

TOXICITÉS ORALE AIGUË ET SUBAIGUË DE L'EXTRAIT AQUEUX DES FEUILLES DE *HOLARRHENA FLORIBUNDA* CHEZ LES RONGEURS

Alida Edwige ODOH^{1*}, Emile BEGBIN², Guédé-Noël ZIRIHI²
et Diénéba KONÉ-BAMBA¹

¹ Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Pharmacognosie, Botanique, Biologie Végétale et Cryptogamie, 22 BP 714 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

² Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, UFR Biosciences, Laboratoire de Biologie et Santé, 22 BP 714 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

(reçu le 10 Novembre 2021 ; accepté le 19 Décembre 2021)

* Correspondance, e-mail : edwigeodoh@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Holarrhena floribunda est une espèce de plante tropicale utilisée en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies infectieuses et métaboliques. La présente étude vise à évaluer la toxicité aiguë et subaiguë de l'extrait sec aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* chez les rongeurs. La toxicité orale aiguë de l'extrait a été déterminée selon la méthode OCDE 423 chez les souris. La toxicité subaiguë par voie orale de l'extrait a été évaluée selon la méthode OCDE 407 modifiée avec la dose de 500 mg/Kg de poids corporel chez les rats pendant 28 jours. Les résultats ont révélé que l'extrait n'a pas de toxicité aiguë car la dose létale 50 % était supérieure à 5000 mg/Kg de PC. Concernant l'étude de la toxicité subaiguë, l'extrait ne provoquait pas de variation des concentrations sériques d'ALAT, d'ASAT, d'urée, de créatinine et des paramètres hématologiques au bout de 28 jours d'administration quotidienne de 500 mg/Kg de poids corporel. Cependant, cet extrait entraînait une diminution significative des concentrations sériques du cholestérol total ($P < 0,01$) et des triglycérides ($P < 0,05$). L'extrait aqueux des feuilles de *H. floribunda* est donc non toxique par voie orale. De plus, il pourrait avoir un effet cardioprotecteur et améliorer la fonction reproductrice par la réduction du cholestérol de l'organisme.

Mots-clés : *Holarrhena floribunda*, toxicité aiguë, toxicité subaiguë, feuilles.

ABSTRACT

Acute and subacute oral toxicity of aqueous extract of *Holarrhena floribunda* leaves in rodents

Holarrhena floribunda is a tropical plant species used in traditional medicine to treat various infectious and metabolic diseases. The present study aimed to evaluate the acute and subacute toxicity of the aqueous dry extract of *Holarrhena floribunda* leaves in rodents. The acute oral toxicity of the extract was determined according to OECD 423 in mice. The subacute oral toxicity of the extract was assessed according to the modified OECD 407 method with the dose of 500 mg/Kg body weight in rats for 28 days. The results showed that the extract was not acutely toxic as the 50 % lethal dose was greater than 5000 mg/Kg body weight. In the sub-acute study, the extract did not induce changes in serum ALT, AST, urea, creatinine and haematological parameters after 28 days of daily administration of 500 mg/Kg body weight. However, this extract significantly decreased serum total cholesterol ($P < 0.01$) and triglyceride ($P < 0.05$) concentrations. The aqueous extract of *H. floribunda* leaves is therefore non-toxic by the oral route. In addition, it could have a cardioprotective effect and improve reproductive function by reducing the body's cholesterol.

Keywords : *Holarrhena floribunda*, acute toxicity, subacute toxicity, leaves.

