



Etude de la toxicité subchronique de l'extrait éthanolique de l'écorce du tronc de *Anonidium mannii* (Oliv) Engl. et Diels (Annonaceae)

Jean Emmanuel MBOSSO TEINKELA^{1*}, Eugène EKOUNÈ KAMÈ²,
Jules Clement ASSOBO NGUEDIA¹, Bathelémy NGAMENI² and Joseph NGOUPAYO²

¹Department of Biological Sciences, Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, P.O. Box 2701 Douala, Cameroon.

²Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaounde I, P.O. Box 1364, Yaounde, Cameroon.

*Corresponding author; E-mail: embosso@yahoo.fr; Phone: +237 6 53 40 15 42.

Received: 16-02-2023

Accepted: 25-06-2023

Published: 30-06-2023

RESUME

Anonidium mannii est une plante utilisée dans la pharmacopée traditionnelle camerounaise contre plusieurs affections dont les otites du nageur, les abcès, les infections cutanées, les infections intra abdominales. Ce travail avait pour objectif l'évaluation de la toxicité subchronique de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *Anonidium mannii* qui n'a pas encore fait l'objet d'études. Récoltée à Nkolotou'outou dans la région du Sud Cameroun, les écorces du tronc de *Anonidium mannii* ont été extrait dans de l'éthanol à 70%. L'évaluation de la toxicité subchronique a été réalisée sur une période de 90 jours, avec 4 lots de 10 rats (5 mâles et 5 femelles par lot) albinos de la souche Wistar, conformément aux directives OCDE 408. La détermination des paramètres biochimiques et des paramètres hématologiques a été faite à partir du serum et les coupes sériques et histologiques sur les organes. L'étude de la toxicité subchronique de l'extrait administré par voie orale aux rats de souche Wistar durant 90 jours aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg pour les 3 lots tests a été faite avec innocuité. Aucun décès n'a été enregistré aux différentes doses. Les paramètres physiologiques étaient normaux, de même que les poids moyens des organes. L'analyse des paramètres biochimiques, hématologiques et des coupes histologiques n'a pas montré de signe sérieux de toxicité dans les groupes traités. Finalement, l'extrait éthanolique d'écorce du tronc de *A. mannii* semble conserver une innocuité acceptable pour la formulation de médicaments traditionnels améliorés. © 2023 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Anonidium mannii*, toxicité subchronique, rats Wistar, plante médicinale.

Study of the subchronic toxicity of the ethanolic extract of the stem bark of *Anonidium mannii* (Oliv) Engl. and Diels (Annonaceae)

ABSTRACT

Anonidium mannii is a plant used in the traditional Cameroonian pharmacopoeia against several diseases including swimmer's ear, abscesses, skin infections and intra-abdominal infections. This work aimed to assess the subchronic toxicity of the ethanolic extract of *Anonidium mannii* stem bark, which has not yet been studied. Harvested in Nkolotou'outou in the South Cameroon region, the stem bark of *A. mannii* was extracted with ethanol at 70%. The assessment of subchronic toxicity was carried out over a period of 90 days, with 4 batches of 10 albino rats (5 males and 5 females per batch) of the Wistar strain, in accordance with OECD 408 guidelines. The

determination of biochemical parameters, and hematological parameters was done in serum and histological sections on organ. The study of subchronic toxicity of the extract administered orally to Wistar rats for 90 days at doses of 100, 200 and 400 mg/kg for the 3 test batches determined its safety. No deaths were recorded at any dose level. Analysis of biochemical, hematological and histological sections did not show any serious signs of toxicity in the treated groups. Finally, the ethanolic extract of the stem bark of *A. mannii* appears to conserve an acceptable safety for the formulation of improved traditional medicines.

© 2023 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: *Annonidium mannii*, subchronic toxicity, Wistar rats, medicinal plant.

INTRODUCTION

La médecine traditionnelle parfois appelée médecine parallèle ou médecine douce est la somme des connaissances, compétences et pratiques qui reposent sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales (Etame et al., 2018). Elle provient des connaissances ancestrales que possèdent les descendants de certaines familles, les initiés de certains villages, les herboristes et les vendeurs de drogues. Face aux limites constatées de la médecine moderne, aux habitudes socioculturelles, à la pauvreté, les populations africaines ont recours à la médecine traditionnelle qui s'avère être efficace pour la santé humaine (Rosenzweig, 2008). Les plantes aromatiques et médicinales, qui représentent une riche source de molécules bioactives, sont utilisées depuis de nombreuses décennies dans le traitement de plusieurs pathologies. Leurs utilisations foisonnent dans les pays en voie de développement (Ouattara et al., 2022). Il a été démontré que l'utilisation accrue des plantes médicinales dans le traitement des maladies humaines est aussi liée à la toxicité et au coût élevé des médicaments conventionnels, à l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural, limitant une prise en charge véritable des problèmes de santé publique (Maguirgue et al., 2022). C'est ainsi que plusieurs équipes de recherches travaillent dans l'optique de valoriser la biodiversité pour soigner les maladies et apporter du bien être aux populations. Dans le but d'apporter notre contribution à ce programme, nous nous sommes intéressés à *Annonidium mannii* (Oliv) Engl. et Diels. Le

choix de cette plante a été motivé d'une part, par son usage traditionnel dans le traitement des infections cutanées, des otites du nageur, abcès et des infections intra abdominales (Kuete et al., 2013 ; Tsabang et al., 2012 ; Djeussi et al., 2013). D'autre part, une revue de la littérature qui a révélé qu'aucune étude avaient été menées sur *A. mannii* pour ce qui est de l'étude de la toxicité subchronique à notre connaissance. Cependant, l'étude phytochimique, les activités antiprotozoaire et cytotoxique des écorces du tronc (Muganza et al., 2012), les activités antimycobactérienne des feuilles et des brindilles (Taffou et al., 2017) ; antiplasmodiale des feuilles et des tiges (Boyom et al., 2011) ; les activités antioxydante, cytotoxique et antibactérienne des feuilles (Kuete et al., 2013 ; Dzoyem et al., 2014) ; le screening phytochimique et l'activité antioxydante toutes les parties (bois des racines, feuilles, écorces du tronc, bois du tronc et écorces des racines) (Mbosso et al., 2022) ; la toxicité (aiguë et subaiguë) et l'évaluation des activités antimicrobiennes des écorces du tronc (Ekounè et al., 2022), ainsi que l'activité antibactérienne de l'extrait au méthanol des feuilles et racines de *A. mannii* (Djeussi et al., 2013) ont déjà fait l'objet d'étude. En conséquence, ce travail avait pour objectif d'étudier la toxicité subchronique de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *A. mannii*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Le matériel végétal était constitué des écorces du tronc de *Annonidium mannii* (Photo 1), récoltée dans la région du Sud Cameroun, Département du Dja et Lobo, Arrondissement de Sangmélina, plus précisément dans une forêt du village Nkolotou'outou et authentifiée à Herbar National du Cameroun sous le N°

50327/HNC. Le choix et l'identification des animaux a été porté sur les rats de souche Wistar, nullipares, non gravides, âgés de 06 à 09 semaines (Photo 2).

Méthode

Préparation de l'extrait éthanolique

Les écorces du tronc de *A. mannii* ont été lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée afin d'éliminer toute impureté qui pourrait affecter l'évaluation de la toxicité. La matière végétale a ensuite été séchée à température ambiante et réduite en particules fibreuses. Les fibres obtenues ont subi une macération dans de l'éthanol à 70% à température ambiante pendant 72 heures selon le protocole décrit par Mugiraneza et al. (2009). Brièvement, 6500 g de fibre d'écorces du tronc de *A. mannii* ont été mélangées avec 32,5 litres d'éthanol à 70% et le mélange résultant a été agité pendant 72 heures à température ambiante (25°C); Le mélange a été filtré trois fois sur du coton et sur du papier filtre Wattman de 3 mm. Enfin, le filtrat a été évaporé à 60°C en utilisant un évaporateur rotatif (Heidolph LABOROTA 4000).

