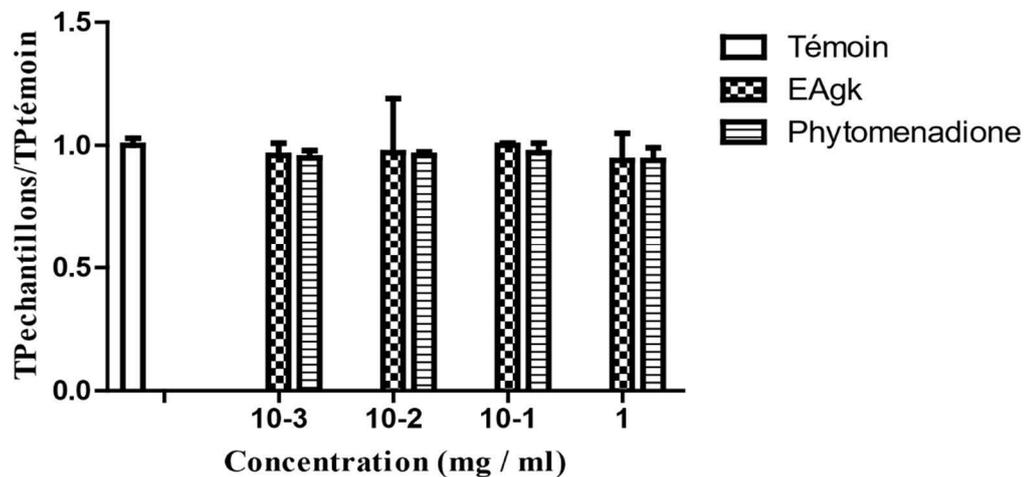


**Figure 7:** Effets de l'EAk et de la phytoméнадione sur le temps de céphaline activée (TCA) *in vitro*.

L'EAk et la phytoméнадione ont diminué le temps de coagulation de manière concentration dépendante par voie intrinsèque. Cette diminution n'était pas significative ( $ns p > 0,05$ ,  $n = 4$ ).

#### □ Effets de l'extrait aqueux de *Garcinia kola* sur le temps de prothrombine (TP)

Le test d'exploration de la voie extrinsèque ou exogène de la coagulation a révélé que le temps de prothrombine n'a pas été affecté par l'application de l'EAk et la phytoméнадione (vitamine K1). Les effets de l'EAk et du phytoméнадione (**Figure 8**).



**Figure 8:** Effets de l'EAk et de la phytoméнадione (vitamine K1) sur le temps de prothrombine *in vitro*

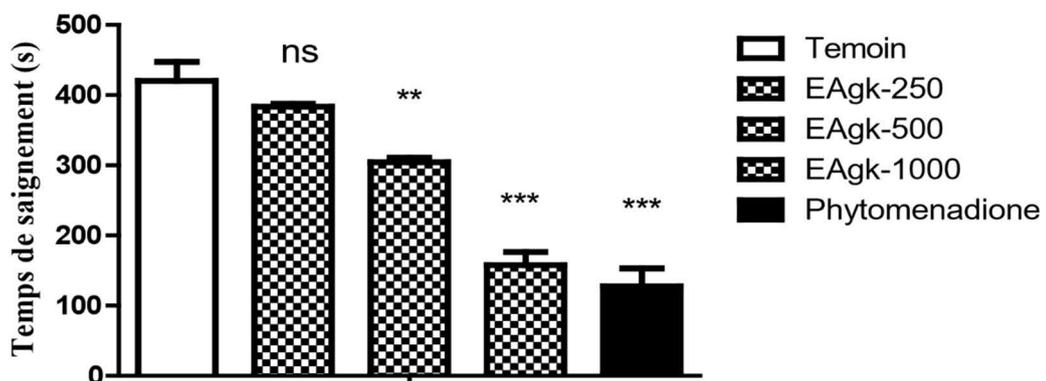
L'EAk et la phytoméнадione n'ont pas affecté le temps de coagulation par voie extrinsèque.