I - INTRODUCTION

Holarrhena floribunda (G. Don) Dur. et Schinz est une espèce végétale présente du Sénégal au Cameroun, jusqu'à la république démocratique du Congo. Elle est peu commune, très répandue mais disséminée. Dans les régions tropicales, c'est un petit arbre de 10 à 25 mètres de haut au fût élancé de 30 cm de diamètre [1]. Les feuilles sont utilisées contre la diarrhée, la gonorrhée, comme hémostatiques pour traiter les plaies et coupures, les urticaires, les maladies infantiles, le paludisme. Le décocté des feuilles est prescrit contre la dysenterie amibienne [1]. Au Sénégal, l'infusion ou le macéré des feuilles est utilisé pour traiter le diabète et l'aménorrhée [2]. Les racines associées aux feuilles sont utilisées lors des accouchements [1]. Des études antérieures ont démontré que les feuilles de *H. floribunda* contiennent surtout des alcaloïdes stéroïdiques dérivés de la prégnane tels que l'holarrhimine, l'holaphyllamine, l'holamine et l'holaphylline ainsi que des alcaloïdes dérivés de l'adénine comme la triacanthine [3, 4]. Les feuilles de *H. floribunda* contiennent également des flavonoïdes et certaines flavones comme le robinoside [5, 6]. Il est donc opportun d'étudier la toxicité des feuilles de cette plante afin d'optimiser son usage. Ainsi, la présente étude vise à évaluer les toxicités aiguë et subaiguë de l'extrait aqueux des feuilles de *H. floribunda* chez les rongeurs.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1. MATÉRIEL

II-1-1. Matériel animal

Des souris adultes de souche *Swiss* et des rats adultes de souche *Wistar* ont été utilisées pour la réalisation des tests de toxicité aiguë et subaiguë respectivement. Les souris étaient âgées de 9 semaines et leur poids variait de 21 à 26 g. L'âge des rats variait entre 9 et 10 semaines et leurs poids étaient compris entre 150 et 200 g. Les animaux femelles étaient nullipares et non gravides. Tous les animaux avant expérimentation ont été acclimatés pendant une semaine dans des cages, à l'animalerie de l'Unité de Formation de Recherche (UFR) en Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), afin de réguler et harmoniser leurs états physiologiques avant les expériences. Dans cette animalerie la température moyenne était de 26 ± 4 °C avec une humidité relative de 60 % et une photopériode de 12/24. Les animaux ont été nourris avec une alimentation standard pour animaux d'expérimentation et ont reçu de l'eau à volonté.

II-1-2. Matériel végétal

Les feuilles de *Holarrhena floribunda* ont été récoltées en mars 2019 dans la région d'Issia, à l'Ouest de la Côte d'Ivoire. Après nettoyage, les feuilles ont été séchées à l'ombre, à la température du laboratoire pendant deux semaines. Après séchage, elles ont été rendues en poudre fine grâce à un broyeur mécanique (RESCHT GM 300). La poudre végétale obtenue a été ensuite stockée dans des bocaux à fermeture hermétique puis conservés à l'abri de la chaleur et de l'humidité.

II-2. MÉTHODES

II-2-1. Extraction

Une quantité de 100 g de poudre de feuilles séchées a été portée à ébullition dans un bécher contenant un litre d'eau distillée à l'aide d'un chauffe-ballon thermostatée à 100°C pendant 30 minutes. L'homogénat obtenu a été d'abord essoré dans un carré de tissu, puis filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier filtre Wathman trois mm. Le filtrat recueilli, a été évaporé dans une étuve (MEMMERT) à 50 °C et la poudre obtenue a constitué l'extrait sec de feuilles séchées (EAHf).

II-2-2. Toxicité aiguë par voie orale

La toxicité aiguë par voie orale de l'EAHf a été évaluée selon la méthode OCDE 423; essai limite avec l'ajout de la dose de 1000 mg/Kg. Quatre lots de six souris femelles ont été formés. A chaque lot, 2 mL de solution aqueuse de 1000, 2000, 5000 mg/Kg de poids corporel (PC) d'extrait ou d'eau distillée a été administré par gavage intra gastrique (voie orale). Puis, l'observation de la mortalité, morbidité et la variation de poids a été notée sur 14 jours [7].

II-2-3. Toxicité subaiguë par voie orale

La toxicité subaiguë par voie orale de l'EAHf a été évaluée selon la méthode OCDE 407 modifiée avec la dose de 500 mg/Kg de PC [8]. Ainsi deux (2) lots de cinq (5) rats ont été constitués. Le premier lot (témoin) a reçu de l'eau distillé tandis que le second a reçu 500 mg/Kg de PC d'EAHf. Les animaux recevaient quotidiennement 1 mL/100 g du produit d'essai par gavage pendant 28 jours. Au terme de l'expérience, des échantillons de sang ont été récupérés d'une part dans des tubes secs pour mesurer les taux sériques d'urée, de créatinine, des transaminases (AST, ALT), des triglycérides, du cholestérol total, du HDL- cholestérol, et d'autre part dans des tubes héparinés pour mesurer les taux de globule blanc, de globule rouge, d'hémoglobine, d'hématocrite et des plaquettes sanguines.

