

EVALUATION DE LA TOXICITE GENERALE AIGUE D'UN EXTRAIT AQUEUX DE LA POUDRE DE RACINES DE TINOSPORA BAKIS (A RICH) MIERS MENISPERMACEAE

N.SOME^{*}
L. SAWADOGO^{**}
M. LOMPO^{***}
J. L. POUSSET^{****}
I.P. GUISSOU^{****}

Résumé

La toxicité générale aiguë d'un macéré aqueux de la poudre de racines de *Tinospora bakis* (A Rich), Miers, Menispermaceae, a été évaluée en administration intrapéritonéale (I.P.) et sous-cutanée (S.C.) chez la souris albinos comparativement à l'atropine, en raison de son utilisation tradithérapeutique dans les troubles gastro-duodénaux. Au niveau du syndrome d'intoxication, l'extrait administré, à l'instar de l'atropine, s'est avéré doué de propriétés anticholinergiques. En I.P la létalité s'est traduite par une DL50 de 360 mg/kg pour l'extrait aqueux contre 425 mg/kg à l'atropine rendant un degré de toxicité moyen pour les deux produits.

L'examen des rapports DL5/DL95 montre une plus grande maniabilité de l'extrait comparativement à l'atropine.

Mots clés : Plantes médicinales ; Pharmacopée traditionnelle ; *Tinospora bakis* ; atropine ; toxicité aiguë ; DL50.

Abstract

The general acute toxicity of a macerated aqueous extract of *Tinospora bakis* root powder is investigated on albinos mouse using I.P. and S.C. administration comparatively with atropin. The symptoms of intoxication showed the tested extract may possess anticholinergic properties as atropin.

The I.P lethality gave 360 mg/kg pc as LD50 for the tested extract against 425 mg/kg pc for atropin. These datas indicate the more toxicity of the plant extract and include both in the class of products with moderate toxicity.

In addition the study showed by the ratio LD5/LD95 that the plant extract is, in employment more safe-ty than atropin.

Key-words : Medicinal plants; Traditional Pharmacopoea ; *Tinospora bakis* ; Atropin general acute toxicity ; LD50.

* Institut de recherche sur les substances naturelles (IRSN/CNRST), 03 BP 7192 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

** Laboratoire de physiologie animale, Faculté des sciences et techniques, université de Ouagadougou.

*** Laboratoire de pharmacognosie et de pharmacopée traditionnelle, Faculté de médecine et de pharmacie, 34, rue du Jardin des Plantes ; BP 199 - 86005 Poitiers - Cedex.

**** Département de pharmacologie toxicologie, Faculté des sciences de la Santé, université de Ouagadougou.

Introduction

Dans toute étude de valorisation des données de la pharmacopée traditionnelle, l'évaluation de la toxicité générale aiguë devrait tenir une place de choix voire être un préalable. Cet aspect nous paraît essentiel pour l'utilisation des données de la tradithérapeutique dans des pays comme le Burkina Faso où les remèdes sont administrés sur une courte durée et souvent en automédication. Cette évaluation présente plus d'intérêt lorsqu'elle est menée comparativement à un produit de référence.

Le macéré aqueux de la poudre de racines de *Tinospora bakis* est utilisé en tradithérapeutique dans divers troubles touchant les domaines gastro-entéral et hépatique. Il nous a donc paru judicieux d'en évaluer la toxicité générale aiguë comparativement à des macérés organiques et à l'atropine, produit de référence. En effet ledit extrait est très utilisé en tradithérapeutique dans les gastro-entéralgies. Les résultats de cette étude contribueront à la constitution de prérequis pour la sécurité d'emploi chez l'homme. L'étude a été réalisée à l'Institut de Recherche sur les Substances Naturelles (I.R.S.N.) un des cinq instituts spécialisés du Centre Nationale de la Recherche Scientifique et Technologique (C.N.R.S.T.) chargé de la valorisation des données de la pharmacopée traditionnelle.

