



Article Original

Étude Toxicologique *In Vivo* de l'Extrait Aqueux des Feuilles de *Psychotria Calceata*

Toxicological study of the aqueous extract of the leaves of psychotria calceata in vivo

Nnanga Nga^{1,2,3*}, Ngolsou F², Nyangono Ndongo M^{1,2}, Soppo Lobe V¹, Betoté DPH^{2,3}, Benga Mekoulou C², Maniepi NPJS², Fifen R⁴, Dimaïssou JA², Eya'ane MF¹, Mpondo Mpondo E^{1,2}, Ze Minkande²

RÉSUMÉ

Objectif. La présente étude avait pour but d'évaluer la toxicité orale aiguë de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* Petit (Rubiaceae) sur les rats de souche Wistar. Ce regain d'intérêt est lié au besoin de rechercher une médication par une thérapie moins toxique et sans effets secondaires. **Matériel et méthodes.** L'étude de la toxicité orale aiguë de l'extrait aqueux de la drogue a été réalisée sur les rats Wistar suivant la ligne directrice 423 modifiée de l'Organisation pour la Coopération et le Développement Economique de 2008, aux doses de 300, 1200, 2000 et 5000mg/kg pour les lots 2,3, 4 et 5 respectivement ; le lot 1 étant le control normal ayant reçu de l'eau distillée. **Résultats.** L'administration de l'extrait aqueux à dose unique n'a entraîné aucun décès au sein des différents lots traités. La DL50 est donc être supérieure à 5000 mg/kg. À l'analyse histologique des organes (reins, foie et rate), aucun signe de toxicité n'a été trouvé. **Conclusion.** Chez les rats Wistar, la DL50 de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* est supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel et l'analyse histologique des organes (reins, foie et rate) ne montre aucun signe de toxicité. Cette innocuité justifie l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle. Des études plus poussées sont nécessaires dans le but d'identifier les molécules actives, d'explorer leurs propriétés pharmacologiques et de formuler des phytomédicaments.

ABSTRACT

Objective. The aim of the study was to evaluate the oral acute toxicity of the aqueous extract of the leaves of *Psychotria calceata* Petit (Rubiaceae). **Materials and methods.** The oral acute toxicity study of the aqueous extract of the drug was performed on Wistar rats according to the modified 2008 Organisation for Economic Co-operation and Development guidelines 423, at doses of 300, 1200, 2000 and 5000 mg/kg for lots 2, 3, 4 and 5 respectively; lot 1 being the normal control that received distilled water. **Results.** Administration of the single-dose aqueous extract resulted in no deaths in any of the treated lots. The LD50 could not be determined, since it was higher than 5000 mg/kg. At histological analysis of the organs (kidneys, liver and spleen); no signs of toxicity were found. **Conclusion.** The LD50 of the aqueous extract of the leaves of *Psychotria calceata* is greater than 5000 mg/kg body weight and there is no histological evidence of kidney, liver or spleen toxicity. This harmlessness justifies the use of this plant in traditional medicine. More studies are needed to identify the various molecules, to explore their pharmacological properties and to formulate phyto-medicaments.

1. Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, P.O. Box 2701, Douala Cameroon
2. Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, Université de Yaoundé I
3. Centre for Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine, IMPM, P.O. Box 13033, Cameroon
4. Faculty of Science, Department of animal biologie and physiological, University of Yaoundé I.

Auteur correspondant :

Nnanga Nga Emmanuel

Adresse e-mail :

nngnanga@yahoo.fr

Tél : (+237) 691 599 985

Mots-clés : toxicité orale aiguë, *Psychotria calceata*, Rubiaceae, DL50, rats Wistar.