### III.1.7 Toxicité aigüe de l'extrait aqueux

Toxicité aigüe de l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* a montré que l'EAgk à la dose de 5000 mg/kg de poids corporel n'a provoqué aucune mortalité chez le rat. Cependant à la même dose, l'EAgk a induit une modification générale du comportement du rat par rapport au groupe témoin. Ils sont devenus remarquablement calme et sont restés en groupe au coin de la cage. Leur mouvement spontané a été réduit pendant 2 heures.

### III.1.8 Effets de l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* sur le temps de saignement

Le temps de saignement a été raccourci chez les rats traités avec différentes doses (250, 500 et 1000 mg/kg de poids corporel) de l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* par rapport au groupe témoin. La diminution du temps de saignement a été dose-dépendante. Il a été démontré que les groupes de rats traités avec EAgk (1000 mg/kg pc) et phytoméнадione (15 mg/kg pc) ont réduit significativement les saignements avec des valeurs de temps de 157,5 ± 18,9 s et 127,5 ± 25,5 s respectivement, par rapport aux rats témoins (420 ± 27,3 s) ( $p < 0,001$ ,  $n = 4$ ) (Figure 9).



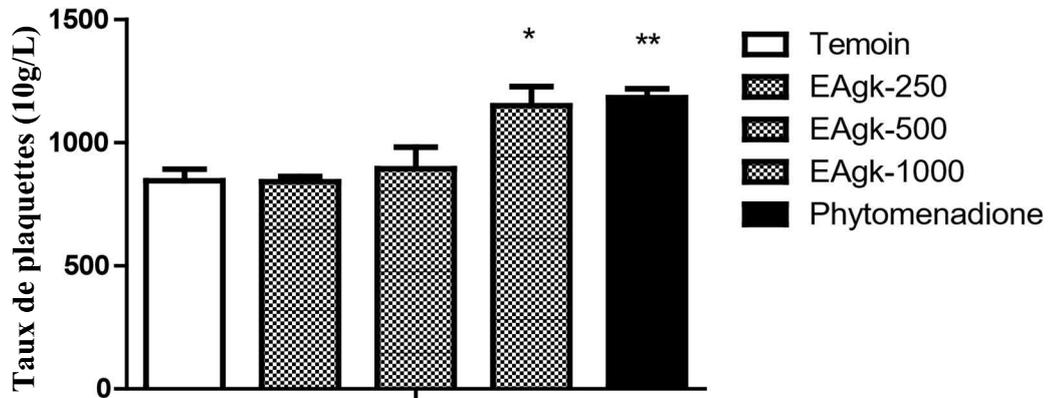
**Figure 9:** Effets de l'EAgk et de la phytoméнадione (vitamine K1) sur le temps de saignement *in vivo*.

L'EAgk (1 000 mg/kg de poids corporel) et la phytoméнадione (15 mg/kg de poids corporel) ont considérablement réduit le temps de coagulation (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ,  $n = 4$ ).

### III.1.9 Effets de l'extrait aqueux sur le taux de plaquettes sanguines

Les effets de l'extrait aqueux sur le taux de plaquettes sanguines a révélé que la numération plaquettaire a augmenté chez les rats traités avec différentes doses (250, 500 et 1000 mg/kg de poids corporel) de l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* par rapport au groupe témoin de rats. Cette augmentation du nombre de plaquettes a été dose-dépendante. Il a été

démontré que les groupes de rats traités avec EA<sub>gk</sub> (1000 mg / kg de poids corporel) et phytoméнадione (15 mg / kg de poids corporel) ont augmenté de manière significative le nombre de plaquettes par rapport au groupe témoin ( $p < 0,1$  ;  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ) (**Figure 10**).



**Figure 10:** Effets de l'EA<sub>gk</sub> et de la phytoméнадione sur la numération plaquettaire *ex vivo*.

L'EA<sub>gk</sub> (1000 mg/kg de poids corporel) et la phytoméнадione ont augmenté de manière significative le nombre de plaquettes (\*  $p < 0,1$  ; \*\* $p < 0,01$  ;  $n = 4$ ).