I. Matériel et méthodes d'étude

1. MATÉRIELS D'ÉTUDE

** Matériel végétal

Les racines fraîches de la plante provenant du Sénégal (récolte de juillet 1991) sont nettoyées à grande eau sur une rampe appropriée. Après découpage et séchage à l'ombre sous ventilation elles sont broyées. Cent grammes (100g) de la poudre obtenue sont mis à macérer à froid pendant 24 heures dans un litre d'eau distillée (macéré aqueux) ou dans un solvant organique à raison de xg de poudre de plante pour 5x ml de solvant. Chaque filtrat obtenu est alors centrifugé. L'extrait aqueux est lyophilisé. Les extraits organiques sont portés à siccité jusqu'à poids successivement constant. Les résidus obtenus sont pesés et conservés dans un dessiccateur. Ils font l'objet d'un screening phytochimique, d'une analyse par chromatographie sur couches minces (C.C.M.) et par spectrophotométrie U.V/visible. En C.C.M., les mélanges CHCl_3 -MeOH 80/20 et 97/3 constituent les solvants de migration ; tandis que la révélation est assurée par la lampe U.V. (255 et 375 nm), le réactif de CARR -PRICE et le DRAGGENDORF. Ce lyophilisat, à l'instar des autres résidus, est convenablement dissout dans l'eau distillée au moment de l'emploi.

** produit de référence

L'atropine, produit de référence nous vient de la firme MERCK : pureté 99,99 % ; N° de série 727K3401975.

** Matériel biologique

L'animal d'étude est la souris albinos provenant du Centre de Recherche sur les Trypanosomoses Animales (C.R.T.A) de Bobobo-Dioulasso (Burkina Faso). Les conditions d'élevage sont celles fixées par le laboratoire :

- * alimentation aux granulés de l'Atelier de Fabrication d'Aliments Bétails (A.F.A.B) de Bobo-Dioulasso ;
- granulés à 29 % de protéines et de l'eau vitaminée pour les reproducteurs et les petits jusqu'au sevrage ;
- granulés à 20 % de protéines et eau courante pour les adultes en stock ;
- * éclairage de 6 heures à 18 heures ;
- * climatisation permanente pour maintenir une température stable de 25°C.

2. Méthodes d'étude

L'étude a été faite selon la méthode classique consacrée (TREVAN, 1927) et ses différentes améliorations successives (MILLER ET TAINTER, 1944 ; LICHTFIELD ET WILCOXON, 1949 ; PRIEUR et Coll 1973 ; DESCOTES, 1985). Les animaux âgés de 3 mois et pesant 36 g environ, préalablement mis à jeûn pendant 24 heures, sont repartis en 4 lots et un lot témoin de 6 souris chacun. L'extrait aqueux et l'atropine, dissouts dans l'eau, ont été administrés par voies I.P et S.C, les souris témoins recevant le solvant/eau bidistillée. Les solutions ont été préparées de manière à n'administrer en moyenne à chaque souris qu'entre 0,15 et 0,3 ml soit 3,6 à 7,2 mg d'extrait.

Le test a été répété 3 fois pour les souris de chaque sexe. Les animaux traités sont observés pendant les deux heures suivantes pour la toxicité immédiate puis, avec retour aux conditions d'avant jeûn, jusqu'à une semaine pour la toxicité aiguë retardée.

L'ensemble des symptômes observés est utilisé pour caractériser le syndrome d'intoxication de chaque produit testé. Les létalités respectives sont rendues par les pourcentages de morts, les courbes correspondantes, les valeurs des DL5, DL50 et DL95 ainsi que leurs rapports respectifs. Une comparaison a été faite par rapport à l'atropine.

II. Résultats et commentaires

1. Caractéristiques physico-chimiques des extraits étudiés

Les résultats sont présentés au Tableau I.

Le macéré aqueux est obtenu sous deux formes MA₁ et MA₂ avec une fréquence de 40 % pour la seconde. Le même constat est fait au niveau des extraits chloroformique(MC) et éthanolique (MEt) avec une nette moindre fréquence pour le type 2. Le screening phytochimique révèle :

1) que la richesse de la racine de *Tinospora bakis* en substances phytochimiques : toutes les réactions de caractérisation sont au minimum moyennement positives (++) ;

2) que les groupes phytochimiques majoritaires (+++) sont les terpénoïdes, les alcaloïdes bases comme sels et les anthocyanosides suivis des hétérosides stéroïdiques, saponosides, tanins, coumarines... ;

3) que les formes 1 et 2 respectives ont la même composition chimique.

En C.C.M le type 1 du macéré aqueux semble présenter un nombre de spots supérieur au type 2. A l'absorption U.V., celui-ci conduit à trois types de bandes pour le macéré aqueux :

- des bandes communes à MA₁ et MA₂ : 320,206,202,198, et 194 nm;
- des bandes propres à MA₁ : 270,260,216 et 213 nm;
- des bandes propres à MA₂ : 280,254 et 210 nm.

