

ÉTUDE TOXICOLOGIQUE AIGUË ET SUBAIGUË DE LA PARTIE AÉRIENNE DE *RUBUS ULMIFOLIUS* SCHOTT (ROSACEAE) DANS UN MODÈLE ANIMAL

CHABANE Dalila^{1*}, SAIDI Fairouz¹ et ROUIBI abdelhak¹

1. Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université Blida 1, B.P.270, route de Soumaa, Blida, Algérie.

Reçu le 02/01/2021, Révisé le 24/10/2021, Accepté le 12/11/2021

Résumé

Description du sujet : *Rubus ulmifolius* connue sous le nom vernaculaire de ronce à feuille d'orme est une plante de la famille des Rosaceae, utilisée en médecine traditionnelle. La présente étude s'est focalisée sur l'évaluation de la toxicité aiguë et subaiguë sur un modèle animal.

Objectifs : L'objectif de cette étude est d'estimer la toxicité aiguë et subaiguë qui n'a pas fait objet d'étude ; nous avons donc déterminé l'effet toxique possible de cette plante sur les paramètres biochimiques, hématologiques et histologique chez les rats.

Méthodes : Dans l'étude de la toxicité aiguë, on a administré par voie orale à des souris des doses comprises entre 1,25 et 12,5g/kg en une seule prise. Le comportement général, les effets indésirables et la mortalité ont été déterminés jusqu'à 14 jours après le traitement. Dans l'étude de la toxicité subchronique l'extrait de *Rubus ulmifolius* a été administré quotidiennement à des rats à des doses de 100, 300 et 600 mg/kg/jours pendant 28 jours. Le poids corporel des animaux a été observé tout au long de la période expérimentale, tandis que les paramètres biochimiques et hématologiques du sang et de l'urine, ainsi que l'histologie des tissus rénaux et hépatiques ont été évalués à la fin de l'expérience.

Résultats : Dans l'étude de la toxicité aiguë chez les souris aucune des doses administrées n'a induit aucune mortalité. Les doses subaiguës testées n'ont eu aucun effet sur les paramètres étudiés.

Conclusion : En conclusion la toxicité aiguë n'a induit aucune mortalité chez les souris, les doses subaiguës testées n'ont eu aucun effet sur les tissus. Ces résultats démontrent que la plante peut être utilisée sans danger. Toutefois, nous suggérons une étude chronique à long terme pour confirmer ses résultats.

Mots clés : Aiguë ; animal ; *Rubus ulmifolius* ; subaiguë ; toxicité.

TOXICOLOGICAL OF ACUTE AND SUB-ACUTE OF AERIAL PART OF *RUBUS ULMIFOLIUS* SCHOTT L. (ROSACEAE) IN EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL

Abstract

Description of the subject: *Rubus ulmifolius* known as the vernacular name elm leaf bramble is a plant of the Rosaceae family, used in traditional medicine. The present study focused on the evaluation of the acute and sub-acute toxicity in an animal model.

Objective: The aim of this study is to evaluate the acute and sub-acute toxicity that has not been studied. We therefore determined the possible toxic effect of aqueous extract of *Rubus ulmifolius* on biochemical and hematological parameters in rats.

Methods: In acute studies, a single administration was given orally to mice at doses ranging from 1.25 to 12.5 g/kg. General behavior, adverse events and mortality were determined up to 14 days after treatment. In the sub-chronic study, the *Rubus ulmifolius* extract was given orally as a single administration to Wistar rats at doses of 100, 300 and mg/kg /day for 28 days. Animal body weight was observed throughout the experimental period while biochemical and hematological parameters of blood and urine, as well as kidney and liver tissues histology were evaluated at the end of the experiment.

Results: In the acute toxicity study in mice, none of the administered doses induced mortality. The sub-acute doses tested had no effect on the parameters studied.

Conclusion: In conclusion, acute toxicity induced no mortality in mice, the sub-acute doses tested had no effect on tissues. These results show that the plant can be used safely. However, we suggest a long-term chronic study to confirm the results.

Keywords: Acute; animal, *Rubus ulmifolius*; sub-acute; toxicity.

