



Étude chimique de l'extrait aqueux d'*Allium subvillosum* (L.) (Alliaceae) et l'évaluation de sa toxicité chez les souris

Farida ADLY¹, Mina MOUSSAID^{1,2,3*}, Abdel Aziz ELAMRANI², Chadi BERAHALL³,
Hassane MOUSSAID³, Nourdinne BOURHIM¹ et Mohammed LOUTFI¹

¹Laboratoire de Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Département de Biologie, Faculté des sciences I, Ain Chock, Université Hassan II, B.P 5366, Maarif, Casablanca, 20100 Maroc.

²Laboratoire des Synthèses Organiques et Etudes Biologiques, Département de Chimie, Faculté des sciences I, Ain Chock, Université Hassan II. B.P 5366, Maarif Casablanca, 20100 Maroc.

³Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Institut de Pharmacie, Campus de la Plaines, Boulevard du Triomphe, 1050, Bruxelles, Belgique.

*Auteur correspondant, E-mail : noune_moussaid@yahoo.fr

RESUME

Allium subvillosum (L.) fait partie de la pharmacopée marocaine, dont les bulbilles sont couramment utilisées comme dépuratifs et antidotes. Nous avons mené une étude chimique et biologique de l'extrait aqueux de la partie souterraine, constituée par des petites bulbilles à odeur d'ails, dont le but est de valoriser cette plante, aussi bien par la caractérisation chimique que l'étude toxicologique, et pour fixer ainsi une marge de sécurité de son emploi par la population locale. Les résultats chimiques obtenus ont révélé la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des stérols, des triterpènes, des tanins, des composés réducteurs, des hétérosides cardiotonique et des saponosides. Et l'étude de la toxicité aiguë, réalisée chez des souris, a montré que l'extrait aqueux administré par voie intrapéritonéale est moyennement toxique avec une $DL_{50} = 562.34 \pm 342.64$ mg/kg du poids corporel (PC). Alors que la même substance est faiblement toxique avec une $DL_{50} = 3235.93 \pm 878.34$ mg/kg du PC, lorsqu'elle est administrée par voie orale.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: Pharmacopée marocaine, toxicité aiguë, voie intrapéritonéale, voie orale, phytochimie.

INTRODUCTION

L'espèce *Allium Subvillosum* (L.) est un géophyte spontané, floraison de mars à mai sur des rochers calcaires et dolomies au Nord du Maroc et sur des plages de sable le long de l'océan atlantique, les fleurs blanches sont très nombreuses à odeur très forte d'ail. (Hammiche et al., 2013).

Au Maroc, les bulbilles d'*Allium subvillosum* sont très utilisées en médecine

traditionnelle marocaine. Les indications sont partout les mêmes : ce sont des anti-infectieux, des dépuratifs généraux, des stimulants des fonctions vitales et des antidotes de tous les poisons (Bellakhdar, 2006).

Ils entrent ainsi dans la composition des suppositoires contre les hémorroïdes. Après cuisson, le mélange, beurre, lait, miel et

bulbes écrasés, constitue un mélange aphrodisiaque estimé (Bellakhdar, 2006).

Dans la région de Chaouïa, où cette étude ethnobotanique a été effectuée, les habitants utilisent le plus couramment ces ails sauvages comme cataplasmes contre les piqûres d'insectes, de scorpions et les morsures de serpents. Les bulbilles sont utilisés à l'intérieur, le plus souvent trituré dans du miel ou dans du beurre, dans la dysenterie, la typhoïde, les coliques des enfants, les vers intestinaux, les maladies infectieuses, les refroidissements de toutes sortes et la tuberculose (Moussaid, 2013).

Cette plante n'a fait l'objet d'aucun travail phytochimique où pharmaceutique, c'est la première fois qu'elle sera étudiée, même si elle est communément utilisée par la population de la région côtière atlantique (Moussaid et al., 2011 a et b).

La présente étude a été menée dans le cadre d'un axe de recherche visant la valorisation de la flore spontanée marocaine, et la préservation d'un patrimoine ancestral d'utilisation des plantes médicinales, pour mieux la conserver et l'utiliser d'une manière rationnelle.