Ces caractéristiques physico-chimiques semblent indiquer que les formes 1 et 2, notamment MA₁ et MA₂ de l'extrait aqueux de la plante, pourraient être dues à des phénomènes d'oxydo-réduction et/ou de réarrangements structuraux.

Tableau I : Quelques caractéristiques physico-chimiques des extraits étudiés : screening phytochimique, rendement, solubilité, C.C.M. et absorption U.V.

	MC	MEt	MA ₁	MA ₂
Acides gras	++			
Polyoses			++	++
Composés reducteurs		++	++	++
Tanins		++(C)	++(C)	++(C)
Terpénoïdes	+++ (T)			
Caroténoïdes	++			
Alcaloïdes	+++ (B)	+++ (S)	+++ (S)	+++ (S)
Hétérosides stéroïdiques		++ (*)	++ (*)	++ (*)
Coumarines	++	++ (*)	++ (*)	++ (*)
Anthocyanosides		+++ (*)	+++ (*)	+++ (*)
Rendement %	1,60	2,00	7,20	6,80
Hydrosolubilité	20 %	85 %	150mg/ml	150mg/ml
C. C. M.	T, B	S, P	S, P	S, P
Absorption U. V. (nm)	344-272 264-220	460-372-316 304-272	270-260 216-213	280-254-210

B: alcaloïdes bases
 C: tanins catéchiques
 S: alcaloïdes sels
 P: polyphénols
 T: terpénoïdes

±: Imprécis
 +: faiblement positif
 ++: moyennement positif
 +++: fortement positif
 *: après hydrolyse

2. Les syndromes d'intoxication

Des quatre extraits testés, seule la forme MA₁ du macéré aqueux a développé une toxicité générale aiguë chez les animaux traités au bout de 72 heures.

Les signes essentiels de l'intoxication aiguë de la souris albinos par ledit extrait sont:

- une baisse de l'instinct d'exploration marquée par un blotissement groupé ou individuel dans un coin de la cage entrecoupé de phases d'excitation brèves marquées par le hérissément des poils ;
- des troubles respiratoires marqués par une dyspnée ;
- des troubles gastro-duodénaux caractérisés par une défécation abondante chez certaines souris.

La mort survient en position de repos isolé d'inanition au milieu ou dans un coin de la cage. Avec l'atropine nous observons une difficulté à la locomotion, une excitation marquée par une agitation beaucoup plus fréquente qu'avec l'extrait de plante notamment à partir de 500 mg/kg. La phase d'inanition est rapidement suivie de la mort de l'animal. Ce tableau clinique correspond à ce qui est généralement décrit pour l'intoxication atropinique en dehors de la défécation notée avec l'extrait de la plante. En administration S.C ces signes sont retardés et moins marqués. Tous ces éléments sont indiqués au Tableau II.

Tableau II : syndromes d'intoxication comparés du macéré aqueux de la racine de *Tinospora bakis* et de l'atropine.

	<i>Nauclea latifolia</i> (1)	<i>Tinospora bakis</i> (MA ₁)	Atropine sulfate (2)
Mobilité et instinct d'exploration	Baisse +++	Baisse +++	Baisse +++
Excitation, agitation	++	++	++
Poils hérissés	++	++	+++
Tractus digestif	Défécation en baisse	Défécation : - baisse +++ - accélérée +	Défécation absente
Respiration	Dyspnée	Dypnée	Dypnée
Température	Hypothermie ++	±	±
Alimentation	Refus	Refus	Refus
Retour à la normale	72 heures	72 heures	72 heures
Principal mode d'action toxique	Anticholinergique (AChN) Hypothermie	AChN	AChN

(1) : I.P. GUISSOU, 1992.

(2) : GOLDENTHAL, 1971 ; C. TVEDE, 1952.

Les signes cliniques de l'intoxication aiguë de la souris albinos par l'extrait de plante tels qu'observés et comparés à ceux de l'atropine (GOLDENTHAL, 1971 ; TVEDE, 1952) et du macéré aqueux de *Nauclea latifolia* (I. P. GUISSOU..., 1992) traduisent une atteinte principalement nerveuse avec une répercussion locomotrice, respiratoire et digestive. Ceci permet de dire que l'extrait de plante est doué d'activités anticholinergiques ou atropiniques. Ces effets sont plus difficilement perçus par voie S.C en raison du processus de résorption qui rend plus lente la diffusion des produits. Ce processus est absent par voie I.P qui est comparable à la voie intra-veineuse (I.V).