II-2-4. Examens biochimiques et hématologiques

Le cholestérol total, le HDL-cholestérol et les triglycérides sériques sont dosés par des méthodes enzymatiques [9, 10]. L'aspartate aminotransférase (AST) a été dosée selon la méthode colorimétrique standard [11]. L'alanine aminotransférase (ALT) a été dosée selon la méthode colorimétrique recommandée par la Fédération Internationale de Chimie Clinique (FICC) [12]. Le dosage de la créatinine repose sur la méthode colorimétrique standard [14]. La concentration sérique de l'urée a été effectuée par un dosage cinétique dans lequel le début de la réaction est linéaire dans un intervalle de temps défini [14]. La numération de la formule sanguine (NFS) a été faite selon les méthodes standards [15].

II-2-5. Analyses statistiques

Les différentes valeurs obtenues ont été exprimées sous la forme de moyenne suivie de l'erreur standard sur la moyenne ($M \pm \text{ESM}$). La signification des différences observées entre les groupes expérimentaux a été appréciée par le test T Student et l'analyse des variances (ANOVA) du test de comparaison multiple de Turkey-Kramer via le logiciel GraphPad Prism 7.03 (California, USA).

III - RÉSULTATS

III-1. Toxicité aiguë par voie orale

L'administration par voie orale de 1000, 2000 et 5000 mg/Kg de PC d'EAHf aux souris n'entraînait aucune mort. L'EAHf a donc une dose létale 50 % (DL50) supérieures à 5000 mg/Kg de PC par voie orale selon la ligne directrice de l'OCDE 423 [6]. Cependant une baisse de l'activité motrice et une somnolence ont été enregistrées juste après l'administration des substances d'essai et ce, pendant 1 heure de temps. Les différentes doses n'avaient pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur l'évolution de la masse pondérale des animaux testés pendant 14 jours d'observation comparativement aux animaux témoins ayant reçu de l'eau distillée (**Figure 1**).

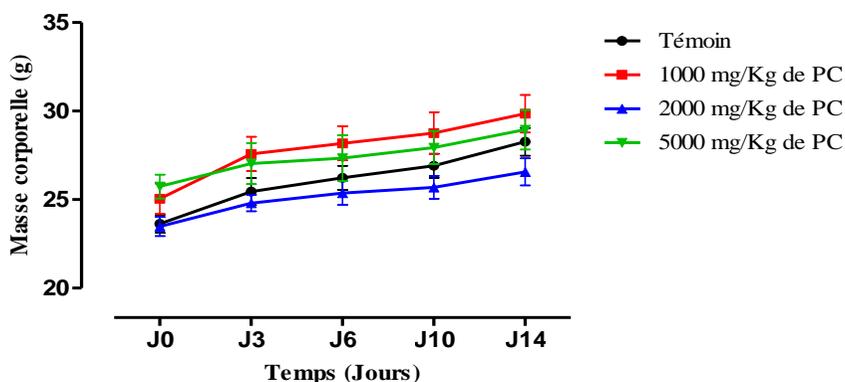


Figure 1 : Variation de la masse corporelle des souris après administration unique par voie orale des doses 1000, 2000 et 5000 mg/kg de PC de EAHf

III-2. Toxicité subaiguë par voie orale

III-2-1. Effets de l'EAHf sur le profil lipidique des rats

L'EAHf entraînait au bout de 28 jours d'administration orale quotidienne de 500 mg/kg PC (EAHf₅₀₀) à des rats sains, des diminutions significatives des concentrations sériques du cholestérol total ($P < 0,01$) et des triglycérides ($P < 0,05$) ce qui peut être mis à profit dans le cas de sujets obèses (**Figure 2**).