Keywords: oral acute toxicity, *Psychotria calceata*, Rubiaceae, LD50, Wistar rats

INTRODUCTION

La toxicité se définit comme étant l'ensemble des effets néfastes pouvant être des lésions morphologiques et fonctionnelles dans un organisme vivant, provoquées par une substance introduite à dose unique relativement élevée ou à des petites doses longtemps répétées [1]. Elle permet aussi de déterminer le degré ou le caractère nocif d'une substance et de réglementer son utilisation. Plusieurs paramètres permettent d'évaluer la toxicité d'une substance : le mode ou voie d'administration, la dose à administrer, la variation du poids,

l'histopathologie des organes, la modification des paramètres biochimiques et l'observation du taux de mortalité [2]. Dans les pays en voie d'émergence, environ 2/3 de personnes se servent des plantes pour se soigner. Les plantes constituent ainsi donc une source précieuse de produits naturels ayant un potentiel thérapeutique parfois inconnu et un coût peu onéreux [3]; d'où l'intérêt de mener des études sur leur éventuelle toxicité (composition chimique) [4] pour permettre ainsi de mettre en évidence leurs différentes propriétés pharmacologiques et favoriser leur utilisation. Fort de ce constat, nous avons fait le choix d'orienter

notre étude sur une plante menacée de disparition au Cameroun pour cause de déforestation [5] et dont le genre possède plusieurs propriétés pharmacologiques [6] (antivirale, antimicrobienne, analgésique, anti-inflammatoire, antioxydante) [7,8] utilisées en médecine traditionnelle à savoir *Psychotria calceata* Petit (Rubiaceae). Nous nous sommes proposé de mener une étude toxicologique *in vivo* de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

L'étude réalisée était de type expérimental. Elle s'est tenue au Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Législation Pharmaceutique de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I. La récolte de la matière première s'est faite à *Afane Essokié* et son identification à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à la collection botanique de MIKIO échantillon référencé C5 et enregistré sous le numéro 54000/hnc.

Matériel animal

La population ayant servi à l'étude expérimentale était constituée de 20 rats femelles de souche Wistar. Leur sélection reposait sur les critères d'inclusion suivant : avoir 06 semaines d'âge au minimum, ne pas présenter des signes de malformation physique, être nullipare, non gestante et avoir un poids compris entre 150 et 200g. Il s'en est suivi une acclimatation des rats aux conditions du laboratoire (12h de lumière, 12h d'obscurité, température 25 °C) pendant 07 jours puis une répartition en 05 lots de 04 animaux. Ces derniers ont été privés de nourriture 24h avant l'administration de l'extrait par gavage.

Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata*

L'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* a été obtenu par infusion aqueuse en portant à ébullition pendant 02 heures, 03 litres d'eau contenant 60g de poudre de feuilles séchées à l'abri de la lumière. Puis, s'en est suivi une filtration et un séchage à l'étuve (50 °C).

Toxicité aiguë par voie orale

La méthode utilisée pour le test de toxicité aiguë est celle décrite par la ligne directrice 423 de l'OCDE de 2008 modifiée [10]. Elle a permis de tester la toxicité de l'extrait aux doses limites préalablement définies de 300, 1200, 2000 et 5000 mg/kg. La répartition des animaux s'est faite au hasard et par la suite, ils ont été marqués et repartis par en 05 lots. Chaque lot contenait 04 animaux en fonction de leur poids : 01 lot témoin (gavage à l'eau distillée) et 04 lots tests (gavage aux différentes concentrations de l'extrait aqueux). Les doses à administrer ont été déterminées par la formule suivante :

$$V = \frac{D \times M}{C}$$

Avec : *D* : dose en mg/Kg ; *M* : masse des animaux en Kg ; *C* : concentration de la solution mère en mg/ml ; *V* : volume en ml. Après administration des différentes solutions mères, l'observation comportementale a été faite après 30 mn, 02h et 04h. L'observation s'est poursuivie pendant 07

jours. Les paramètres suivant ont été observés afin d'évaluer la toxicité sur le plan physique : la modification de la couleur de la peau, de l'aspect des poils, de la couleur des yeux, les tremblements, les convulsions, la salivation, la diarrhée, la léthargie, la sensibilité au son, le sommeil et le décès. Les animaux ont été pesés tous les jours à la même heure durant l'expérience et ont été sacrifiés par aspiration de l'éther le septième jour. Les organes (foie, reins et rate) ont été prélevés pour des coupes histologiques.