MATERIEL ET METHODES

La plante étudiée a été récoltée dans la région de Casablanca entre janvier et mars 2010. Elle a été identifiée par Laila RHAZI botaniste du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences I de Casablanca. Un spécimen de la plante a été séché et conservé au laboratoire sous le N° A.S 01-03-2010. Le matériel utilisé a été constitué exclusivement des bulbilles.

Extraction

Les bulbilles ont été séchées à l'ombre à une température comprise entre 26 et 30 °C puis finement broyées à l'aide d'un microbroyeur. Le broyat obtenu (50 g) a été mis en macération dans 1 litre d'eau distillée pendant 24 heures sous agitation magnétique. Le surnageant obtenu a été filtré sur du papier Wattman N°1. Le filtrat a été évaporé à 70 °C

à l'aide d'un évaporateur rotatif (Harborne, 1984).

Caractérisation des principaux constituants chimiques

Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes ont été mis en évidence par la réaction à la cyanidine. La recherche des alcaloïdes a été faite à l'aide des réactifs généraux caractérisant ces derniers. Deux réactifs ont été utilisés à savoir le réactif de Dragendorff et le réactif de Mayer. La mise en évidence des stérols et des terpènes s'est faite grâce à la réaction de Liebermann. Les composés appartenant au groupe des tanins ont été montrés grâce à la réaction de Stiasny. Les composés réducteurs ont été mis en évidence grâce à la liqueur de Fehling. Les composés hétérosides ont été mis en évidence grâce à la réaction de Raymond-Marthoud. La recherche des saponosides a été basée sur la propriété des solutions aqueuses contenant des saponosides de mousser après agitation (Harborne, 1998).

Traitement des animaux

Les souris, au total de 72 (36 mâles et 36 femelles), de 10 à 12 semaines préalablement mises à jeun pendant 24 heures avant le test, et maintenues dans un local d'expérimentation à 22 ± 2 °C et $70 \pm 5\%$ d'humidité ambiante, ont été regroupées de la façon la plus homogène possible (poids moyen du lot compris entre 25 et 28 g) (Anonyme, 1996).

Étude toxicologique

Six lots de six (6) souris dont un lot témoin ont été utilisés. Chaque animal a été identifié par un numéro et une marque différente, ensuite le poids de chaque souris a été pris, les animaux ont reçu une dose donnée par lot. L'administration des doses a été effectuée par les deux voies d'administration : intrapéritonéale et orale. Après administration, l'observation a été faite pendant 2 h avant de leur donner à manger (cela pour observer le cas de mort immédiat). Nous avons observé les souris pendant 72 h

afin de noter les symptômes de l'intoxication et la létalité (Litchfieldj et Wilcoxon, 1949 ; Dupont, 1970)

La méthode de calcul de la DL_{50} et de ses limites de confiance était décrite par Miller et Tainter (1944) et Muhammad (2009). Elle consiste à porter directement sur du papier Log *Probit*, le pourcentage de mortalité en fonction du log de la dose. Le calcul des rapports DL_{50} / DL_{99} et DL_1 / DL_{50} ont servi à la validation de la droite de toxicité. Les DL_{50} obtenues avec les extraits sont classées selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1980).

Étude de la toxicité aiguë par gavage

Six lots de six (6) souris comprenant autant de mâles que de femelles sont constitués au hasard. Chaque lot reçoit une dose unique de l'extrait, les différentes solutions ont été administrées par voie orale, à raison de 1 ml. La dose administrée est exprimée en mg/kg de poids corporel. L'administration du produit est réalisée par gavage à l'aide d'une sonde rigide à bout olivaire (Bruneton, 2009). Pour ce test, des lots de souris reçoivent per os des doses croissantes du produit à tester. Cette procédure permet de déterminer la plus forte des faibles doses qui donne 0% de mortalité et la plus faible des fortes doses qui donne 100% de mortalité. Des dilutions sont effectuées entre ces deux valeurs extrêmes afin de déterminer la dose létale 50%. Après l'administration de l'extrait, les animaux sont observés toutes les 30 minutes pendant 8 heures le premier jour et tous les jours pendant une semaine. Pendant cette période d'observation, on note le nombre de morts ainsi que les troubles symptomatiques.