Le taux d'extraction a été calculé à partir de la formule :

$$\tau = \frac{m}{M} \times 100$$

avec τ : taux d'extraction ; M : masse de poudre ; m : masse de l'extrait.

Toxicité subchronique

Elle a été conduite suivant la ligne directrice 408 de l'OCDE en 90 jours sur 40 rats répartis en 04 lots égaux de 5 mâles et 5 femelles recevant par voie orale de l'eau distillée (lot I) ; l'extrait à raison de 100, 200 et 400 mg/kg de poids corporel respectivement pour les lots II, III et IV. Les paramètres comportementaux ont été observés (OCDE, 2009). A la fin de l'étude, les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de Kétamine-Acépromazine (1,8 mg/190 g de poids corporel). Le sang de chaque animal a été prélevé de l'œil à l'aide des tubes à hématocrite puis par ponction cardiaque à l'aide d'une seringue, transféré dans les tubes secs, centrifugé 3500 trs/min pendant 15 min. Le sérum recueilli a été

conservé à 4°C pour les analyses biochimiques : les transaminases (l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'analine aminotransférase (ALAT)) ; protéines totales ; fonction rénale (Urée et Créatinine) ; et le profil lipidique (cholestérol total, HDL-cholestérol et triglycérides). Le serum a également été transféré dans les tubes EDTA pour les tests hématologiques (GB, GR, Hématocrite, Plaquette sanguine, Hémoglobine) (Diaby, 2017 ; Sidy, 2008).

Coupes histologiques

La procédure histologique a été réalisée selon la méthode décrite par Biswas et al (2010) avec quelques modifications. Le foie, le cœur, les reins et les poumons des groupes testés et témoin ont été traités avec un processeur automatique de tissus (STP 120) par la méthode de traitement des tissus décrite par Galen et Gambino (1975). La préparation de l'histologie a été effectuée dans des coupes de tissu de 4 μ m avec un microtome (Leica, RM 2145). Ces coupes ont ensuite été déparaffinées dans du xylène, déshydratées par une série graduée d'éthanol et colorées à l'hématoxyline-éosine et clarifiées dans du xylène I et du xylène II et ces organes ont été conservés pour un examen microscopique. Les lames préparées par ce processus ont été observées au microscope (modèle Nikon Labophot. 223425 Japon) et photographiées au microscope Nikon labophot Advanced Research, modèle 223425 Japon, avec Sony Digital 12,1 MEGA PIXELS. Ce dosage a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé 1.

Analyses statistiques

Le logiciel Excel a été utilisé pour enregistrer les données du suivi pondéral des rats, des masses des organes et de la concentration des marqueurs biochimiques tandis que le logiciel GraphPad Prism 8.0.1. nous a permis de tracer les courbes et de réaliser les analyses statistiques par les méthodes «oneway» ANOVA et «two-way» ANOVA grâce au test paramétrique de DUNNETT avec un seuil de significativité de 5%.



Photo 1 : *Anonidium mannii*.



Photo 2 : Rats de souche Wistar

RESULTATS

Extraction

Après extraction, nous avons recueilli un résidu qui a été séché à température ambiante jusqu'à obtention d'une masse constante de 248,4 g correspondant à un taux de rendement de 3,81% (Tableau 1).

Etude de la toxicité subchronique

Paramètres comportementaux

L'observation du comportement des rats tout au long des 90 jours d'étude, après administrations quotidiennes d'eau distillée, de 100, 200 et 400 mg/kg d'échantillon a permis d'enregistrer les paramètres représentés dans le Tableau 2.

L'aspect des selles, des yeux, le regroupement, la motilité, la nutrition, la modification du pelage, la sensibilité au bruit, le toilettage étaient normaux dans les lots test, de même que chez les témoins des deux sexes. L'absence de tremblement a aussi été observée lors de l'étude.

Croissance pondérale massique

Les Figures 1 et 2 montrent l'effet de l'extrait sur la croissance pondérale massique des rats de sexe féminin et masculin respectivement durant 90 jours d'étude. Les masses étaient prises en compte tous les dix jours. L'évolution des courbes est la même chez tous les lots des femelles en comparaison au témoin. Il en est de même chez les mâles. Par

ailleurs, les analyses statistiques ont révélé des différences non significatives avec une p value $> 0,9999$ dans les deux sexes.

Effet de l'extrait sur le poids moyen des organes des rats

L'effet de l'extrait sur le poids moyen des organes des rats des différents lots femelles et mâles de toxicité subchronique a permis de réaliser les Figures 3 et 4 respectivement. Les diagrammes montrent de faibles variations des cœurs et des reins chez les deux sexes. En comparaison aux témoins, les poids des foies des lots tests sont plus bas, augmentant progressivement avec la dose de l'extrait. Contrairement pour ce qui est des poumons, les poids des lots tests sont plus élevés et décroissent avec la dose de l'extrait. Ces observations sont valables pour les mâles et les femelles. L'analyse des masses moyennes des organes des différents lots des deux sexes, conformément au test multi comparatif 2 WAY ANOVA du logiciel GraphpadPrism version 8.0.1, a montré que les valeurs moyennes de la masse des organes en comparaison aux témoins ont des différences statistiques non significatives suivant les facteurs de colonne avec des p-value $> 0,05$.

Paramètres hématologiques

Le Tableau 3 nous présente le résultat des examens d'hématologie de la numération formule sanguine (NFS) et numération

globulaire. Chaque valeur représente la moyenne de cinq échantillons avec l'erreur standard relative. La numération formule sanguine des rats traités en comparaison aux témoins dans les deux sexes, n'a relevé aucune variation significative des paramètres sanguins étudiés.

Paramètres biochimiques

Le dosage des marqueurs biochimiques a permis de mettre en évidence les fonctions hépatiques par le dosage des transaminases (ASAT et ALAT) ; les fonctions rénales par les dosages de l'urée et la créatinine ; ainsi que les dosages du cholestérol total, du HDL-cholestérol et des protéines totales. Les longueurs d'ondes mesurées par le spectrophotomètre sont issues de la moyenne de cinq échantillons. Leurs valeurs ont servi à réaliser les Figures 5 et 12.

Effet des doses répétées de l'extrait sur le taux d'ASAT

La Figure 5 ci-dessous montre l'évolution du taux d'ASAT des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. Dans les deux sexes, nous observons des différences de variations peu considérables avec une légère perte de concentration en l'augmentant la dose. Conformément au test multi comparatif 2 WAY ANOVA du logiciel Graphpad Prism version 8.0.1, il en ressort que les différences sont considérées comme non significatives avec pour p valeur 0,5742.

Effet des doses répétées de l'extrait sur le taux d'ALAT

La Figure 6 ci-dessous montre l'évolution du taux d'ALAT des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. L'histogramme des mâles montre que les concentrations des lots tests sont basses par rapport au témoin et croissent avec l'élévation des doses administrées. Chez les femelles, les variations sont moins importantes et un peu au-dessus de la concentration du lot témoin. Dans l'ensemble, les analyses statistiques sont non significatives à l'exception du lot 2 mâle qui est peu significatif avec le témoin dont la p valeur est de 0,0373.

Effet des doses répétées de l'extrait sur les protéines totales

La Figure 7 ci-dessous montre l'évolution du taux des protéines totales des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. Pour ce qui est des protéines totales, nous observons des différences de variations non considérables dans les deux sexes avec une légère perte de concentration au niveau du lot 3 chez les mâles. L'effet est considéré comme non significatif avec une p valeur de 0,2242.

Effet des doses répétées de l'extrait sur la créatinine sérique

La Figure 8 ci-dessous montre l'évolution du taux de créatinine sérique des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. Nous observons dans les deux sexes une décroissance des concentrations de la créatinine par rapport aux témoins et à l'augmentation des doses de l'extrait des lots tests. Les différences statistiques ont été considérés comme non significatives avec une p valeur de 0,2647.