Analyse histologiques des organes prélevés [11]

Autopsie générale

Les foies, rates et reins de tous les animaux ont été débarrassés de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais aussitôt après sacrifice et dissection. Les poids relatifs des organes prélevés ont été déterminés par la formule :

$$PRO(\%) = \frac{po(g)}{pa(g)} * 100$$

Avec : *PRO* : poids relatif de l'organe ; *Po* : poids de l'organe ; *Pa* : poids de l'animal.

Après la pesée, ces organes ont été conservés dans du formol 10%.

Coupes histologiques

Les organes ont été conservés dans du formol tamponné à 10% pour y être fixés pendant un délai minimal de 7 jours. Le mode opératoire suivant a ensuite été employé pour la réalisation des coupes histologiques.

Pour le *trimming*, des tranches fines et régulières de chaque organe fixé ont été prélevées à l'aide d'un bistouri, puis rangées dans des cassettes.

En ce qui concerne la déshydratation, les cassettes ont été passées dans des bains d'éthanol de concentration croissante: éthanol 50° (1heure), éthanol 70° (1 heure), éthanol 95° n°1 (1 heure), éthanol 95° n°2 (1 heure 30 min), éthanol 100° n°1 (1 heure), éthanol 100° n°2 (1 heure 30 min), éthanol 100° n°3 (2 heures). Elles ont ensuite été passées dans 2 bains de xylène respectivement 1 heure et 2 heures et enfin dans 3 bains de paraffine à 60°C respectivement 1 heure, 1 heure 30 min et 2 heures.

En ce qui concerne l'inclusion, les tissus ont ensuite été placés dans des moules remplis de paraffine en fusion puis mis à solidifier sur une surface froide après orientation appropriée du tissu dans le bloc.

Des coupes de 5µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome. Une fois coupées, les sections ont été mises à dépliées dans un bain-marie (environ 40 °C) puis récupérées sur des lames. Les lames ont ensuite été laissées 24 heures à l'étuve (45 °C) avant la coloration. La coloration des coupes s'est faite dans une batterie de déparaffinage constituée d'une série de bains de 5 à 10 min chacun selon la séquence suivante: xylène n°1, xylène n°2, xylène n°3, éthanol à 100° n°1, éthanol à 100° n°2, éthanol à 100° n°3, éthanol à 95°, éthanol à 70°, eau distillée. Les coupes ont ensuite été immergées 10 min dans un bac contenant de l'hématoxyline de Mayer, puis rincées pendant 10 min à l'eau du robinet courant. Elles ont ensuite été passées dans un bain d'éthanol 95° pendant 5 min, puis immergées 5 min dans de l'éosine alcoolique 0,5% + 40µl d'acide acétique par

100 ml de solution. Elles ont ensuite été déshydratées dans de l'éthanol 100° (3 × 5 minutes), éclaircies dans du xylène (3 × 5 min).

Le montage: une fois sortie du xylène, quelques gouttes de résine ont été déposées sur les coupes, puis ces dernières ont été recouvertes d'une lamelle de verre pour l'observation au microscope.

RÉSULTATS

A l'issu de notre étude, les paramètres morphologiques, la variation du poids corporel, le poids relatif des organes et les coupes histologiques des organes nous ont permis d'évaluer la toxicité orale aigue de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata*.

Effet de de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* sur quelques paramètres morphologiques.

Les résultats de l'observation des paramètres morphologiques sont consignés dans le tableau I suivant.

Tableau I: effet de de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* sur quelques paramètres morphologiques chez les rates au cours des 04h ainsi que les 07 jours suivant l'administration.

Paramètres à évaluer	30 mn	02h	04h	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Coloration de la peau	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Aspect des poils	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Coloration des yeux	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Tremblements	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Convulsions	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Salivation	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Diarrhée	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Léthargie	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sensibilité au son	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sommeil	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Décès	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N=normal ; A=agressif ; D=diminué ; P=pâteux ; G= granuleux ; R=réduit.

Effet de l'extrait aqueux de *Psychotria calceata* sur le poids corporel des Rats

Le suivi de la variation du poids des animaux au cours de l'expérience de la toxicité aiguë à différentes concentrations pendant 07 jours par l' extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* est représenté par la figure 1 ci-dessous.