### III.2. DISCUSSION

Les propriétés anti-radicalaires de l'extrait des graines de *Garcinia kola* pourraient être attribuées à la présence de composés phénoliques révélés par un criblage phytochimique. Les polyphénols sont responsables de nombreuses activités pharmacologiques telles que leur capacité à piéger les radicaux libres et leur activité hémostatique **Triratana et al. (1991)** ; **Nanasombat & Teckchuen (2009)**.

Selon l'ordre professionnel des technologues médicaux du Québec, il est fortement déconseillé d'effectuer une analyse d'hémostase sur un échantillon hémolysé (**OPTMQ, 2017**). Les échantillons hémolytiques ne conviennent pas aux tests de coagulation en raison de la libération d'hémoglobine, de composants intracellulaires et de substances thromboplastiques à partir de cellules sanguines endommagées **Lippi et al. (2006)**.

L'étude des activités hémolytiques et anti-hémolytiques de l'extrait des graines de *Garcinia kola* a été entreprise pour apprécier la capacité de l'extrait à protéger les globules rouges contre l'hémolyse. La préincubation des globules rouges avec l'extrait des graines de *Garcinia kola* n'a montré aucun effet nocif sur les cellules. De plus, l'extrait a inhibé l'hémolyse induite par le 2,2'-azobis di chlorhydrate de (2-méthylpropionamide) (AAPH). À température

physiologique, l'AAPH peut se décomposer pour générer des radicaux alkyles qui initient la peroxydation lipidique et l'hémolyse **Hsin-Ling et al. (2017)**. L'action protectrice de l'extrait de graines de *Garcinia kola* contre l'hémolyse peut être due à la capacité de l'extrait à piéger le radical hydrazyl 2, 2-diphényl-1-picryl et le radical peroxyde évalués dans notre étude.

Dans les expériences *ex vivo*, l'extrait de *Garcinia kola* et la vitamine K1 ont augmenté le nombre de plaquettes. La corrélation entre la numération plaquettaire et le temps de saignement a été rapportée par plusieurs auteurs. La numération plaquettaire a été significativement plus faible et le temps de saignement significativement prolongé chez les patients atteints de prééclampsie par rapport au groupe témoin **Ramanathan et al. (1989)**. De plus, une numération plaquettaire élevée a été associée à un risque multiplié par 1,8 de thrombose artérielle dans le cerveau **Warny et al. (2019)**. Ainsi, l'augmentation du nombre de plaquettes induite par l'extrait de graines de *Garcinia kola* pourrait justifier les effets de raccourcissement du temps de saignement.

L'extrait de *Garcinia kola* et la phytoménadione ont raccourci le temps de céphaline activée *in vitro* alors que le temps de prothrombine n'a pas été affecté. Cependant, la diminution du temps de céphaline activée n'a pas été pas significative. L'extrait pourrait agir par la voie intrinsèque de la coagulation. Cette voie fait intervenir les protéines plasmatiques, les facteurs VIII, IX, XI et XII ; et la prékallikréine **Wheeler & Galiani (2016)**.

Il est bien documenté dans la littérature que la phytoménadione renforce la coagulation, mesurée par la diminution du temps de prothrombine et l'augmentation de l'activité des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K et de la génération de thrombine **Dahlberg et al. (2021)**. Les effets de la vitamine K1 sur le temps de prothrombine dans cette étude sont différents de ceux obtenus dans nos expériences. Cette différence peut être due aux conditions expérimentales qui ne sont pas les mêmes.

# CONCLUSION



La présente étude indique que l'extrait aqueux des graines de *Garcinia kola* raccourcit le temps de saignement, diminue le temps de céphaline activée et augmente le nombre de plaquettes. L'extrait a protégé les globules rouges du sang contre l'hémolyse et impliquerait la coagulation sanguine par voie intrinsèque. Les graines de *Garcinia kola* possèdent des propriétés hémostatiques. Cette propriété est justifiée par la présence de composants coagulants dans l'extrait. D'autres études sont nécessaires pour isoler le composant coagulant et pour mieux comprendre le mécanisme de son action pharmacologique.

