



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Étude de la toxicité subaiguë hématologique et biochimique des extraits hydro-méthanoliques de *Ingofera pulchra* chez les rats Wistar

Yao LAYIBO^{1*}, Hézouwé MAGNANG¹, Kossivi DOSSEH², Norbert TOGBENOU³,
Délagnon Messanh Irenée KUEVIAKOE¹ et Amégnona AGBONON³

¹Faculté des Sciences de la Santé, Université de Lomé, Togo.

²Institut National de la Jeunesse et des Sports, Lomé, Togo.

³Faculté des Sciences, Université de Lomé, Togo.

*Auteur correspondant ; E-mail : mylayibo@yahoo.fr

Received: 23-09-2022

Accepted: 12-10-2023

Published: 31-10-2023

RESUME

Indigofera eIndigofera pulchra (*Ip*) Willd est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter l'anémie, le paludisme et la douleur, par des ingestions répétées. L'objectif de cette étude était d'évaluer la toxicité subaiguë des extraits hydro-méthanoliques de *Ip*. La constitution phytochimique de l'extrait a été déterminée. Quatre lots de cinq rats Wistar chacun ont été constitués dans lesquels étaient administrés quotidiennement de l'eau distillée (lot 1 : groupe témoin), l'extrait à 100 mg/kg de poids (lot 2), l'extrait à 200 mg/kg de poids (lot 3) et l'extrait à 400 mg/kg de poids (lot 4). Un hémogramme, une numération des réticulocytes (J0, J15 et J29) et des examens biochimiques (J0 et J29) ont été réalisés après gavage avec les extraits. L'extrait contenait des flavonoïdes, des tanins, des triterpènes et stérols, des saponosides et des coumarines. La variation de la numération des globules rouges ($p=0,014$) et l'urée sérique ($p=0,019$) était plus faible et celle du volume globulaire moyen ($p=0,015$) et de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ($p=0,014$) plus importante dans le lot 4 par rapport au lot 1 à J29. Il n'y avait pas de différence significative des valeurs et de la variation des paramètres biologiques étudiés. *Ip* n'est pas responsable de toxicité hématologique, hépatique ou rénale à la dose 100 à 400 mg d'extrait par kilogramme chez les rats.

© 2023 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Indigofera pulchra*, toxicité rénale, toxicité hépatique, toxicité subaiguë, hémogramme.

Hematological and biochemical subacute toxicity study of hydro-methanolic extracts of *Ingofera pulchra* in Wistar rats

ABSTRACT

Indigofera pulchra (*Ip*) Wild is used as medicinal plant to treat anemia, malaria and pain, conditions that often require repeated doses. The aim of this work was to evaluate the subacute toxicity of *Ip* hydro-methanolic extracts. Four groups of five Wistar rats receiving orally every day and respectively distilled water (group 1: control group), 100 mg of extract per kilogram of weight (group 2), 200 mg/kg (group 3) and 400 mg/kg weight (group 4). A complete blood count with reticulocytes count (day0, day15 and day29) and biochemical tests (day0 and day29) were assessed after the extract administration. Flavonoids, tannins, triterpenes and sterols, saponins and coumarins were detected in the extract. The change in red blood cell count ($p=0.014$) and serum urea

($p=0.019$) was lesser and that of the mean corpuscular volume ($p=0.015$) and the mean corpuscular hemoglobin ($p=0.014$) greater in group 4 compared to group 1 at day 29. The other hematological and biochemical parameters were not significantly different between the groups of rats. There was no significant difference in the absolute values and the variation of the assessed biological parameters. *Ip* is not responsible for hematological, liver or renal toxicity when administered orally at the dose of 100-400 mg extract per kilogram in rats.

© 2023 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: *Indigofera pulchra*, renal toxicity, liver toxicity, subacute toxicity, blood cell count.

INTRODUCTION

Indigofera est le troisième plus grand genre de la famille *Leguminosae* et comprend environ 750 espèces dont environ 75% sont limitées à l'Afrique et à Madagascar Sud (Camara et al., 2019; Gerometta et al., 2020; Atta et al., 2022). *Indigofera pulchra* (*Ip*) Willd est une plante herbacée ou arbustive annuelle non grimpante qui peut atteindre 1 m de haut. Il est retrouvé dans les régions tropicales et subtropicales du Nigeria, du Niger, du Togo, du Bénin, du Ghana et du Tchad (Agyare et al., 2013). Les décoctions et infusions de la plante entière ou de la tige feuillée de *Ip* sont utilisées au Ghana pour traiter le paludique (Asase et al., 2005) et soulager les douleurs et les inflammations (Hassan et al., 2012) ainsi que les morsures douloureuses (Abubakar et al., 2007) au Nigeria. *Ip* est également utilisé dans le traitement des affections hépatiques et les maladies infantiles au Bénin (Adomou et al., 2012; Sangaré et al., 2013; Kouhadé et al., 2016).