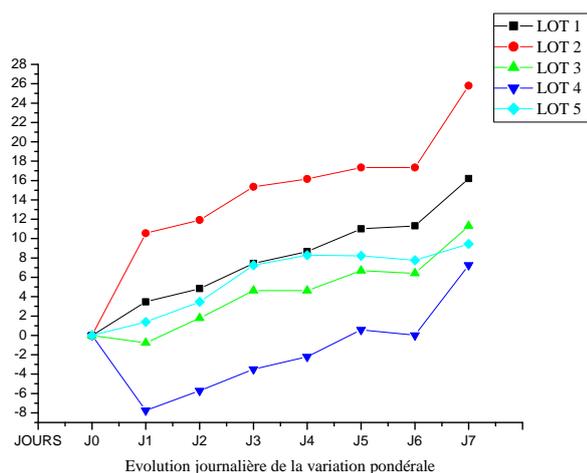


Figure 1: Variations pondérales des rats.

Légende : LOT 1=control normal traité à l'eau physiologique ; LOT2=traité à 300mg/kg ; LOT3=traité à 1200mg/kg ; LOT4=

Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* sur le poids des organes prélevés

Le tableau II présente l'effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* sur le poids relatifs (%) de quelques organes (reins, foies et rates) des rats exposées aux différentes doses comparativement au témoin. Celui-ci montre qu'aucune différence significative dans la prise de poids des organes des rates exposées n'a été obtenue par comparaison aux poids des organes des rates du lot témoin.

Tableau II: Poids relatif des organes

Doses d'EA	Reins	Foies	Rates
Contrôle normal	0,68±0,06	3,43±0,24	0,45±0,17
EAPC 300 mg/kg	0,70±0,20	4,04±0,99	0,44±0,07
EAPC 1200 mg/kg	0,62±0,03	3,57±0,17	0,51±0,03
EAPC 2000 mg/kg	0,62±0,02	3,56±0,14	0,33±0,10
EAPC 5000 mg/kg	0,59±0,01	3,26±0,17	0,53±0,12

EA=Extrait Aqueux
EAPC=Extrait Aqueux de *Psychotria Calceata*

Effets toxiques de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* sur les tissus des organes

Étude histopathologique du foie

Les coupes histologiques du foie des animaux du groupe témoin normal, tout comme celui des rates recevant l'extrait à différentes doses, montrent une architecture normale du parenchyme hépatique avec une veine centrolobulaire et des hépatocytes bien distincts.

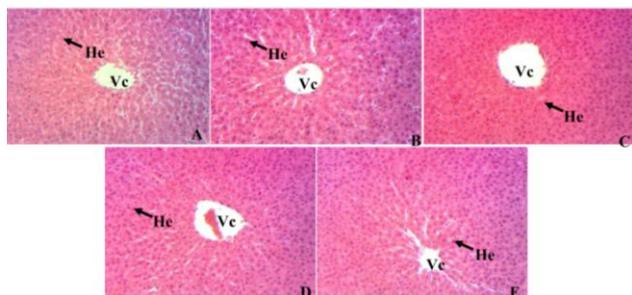


Figure 2: Microphotographies du foie (Hématoxyline-éosine X 100). NGOLSOU, 15/09/19.

He : Hépatocytes ; **Vc :** Veine centrolobulaire ; **A :** Témoin normal ; **B, C, D, E :** Lots traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* aux doses respectives de 300, 1200, 2000 et 5000mg/kg.

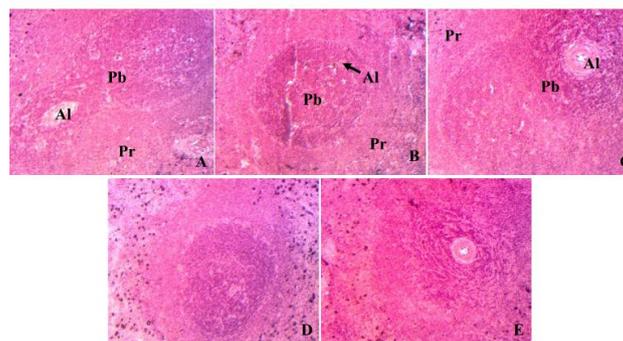


Figure 4: Microphotographies des rates (Hématoxyline-éosine X 100). NGOLSOU, 15/9/19

Al = Artériole lymphoïde ; **PB =** Pulpe blanche ; **PR =** Pulpe rouge ; Lots traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* aux doses respectives de 300, 1200, 2000 et 5000mg/kg.