* Auteur correspondant : CHABANE Dalila, Email : chabilila4@gmail.com

INTRODUCTION

Les espèces de *Rubus* (famille des Rosacées) ont été utilisées traditionnellement à des fins thérapeutiques [1]. C'est une plante qui pousse en Europe méditerranéenne, en Asie et en Afrique [2, 3], Elle est réputée pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-diabétiques [4, 5], antalgiques [6] et antimicrobiennes [7], La décoction de feuilles est utilisée pour les yeux rouges, lavages vaginaux, ulcères de la bouche et pour un usage interne tels que la diarrhée, les hémorroïdes et les inflammations intestinales [8]. Les composés purs, isolés de la plante, tels que l'ursane, l'oléanane triterpènes et les glycosides flavonoïdes, exercent une activité antimicrobienne sur plusieurs micro-organismes certaines bactéries multirésistantes tels que *staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa* [9]. On sait que la consommation de plantes médicinales sans évaluation de l'efficacité et de la sécurité peut entraîner des effets inattendus ou toxiques qui peuvent affecter différents organes, c'est dans cette optique que notre étude s'est focalisée sur la toxicité subaiguë de *Rubus ulmifolius*, recèle-t-elle des molécules toxiques ?

Leurs impacts sur certains organes cibles du fait de leurs implications dans le métabolisme et l'excrétion de composés chimiques et pourrait être un danger potentiel sur la santé humaine. Les lésions rénales ont également été associées à l'utilisation de plantes médicinales dans le traitement de différentes maladies [10]. La toxicité subaiguë de la plante n'a pas fait l'objet d'étude. Nous estimons donc déterminer l'effet toxique possible de l'extrait aqueux de *Rubus ulmifolius* Schott sur les rats Wistar, après une seule administration orale quotidienne durant 28 jours.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Rubus ulmifolius (Ru) a été collectée en septembre 2013 dans le parc national de protection des plantes à Chréa (Blida) à 50 km au sud-ouest d'Alger (Latitude: 36.4256, Longitude: 2.87667 36° 25' 32" Nord, 2° 52' 36" Est). Le matériel végétal a été lavé, séché et broyé en poudre fine entreposée dans des sacs en papier. La plante a été authentifiée par le Département de Botanique de l'École Nationale des Sciences Agronomiques (ENSA, Alger) et comparée à un spécimen de référence déposé dans ce dernier. L'extrait aqueux de *Rubus ulmifolius* (EARU) a été préparé comme suit :

la poudre est mise en suspension dans de l'eau distillée (50 g de poudre pour 500 ml d'eau), puis chauffée pendant 30 min, la décoction a été centrifugée et filtrée. Le rendement brut de l'extrait lyophilisé (extrait de plante) est d'environ 20% et conservé à 2°C jusqu'à son utilisation ultérieure [11]

2. Matériel animal

Le test de toxicité aiguë a été réalisé pendant quatorze jours sur des souris *Mus Musculus* mâles et femelles, pesant entre 20 et 29 g de souche NMRI (Institut de recherche médicale navale), d'origine suisse, importés d'IFFA-CREDO (Lyon). L'évaluation de la toxicité subaiguë a été réalisée sur des rats Wistar pesant entre 200 et 270 g. Les animaux ont été livrés par le laboratoire pharmacologique du complexe antibiotique (SAIDAL, Alger). Les animaux ont été logés 6 par cage en plastique avec photopériode (de 6h00 à 18h00), les changements d'air et la température ambiante contrôlée (24±1°C). Tous les animaux avaient libre accès à l'eau et à la nourriture. Toutes les procédures utilisées dans l'étude ont suivi les principes du laboratoire IFFA-CREDO et ont été approuvées par le laboratoire d'éthique animale de SAIDAL.

3. Toxicité aiguë

Les souris ont été divisées en 2 groupes de 6 animaux chacun (3 mâles et 3 femelles). Le premier groupe (groupe témoin) a reçu de l'eau distillée, tandis que les groupes restants ont reçu oralement en doses uniques d'EARU à raison de 1,25, 2,50, 5,00, 7,50, 10,00 et 12,50 g / kg, respectivement. Les animaux ont été observés en matière de comportement et de mortalité pendant une période de 14 jours après le traitement [12].

4. Toxicité subaiguë

Les animaux ont été divisés en 4 groupes de 6 animaux chacun (3 mâles et 3 femelles) et leurs poids ont été enregistrés. Les rats du groupe témoin ont reçu de l'eau distillée, tandis que trois autres groupes ont été traités par EARU à raison de 100, 300 et 600 mg respectivement [12]. Les doses ont été choisies selon la littérature en fonction des doses efficaces appliquées notamment sur l'activité hépatoprotectrice [13]. Le traitement est administré en une seule prise par voie orale pendant 28 jours. Les animaux ont été observés pour des signes de toxicité et de mortalité tout au long de la période de traitement.