Effet des doses répétées de l'extrait sur le taux d'urée

La Figure 9 ci-dessous montre l'évolution du taux d'urée des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. Nous observons chez les femelles, une décroissance des concentrations d'urée par rapport aux témoins en fonction de l'augmentation des doses de l'extrait des lots tests. Chez les mâles, les concentrations diminues par rapport au lot témoin, avec le lot 3 qui paraît plus élevé que le 2 et 4. Contrairement aux autres lots, nous observons une différence significative entre les témoins et les lots 4 des deux sexes de p valeur 0,0018.

Effet des doses répétées de l'extrait sur le profil lipidique

Cholestérol sérique total

La Figure 10 ci-dessous montre l'évolution du taux de cholestérol total des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. Nous observons des variations de concentrations non considérables du cholestérol total chez les mâles et les femelles qui oscillent autour de 60 et 62 mg/dl respectivement. La différence statistique est

non significative (p value = 0,9769) avec 98% de chances d'observer au hasard un effet de cette ampleur (ou plus) dans l'ensemble des colonnes.

Cholestérol HDL

La Figure 11 ci-dessous montre l'évolution du taux du cholestérol HDL des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. Nous observons dans les deux sexes une décroissance des concentrations de cholestérol HDL par rapport aux témoins et à l'augmentation des doses de l'extrait des lots tests. Chez les femelles, le lot 1 et 2 semble avoir les mêmes concentrations pareillement que les lots 3 et 4. La différence statistique est peu significative (p value = 0,0363) avec 3,6% de chances d'observer au hasard un effet de cette ampleur (ou plus) dans l'ensemble des colonnes.

Triglycérides

La Figure 12 ci-dessous montre l'évolution du taux de triglycérides des rats mâles et femelles ayant reçu l'extrait en comparaison aux témoins. Nous observons

dans les deux sexes, une croissance des concentrations de triglycérides par rapport aux témoins et à l'augmentation des doses de l'extrait des lots tests. L'analyse statistique a révélé des différences peu significatives avec une p value de 0,0445.

Paramètres histologiques

Chez les femelles (Figure 13) et les mâles (Figure 14), les coupes histologiques ont montré une architecture d'ensemble normale du : Foie (parenchyme hépatique avec une veine centro-lobulaire et des hépatocytes bien distincts), Rein (parenchyme normal avec un glomérule et un espace urinaire bien distincts), Cœur (fibres musculaires et noyaux bien distincts), Poumon (Epithélium pulmonaire, sac alvéolaire) dans les deux sexes. Aucuns signes d'altérations significatives au niveau de ses organes n'ont été observés. Aucune d'altération structurale au niveau de ces différents organes n'a été observée chez les groupes recevant l'extrait aux différentes doses par rapport à celui recevant de l'eau distillée.

Tableau 1 : Rendement de l'extrait à l'éthanol des écorces du tronc de *Anonidium mannii*.

Etapes	Masse initiale (kg)	Masse finale (kg)	Rendement (%)
Séchage	27,5	10	36,36
Broyage	10	8,8	88
Extraction (Éthanol)	6,5	0,25	3,81

Tableau 2 : Paramètres cliniques des rats soumis à la toxicité subchronique.

Paramètres	Lot 1 :	Lot 2 : Test 1	Lot 3 : Test 2	Lot 4 : Test 3
	Eau distillée			
	Témoin neutre	Lot 100 mg/kg	Lot 200 mg/kg	Lot 400 mg/kg
Aspect des selles	N	N	N	N
Aspect des yeux	N	N	N	N
Groupement	N	N	N	N
Motilité	N	N	N	N
Nutrition	N	N	N	N
Modification du pelage	N	N	N	N
Sensibilité au bruit	N	N	N	N
Toiletage	N	N	N	N
Tremblement	A	A	A	A

A = Absent, N = Normal.

Tableau 3 : Résultats de la NFS et la numération glomérulaire.

Désignations	Femelles				Mâles			
	Témoin	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	Témoin	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Hématies ($10^6/\text{mm}^3$)	4,19 ± 0,10	4,13 ± 0,63	4,28 ± 0,29	4,83 ± 0,78	5,23 ± 0,17	3,84 ± 0,85	4,06 ± 0,55	3,49 ± 0,48
Leucocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	5,83 ± 1,67	3,18 ± 0,66	4,04 ± 1,95	6,39 ± 3,04	6,41 ± 0,90	5,30 ± 1,35	4,70 ± 0,72	6,58 ± 1,72
Hémoglobine (gdl)	11,10 ± 0,10	10,29 ± 1,90	11,03 ± 0,85	10,99 ± 2,27	11,32 ± 0,62	10,13 ± 0,28	10,81 ± 0,76	12,02 ± 1,00
Hématocrite (%)	60,00 ± 10,39	48,42 ± 16,27	47,40 ± 4,34	49,10 ± 2,92	53,72 ± 1,90	46,62 ± 15,90	42,22 ± 5,24	45,48 ± 1,82
VGM (μm^3)	69,60 ± 7,47	88,00 ± 8,37	87,20 ± 5,72	75,20 ± 13,01	58,20 ± 4,55	81,20 ± 2,17	90,20 ± 8,07	89,60 ± 5,50
TCMH (pg)	28,60 ± 3,21	32,40 ± 4,83	24,84 ± 3,42	24,85 ± 4,13	32,80 ± 0,45	27,40 ± 3,29	27,04 ± 1,84	30,20 ± 2,95
MCHC (g/dl)	31,34 ± 2,63	31,62 ± 4,29	33,78 ± 2,17	33,60 ± 2,41	31,21 ± 0,61	30,09 ± 2,44	31,34 ± 2,10	34,40 ± 0,55
Plaquettes ($10^6/\text{mm}^3$)	158,40 ± 16,73	158,60 ± 16,41	147,00 ± 4,30	150,60 ± 11,59	131,20 ± 8,41	188,80 ± 26,50	149,60 ± 4,88	142,80 ± 2,05
Lym # ($10^3/\mu\text{l}$)	1,61 ± 0,63	0,81 ± 0,64	1,22 ± 0,66	1,03 ± 0,76	1,41 ± 0,90	0,65 ± 0,75	1,27 ± 1,70	1,58 ± 0,75

VGM = volume globulaire moyen; MCHD = teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine; MCHC = concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine; Lym = lymphocyte; pg = pictogramme.

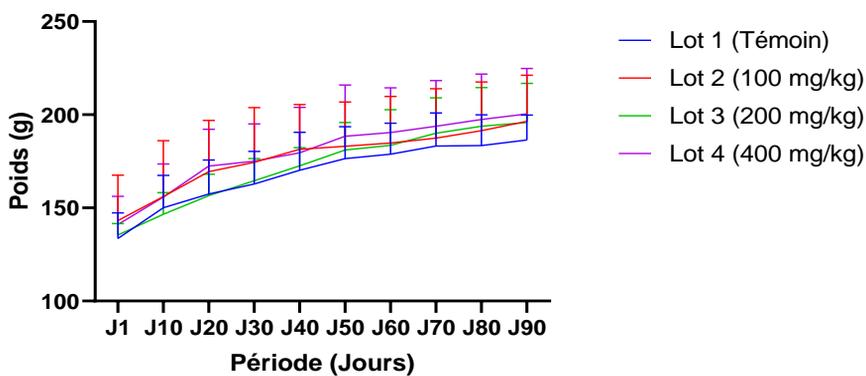


Figure 1 : Courbes évolutives des masses moyennes des rats femelles.