Étude histopathologique du Rein

L'analyse histologique des reins des rats témoins normaux et ceux des animaux traités aux différentes doses n'a révélé aucune anomalie notable au niveau du parenchyme rénal.

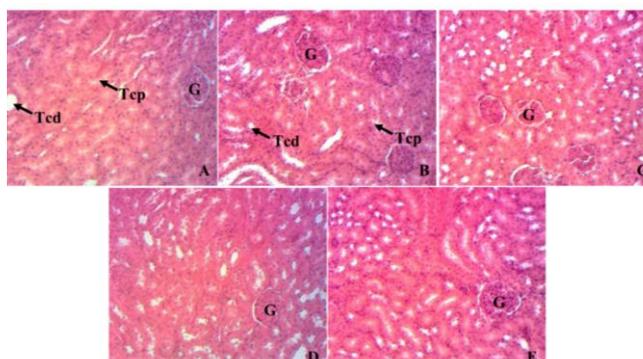


Figure 3: Microphotographies du rein (Hématoxyline-éosine X 100). NGOLSOU, 15/09/19.

G = Glomérule ; **Tcd =** Tubule contourné distal ; **Tcp =** Tubule contourné proximal ; **A :** Témoin normal ; **B, C, D, E :** Lots traités à l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* aux doses respectives de 300, 1200, 2000 et 5000mg/kg.

Étude histopathologique de la rate

La figure 4 montre les microphotographies de la rate des animaux des différents groupes. Dans le lot témoin tout comme les lots traités aux extraits à différentes doses, la rate présente une architecture normale avec une pulpe blanche (nodule lymphatique contenant une artériole et un centre germinal, lieu de prolifération des lymphocytes et des lymphoblastes) et une pulpe rouge (corde splénique, artériole et sinus veineux).

DISCUSSION

Les résultats obtenus à l'issue de l'étude toxicologique impliquent que la DL50 de l'extrait aqueux des feuilles de *Psychotria calceata* est supérieur à 5000 mg/kg de poids corporel. Selon le système de classification globalement harmonisé de l'OCDE de 2008, notre extrait peut être classé dans la catégorie 5 et considéré comme une substance non toxique par voie orale. Cette même méthode a été utilisée par Adeneye et Agbaje en 2007 [12], qui ont montré que la DL50 de l'extrait aqueux de *Cymbopogon citratus* (Poaceae) est supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel. Koné et al. en 2009 par la même méthode, ont montré que la DL50 de l'extrait total aqueux de *Sacoglottis gabonensis* est supérieur à 5000 mg/kg [13].

Les paramètres morphologiques observés étaient normaux pour les animaux de tous les lots. Une étude menée par Boumba et al. sur une autre plante de la famille des Rubiaceae (*Heinsia crinita*) a montré les mêmes résultats [14]. L'évolution du poids corporel était similaire pour la quasi-totalité des lots. Toutefois, seul le lot 4 traité avec une concentration de 2000 mg/kg a connu une baisse légère de son poids corporel au premier jour après administration. Cette perte de poids pourrait être corrélée à l'état physiologique de l'animal. Cette baisse de croissance de manière spontanée pourrait également s'expliquer par une réduction de la consommation des aliments, le stress involontaire affligé à l'animal mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée par les animaux de ce lot [15]. Le poids relatif des organes étaient sensiblement le même dans tous les lots [14]. Les microphotographies des coupes histologiques des organes étudiés (foie, reins et rate) ne présentent aucun signe d'anomalie particulier traduisant une toxicité. Elles sont donc normales pour tous les lots traités (300, 1200, 2000 et 5000 mg/kg) par comparaison au lot du contrôle normal.

Aucun décès d'animaux, ni de signes cliniques de toxicité n'a été observé durant l'évaluation *in vivo* de la toxicité orale aigüe de l'extrait aqueux des feuilles de

Psychotria calceata Petit (Rubiaceae) sur les rats de souche Wistar.