De plus, le poids corporel des animaux était enregistré à la fin de chaque semaine. Le dernier jour du traitement, les animaux ont été placés dans des cages individuelles pendant 24 h et l'urine a été collectée. À la fin du traitement, les animaux ont été mis à jeun toute la nuit, tout en permettant un libre accès à l'eau. Ils ont ensuite été anesthésiés à l'éther et le sang prélevé à l'EDTA, un anticoagulant, par des ponctions rétro-orbitales [14], en utilisant des tubes capillaires pour des études hématologiques et biochimiques, respectivement. Après le prélèvement du sang, les rats ont été sacrifiés. Les organes tels que le cœur, le foie, les poumons, les reins et la rate ont été recueillis et pesés. Les rapports poids de l'organe / poids corporel total (PC) de chaque rat ont été comparés à ceux du groupe témoin.

5. Paramètres Hématologique et biochimiques chez les rats

L'analyse hématologique a été réalisée à l'aide d'un analyseur automatique d'hématologie. Les paramètres inclus : le nombre de globules rouges, le nombre de leucocytes, l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (HCT), le volume corpusculaire moyen (MCV), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC) et le nombre de plaquettes [16, 17]. Pour l'analyse biochimique, le sang et l'urine ont été centrifugés à 3500 tr / min pendant 10 min. Le sérum a été séparé et conservé au frais jusqu'à la détermination du glucose, de l'aspartate amino transférase (AST), de l'alanine amino transférase (ALT), du cholestérol total (TC), des triglycérides (TG) et des protéines totale (TP). Le dosage des indices de la fonction rénale dans le sang a été déterminé par concentration de créatinine et d'urée [15, 16].

6. Examen histologique

Des échantillons du foie et des reins ont été déshydratés avec une solution d'éthanol en série et enfermés dans de la paraffine. Des coupes micrométriques coupées au microtome de 5 mm

ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) et examinées au microscope optique ; des microphotographies des échantillons ont été enregistrées [17].

7. Analyse Statistique

L'analyse statistique a concerné quatre groupes de rats, un groupe témoin et trois groupes expérimentaux (I, II et III) traités avec différentes doses d'extrait aqueux de la partie aérienne de *Rubus ulmifolius* (100, 300 et 600 mg / kg / jour, respectivement). Les poids relatifs des rats (par rapport au poids initial) ont été calculés sur une période de vingt-huit jours (30 mesures, six par jour pour les jours 0, 7, 14, 21 et 28) pour le groupe témoin et les différents groupes expérimentaux. Les gains des groupes I, II et III par rapport au groupe témoin ont été comparés par le test de Wilcoxon. Les poids moyens des organes et les paramètres hématologiques des différents groupes ont été comparés par ANOVA one way, le test Dunnett a été utilisé pour la comparaison entre le groupe témoin et les différents groupes, en raison d'un léger écart par rapport à la normalité et de l'hétérogénéité des variances. Les paramètres biochimiques ont été comparés à l'aide d'ANOVA non paramétrique Kruskal-Wallis. Les groupes présentant des différences significatives ont été identifiés avec les multiples comparaisons des moyennes.

RÉSULTATS

1. Toxicité aiguë

Aucun décès ni aucun signe de toxicité n'ont été observés lors de l'administration par voie orale des doses uniques de l'EARU jusqu'à la dose la plus élevée (12,5 g/kg de poids corporel). Toutefois certains effets indésirables ont été observés, tels que l'hypoactivité, la salivation, l'anorexie et sommeil à la dose la plus élevée testée. La dose létale médiane (DL50) de *Rubus ulmifolius* était alors supérieure à 12,5 g/kg de poids corporel. (Tableau 1).

Tableau 1 : Effets des différentes doses administrées par voie orale sur le comportement général des souris

Dose (g/kg)	D/T	Symptômes
0,00	0/6	Non
1,25	0/6	Non
2,50	0/6	Non
5,00	0/6	Non
7,50	0/6	Non
10,0	0/6	Non
12,5	0/6	Calme, perte d'appétit, somnolence

Chaque dose a été administrée à un groupe (3 mâles and 3 femelles).D/T : Souris mortes/ souris traitées

2. Toxicité subaiguë chez les rats

Aucune exposition subaiguë n'a entraîné une altération des organes et du poids corporel des

rats aussi bien dans le groupe témoin que dans les groupes expérimentaux (Tableau 2).