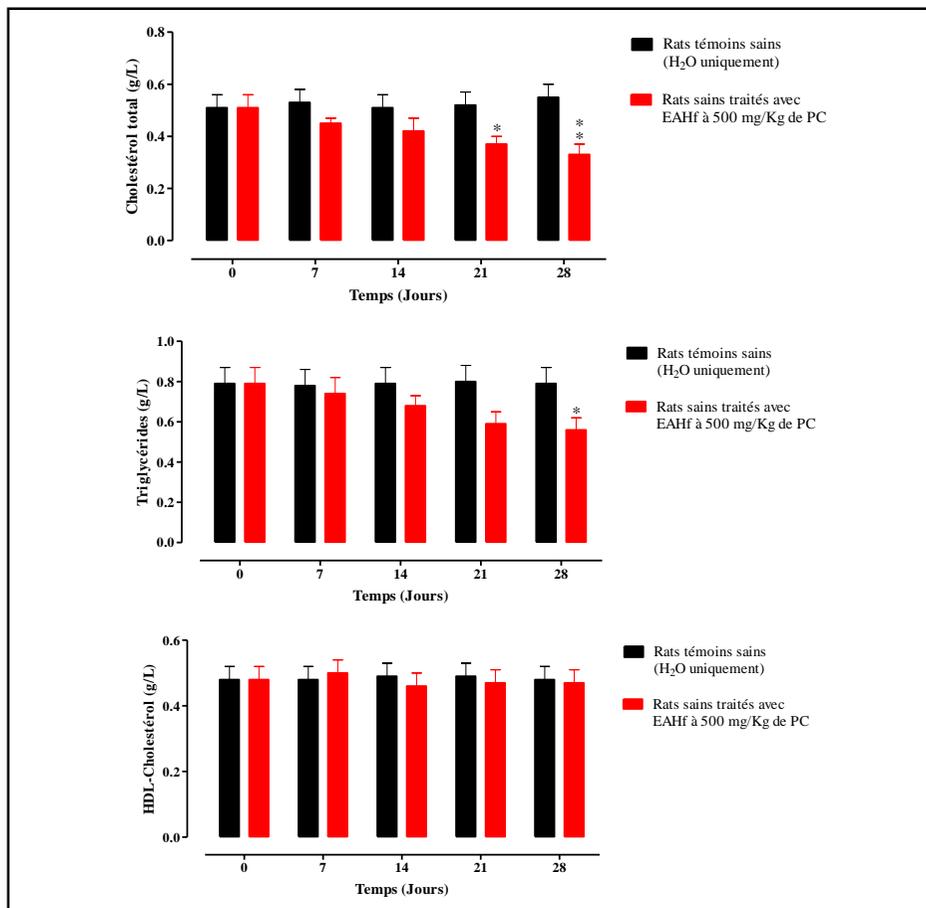


Figure 2 : Effets d'EAHf₅₀₀ sur le profil lipidique biochimique des rats sains $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ par rapport aux rats témoins sains

III-2-2. Effets de l'EAHf sur la fonction hépatique des rats

L'EAHf₅₀₀ ne provoquait pas de variation des concentrations sériques des ALAT et ASAT des animaux après 28 jours de traitement (**Figure 3**).

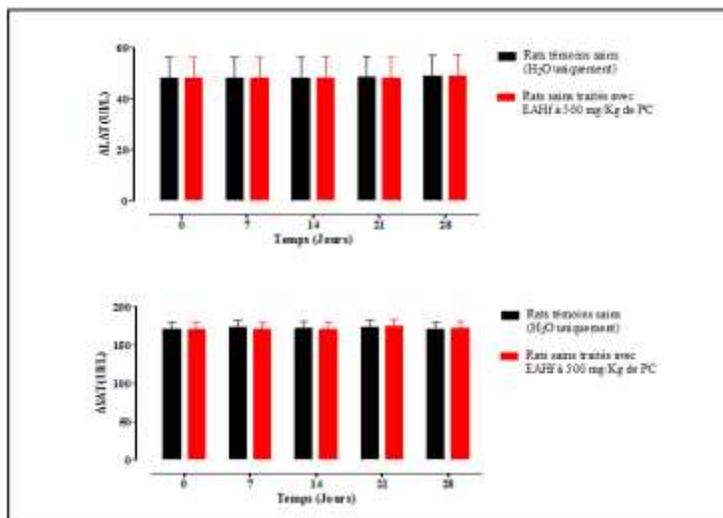


Figure 3 : Effets d'EAHf₅₀₀ sur les paramètres sériques de la fonction hépatique des rats sains

III-2-3. Effets de l'EAHf sur la fonction rénale des rats

L'EAHf₅₀₀ ne provoquait pas de variation des concentrations sériques d'urée et de créatinine des rats après 28 jours d'administration (**Figure 4**).