CONCLUSION

L'importance des plantes dans le domaine médical et nutritionnel a toujours occupé une place cruciale et vitale pour la vie des Hommes et même des animaux. Cependant leurs usages en permanence pourraient avoir des effets toxiques sur les organes. Raison pour laquelle la recherche scientifique est d'un intérêt capital pour le bien de l'humanité car grâce à ses expériences *in vivo*, *in vitro*, *in silico*, l'on peut s'orienter vers les plantes médicinales pour se soigner.

L'étude de toxicologie a quant à elle démontré, qu'il n'y a apparition d'aucun signe délétère sur l'aspect physique des animaux, aucune modification de la texture et de l'architecture des organes étudiés et donc par conséquent pas de toxicité pour les concentrations ayant faites l'objet de notre étude à savoir 300, 1200, 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel.

Conflit d'intérêt

Aucun

Remerciements

- Au Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Législation Pharmaceutique de la Faculté de Médecine et de Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I ;
- Institut de Recherche Médicale et d'Étude des Plantes Médicinales ;
- Faculté des sciences, Département de biologie animale et physiologique, Université de Yaoundé I.

Sources de financement

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Législation Pharmaceutique de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I.

RÉFÉRENCES

1. Hodgson E. A textbook of modern toxicology. 3th edition. USA : Wiley Interscience. 2004. Pp. 525-541.
2. Serrano JJ. Toxicopharmacologie expérimentale des plantes médicinales. Actes du 1er colloque européen d'ethnopharmacologie. Office de la recherche scientifique d'outre-mer (ORSTOM). 1990. Pp. 210-218.
3. Farnsworth NR. Screening plants for new medicines. In: Wilson EO, editor. Biodiversity. Washington: National Academy press. 1989. Pp. 83-97.
4. Zeggwagh A, Younes L et Yassir B. Enquete sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à Fes au Maroc. *Pan Afr Med J*. 2013 ; 14 :125 – 1746.
5. Olivier S. et Martin C. *Psychotria monensis* sp nov (Rubiaceae), a tree species from Cameroon. *Nordic Journal of Botany*. 2010 ; 28 : 130-133.
6. Hongmei Y, Hongmei Z, Caiqiong Y et Yegao C. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Psychotria*. *Chem. Biodiversity*. 2016 ; 13 : 807 – 820.
7. Abimbola O., Dzoyem J., Jacobus N. et Lyndy J. Extracts of six Rubiaceae species combined with rifampicin have good *in vitro* synergistic antimycobacterial activity and good anti-inflammatory and antioxidant activities. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 16:385.
8. Saleem T., Azeem A., Dilip C., Sankar C., Prasanth N. and Duraisami R. Antiinflammatory activity of leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011; 147-149.
9. Harbone J.B. *Phytochemical method: a guide to modern technique of plants*. Third edition. (1998). ISBN: 0412-57260-5.
10. Ligne directrice 423 OCDE
11. Rigalli A, Verónica EDL. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. International Standard Book, 2009; Number-13: 978-1-4200-9326-1.
12. Adeneye AA, Agbaje EO. 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. In rats. *J. Ethnopharmacol.*, 112(3): 440-444.
13. Koné M, Bleyere NM, Yapo AP, Vangah MO, Ehilé EE. 2009. Evaluation de la toxicité d'un extrait aqueux de *Sacoglottis gabonensis* (Baille) Urban (Humiriaceae) chez les rongeurs, une plante utilisée dans le traitement de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 3(6): 1286-1296.
14. Boumba LS, Nsonde Ntandou GF, Loufoua AB, Makambila MC, Abena AA. Toxicité aiguë, effets anti-inflammatoire et analgésique de l'extrait aqueux de *Heinsia crinita* (Afzel.) G. Taylor (Rubiaceae). *Phytothérapie* [Internet]. 2018 [cité 2 août 2020]; Disponible sur: <https://phyto.revuesonline.com/10.3166/s10298-017-1174-4>
15. Hilaly JE, Israili ZH, Lyouss B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 91: 43–50.