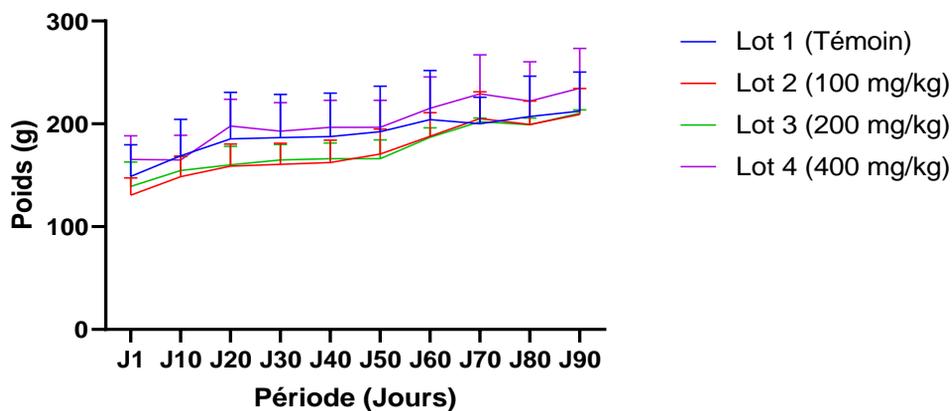


Figure 2 : Courbes évolutives des masses moyennes des rats mâles.

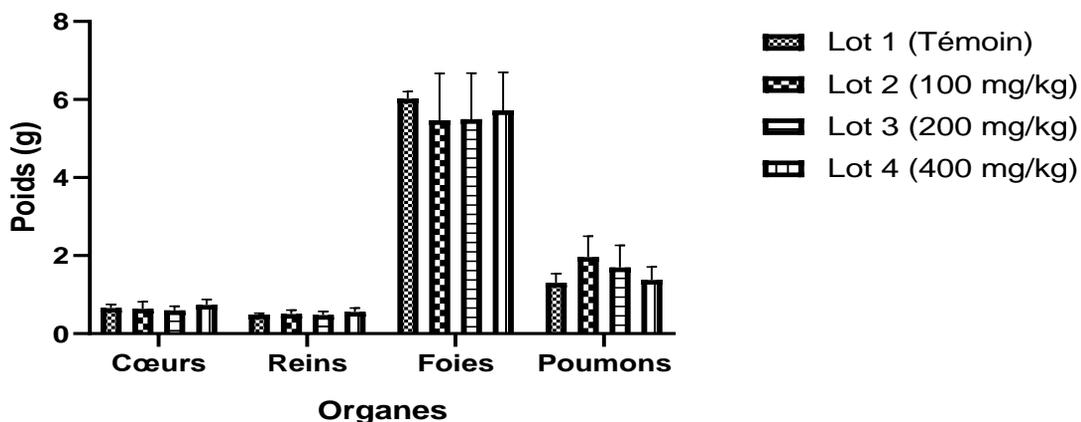


Figure 3 : Histogrammes des masses moyennes des rats femelles.

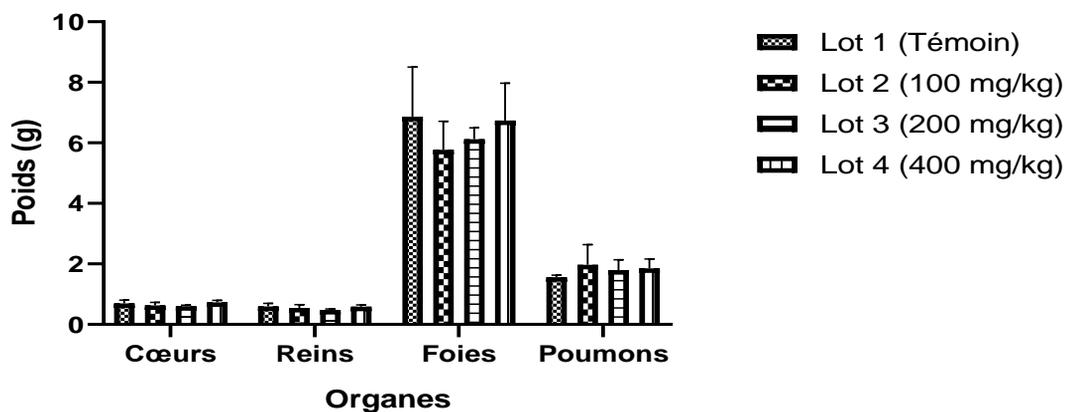


Figure 4 : Histogrammes des masses moyennes des rats mâles.

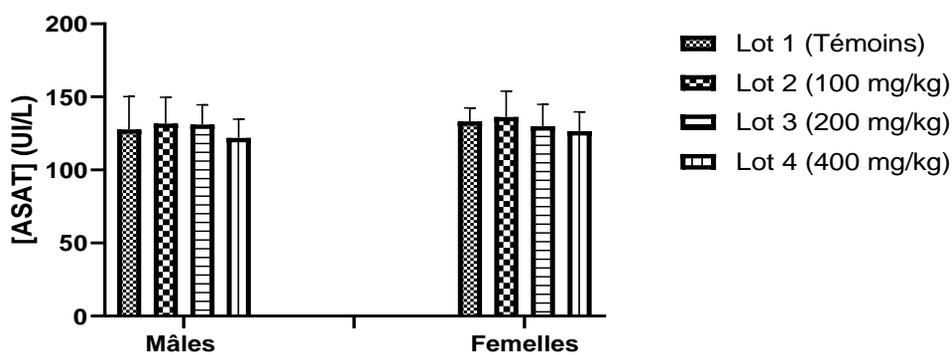


Figure 5 : Diagrammes d'évolution de l'ASAT.

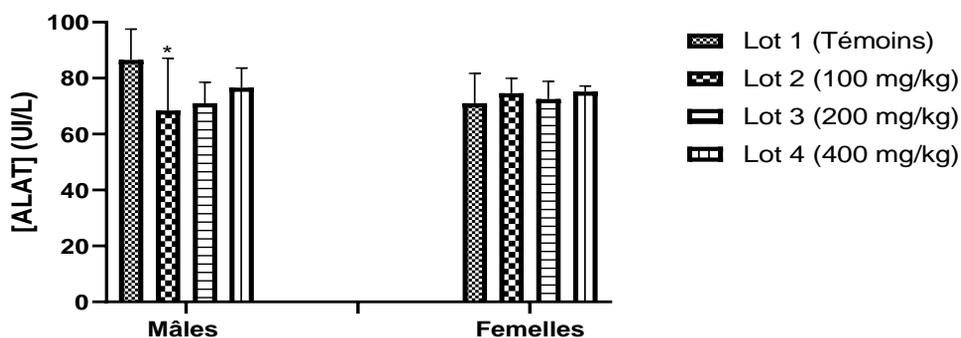


Figure 6 : Diagrammes d'évolution de l'ALAT.
 p < 0,05 (*) = peu significatif.

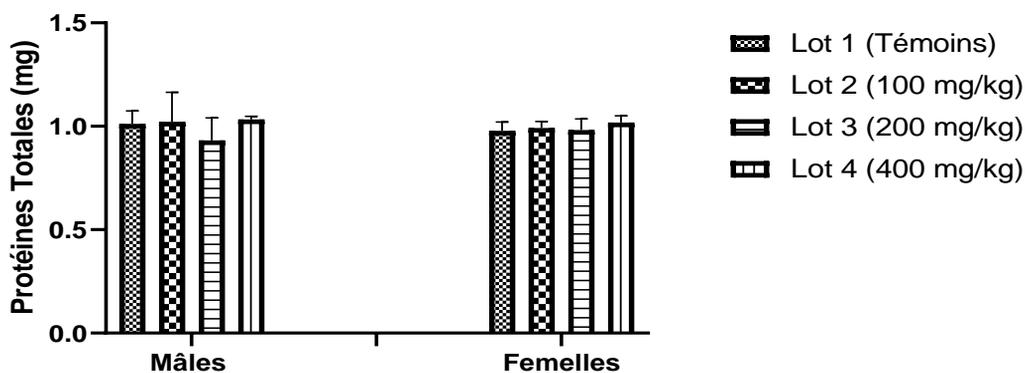


Figure 7 : Diagrammes d'évolution de la quantité des protéines totales.