3. Létalité et courbe de toxicité aigue

La Figure 1 indique les courbes de toxicité de l'atropine en I.P (C_1) et en S.C. (C_4) et ceux de l'extrait, respectivement (C_2) et (C_3).

Sur ces courbes (droites) les valeurs de DL50 sont notées :

- 425 mg/kg et 1500 mg/kg pour l'atropine respectivement en I.P. et S.C.,
- 360 mg/kg et 650 mg/kg dans le cas de l'extrait de plante.

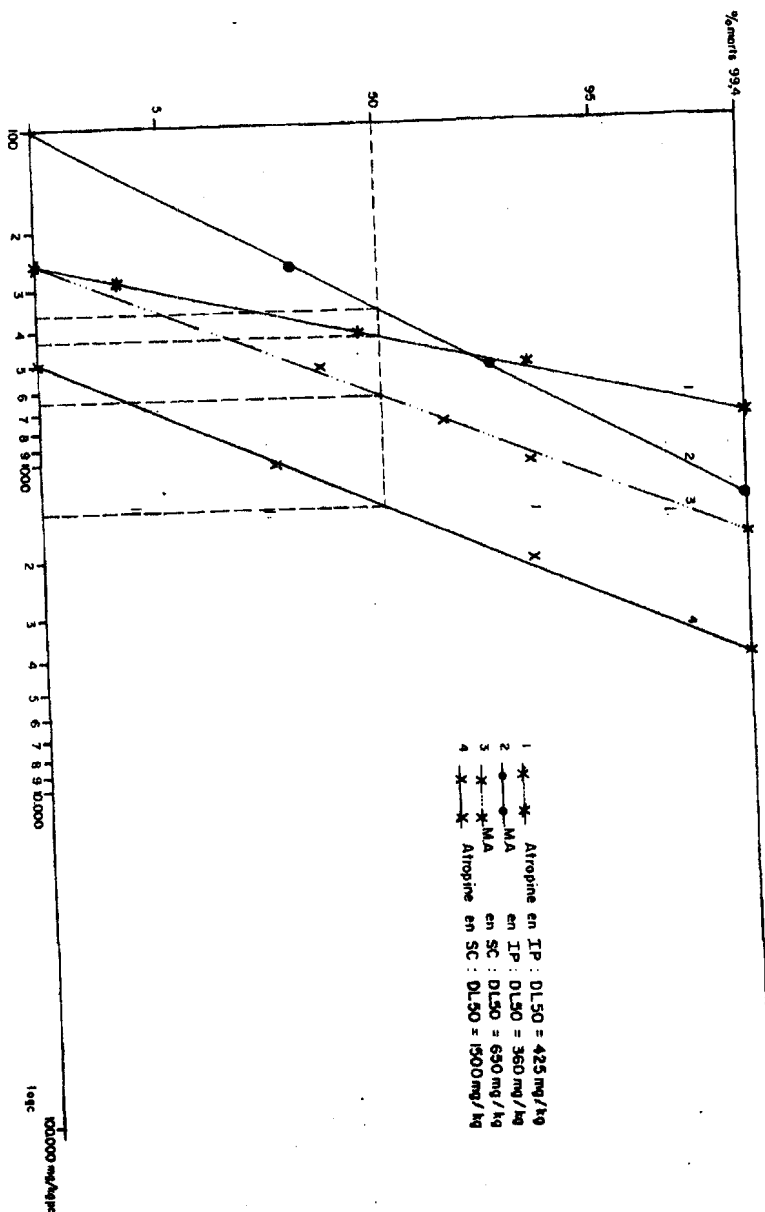


Figure 1 : courbes de toxicité générale aigue de l'atropine et de l'extrait aqueux M.A par voies sous cutanées (SC) et intrapéritonéale (IP) chez la souris albinos .

Les données de l'évaluation de ces droites (DL50 par la méthode de LICHTFIELD et WILCOXON (1949) et par d'autres approches critiques (PRIEUR et Coll 1973 ; DESCOTES 1985) sont présentées au Tableau III. Celles-ci valident les différentes valeurs de DL50. Ceci est confirmé par la presque-égalité des valeurs des rapports DL5/DL50 et DL50/DL95 respectifs correspondants. Cependant si le rapport DL5/DL95 par voie S.C. est le même pour les deux produits testés, en I.P. il va du simple au double respectivement pour l'extrait de plante et celui de l'atropine (0,19 et 0,49).