# REFERENCES

- Abo K. J. C. (2013). De la plante à la molécule : toxicité, effets pharmacologiques et mécanisme d'action de *Justicia Secunda* (Acanthaceae), plante antihypertensive, sur le système cardio-vasculaire de mammifères. Thèse de doctorat d'état des Sciences Naturelles, Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 351 pp.
- Adaramoye O. A. & Adeyemi E. O. (2006). Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of fractions from kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia Kola* in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 121-8.
- Adesina S. K., Gbile Z. O. & Odukoya O. A. (1995). Survey of indigenous plants of West Africa with special emphasis on medicinal plants and issues associated with management. The United Nations Programme on Natural Resources in Africa; 2nd edition. 84–5.
- Atsukwei D., Eze E. D., Moses D. A., Joshua A. T., Onaadepo O. & Malgwi I. S. (2015). Effect of *Garcinia kola* seed ethanolic extract on renal function indices in male Wistar rats. *International Journal of Pharmacology Sciences and Research*, vol 6, 8 : 1193-1200 pp.
- Bessada et al. (2015). Espèces d'Asteraceae avec la bioactivité la plus importante et leurs applications potentielles : examen, La source du livre : Cultures et produits industriels 2015 v. 76 pp 604-615
- Brand-Williams. (1995). Utilisation d'une méthode radicalaire pour évaluer l'activité antioxydante, 25-30.
- Broekema F. I., Oeveren W. V. & Bos R. R. M. (2016). Analysis of the hemostatic efficacy of polyurethane foam using a novel method to compare topical hemostatic agents in a rat tail-tip model. *International Surgery Journal*, 3, 1551–1556.
- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A. & Akpulat H. A. (2003). Cell Lysis on Routine Coagulation Testing. *Archives of Pathology Laboratory and Medicine*, 130, 181-184 .
- Christian N. (2011). Les interactions entre les antithrombotiques et les plantes médicinales Copenhagen General Population study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17, 1898-1911.
- Dahlberg S., Schott U., Eriksson E. A., Tahirsyla Y., Schurgers L. & Kinder T. (2021) Intravenous vitamin K1 for correction of prolonged prothrombin times in non-bleeding critically III patients : A prospective observational study. *Nutrients*, 13, 2580-2591.
- Dalziel J. M. (1937). The Useful Plants of West Tropical Africa. Crown Agents for the Colonies, London.
- De Revel T., Doghmi K. (2004) Physiologie de l'hémostase. Encyclopédie Médico Chirurgicale

22-009-D-20 pp

- Dinzedi M R. (2015). Activités antibactériennes de extraits de *Terminalia catappa* et *Thonningia sanguinea* sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* multiresistantes d'origine humaine. Thèse de Doctorat de l'Université Félix HouphouëtBoigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 133 p.
- Ebana R. U., Madunagu B. E. & Ekpe E. D. (1991). Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*, *Borreria ocymoides*, *Kola nitida* and *Citrus auratifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 398-401.
- Esiegwu AC, Okoli IC, Emenalom 00, Esonu BO & Udedibie ABI (2014). The emerging nutraceutical benefits of the African wonder nut (*Garcinia kola* Heckel). *Global Journal of Animal scientific Reseach*, 2 (2) : .170-1 83.
- Farombi E. O., Abolaji A. O., Farombi T. H., Oropo, A. S., Owoje O. A. & Awunah M. T (2015) *Garcinia kola* seed biflavonoid fraction (Kolaviron), increases longevity and attenuates rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, 145, 39–45.
- Hamouda H. (2020). Hémolyse normale et pathologique. Cours, Université Ferhat Abbas1 Faculté de médecine de Sétif, 33.
- Houmènou V., Adjatin A., Assogba F., Gbénu J. & Akoègninou A. (2018). Etude phytochimique et de cytotoxicité de quelques plantes utilisées dans le traitement de la stérilité féminine au Sud-Bénin. *Journal scientifique européen*, ESJ, 14 (6), 156.
- Hsin-Ling Y., Mallikarjuna K., Ming-Kuem L., Hebron C., Chi-Rei W. & Meng-Shiou L. *et al.* (2017). Antihemolytic and antioxidant properties of pearl powder against 2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride-induced hemolysis and oxidative damage to erythrocyte membrane lipids and proteins. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 898907.
- Igwegbe C. A., Ighalo J. O., Onukwuli O. D., Oblora-okafo I. A. & Anastopoulos L. (2021) Coagulation-flocculation of Aquaculture wastewater using green coagulant from *Garcinia kola* seeds: Parametric studies, kinetics modelling and cost analysis. *Sustainability*, 13, 9177-9189.
- Iwu M. (1993) Handbook of African medicinal plants.CRC Press, Boca Raton F.L. 12 : 32-38 pp.
- Juliana A., Moctar S. & Christophe K. (2006) *Garcinia kola* Heckel. Forest & Land scape Denmark.