Tableau 2 : Effets des différentes doses de EARU sur le poids des organes (g/100g PC) des rats Wistar pendant 28 jours.

Organes	Control	Traitement (g/kg)		
		100	300	600
Coeur	0,35±0,001	0,37±0,01	0,38±0,02 ab	0,40±0,01 b
Foie	2,29±0,05	0,32±0,05	2,26±0,08 a	2,48±0,22 a
Rein	0,63±0,02	0,63±0,02	0,62±0,03 a	0,63±0,01 a
Rate	0,72±0,01	0,73±0,01	0,71±0,02 a	0,73±0,01 a
Poumon	0,30±0,01	0,32±0,01	0,32±0,01 b	0,33±0,01 b

Les valeurs dans la même ligne avec lettres différentes en exposant indiquant des moyennes avec des différences significatives ($p < 0,05$, $n = 6$, 3/sexe)

La comparaison des différents paramètres biochimiques : glycémie, créatinine, urée et

d'autres paramètres hépatiques sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Paramètres des fonctions hépatique et rénale suite à l'administration des différentes doses des extraits de *Ru* par voie orale pendant 28 jours

Paramètres	Control	EARU			P
		I	II	III	
Gly (g /L)	1,02±0,04	1,07±0,07	0,98±0,02	1,00±0,02	0,02
Créatinine (mg/L)	0,68±0,01	0,68±0,01	0,68±0,01	0,72±0,01	0,06
TC (mg /dL)	43,2±0,9	44,2±0,9	43,6±0,9	0,72±0,01	0,06
TG (g/L)	0,93±0,02	0,88±0,01	0,80±0,01	0,69±0,02	0,0001
AST (d/L)	59,9±0,6	59,5±0,5	58,8±1,5	55,6±1,0	0,054
ALT (d/L)	90,6±0,8	85,3±1,3	82,8±1,0	78,1±0,4	0,0002
Urée (mg/dL)	68,0±1,2	85,1±0,9	80,9±0,7	69,6±1,2	0,0003
TP (g/L)	54,5±0,7	54,4±0,9	52,3±0,6	51,5±0,4	0,022

EARU : Extrait aqueux de *Rubus ulmifolius*, TC: cholestérol total, TG: triglycérides; TP: Protéine totale; Gly: glycémie (Chaque valeur représente la moyenne ± SE, $n = 6$, 3/ sexe)

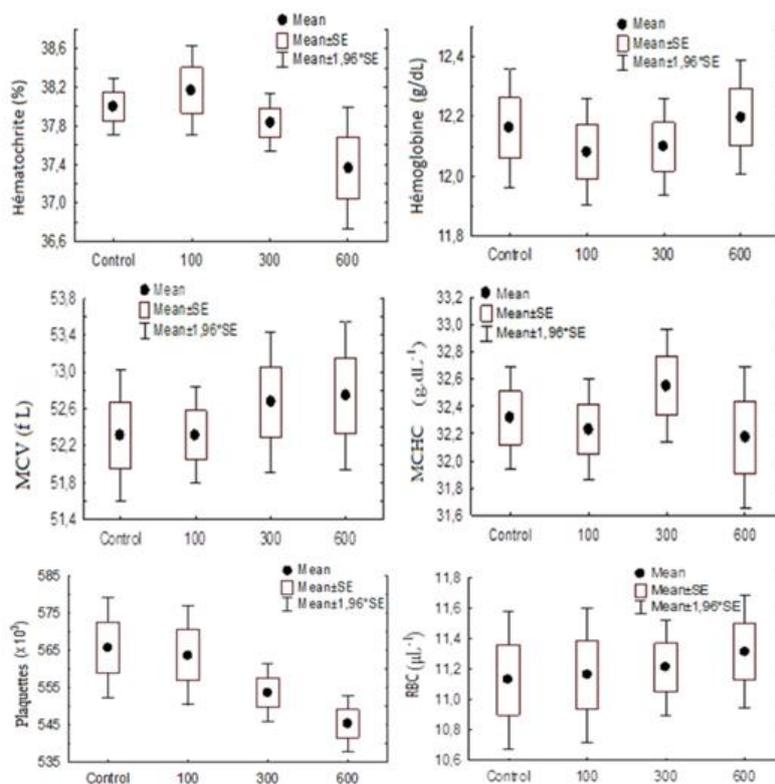


Figure 2 : Box plots des paramètres hématologiques des groupes témoin et expérimentaux

3. Effet de *Rubus ulmifolius* sur les paramètres hématologiques chez les rats

L'analyse hématologique a été réalisée sur les paramètres inclus : le nombre de globules rouges, le nombre de leucocytes, l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (HCT), le volume corpusculaire moyen (MCV), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC) et le nombre de plaquettes, Les diagrammes des paramètres hématologiques pour les différents groupes sont illustrés dans la figure 2.