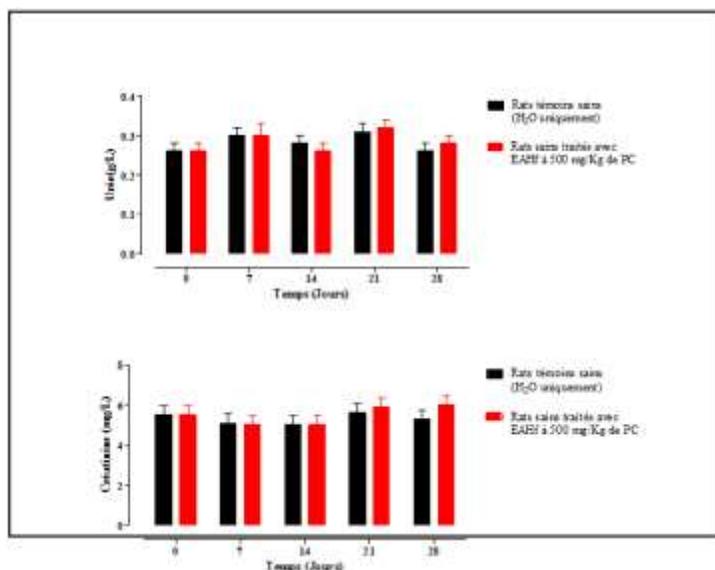


Figure 4 : Effets d'EAHf₅₀₀ sur les paramètres sériques de la fonction rénale des rats sains

$p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ par rapport aux rats témoins sains

III-2-4. Effets de l'EAHf sur les paramètres hématologiques de rats

Le traitement quotidien des animaux à l'EAHf₅₀₀ n'entraînait pas de variation des paramètres hématologiques (*Figure 5*).