Étude de la toxicité aiguë par injection intrapéritonéale

La technique expérimentale consiste en la répartition des souris en six lots de six (6) souris vigiles. Les substances sont injectées par voie intrapéritonéale (IP). Les souris d'un même lot reçoivent par voie IP : 0,4 ml d'une

solution à une concentration donnée. (Bruneton, 2009.)

L'injection de différentes concentrations des substances étudiées aux six lots de souris permet dans un premier temps de déterminer la concentration qui provoque 0% de mortalité et celle qui provoque 100% de mortalité. Ensuite des dilutions intermédiaires sont réalisées entre ces deux concentrations limites et injectées à six autres lots de souris afin de réaliser l'étude toxicologique proprement dite. Les dilutions des substances utilisées sont réalisées dans une solution de NaCl à 0.9%. Le taux de mortalité en fonction de la concentration de la substance injectée est relevé dans les 72 heures. Le pourcentage de mortalité de la souris est représenté en fonction des doses de la substance exprimée en mg/kg de poids corporel.

Traitement des résultats expérimentaux

Les souris mortes sont dénombrées et les valeurs enregistrées sont traitées en utilisant le programme informatique : *Pharmacological Calculation System* (version 4.2) de Tallarida et Murray (1987) pour les calculs des différents paramètres de la relation Dose- Réponse. Le programme utilisé a permis la détermination de la DL_{50} ainsi que son intervalle de confiance. La différence entre les moyennes est considérée statistiquement significative au seuil de 5% ($P < 0,05$).

RESULTATS

Étude phytochimique

L'analyse phytochimique réalisée à partir de l'extrait aqueux des bulbilles de *A. subvillosum* (Tableau 1) a révélé la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des stérols, des triterpènes, des tanins, des composés réducteurs, des hétérosides cardiotonique et des saponosides.

Étude toxicologique de l'extrait aqueux de *Allium subvillosum*

L'administration par voie orale pour des doses comprises entre 856,53 mg/kg de

PC et 8565,31 mg/kg de PC provoque une diminution de la motricité des souris. Ces animaux se déplacent d'abord difficilement puis traînent leur train arrière. Ces phénomènes, doses dépendants, se manifestent au bout d'une heure pour les faibles doses et après une vingtaine de minutes pour les fortes doses. Quelle que soit la dose administrée, ces animaux se couchent les uns sur les autres dans un coin de la cage. Les souris s'agitent fortement avant leur mort. Les premiers animaux sont morts 24 heures après l'ingestion des extraits aqueux, tandis que les derniers sont morts le cinquième jour.

Le même comportement a été observé chez les souris après injection par voie IP, pour des doses comprises entre 100 mg/kg de PC et 2500 mg/kg de PC. Toutefois, les effets des extraits administrés par IP s'expriment plus rapidement et sont plus intenses. Les effets des faibles doses injectées aux souris s'observent après une trentaine de minutes tandis que les effets de fortes doses apparaissent à dix minutes environ après l'injection de l'extrait. Les premiers animaux morts sont enregistrés 5 heures après l'injection des l'extraits, quant aux derniers animaux morts, ils l'ont été après 18 heures.

Détermination de la dose létale 50% après administration par voie orale

Après administration par voie orale, des extraits aqueux d'*Allium subvillosum* aux différents lots de six souris, aux doses comprises entre 856,53 mg/kg de P.C et 8565,31 mg/kg de P.C, les pourcentages de mortalité ont été relevés et consignés dans le Tableau 2.

Le graphe de la Figure 1, construit à partir des valeurs du Tableau 2, permet de déterminer une valeur de DL₅₀ de 3235.93 ± 878.34 mg/kg PC.