4. Evaluation histopathologique du foie et des reins

Les caractéristiques histologiques du foie et du rein du groupe témoin ou des rats traités avec les doses subchroniques 100, 300, et 600 mg/kg d'EAES ont montré une structure normale des organes (résultats non présentés).

DISCUSSION

D'après l'OMS la phytothérapie est utilisée par 80% des populations des pays en voie de développement. Cependant, et malgré cette utilisation généralisée, peu d'études scientifiques ont été entreprises pour vérifier l'innocuité des médicaments et des produits végétaux à usage humain [16]. Des évaluations toxicologiques sont effectuées chez divers animaux de laboratoire afin de prédire la toxicité et de fournir des lignes directrices pour le choix d'une dose « sécuritaire » chez l'Homme. La plus forte concordance globale de la toxicité chez les animaux et l'Homme est avec les effets indésirables hématologiques, gastro-intestinaux et cardiovasculaires [17, 18]. Pour notre étude, concernant la toxicité subaiguë entre le début de l'expérience et le 28^{ème} jour, le poids moyen des mâles est passé de 222,3 à 238,3 g dans le groupe témoin (+7,2%) et de 222,0 à 261,0 g dans le groupe III (17,6%) ; celui des femelles est passé de 202,3 à 237,7 g dans le groupe témoin (+17,5%) et de 204,0 à 234,3 g dans le groupe III (+14,9%). Malgré l'augmentation légère du poids des mâles dans l'échantillon traité (17,5% contre 7,2%, $p=0,02$), les gains étaient comparables aux poids des femelles (17,5 et 14,9%, $p=0,59$). Globalement, les gains de poids sont demeurés comparables entre le groupe témoin et le groupe III (12,3 et 16,4%, $p=0,23$) ; Le poids relatif des organes est considéré comme étant un indicateur relativement sensible dans les études de toxicité [19].

Après une exposition de 28 jours le traitement pour une toxicité subaiguë n'a produit d'altération des organes du rat ni de mort ou de signes cliniques de toxicité. Le test One Way ANOVA n'a montré aucune différence significative ($p>0,05$) des poids des différents organes entre le groupe témoin et les groupes traités par les différentes doses de l'extrait aqueux de la plante. Une situation semblable a déjà été signalée par Atsamo et al. [20], Balmain et al. [21], Gome et al. [22] et Luka et al. [23]. Cependant, l'EARU pourrait contenir des principes biologiquement actifs dont les effets semblent réduire l'activité corporelle. Pour le profil biochimique, les comparaisons effectuées par le test Kruskal-Wallis ANOVA des différents paramètres après administration orale subaiguë d'EARU entre les groupes témoins et expérimentaux ont montré des différences significatives dans le profil biochimique, les valeurs stables des paramètres biochimiques tels que ceux de l'urée et de la créatinine dans le groupe III suggèrent que l'extrait est sans danger pour la fonction rénale. La transaminase est un bon indice du foie, du cœur et des reins, ce sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules. Leur augmentation reflète une lésion cellulaire ; en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire [24-26]. Une légère diminution a été observée pour TC et TP dans le groupe III et une diminution significative a été observée pour ALT dans le groupe III et pour TG dans le groupe II et III. La diminution d'ALT est insignifiante, par contre chez les sujets malades, une élévation d'ALT, TP peut s'expliquer par des perturbations hépatiques (fibrose ou cirrhose [27-29]). L'extrait de la plante a eu un effet sur la diminution de TG dans le groupe II et III, les études phytochimique ont révélé la présence de quercétine chez *Rubus ulmifolius* [9], les travaux de Bisht et al. [30] ont démontré que la quercétine qui est un polyphénol semble avoir un effet anti-hyperlipidémiant. D'après Mukinda & Syce [28], l'analyse des paramètres sanguins est pertinente car elle donne des informations sur la fonction hématopoïétique (évaluation des cellules de la lignée myéloïde), sur l'apparition d'allergies (études des globules blancs) et sur les effets intravasculaires comme l'hémolyse. Pour les paramètres hématologiques, Les tests ANOVA ont montré que les doses subaiguës de l'extrait aqueux de *Rubus ulmifolius* n'ont eu aucun effet,