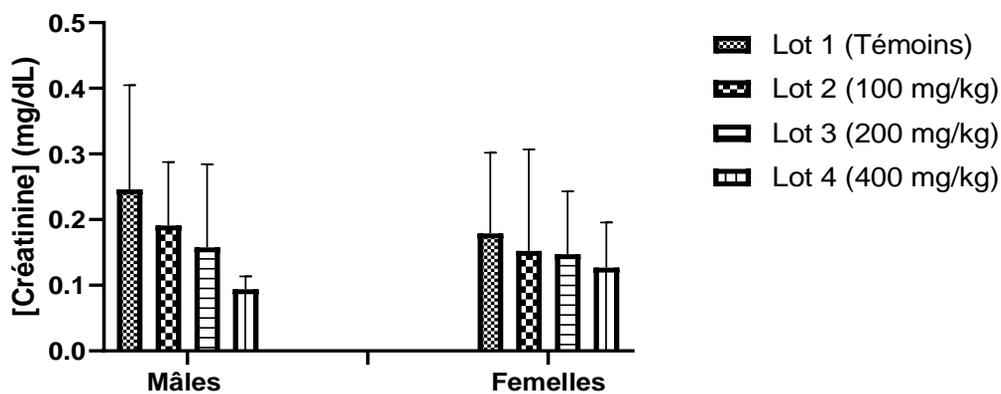


Figure 8 : Diagrammes d'évolution de la créatinine sérique.

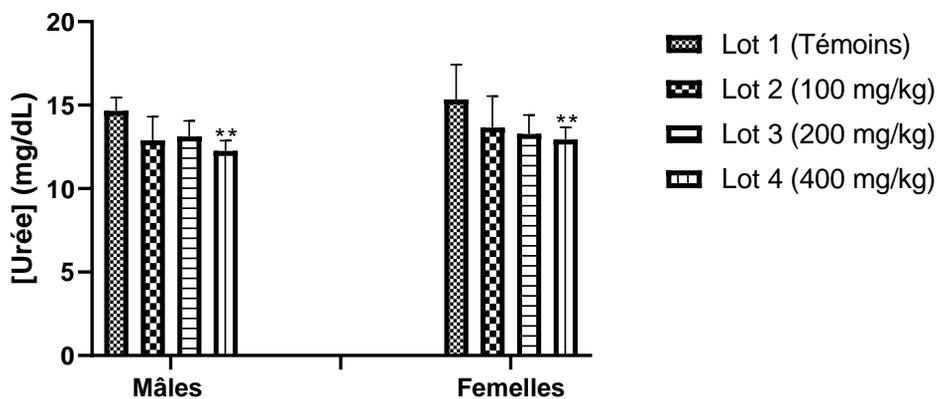


Figure 9 : Diagrammes d'évolution de l'urée.
 p < 0,01 (**) = significatif.

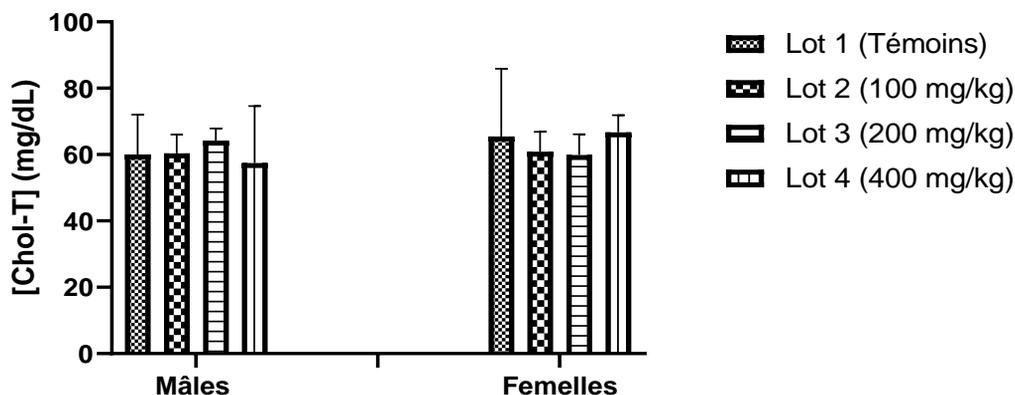


Figure 10 : Diagrammes d'évolution de Cholestérol total.

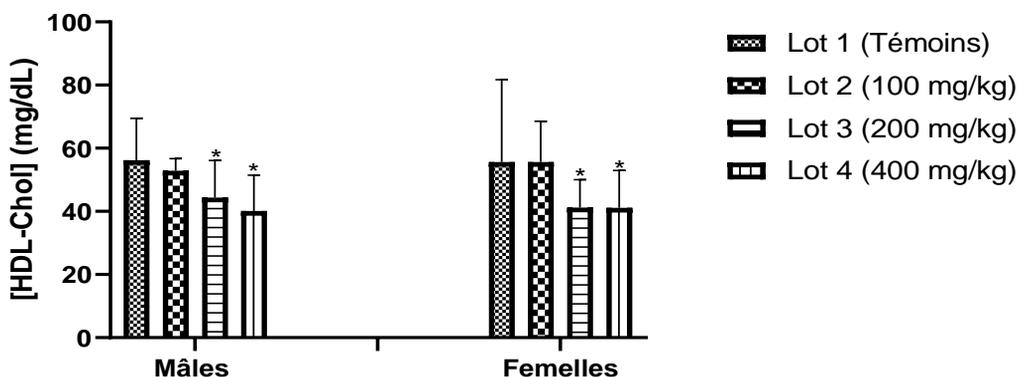


Figure 11 : Diagrammes d'évolution du cholestérol HDL.
 $p < 0,05$ (*) = peu significatif.

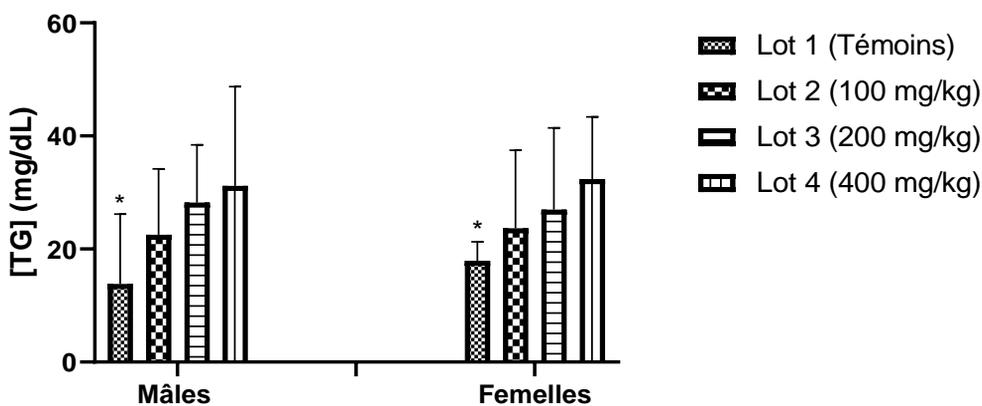


Figure 12 : Diagrammes d'évolution de triglycérides.
 $p < 0,05$ (*) = peu significatif.