- Lagnika L., Amoussa M., Adjovi Y. & Sanni A. (2012). Antifungal, antibacterial and
- Lazureski G. V., Terenteva I. V. & Chamchurin A. A. (2007). Pratiqueskii raboti po khimii soedinienii. *Vischaya Chkola*, (Moscou, Russie) ; 334.
- Lazureski G. V., Terenteva I. V. & Chamchurin A. A. 2007. Pratiqueskii raboti po khimii soedinienii.. *Vischaya Chkola*, (Moscou, Russie) ; 334 p
- Lippi G., Salvagno G. L., Montagnan M., Poli G. & Guidi G. C. (2006). Interference of Blood Cell Lysis on Routine Coagulation Testing. *Archives of Pathology Laboratory and Medicine*, 130, 181-184.
- Mandal C., Dhara A. K., Ashok K. C. K., Maiti B. C. (2001), Neuropharmacological activity of *Xanthium Strumarium* Linn. Extract. *Journal of Herbs, Species Medicinal Plants*, 8, 69-77.
- Mao W., Li H., Li Y., Zhang H., Chen Y., Guo S. (2009). Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta) *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 7074.
- Marin B. et Chrestin H. (2007) La valorisation des plantes médicinales. Fond documentaire ORSTOM,
- Mathew O.W. & Blessing C.D. (2007). Hepatoprotective effects of *Garcinia kola* seed against hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Biokemistri*, 19, 17-21.
- Maureen Mc M. D.V.M. (2012) New Models of Hemostasis. *Topics Companion Animal Medicine*, 27, 40-45.
- Mea A., Ekissi Y. H. R., Abo K. J. C. & Kahou B. G. P. (2017). Hypoglycaemiant and antihyperglycaemiant effect of *Juscticia secunda* m. vahl (Acanthaceae) on glycaemia in the Wistar rat. *International Journal of Development Research*, 07(06), 13178-131.
- Michel Hanss (2012). Anomalies constitutionnelles de la fibrinolyse et syndromes hémorragiques, *Revue Francophone des Laboratoires*, 443, 39-45.
- Nanasombat S. & Teckchuen N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 443-449.
- Nigel M., Rachel E. T. & Nigel S. K. (2007). Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Atherosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 27, 1687-1693.
- Nwangwa E. K. (2012). Effects of *Garcinia kola* on the Lipid Profile of Alloxan-Induced Diabetic Wistar Rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3, 39-42.