ces derniers sont restés comparables pour l'hémoglobine ($p=0,80$), hématocrite ($p=0,10$), MCV ($p=0,76$), MCHC ($p=0,62$), plaquettes ($p=0,08$), RBC ($p=0,93$) et WBC ($p=0,75$), aucun changement significatif n'a été observé dans tous les paramètres hématologiques des animaux traités à l'extrait. Selon Onyeyilli et al. [32] et Johnson-Wimbly & Graham [33], l'anémie résultant après l'administration d'un agent toxique peut être le résultat de la lyse des cellules sanguines. Cependant, une telle anémie n'a pas été observée après un traitement subaiguë avec notre extrait. Les valeurs observées des paramètres sanguins dans la plage normale ont montré que l'extrait de la plante n'est pas toxique.

CONCLUSION

Cette étude a été conduite dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de notre région et plus précisément d'évaluer la toxicité de cette plante et d'identifier certaines molécules bioactives capables de provoquer des lésions sur certains organes ou des effets secondaires lors de leurs prises. En effet, le végétal n'est pas forcément le plus inoffensif, contrairement à l'idée que beaucoup de gens se font des plantes, c'est dans cette optique que notre travail a été réalisée, dans le but d'apporter une contribution pour une meilleure connaissance de la toxicité de cette plante utilisée en médecine traditionnelle. L'extrait aqueux de *Rubus ulmifolius* n'a entraîné aucune mortalité, ni de toxicité visible. Aucun symptôme grave ni aucune lésion des organes à des doses orales chez le rat, seuls, l'hypoactivité et la somnolence ont été observées chez les souris traitées at que la dose létale médiane (DL50) de *Rubus ulmifolius* était alors supérieure à 12,5 g/kg de poids corporel. Donc on peut conclure au terme de cette étude qu'aux résultats que nous sommes parvenues que la plante est exempte de molécules bioactives capable de provoquer une quelque toxicité sur les organes cibles, mais toutefois, nous suggérons une étude chronique à long terme pour confirmer ses résultats.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Patel, A.V. ; Rojas-Vera, J. & Dacke, C.G. (2004). Therapeutic constituents and actions of *Rubus* species. *Current Medicinal Chemistry*, 11 : 1501-1512.
- [2] International Plant Names Index, (2020). The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens.
- [3]. Ait Youcef, M. (2006). *Plantes médicinales de Kabylie*. (Edit) IbissPress. Paris, pp.349
- [4]. Lemus, I.; Garcia, R.; Delvilar, E. & Knop, G. (1999). Hypoglycemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy research*, 13 : 91-94
- [5]. Ticli, B. (2006). *Votre herbier des plantes médicinales. Livre de France* (Edit) De Vecchi S.A, pp. 302-305.
- [6]. Guarrera, P.M. (2005). Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*, 76: 1-25.
- [7]. Mc Cutcheon, A.R.; Ellis, S.M.; Ancock, R.E.W. & Towrs, G.H.N. (1994). Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, 44: 157-169.
- [8]. Uncini Manganeli, R.E. & Tomei, P.E. (1999). Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. *Journal of Ethnopharmacology*, 65: 181-202.
- [9]. Panizzi, L.; Caponi, C.; Catalano, S.; Cioni, P. & Morelli, I. (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 165-168.
- [10]. Mapanga, R.F. & Musabayane, C.T. (2010). The renal effects of blood glucose-lowering plant-derived extracts in diabetes mellitus – an overview. *Renal Failure*, 32: 132-138
- [11]. El Hillaly, J.; Izraili, Z. & Lyoussi, B. (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 491: 43-50.
- [12]. Costa-Silva, J.H.; Lima, C.R.; Silva, E.J.R.; Araujo, A.V.; Fraga, M.C.A.; Ribeiro, A.; Arruda, A.C.; Lafayette S.S.L. & Wanderley A.G. (2008). Acute and subacute toxicity of the *Carapaguai anensis* Aublet (Meliceae) seed oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 495-500
- [13]. Donfack, J.H.; Njayou, F.; Rodrigue, T.K.; Chuisseu, D.D.P.; Tchana, N.A.; Finzi, V.P.; Tchounguep, M.F.; Ngadjui, T.B. & Moundipa, F.P. (2008). Study of hepatoprotective and antioxidant fraction from *Erythrina senegalensis* stem bark extract: in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 329-335.
- [14]. Waynforth, B.H. *Injection technique, in: Experimental and Surgical Technique in the Rat. Academic Press, London, (UK), (1980),30-61.*
- [15]. Lifshitz, Y.; Levi, L.; Eyal, I.; Cohen, T. & Tessler, S. (2015). Sub-chronic (13-week) oral toxicity study preceded by an in-utero exposure. *Food Chem Toxicol*, 86: 234-244.
- [16]. Rosidah Yam, M.F.; Sadikun, A.; Ahmad, M.; Akowuah, G.A. & Asmawi. M. Z. (2009). Toxicology Evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 123:244-249.
- [17]. Silva, E.J.R.; Goncalves E.S.; Aguiar F.G.S.; Eventio, M.C.A., Wenderly, A.G.; Lyra, L.B.; Ceollo, M.M.A. & Fraga, M.C.O.C. (2007). Sub-chronic (13-week) oral toxicity study, preceded by an in-utero exposure phase and genotoxicity studies with fish source phosphatidylserine in rat. *Food Chem Toxicol*, 86:234-244.
- [18]. Lahlou, S. ; Israili, Z. & Lyoussi, B. (2008). Acute and chronic toxicity of lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in Rodent. *Journal of Ethnopharmacology*, 117 : 221-227.
- [19]. Lullmann-Rauch, R. (2008). *Histologie. De Boeck Supérieur, Bruxelles, Belgique. 704p.*