De telles données n'ont pas été obtenues avec les extraits chloroformique, éthanolique et aqueux seconde forme même à la dose de 2000 mg/kg en administration intra-péritonéale.

III. Discussion

Il s'agit de commenter les résultats obtenus et de les apprécier notamment ceux relatifs à la poudre de racine de *Tinospora bakis* par rapport aux données de la littérature.

* Les différentes valeurs de DL50 obtenues indiquent que l'extrait de plante et l'atropine sont plus toxiques en I.P. qu'en S.C. : environ 2 fois plus pour l'extrait de plante et 3 fois plus pour l'atropine. Le macéré aqueux de *Tinospora bakis* est par ailleurs 2 fois plus toxique que l'atropine en I.P. et de même toxicité en S.C. (Tableau III).

Tableau III : toxicité générale aigüe de l'extrait de plante comparée à celle de l'atropine.

- Valeurs des DL5, DL50, DL95, DL5/DL50, DL50/DL95, et DL5/DL95.

- Toxicité absolue et toxicité relative selon la voie d'administration.

PRODUIT ET V.A	DL5 mg/kg	DL50 mg/kg	DL95 mg/kg	DL5/DL50	DL50/DL95	DL5/DL95
At en S.C	725	1425 (937-2170)*	2750	0,50	0,51	0,26
At en I.P	300	425 (312-578)*	610	0,70	0,70	0,49
MA ₁ en S.C	350	650 (485-871)*	1225	0,54	0,53	0,28
MA ₁ en I.P	160	360 (248-522)*	840	0,44	0,42	0,19
	Toxicité absolue					
	- en I.P. : MA ₁ > At, 2 fois - en S.C. : MA ₁ = At					
	Toxicité relative					
S.C./I.P. MA ₁	225	180	1,57	I.P > S.C., 2 fois		
S.C./I.P. At	241	335	4,50	I.P > S.C 3 fois		
MA ₁ / At S.C.	2,07	2,19	224	MA ₁ > At 2 fois		
MA ₁ /At I.P.	1,87	1,18	1,38	MA ₁ =At		

V.A : voie d'administration

* : validation par la méthode de LICHTFIELD et WILCOXON (1949)

Ceci pourrait s'expliquer par une ou plusieurs des hypothèses ci-après :

- tandis que l'atropine est une substance pure, plusieurs substances phytochimiques composent l'extrait de plante testé (résorption, activité) qui est un totum d'extraction ;
- la toxicité de l'extrait de plante pourrait ne pas être due aux seuls effets anticholinergiques, en témoigne la manifestation de défécations qui ne sont pas observées avec l'atropine ;
- l'extrait de plante, mélange de plusieurs substances, présenterait moins de spécificité et d'affinité pour les récepteurs correspondant à l'atropine (faible écart d'activité entre les deux produits par voie I.P où il n'y a presque pas de phénomène de résorption). Tous ces éléments ressortent de l'analyse des rapports DL5/DL95 qui font apparaître une plus grande marge de maniabilité de l'extrait aqueux par voie I.P que l'atropine (2,50 fois plus) et une même marge d'utilisation par la voie S.C (valeurs des rapports DL5/DL95 : 0,28 et 0,26).

* Ces résultats peuvent être considérés inédits. En effet nous n'avons pas eu connaissance de travaux similaires dans la revue de la littérature que nous avons réalisée.

KAMSOULOU (1984) n'a trouvé aucun trouble attribuable au décocté de la poudre de racines de *Tinospora bakis* administré per os à des rats même à la dose de 2000 mg/kg. De tels résultats ont été obtenus chez la souris albinos traitée per os avec la deuxième forme de notre extrait, forme certainement due à des phénomènes d'oxydo-réduction et/ou de réarrangements structuraux. La toxicité de la colombine rapportée par BEAUQUESNE (1938) ; KERHARO et ADAM (1974) pourrait être attribuée aux différents extraits et fractions de terpenoïdes ; mais ceux-ci n'ont pas été testés au cours de notre étude.