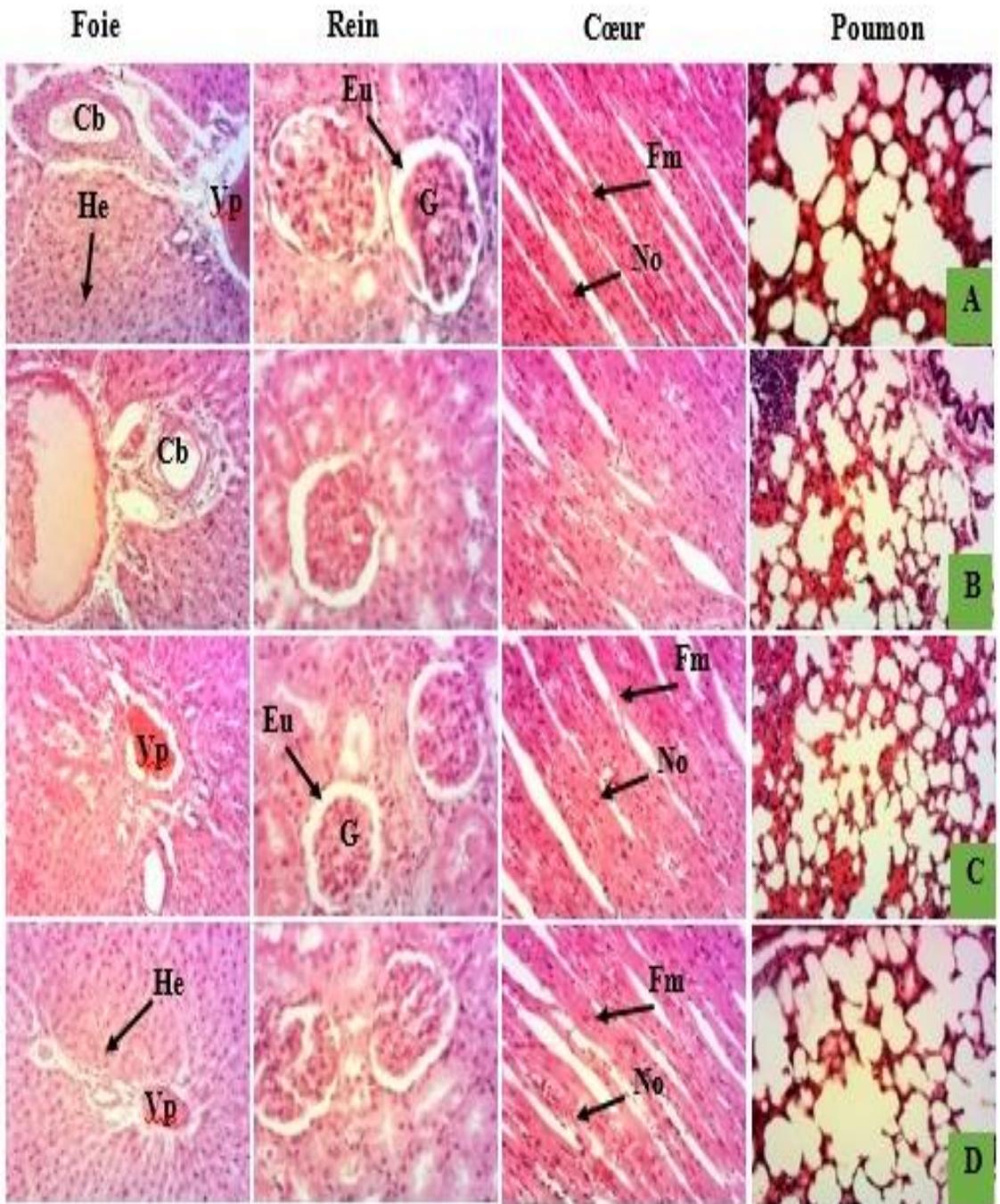


Figure 13 : Effets de l'extrait de *Annonidium manii* sur la structure du foie (100X), du rein (200X), du cœur (100X) et du poumon (200X) chez les rats femelles (HE). A, B, C et D représentent respectivement les lignes des lots témoins, et lots tests ayant reçu 100, 200 et 400 mg/kg de poids corporel d'extrait. **Foie :** Vp = Veine porte, He = Hépatocyte, Cb = Canalicule biliaire ; **Rein :** G = Glomérule, Eu = Espace urinaire, **Cœur :** No = Noyau, Fm = Fibre musculaire ; **Poumon :** Sa = sac alvéolaire.

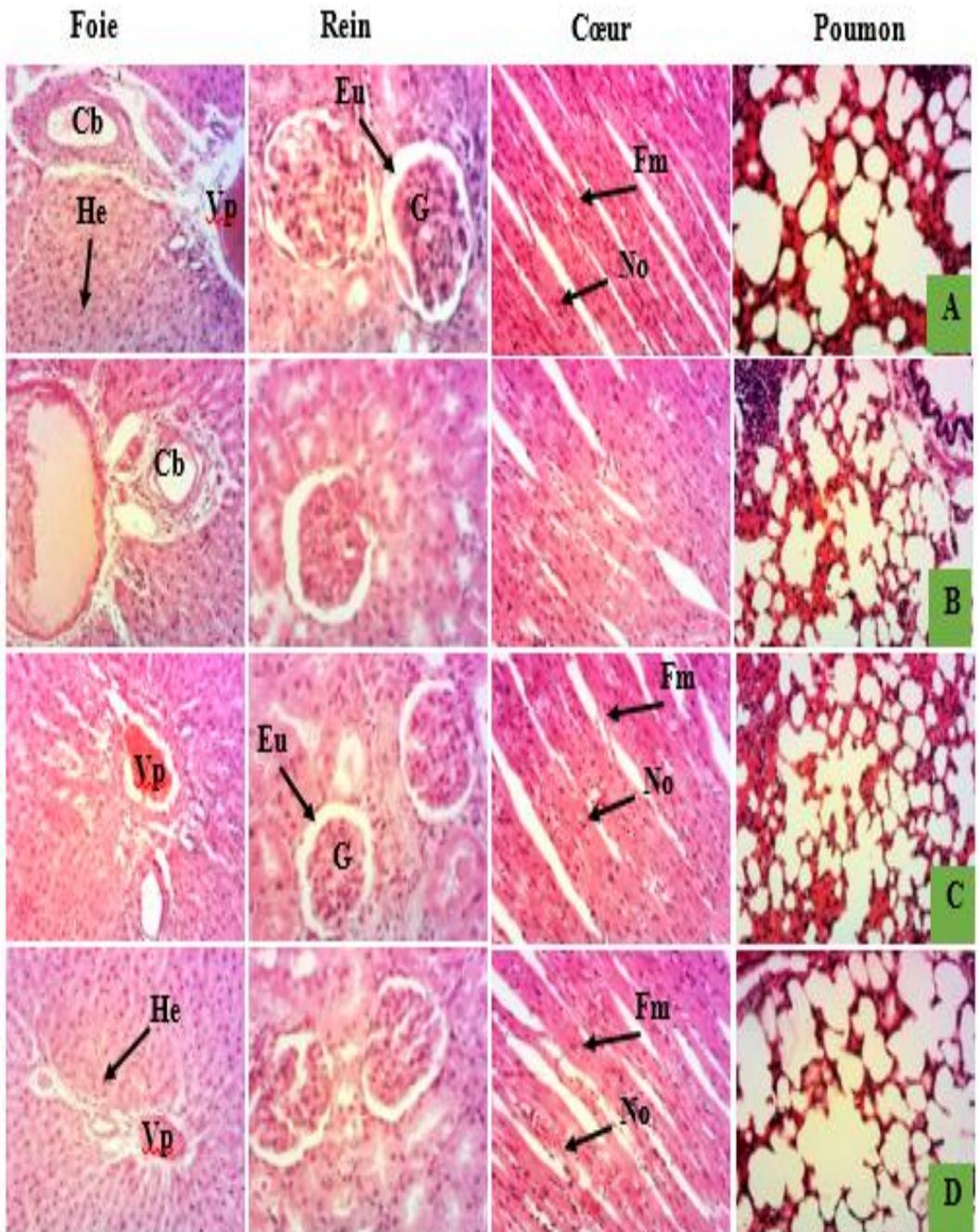


Figure 14 : Effets de l'extrait de *Annonidium manii* sur la structure du foie (100X), du rein (200X), du cœur (100X) et du poumon (200X) chez les rats mâles (HE). A, B, C et D représentent respectivement les lignes des lots témoins, et lots tests ayant reçu 100, 200 et 400 mg/kg de poids corporel d'extrait. **Foie :** Vp = Veine porte, He = Hépatocyte, Cb = Canalicule biliaire ; **Rein :** G = Glomérule, Eu = Espace urinaire, **Cœur :** No = Noyau, Fm = Fibre musculaire ; **Poumon :** Sa = sac alvéolaire.