- [20]. **Atsamo, A.D. ; Nguelfack, T.B. ; Datte, J.Y. & Kamanyi, A. (2001).** Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents *Journal of Ethnopharmacology*, 134: 3697–702.
- [21]. **Balmain, A.; Gray G. & Ponder, V. (2003).** The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.*, 33 Suppl 238–244.
- [22] **Gome, A.M.B. ; Kouakou, K. ; Toure, A.,&Traore, F. (2011).** Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5): 1777-1789.
- [23] **Luka, J.; Badau, S.J.; Mbaya, A.W.; Gadzama, J.J. & Kumshe, H.A. (2014).** Acute toxicity study and effect of prolonged administration (28 days) of crude ethanolic root extract of *Diospyros mespiliformis* Hochst (Ebenaceae) on clinical, haematological and biochemical parameters of albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 153 (1), 268–273.
- [24]. **Burger, C.; Fischer, D.R.; Cordenunzi, D.A.; Batschauer, A.P.B.; Filho, V.C. & Soares, A.R.S. (2005).** Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice. *Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 8: 370–373.
- [25]. **Ramaiah, S.K. (2011).** Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31 (1) :161–172.
- [26]. **Sanogo, R. ; Djimdi, A. ; Guiro, C.; Maoga, A.; Dumbo, O. & Dialo, O. (2008).** Etude de la toxicité sub-chronique du décocté d'*Argomone mexicana* *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines*, 15 :26-31.
- [27]. **Ratziu, V.; Giral, P.; Charlotte, F., et al., (2000)** Liver fibrosis in over- weight patients. *Gastroenterology*.118:1117–23.
- [28]. **Mukinda, J.T. & Syce, J.A. (2007).** Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 138–144.
- [29]. **Brunt, EM. (2001).** Nonalcoholic steatohepatitis: Definition and pathology. *Semin Liver Dis.* 21(01):3–16.
- [30]. **Datz, C. ; Cramp, M. ; Haas, T. ; et al. (1999).** The natural course of hepatitis C virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis center. *Gut*, 44:563–7.
- [31]. **Bisht, A.; Madhav, S. & Upadhyaya, K. (2015).** Screening of polyherbal formulation for its potential anti-hyperlipidemic and antioxidant activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(5):134-139.
- [32]. **Onyeyilli, P.A.; Iwuoha, C.L. & Akinniyi, J.A. (1998).** Chronic toxicity study of *Ficus platyphlla blum* in rats. *West Africa. J Pharmacol Drug Res.* 14:27-30.
- [33]. **Johnson -Wimbly, T.D. & Graham, D.W. (2011).** *Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 4(3): 177-184.