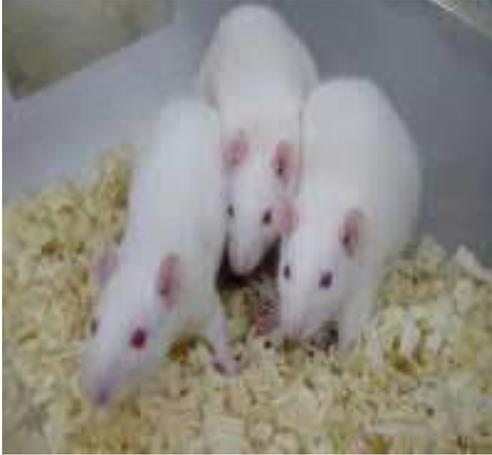
- OCDE. (2001). Test guide line 423 : OECD guide line for chemicals. [On line], 20 january 2022 Available.
- OPTMQ (2017). Guide d'hémostase. ISBN : 978-2-9816759-1-0.
- Okoka T. & Ere D. (2012). Antioxidant activities of *Solenostemon monostachyus* leaf extract using *in vitro* methods. *Scientific Research and Essays*, 7, 621-626
- Otor J. U., Abdulkadir U. & Abu M. A. (2001). Some biological activities of *Garcinia kola* in growing rats. *Veterinary Archives* ; 71 (5) : 287-297.
- Pandith H., Thongpraditchote S. & Wongkrajang Y. (2012). *In vivo* and *in vitro* hemostatic activity of *Chromolaena odorata* leaf extract, *Pharmaceutical Biology*, 50,1073-1077.
- Penduka D., Okoh O. O. & Okoh A. I. (2011). *In-Vitro* Antagonistic Characteristics of Crude Aqueous and Methanolic Extracts of *Garcinia kola* (Heckel) Seeds against Some *Vibrio Bacteria*. *Molecules*, 16, 2754-2765.
- Ramanathan J., Sibai B. M., Vu T. & Chauhan D. (1989). Correlation between bleeding times and platelet counts in women with preeclampsia undergoing cesarean section. *Anesthesiology*, 71, 188-191.
- Sogut O., Erdogan M. O., Kose R., Boleken M. E., Kaya H. & Gokdemir M. T. (2020) Effects of Algan Hemostatic Agent on bleeding time in a rat tail hemorrhage model. *Turkish Association of Trauma and Emergency Surgery*, 26, 853-858.
- Son E., Kim H. S., Yan W. K. & Kim D. S. (2017). Antiplatelet mechanism of an herbal mixture prepared from the extracts of *Phyllostachys pubescens* leaves and *Prunus mume* fruits. *Complementary Alternative Medicine*, 17, 541-552.
- Tebekeme O. (2009). *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activities of *Garcinia kola* seeds. *Food Chemistry and Toxicology*, 47 ,2620–2623.
- Totuk M. G., Güzel Ş. E., Ekici H., Kumandaş, A. (2020), Effects of AHA on bleeding time in a rat tail hemorrhage model. *Turkish Association of Trauma and Emergency Surgery*, 26, 853-858.
- Triratana, T., Suwannuraks, R. & Naengchomnong W. (1991). Effect of *Eupatorium odoratum* on blood coagulation. *Journal of Medical Association of Thailand*, 74, 283–287.
- Udenze E. C. C., Braide V. B., Okwesilieze C. N. & Akuodor G. C (2012). Pharmacological Effects of *Garcinia kola* Seed Powder on Blood Sugar, Lipid Profile and Atherogenic Index of Alloxaninduced Diabetes in Rats. *Pharmacologia*, 3 (12) : 693-699.
- Vyas C. S. & Saha, S. P. (2013). Comparison of hemostatic agent used in vascular surgery.

- Expert Opinion Biology and Therapy*, 13, 1663-1672.
- Wagner H. & Blatt S. (2001). Plant Drug analysis. A thin layer chromatography atlas. 2<sup>ème</sup> édition. *Springer*. (Berlin, Allemagne) ; 384.
- Warny M., Helby J., Birgens H. S., Borge S. B. & Nordestgaard G. (2019). Arterial and venous thrombosis by high platelet count and high hematocrit: 108521 individuals from the Copenhagen General Population study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17, 1898- 1911.
- Wheeler A. P. & Gailani D. (2016). The intrinsic Pathway of Coagulation as Target for Antithrombotic Therapy. *Oncology Clinical Northern America*, 30, 1099-1114.
- Yuan X., Wang J., Yao H. & Chen F. (2005). Free radical scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. *LWT-Food Sciences and Technology*, 38, 877-883.
- Zang Y., Giboulot A., Zivy M., Valot B., Jamet E. & Alenne C. (2011). Combining various strategies to increase the coverage of the plant cell wall glycoproteome. *Phytochemistry*, 72, 1109-1123.