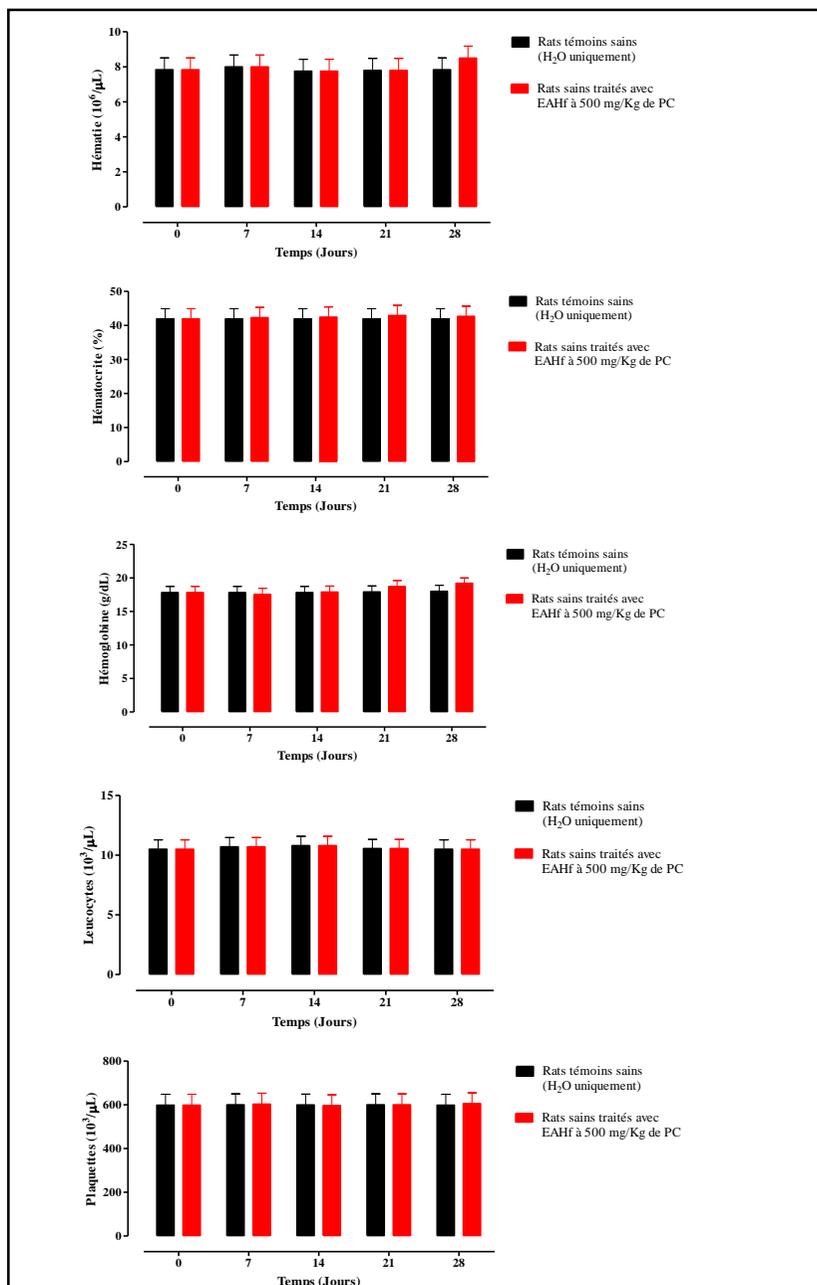


Figure 5 : Effets d'EAHf₅₀₀ sur les paramètres hématologiques des rats sains $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ par rapport aux rats témoins sains

IV - DISCUSSION

Le test de toxicité aiguë par voie orale montrait que la DL50 de l'EAHf était supérieure à 5000 mg/Kg de PC. D'autres études de toxicité aiguë réalisées en Côte d'Ivoire et au Togo sur l'extrait d'acétate d'éthyle et d'éthanol des feuilles de *H. floribunda* ont aussi révélé une DL50 supérieure à 3000 mg/kg [16 - 19]. Cependant la majorité des études réalisées en dehors du pays ont révélé une toxicité aiguë peu élevée avec une DL50 du macéré des feuilles de 495 mg/Kg PC et une DL50 du décocté des feuilles de 1000 mg/kg ont été retrouvés au Burkina [5 - 20]. Ces différences peuvent être dues à des variations d'extrait ou d'espèces d'une région à l'autre. Afin d'évaluer la toxicité subaiguë, une dose quotidienne de 500 mg/kg de chaque extrait a été administrée à des rats sains pendant 28 jours. Aucun changement significatif ($P < 0.05$) n'a été observé au niveau des paramètres hématologiques (Globules blancs, hématie, hémoglobine, plaquettes), des paramètres biochimiques de la fonction hépatique (ASAT, ALAT) et des paramètres biochimiques rénaux (urée, créatinine). Cependant, l'EAHf a provoqué une baisse peu significative ($P > 0.05$) des triglycérides à J28. L'EAHf a entraîné une baisse du cholestérol total peu significative à J21 puis significative à J28. Aucun changement significatif n'a été observé au niveau du HDL-cholestérol encore appelé bon cholestérol. L'EAHf a donc une action sur le profil lipidique diminuant le cholestérol et les triglycérides. Des études de toxicité subaiguë réalisées sur un extrait méthanolique des écorces, un extrait d'acétate d'éthyle de feuilles et un extrait méthanolique de racine de *H floribunda* ont révélé les mêmes variations [21 - 24]. Ceci pourrait être mis à profit dans le traitement des dyslipidémies, de l'obésité. En effet, *H floribunda* a une action plus prononcée sur le métabolisme du cholestérol car il a été démontré qu'il contient des analogues structuraux de cholestérol [25]. Ces analogues structuraux améliorent le niveau d'hormones sexuelles mâles et femelles [21]. Ce qui pourrait améliorer les fonctions de reproduction chez les sujets normaux et ceux qui ont perdu la fonction de reproduction comme c'est le cas des patients diabétiques. [24]. La diminution des taux de cholestérol et des triglycérides indique aussi que cet extrait aurait des effets cardioprotecteurs et pourrait prévenir et diminuer des risques de maladies cardio-vasculaires comme le démontre des études de koudou et Amaechi [24 - 26].

V - CONCLUSION

En définitive l'EAHf est non toxiques par voie orale. De plus l'administration continue de doses non toxiques l'EAHf n'a pas entraîné de lésions aux organes mais pourrait même avoir au niveau physiologique un effet cardioprotecteur et améliorer la fonction reproductrice.