Détermination de la dose létale 50% après administration par voie intrapéritonéale

Après administration, par voie IP, des extraits aqueux de *Allium subvillosum* aux différents lots de six souris, aux doses comprises entre 100 mg/kg de P.C et 2500 mg/kg de P.C, les pourcentages de mortalité ont été relevés et consignés dans le Tableau 2. Le graphe de la Figure 2 construit à partir des valeurs du Tableau 2 permet de déterminer une valeur de DL₅₀ de 630.95 ± 278.13 mg/kg PC.

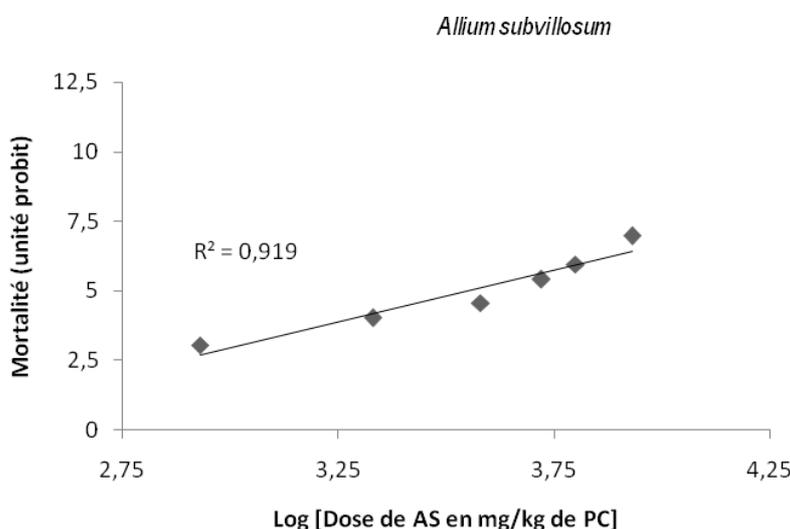


Figure 1 : Taux de mortalité des souris en fonction du logarithme de la dose de *Allium subvillosum*.

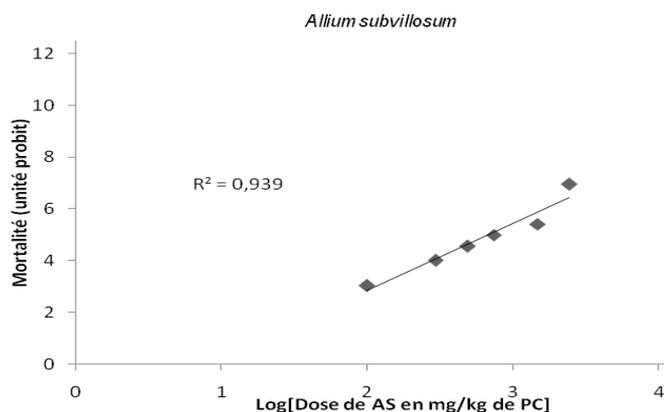


Figure 2 : Taux de mortalité par voie IP des souris en fonction du logarithme de la dose de *Allium subvillosum*.

Tableau 1 : Composition chimique de l'extrait aqueux des bulbilles de *A. subvillosum*.

Constituants chimiques	<i>Allium subvillosum</i>
Alcaloïdes	++
Flavonoïdes	++
Tanins	+
H. Cardiotonique	+++
Saponines	+++
Triterpènes	+
Stérols	+++
Composés réducteurs	+++

(+) signifie que la réaction est positive (Présence abondant : + + + ;
Présence moyen : + + ; Présence louche : +).

Tableau 2 : Mortalité des souris en pourcentage et en unités probits en fonction de la dose de *Allium subvillosum* (mg/kg de P.C).

Mode administration	Lots (n=6)	Dose mg/kg	Mortalité (%)	Mortalité (unité probits)
Voie orale	1	856.53	0	3.04
	2	2141.32	16.66	4.01
	3	3882.66	33.33	4.56
	4	5353.32	66.66	5.41
	5	6429.98	83.33	5.95
	6	8565.31	100	6.96
Voie intra péritonéale	1	100	0	3.04
	2	300	16.66	4.01
	3	500	33.33	4.56
	4	750	50.0000	5.00
	5	1500	66.6666	5.41
	6	2500	100	6.96

DISCUSSION

L'étude phytochimique de l'extrait aqueux de *Allium subvillosum* a montré que cette plante contient des flavonoïdes, des alcaloïdes, des stérols, des triterpènes, des tanins, des composés réducteurs, des hétérosides cardiotoniques ainsi que des saponosides, avec un contenu plus marqué surtout en flavonoïdes et en stérols.