MAHAJAN *et al.* (1985) ont rapporté l'effet convulsivant (toxicité) et hypoglycémiant de l'extrait acéto-éthylé de l'espèce voisine, *Tinospora cordifolia*, poussant en Asie. Pour notre part N. SOME, (1992) les macérés organiques, surtout chloroformique et éthanolique se sont avérés sans effet notable par voie I.P. chez la souris albinos même à la dose de 2000 mg/kg. Cela pourrait relever de la solubilisation partielle des extraits organiques (80 % dans le cas de l'extrait chloroformique) et/ou aux réarrangements structuraux précédemment en question (extrait éthanolique et surtout macéré aqueux de type 2).

S'agissant des valeurs de DL50 relatives à l'atropine, elles paraissent valides par rapport aux données de la littérature que nous avons pu recueillir. En effet celle-ci fait mention d'une DL50 per os égale à 750 mg/kg chez le rat pour l'atropine base (TVEDE, 1952) contre 622 mg/kg pour le sulfate (GOLDENTHAL, 1971). Notre étude bien qu'incomplète à certains égards, présente l'intérêt d'avoir permis d'entrevoir des possibilités de toxicité anticholinergique comparativement à l'atropine.

IV. Conclusion

L'étude de la toxicité générale aiguë du macéré aqueux de la poudre de racines de *Tinospora bakis* comparativement à l'atropine a conduit à des résultats dignes d'intérêt en terme de prérequis pour la sécurité d'emploi chez l'homme :

- un syndrome d'intoxication comparable à celui de l'atropine (effets anticholinergiques) ;
- une plus grande toxicité des deux produits testés par voie I.P que par voie S.C et de l'extrait de plante par rapport au produit de référence ;
- une plus grande maniabilité de l'extrait par voie I.P par rapport à l'atropine.

Les études ultérieures porteront sur l'exploration des anticholinergiques sur le muscle lisse isolé ainsi que l'approfondissement de la toxicité générale aiguë de l'extrait de plante étudié, qui sera fait par voie orale, voie d'utilisation pratiquée en thérapeutique traditionnelle.

Bibliographie

B. BEAUQUESNE., 1938 - Recherches sur quelques Menispermaceae médicinales des genres "Tinospora et Cocculus" Bull.-Sci. Pharmacol , 45, 7-14 p.

J. DESCOTES., 1985- La DL50 en 1984. Lyon Pharmaceutique. 36 (4), 189-191 p.

I. P. GUISSOU ; M. SAWADOGO ; I.Z. KABORE ; J. FAMAY ; ATTASSI ; M. HANOCQ ; 1992 - Etude chez l'animal de *Nauclea latifolia* Sm (Rubiaceae) Annales de l'Université de Ouagadougou; Série B, 128-146 p.

GOLDENTHAL., 1971 - Orally LD50 in rats of atropin sulfate Toxicol. Appl. Pharmacol., 18,185.

KAM-SOULOUM. 1984- Contribution à l'étude de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux de *Tinospora bakis*.- Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Dakar, N°56.

J. KERHARO et J. C. ADAM, 1974- „La pharmacopée sénégalaise traditionnelle : plantes médicinales et toxiques.- Edition Vigot et Frères, Paris VI°, 553-556 p.

J. T. LICHTFIED ; F. A. WILCOXON, 1949 - A simplified method of evaluation doses -effects experiments J. Pharmacol. Exp. Ther 95, 99-113 p.

V. R. MAHAJAN ; S. K. DESAI ; C. I. JOLY - 1985 -Preliminary report on the hypoglycemic agent isolated from *Tinospora cordifolia* Indian J. pharm. Sci., 47 (2), p 65.

L. C. MILLER ; M. T. TAINTER, 1944 - Estimation of LD50 and its error by log -probit graph paper Proc. Soc. Biol ; Exp. Med, 57, 261-264 p.

D. J. PRIEUR ; D. M. YOUNG ; R. D. DAVIS ; D. A. CONEY ; E. R. HOMAN; R. L. DIXON ; A. M. GUARINO - Procedures of preclinical toxicologic evaluation of cancer chemotherapeutic agents : protocols of the laboratory VI Mouse LD50 study Cancer Chemother.- Reports, Part 3, (4), 8.

N. SOME., 1992 - Contribution à l'étude pharmacologique de la poudre de racine de *Tinospora bakis* (A. Rich.), Menispermaceae. Memoire de D.E.A. en physiologie animale; Université de Ouagadougou.

J. W. TREVAN., 1927 - The error of determination of toxicity Proc. Royal. Soc., 101B, 483-514 p.

C. TVEDE., 1952 - Orally LD50 of atropin J. Pharmacol. Exp. Ther., 105, 166.