RÉFÉRENCES

- [1] - M. ARBONNIER, Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Editions Quae, (2009) 573 p.
- [2] - J. KERHARO, J. G. ADAMS JG, *Plantes médicinales et toxiques*. Paris, Ed. Vigot, (1974) 805 - 869
- [3] - M. LEBOEUF, A. CAVE, R. GOUTAREL, Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, 259 (1964) 3401
- [4] - M. JANOT, A. CAVE, R. GOUTAREL, *Bulletin de la Société Chimique de France*, 6 (1950) 896 - 900
- [5] - H. MILLOGO, Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *Holarrhena floribunda*. (G. Don) Dur. et Schinz (Apocynaceae): étude de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes et leur évaluation toxicopharmacologique. Thèse de doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, (1992) 117 p.
- [6] - JA. BADMUS, E. EKPO, F. RAUTENBACH et al., *Acta Biochimica Polonica*, 63 (2) (2016) 353 - 358
- [7] - OCDE. *Essai n° 423: Section 4. Paris: Editions OCDE*, (2002) 14 p.
- [8] - OCDE. *Essai n° 407: Section 4. Paris: Editions OCDE*, (2008) 14 p.
- [9] - P. FOSSATI, L. PRENCIPE, G. BERTI, *Clinical Chemistry*, 29 (1983) 1494 - 1496
- [10] - D. S. YOUNG, L. PESTANER, V. GIBBER MAN, *Clinical Chemistry*, 21 (1975)
- [11] - A. KARMEN, *Journal of Clinical investigation*, 34 (1) (1955) 131 - 133
- [12] - H. U. BERGMAYER, M. HORDER, *Clinical Chemistry* 18 (1980) 521 - 553
- [13] - R. J. HENRY, *Edition, Harper and Row*, (1974) 543 p.
- [14] - L. A. KAPLAN, L. SZABO, E. K. OPPERIN, *Clinical chemistry : interpretation and techniques, 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia*, (1988) 112 - 231
- [15] - V. A. BAKER, K. S. J. HEPBERN, P. JONES, et al., *Food and Chemical Toxicology*, 17 (1999) 748 - 755
- [16] - B. N. GNANGORAN, B. B. N'GUESSAN, P. AMOATENG et al, *J Med Biomed Sci.*;1 (3) (2012) 46 - 54
- [17] - B. N. GNANGORAN, Evaluation de l'effet des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Durand et Schinz (Apocynaceae), Côte d'Ivoire, sur des paramètres biochimiques des rats Wistar (*Rattus norvegicus*). Thèse de doctorat, Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire, (2014) 127 p.
- [18] - B. B. N'GUESSAN, B. N. GNANGORAN, J. A. SARKODIE et al, *European J Med Plants*, 8 (4) (2015) 175 - 89
- [19] - Y. P. HOEKOU, T. TCHACONDO, S. D. KAROU, et al. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 14 (2) (2017) 227 - 233

- [20] - H. TAMBOURA, B. BAYALA, M. LOMPO, et al., *African J Tradit Complement Altern Med.*, 2 (1) (2004) 13 - 24
- [21] - B. BAYALA, H. H. TAMBOURA, M. R. PELLICER, et al. *Biotechnol Agron Soc Environ.*, 10 (3) (2006) 173 - 180
- [22] - K. P. BOGNE, B. V. PENLAP, C. M. MBOFUNG, et al., *Eur J Exp Biol*, 2 (4) (2012) 1284 - 1288
- [23] - L. OTOO, G. KOFFUOR, C ANSAH, et al., *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4 (4) (2015) 293
- [24] - D. AMAECHI, E. O. UDOSEN, V. S. EKAM, et al., *Asian J Res Biochem.*, 3 (3) (2018) 1 - 7
- [25] - R. D. BENNETT, E. HEFTMANN, *Biosynthesis from Pregnenolone in Holarrhena floribunda. Science*, 149 (3684) (1965) 652 - 653
- [26] - D. D. KOUDOU, Toxicite subchronique chez le rat de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Holarrhena floribunda* (g. Don) t. Durand & Schinz, une plante utilisée dans le traitement traditionnel du diabète en Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat, Université Nangui Abroguoa, Abidjan, Côte d'Ivoire (2019) 328 p.