# ANNEXES

## ANNEXES

### Annexe 1 : Matériel animal



Rats wistar



Oryctolagus cuniculus

### Annexe 2 : Matériel technique



Un bain marie



Une balance à précision



Une centrifugeuse



Une étuve à sécher



Un coagulomètre



Spectrophotomètre UV-Visible

## RESUME

**Objectif** : Les graines de *Garcinia kola* (EAgk) (Clusiaceae) contiennent des composants coagulants utilisés pour prétraiter les eaux usées d'aquaculture au Nigeria. Ce travail a été entrepris pour évaluer les effets de l'EAgk sur la coagulation sanguine en raison de son contenu. **Méthodes** : Cinq groupes de quatre rats des deux sexes ( $200 \pm 5$  g) ont reçu de l'eau distillée par voie orale, de la phytoménadione (15 mg/kg p.c.) et de l'extrait de graines de *Garcinia kola* (250, 500 et 1000 mg/kg p.c.) pendant quatre jours et après cette période, le temps de saignement a été mesuré par le modèle d'hémorragie de la queue. Le temps de céphaline activée (TCA) et la numération plaquettaire ont été déterminés respectivement par un coagulomètre et un analyseur hématologique. La protection des globules rouges sanguins par l'EAgk a été mesurée par les méthodes d'hémolyse induite par le dichlorhydrate de 2,2'-azobis (2méthylpropionamide) (AAPH) et l'inhibition du radical 2, 2-diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH) et du peroxyde d'hydrogène. **Résultats** : EAgk à 1 000 mg/kg de p.c. induit une diminution significative du temps de saignement de  $420 \pm 27, 3$  s à  $157,5 \pm 18, 9$  s. Le taux de plaquettes du groupe de rats traités avec EAgk (1000 mg/kg de poids corporel) a augmenté de manière significative ( $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ). L'application d'EAgk a diminué le TCA de manière concentration- dépendante ( $p > 0, 05$ ,  $n = 4$ ). EAgk a inhibé l'hémolyse, le radical DPPH et le peroxyde d'hydrogène avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de  $1, 02 \pm 0, 2$  ;  $3, 2 \cdot 10^{-2} \pm 0, 12$  et  $1, 01 \pm 0, 5$  mg/mg respectivement. **Conclusion** : L'EAgk présente des effets hémostatiques, ce qui pourrait justifier la présence de composants coagulants dans l'extrait. L'activité protectrice des érythrocytes des graines de *Garcinia kola* peut être due à l'inhibition des radicaux libres et du peroxyde d'hydrogène.

**Mots clés** : *Garcinia kola*, Hémostatique, Antihémolytique, Temps de saignement, plaquette.

## ABSTRACT

**Objectives** : *Garcinia kola* seeds (EAgk) (Clusiaceae) contains coagulant components use to pretreat aquaculture wastewater in Nigeria. This work was undertaken to assess the effects of EAgk on blood coagulation because of its contents. **Methods** : Five groups of four rats of both sexes ( $200 \pm 5$  g) received orally distilled water, phytomenadione (15 mg/kg b.w) and *Garcinia kola* seeds extract (250, 500 and 1000 mg/kg b.w.) for four days and after this period, bleeding time was measured by tail hemorrhage model. Activated partial thromboplastin time (aPTT) and platelet count were determined by coagulometer and hematological analyzer respectively. Blood red cells protection of EAgk was measured by the methods of 2,2'-Azobis (2methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and inhibition of 2, 2Diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) radical and hydrogen peroxide. **Results**: EAgk at 1000 mg/ kg b.w. induced a significant decrease of bleeding time from  $420 \pm 27, 3$  s to  $157.5 \pm 18, 9$  s. The platelet count of group of rat treated with EAgk (1000 mg/ kg b.w) increased significantly ( $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ). EAgk application, decreased aPPT in a concentration-dependent manner ( $p > 0, 05$ ,  $n = 4$ ). EAgk inhibited hemolysis, DPPH radical and hydrogen peroxide with IC<sub>50</sub> values of  $1, 02 \pm 0, 2$ ;  $3, 2 \cdot 10^{-2} \pm 0, 12$  and  $1, 01 \pm 0.5$  mg / mg respectively. **Conclusions** : EAgk exhibits hemostatic effects, which could justify the presence of coagulant components in the extract. Erythrocytes protective activity of *Garcinia kola* seeds may be due to free radicals and hydrogen peroxide inhibition.

**Keywords** : *Garcinia kola*, Hemostatic, Antihemolytic, Bleeding time, platele