La richesse de l'extrait aqueux en composés chimiquement actifs pourrait expliquer l'utilisation traditionnelle de cette plante pour soigner de nombreuses maladies telles que la dysenterie, la typhoïde, les refroidissements de toutes sortes, la tuberculose et le diabète. En effet, plusieurs auteurs ont montré que les différents types de composés chimiques mis en évidence dans les extraits de cette plante a des effets thérapeutiques (Frankel et al., 1993).

Il s'agit des alcaloïdes, des stérols et des triterpènes utilisés pour leur propriété antipyrétique et analgésique (Richard et al., 2004), des composés réducteurs dotés de pouvoir antidiabétique, des flavonoïdes capables de réduire l'hypertension artérielle (Gazola et al., 2004), des saponosides et des tanins connue par leur propriété tensioactive, ils sont aussi des antifongiques, antibactériennes et antivirales, de plus les saponosides présentent également des activités protectrices des veines et des capillaires et une activité importante anti-œdémateuse, et en fin les hétérosides cardiotonique préconisées dans certaines insuffisances cardiaques (Macheix et al., 2005).

L'étude toxicologique de l'extrait aqueux de *Allium subvillosum* chez la souris a permis de déterminer selon la méthode graphique de Miller et Tainter une DL₅₀ égale à 3235.93 ± 878.34 mg/kg de PC, lorsque l'extrait est administré par voie orale.

Lorsque les extraits aqueux sont administrés par voie intrapéritonéale, la même

méthode graphique de Miller et Tainter donnent une DL₅₀ égale à 630.95 ± 278.13 mg/kg de PC.

En toxicologie, il est connu qu'une substance pharmacodynamique dont la DL₅₀ est inférieure à 5 mg/kg de PC est ultra toxique. Celle présentant une DL₅₀ comprise entre 5 et 50 mg/kg de PC est une substance extrêmement toxique. Celle dont la DL₅₀ appartient à l'intervalle 50 et 500 mg/kg de PC est considérée comme très toxique. Celle dont la DL₅₀ se situe dans l'intervalle 500 à 5000 mg/kg de PC est modérément toxique. La substance ayant une DL₅₀ se situant entre 5000 et 15000 mg/kg de PC est légèrement toxique et enfin celle dont la DL₅₀ est supérieure à 15000 mg/kg de PC est dite non toxique (Diezi, 1989).

Selon cette classification, l'extrait aqueux, administré par voie orale est modérément toxique. Cependant lorsqu'il est administré par voie intra péritonéale, il est très toxique, cette constatation est identique pour notre plante. (Dallel, 2001). La différence de toxicité en fonction du mode d'administration, a été observée par McMahon et al. (1991) avec la capsaïcine, et Gallez et al. (1999) avec le manganèse.

Cette différence a été aussi observée avec le décocté de feuilles de *Pilostigma reticulatum* (Caesalpiniaceae) (Diallo et Diouf, 2000), et l'extrait brut de *Ziziphus mauritiana* (Rhamnaceae) (N'dounga et al., 1991)

Conclusion

L'étude phytochimique a révélé la présence des principaux groupes de composés chimiques actifs dans l'extrait aqueux d'*A. Subvillosum*, l'administration par voie orale est modérément toxique, tandis qu'il est très toxique lorsqu'il est administré par voie intrapéritonéale.

Cette plante, couramment utilisée en médecine traditionnelle, mérite d'être

employée avec précaution. Cependant, d'autres études pharmacologiques sont également dignes d'intérêt.

Le fractionnement de ces extraits permettra probablement d'isoler les principes actifs responsables des activités biologiques pour lesquelles les habitants de la région de Casablanca utilisent cette fameuse plante pour se soigner.