DISCUSSION

Au cours de l'étude, le rendement d'extraction à l'éthanol 70% par macération des fibres d'écorces du tronc de *A. mannii* a été calculé par rapport à la masse initiale et correspondait à 3,81%. Ce rendement est supérieur à celui de l'extrait à l'éthanol 96% de la même partie de plante (2.46%) réalisé dans une étude précédente en 2022 (Ekounè et al., 2022). Ceci pourrait s'expliquer au fait que l'éthanol 70% soit plus polaire que le méthanol et l'éthanol 96% et entraînerait plus de composés polaires comme les tanins et les saponines retrouvés lors du screening phytochimique (Ekounè et al., 2022).

Au cours des 90 jours de toxicité subchronique, les paramètres physiologiques étaient normaux chez les témoins que dans les lots tests. Les poids corporels moyens ont augmenté dans toute la population au cours de la période d'observation. Ces résultats corroborent avec ceux de Etame et al. (2017) pour lesquels la prise du poids des mâles et des femelles augmente généralement quel que soit le lot choisi avec un gain de poids plus important chez les rats mâles par rapport aux rats femelles (Etame et al., 2017). Pour ce qui est des organes, très peu de variations ont été observées. Ceci pourrait traduire le fait que l'extrait n'est pas nocif. Ces résultats corroborent ceux de Ekounè et al. (2022) réalisé lors de l'étude de la toxicité subaiguë de l'extrait éthanolique de la même partie de plante. Les analyses statistiques des masses moyennes des organes des différents lots des deux sexes ont tous révélés des différences non significatives avec des p-value > 0,05. Ces résultats permettent d'étayer l'hypothèse d'une probable innocuité de l'extrait (Atata et al., 2003). L'analyse des éléments du sang a permis de mettre en évidence les constituants importants dans la détermination de l'index et du statut physiologique et pathologique chez l'homme et aussi chez l'animal. Le système hématopoïétique est l'un des principales cibles des composés toxiques. C'est également un marqueur important de la physiologie et état pathologique chez l'homme et l'animal (Mukinda et Syce, 2007). Le profil sanguin fournit non seulement des informations importantes sur la réponse du corps aux

dommages ou au stress, mais fournit également une prédiction hématologique toxicité chez l'homme (Mukinda et Syce, 2007 ; Soeharto et al., 2018). D'après Hazra et al., certaines substances thérapeutiques pourraient avoir une action sur les cellules de différenciation hématopoïétiques (Hazra et al., 2008). La numération formule sanguine des rats traités n'a relevée aucune variation significative des paramètres hématologiques étudiés, traduisant ainsi l'absence d'effet sur la stimulation hématopoïétique. Ces résultats corroborent ceux de Ekounè et al. (2022) réalisés lors de l'étude de la toxicité subaiguë de l'extrait éthanolique de la même partie de plante. Les variations des taux d'ASAT et ALAT sont considérées comme non significatives dans la population étudiée. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus lors de l'étude de la toxicité subaiguë de la même partie de cette plante (Ekounè et al., 2022). Ces résultats justifieraient l'innocuité de l'extrait.

L'albumine, le fibrinogène et les globulines sont les protéines plasmatiques synthétisées dans le foie. Les stimulations des cellules hépatiques peuvent être en faveur de l'augmentation du taux de protéines, aussi bien que d'autres facteurs. Il est rapporté dans la littérature que les tanins peuvent complexer avec les protéines et les précipiter; cette insolubilisation les rend inaccessible à l'hydrolyse enzymatique contribuant ainsi à augmenter leur taux (Ekounè et al., 2022). Aucune variation significative dose-dépendant du taux sérique de protéines n'a été observée entre les rats ayant reçu l'extrait et les rats témoins. La diminution du taux du lot 3 des mâles devrait être due à un autre facteur. Cette étude a démontré la présence des tanins lors du screening phytochimique de l'extrait éthanolique de la même partie de plante (Ekounè et al., 2022). Les Tanins par des mécanismes cités plus haut, qui n'ont pas vraiment influencé le taux de protéines total avec les doses d'extrait. La fonction rénale peut être évaluée en déterminant les taux sériques d'urée, d'acide urique, de créatinine, de potassium et de sodium. Le niveau de créatinine en particulier est un indicateur clé du potentiel de toxicité. Le rein est normalement capable de filtrer de grandes quantités de créatinine. Donc,

l'augmentation de la créatinine sanguine est un indicateur d'un impact négatif sur la fonction rénale (c.-à-d. lésions rénales ou altération glomérulaire filtrage) (Somda et al., 2022). Des diminutions non significative des taux sériques de créatinine (p value = 0,2647) et significatives (p value = 0,0018) d'urées chez les lots traités à l'extrait par rapport aux lots témoins ont permis de suggérer que l'extrait éthanolique de d'écorces du tronc de *A. mannii* n'est pas nuisible sur la fonction rénale (Palm et Lundblad, 2005). Ces résultats corroborent ceux réalisés lors de l'étude de la toxicité subaiguë en 2022 (Ekounè et al., 2022). L'augmentation des Triglycérides justifierait la diminution du bon cholestérol (HDLc) au détriment du mauvais cholestérol constitué en grande majorité les LDL cholestérol (LDLc) (Tan et al., 2007). La diminution de HDLc pourrait s'expliquer par une éventuelle perturbation du mécanisme de synthèse de HDLc à partir du VLDL cholestérol (VLDLc) qui est produit dans le foie, d'où diminution des masses moyennes de ces organes. Il a aussi été rapporté que les stéroïdes anabolisants peuvent conduire à une diminution des taux de HDLc (Jagtap et al., 2013). La présence des stéroïdes dans l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *A. mannii* lors du screening phytochimique pourrait justifier cet effet (Ekounè et al., 2022). Les coupes histologiques ont montré des architectures normales du foie, du rein, du poumon et du cœur dans les deux sexes. Les signes d'altérations ne sont pas significatifs. Ces résultats corroborent ceux de Ekounè et al. (2022) obtenues lors de l'étude de la toxicité subaiguë, ce qui n'est pas toujours le cas comme l'étude de la toxicité subchronique du mélange de poudre d'écorce de racines de *Calotropis procera* et *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* ou on a observé de nombreuses lésions organiques pathologiques peut être détecté par examen macroscopique des organes, puis une atrophie de la paroi musculaire et une destruction de la surface de l'épithélium du estomac à 1000 mg/kg p.c. par examen microscopique (Somda et al., 2022).

Conclusion

L'ensemble des observations et des résultats obtenus, permettent de conclure que

l'administration de l'extrait éthanolique des écorces du tronc de *Anonidium mannii* chez les rats Wistar a été faite avec innocuité lors de l'étude de la toxicité subchronique. En conséquence, l'usage de cette partie de plante en médecine traditionnelle pourrait se faire sans danger.

CONFLITS D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont aucun conflit d'intérêts.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

JETM designed the study and supervised the work while EEK conducted the experiments. BN wrote the first draft of the manuscript. JG carried out the bibliographic research. JCAN analyzed the results, plotted the curves and corrected the first draft of the manuscript.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M. Nana Victor, botaniste à l'Herbier National du Cameroun pour l'identification et la récolte de la plante.