REFERENCES

- Anonyme. 1996. *Guide pour les Soins et l'Utilisation des Animaux de Laboratoire*, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press: Washington, D.C.
- Bellakhdar J. 2006. *Plantes Médicinales Au Maghreb Et Soins De Base : Précis de Phytothérapie Moderne*. Le Fennec: Casablanca, Maroc.
- Bruneton J. 2009. *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes Médicinales* (4^{ème} éd). Tec and Doc - Éditions Médicales Internationales: Paris, France.
- Dallel R. 2001. Les récepteurs vanilloïdes et leurs ligands. *Revue : Douleur et Analgésie* N°4.
- Diallo B, Diouf A. 2000. Analgesic effect of *Pilocostigma reticulatum* (nguiguais). *Odonto-Stomatologie Tropicale*, **92**: 5-11.
- Diezi J. 1989. Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. In *Pharmacologie. Des Concepts Fondamentaux aux Applications Thérapeutiques*. Slatkine: Genève, Suisse.
- Dupont C. 1970. Détermination de la DL₅₀ chez la souris, fiche technique n°6. *J. Pharmacol.*, **1**(3): 407- 414.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**(8843): 454-457.
- Gallez B, Demeure R, Baudelet C, Geurts M, Geubel A, Roels H. 1999. Evaluation Par RMN De L'intoxication Cérébrale Par Le Manganèse. *Louvain Med.*, **118**: 165-168.
- Gazola R, Machado D, Ruggiero C, Singi G, Macedo Alexandre M. 2004. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacol Res.*, **50**(5): 477-80.
- Hammiche V, Azzouz M, Merad R. 2013. *Plantes Toxiques A Usage Médicinal Du Pourtour Méditerranéen*, Springer: France.
- Harborne JJ. 1984. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, (2nd edn). Chapman and Hall: New York, USA.
- Harborne JJ. 1998. *Phytochemical methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (3rd edn). Chapman and Hall: London, U K.
- Hodge AC, Sterner JH. 1980. Etudes de toxicité: quelques données fondamentales (Done A.K). *Tempo Médical Afrique* N°7.
- Lietchfiel JT, Wilcoxon FA. 1949. A simplifield method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Ther.*, **95**: 113.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. 2005. *Les Composés Phénoliques des Végétaux: un Exemple de Métabolites Secondaires d'Importance Economique*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (PPUR): Lausanne, Suisse.
- McMahon SB, Lewin G, Bloom SR. 1991. The consequences of long-term topical capsaicin application in the rat. *Pain.*, **44**: 301-310.

- Miller LC, Tainter ML. 1944. Estimation of DL_{50} and its Error by means of Logarithmic Probit Paper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **57**: 261–264,
- Moussaid M, Elamrani A, Bourhim N, Benaissa M. 2011a. *In Vivo* Anti-Inflammatory and *In Vitro* Antioxidant Activities of Moroccan Medicinal Plants. *Nat. Prod. Commun.*, **6**: 1441-1444.
- Moussaid M, Elamrani A, Moussaid H, Berahal C, Bourhim N, Benaissa M. 2011b. Evaluation of the Antioxidant Potential of Some Morocco Medicinal Plants. *Global. J. Pharmacol.*, **5**: 153-158.
- Moussaid M. 2013. Contribution à l'étude des activités biologiques et phytochimique de cinq plantes de la région du grand Casablanca. PhD thèse, Université Hassan II, Casablanca, p. 133.
- Muhammad AR. 2009. Calculation of LD_{50} values from the method of Miller and Tainter. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad.*, **21**(3): 184–185.
- Ndonga M, Ouabouzi A, Kouabemba A, Makambila MC, M'pati J, Bilala JP. 1991. Activité bactériostatique et toxicité aiguë de *Syzygium Brazzavillense* (Myrtaceae). *Plant. Méd. Phytothér.*, **2**(3): 141-146.
- Richard D, Senon J.L, Valleur M. 2004. *Dictionnaire des Drogues et des Dépendances*. Larousse : France.
- Tallarida RJ, Murray RB. 1987. Pharmacological Calculation System based. In *Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs* (2nd edn). Springer-Verlag: New York, USA.