REFERENCES

- Atata RF, Alhassan S, Ajewole SM. 2003. Effect of stem bark extracts of *Enantia chloranta* on some clinical isolates. *Biokemistri*, **15**(2): 84-92.
- Biswas S, Troy H, Leek R, Chung Y-L, Li JL, Raval RR, Turley H, Gatter K, Pezzella F, Griffiths JR, Stubbs M, Harris AL. 2010. Effects of HIF-1 and HIF2 on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *J. Oncol.*, **2010**: 1-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/757908>
- Boyom FF, Fokou PVT, Yamthe LRT, Mfopa AN, Kemgne EM, Mbacham WF, Tsamo E, Zollo APH, Gut J, Rosenthal PJ. 2011. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *J. Ethnopharmacol.*, **134**(3): 717-724. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.020>
- Chase MW, Reveal JL. 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Bot. J. Linnean Soc.*,

- 161(2):** 122-127. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.01002.x>
- Djeussi DE, Noumedem JA, Seukep JA, Fankam AG, Voukeng IK, Tankeo SB, Nkuete AHL, Kuete V. 2013. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.*, **13(1)**: 1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-164>
- Dzoyem JP, Kuete V, McGaw LJ, Eloff JN. 2014. The 15-lipoxygenase inhibitory, antioxidant, antimycobacterial activity and cytotoxicity of fourteen ethnomedicinally used African spices and culinary herbs. *J. Ethnopharmacol.*, **156**: 1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.007>
- Ekounè KE, Nguemfo EL, Xavier Siwe NX, Tsakem B, Mpondo ME, Ngameni B, Assob NJC, Mbossso TJE. 2022. Evaluation of *in vivo* toxicity and *in vitro* antimicrobial activities of crude ethanolic stem bark extract of *Anonidium mannii*. *J. Complement. Altern. Med. Res.*, **20(4)**: 49-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/JOCAMR/2022/v20i4424>
- Etame RME, Mouokeu RS, Ngane RAN, Assam JA, Masoohe AM, Tientcheu R, Hopogap ML, Etoa FX. 2017. Acute and sub-acute toxicity of *Harungana madagascariensis* LAM (Hypericaceae) stem bark methanol extract. *J. Applied Pharm. Sci.*, **7(03)**: 160-167. DOI: <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2017.70326>
- Etame-Loe G, Ngoule CC, Mbome B, Pouka CK, Ngene JP, Yinyang J, Okalla EC, Ngaba GP, Dibong SD. 2018. Contribution à l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans le département du Lom et Djerem (Est, Cameroun). *J. Animal Plant Sci.*, **35**: 5560-5578.
- Friedman LS, Martin P, Munoz SJ. 1996. Liver Function Tests and the Objective Evaluation of the Patient with Liver Disease. In *Hepatology: A Textbook of Liver Disease* (3rd Edition), Zakin D, Boyer TD (Eds). WB Saunders: Philadelphia.
- Galen RS, Gambino SR. Beyond normality-the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York: NY, Wiley; 1975.
- Hazra B, Biswas S, Mandal N. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement. Altern. Med.*, **8(1)**: 1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-8-63>
- Jagtap CY, Ashok BK, Patgiri BJ, Prajapati PK, Ravishankar B. 2013. Acute and subchronic toxicity study of *Tamra bhasma* (incinerated copper) prepared from *Ashodhita* (unpurified) and *Shodhita* (purified) tamra in rats. *Indian J. Pharm. Sci.*, **75(3)**: 346-352. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474X.117433>
- Jones Jr DD, Caesar LK, Pelzer CV, Crandall WJ, Jenul C, Todd DA, Horswill AR, Cech NB. 2020. Targeted and untargeted analysis of secondary metabolites to monitor growth and quorum sensing inhibition for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Microbiol. Methods*, **176**: 106000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106000>
- Kuete V, Fankam AG, Wiench B, Efferth T. 2013. Cytotoxicity and modes of action of the methanol extracts of six Cameroonian medicinal plants against multidrug-resistant tumor cells. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, **2013(2013)**: 285903. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/285903>
- Maguirgue K, Wangso H, Oksom SJ-B, Bakaranga-Via I, Nadjioroum N-A, Otchom BB. 2022. Phytochemical evaluation, antioxidant and anti-inflammatory potentials *in vitro* of *Commelina benghalensis* Linn. (Commelinaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **16(6)**: 2673-2684. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v16i6.17>

- Mbosso TJE, Nnanga NS, Fannang SV, Etame LGMM, Eya'ane MF, Xavier Siwe NX. 2022. Phytochemical screening and comparative evaluation of antioxidant activity of different parts of *Anonidium mannii* (Oliv) Engl. et Diels. *J. Complement. Altern. Med. Res.*, **19**(4): 43-52. DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/JOCAMR/2022/v19i4401>
- Muganza DM, Fruth BI, Lami JN, Mesia GK, Kambu OK, Tona GL, Kanyanga CR, Cos P, Maes L, Apers S, Pieters L. 2012. *In vitro* antiprotozoal and cytotoxic activity of 33 ethnopharmacologically selected medicinal plants from Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.*, **141**(1): 301-308. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.035>
- Mugiraneza JP, Nshimiyimana JP, Bajyana E. 2009. Evaluation de l'efficacité de l'extrait éthanolique de *Maytenus undata* (Thumb.) Blakelock sur les germes responsables des diarrhées glairoanglantes. *Life Sci. Nat. Sci.*, **17**: 16-23.
- Mukinda JT, Syce JA. 2007. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *J. Ethnopharmacol.*, **112**(1): 138-144. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.02.011>
- OCDE, 2009. Toxicité subchronique par inhibition: étude sur 90 jours, lignes directrice No. 408, lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- Ouattara LP, Maiga I, Bazie VB, Zerbo M, Bationo RK, Zongo C, Savadogo A, Nebie RCH. 2022. Phytochemical screening and antimicrobial activity of extracts of five aromatic and medicinal plants from Burkina Faso. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **16**(5): 2228-2237. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v16i5.32>
- Palm M, Lundblad A. 2005. Creatinine concentration in plasma from dog, rat, and mouse: a comparison of 3 different methods. *Vet. Clin. Pathol.*, **34**(3): 232-236. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165x.2005.tb00046.x>
- Sidy S. 2008. Etude de la variation des paramètres biochimiques et hématologiques dans le district de Bamako. Thèse de Pharmacie. Université de Bamako.
- Soeharto S, Nugrahenny D, Permatasari N, Mayangsari E. 2018. Subchronic Toxicity of the *Physalis minima* leaves. *Res. J. Life Sci.*, **5**(1): 77-82. DOI: <https://dx.doi.org/10.21776/ub.rjls.2018.005.01.8>
- Somda GD, Ouedraogo N, Ouedraogo GG, Ilboudo S, Ouédraogo M, Ouédraogo S, Assita L-S, Kini BF, Guissou PI, Ouédraogo S. 2022. Acute and sub-chronic toxicity study of the mixture of *Calotropis procera* (Ait). R. Br. (Apocynaceae) and *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae) roots bark powder. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **16**(1): 184-200. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v16i1.16>
- Taffou T, Hounda FJB, Menkem ZE, Yamthe TLR, Mfopa NA, Kamdem SM, Ngouana V, Tsague KJF, Boyom FF. 2017. Anti-yeast potential of some Annonaceae species from Cameroonian biodiversity. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **11**(1): 15. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v11i1.2>
- Tan PV, Boda M, Enow-Orock GE, Etoa FX, Bitolog P. 2007. Acute and sub-acute toxicity profile of the aqueous stem bark extract of *Enantia chlorantha* Oliver (Annonaceae) in laboratory animals. *Pharmacologyonline*, **1**: 304-313.
- Tsabang N, Fokou PVT, Tchokouaha LRY, Noguem B, Bakarnga-Via I, Nguépi MSD, Nkongmeneck BA, Boyom FF. 2012. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *J. Ethnopharmacol.*, **139**(1): 171-180. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.035>