Après une enquête ethnobotanique réalisée dans quatre préfectures de la Région maritime, dans le sud du Togo, *Ip* a été retenu comme composante de l'une de deux recettes destinées à la formulation de phytomédicaments anti-paludiques pour ses propriétés antipyrétiques évoquées dans 4,45% des cas. Il a été aussi cité dans respectivement 16,5%, 5,34% et 3,8% des cas pour son utilisation antianémique, antipaludique et antalgique (Koudouvo et al., 2016). *Ip* est aussi retrouvé dans 1,11% des citations des herboristes pour le traitement des infections dans la région sanitaire de Lomé-commune, toujours dans le sud du Togo (Aboudou et Koudouvo, 2021).

Les activités anti-diarrhéique (Birru et al., 2016), anti-ulcéreuse et anti-sécrétoire (Saleh et al., 2017) et anti-paludique contre *Plasmodium berghei* (Ibrahim et al., 2011) des extraits de *Ip* ont été démontrées chez les rats. *In vitro*, *Ip* a présenté 55% d'activité anti-inflammatoire par rapport à l'indométacine (Larsen et al., 2015) et une faible activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* comparée à la gentamycine (Adamu et al., 2005).

Les études de toxicité sont requises pour sécuriser l'utilisation thérapeutique de *Ip*. La toxicité aiguë de la plante a été évaluée contrairement à la toxicité subaiguë (Birru et al., 2016; Saleh et al., 2017). L'objectif de cette étude était d'évaluer la toxicité subaiguë hématologique et biochimique des extraits de *Ip* administrés par voie orale à des rats Wistar.

MATERIEL ET METHODES

Matériel animal

Un groupe de 20 rats Wistar âgés en moyenne de 12 semaines ont été sélectionnés et élevés dans l'animalerie de la faculté des sciences de l'Université de Lomé. Ils avaient libre accès à la nourriture et à l'eau.

Matériel végétal

Collecte du matériel végétal

Les tiges feuillées de *Indigofera pulchra* ont été collectées à Amoukopyé (Togo, région des plateaux, préfecture de l'Ogou, longitude 1.03333 (1° 1' 60"), latitude 7.45 (7° 27' 0") en zone rudérale en bord de route ; le sol y est ferrugineux tropical à concrétion et cuirassé en quartzites avec des précipitations annuelles de 1200 à 1300 mm. La collecte et l'identification des plantes ont été réalisées par l'équipe du laboratoire de botanique et

écologie végétale de la faculté des sciences de l'Université de Lomé.

Préparation du matériel végétal

Les tiges feuillées de *Ip* ont été séchées après la collecte dans une chambre climatisée pendant trois semaines. Le produit séché a été réduit en poudre dans un broyeur de marque Thomas Wiley Mill Modèle 4 (Laboratory Mill, Lincoln, Etats-Unis d'Amérique). L'extraction a été faite par macération de 100 g de poudre dans 1 litre de méthanol 80% (v/v) pendant 48 heures. L'extrait ainsi obtenu a été filtré avec du papier Whatman et évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur de type RV10 digital IKA.

Recherche qualitative des composés phytochimiques des extraits hydro-méthanoliques de *Indigofera pulchra*

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait par des techniques de caractérisation qualitatives des métabolites, selon les méthodes décrites par Ciulei (1982), Evans et Trease (1989), Harborne, (1998) et Dohou et al. (2003). Les résultats obtenus ont été exprimés en abondances relatives comme suit : fortement positif (+++), moyennement positif (++) , faiblement positif (+), négatif (-).

Recherche des saponosides

L'extrait solide a été dissout dans de l'eau distillée dans un tube à essai. Quelques gouttes d'eau distillée ont été ajoutées. L'apparition de la mousse persistante après agitation énergique indique la présence de saponosides.

Recherche des triterpènes et stérols

L'extrait solide a été dissout dans de l'eau distillée et repartis dans deux tubes. Dans un premier tube (tube test), quelques gouttes de chloroforme et de l'acide sulfurique (H₂SO₄) ont été ajoutées. L'apparition d'un anneau rouge brun entre deux phases, l'une claire en bas et l'autre verte en haut indique la présence de triterpènes et des stérols dans l'extrait. Le second tube a servi de témoin.

Recherche des coumarines

L'extrait solide a été dissout dans de l'eau distillée et repartis dans deux tubes. Dans

un premier tube (tube test), 2 mL d'eau distillée ont été ajoutées puis une petite quantité d'ammoniac est ajoutée au mélange. L'apparition d'une fluorescence après une illumination ultra-violette indique la présence des coumarines dans l'extrait hydro-méthanolique. Le second tube a servi de témoin.

Dosage des composés phytochimiques contenus dans les extraits hydro-méthanoliques de *Indigofera pulchra*

Le dosage des composés phytochimiques ont été réalisé trois fois.

Dosage des phénols totaux

La méthode colorimétrique utilisée par Saloufou et al., (2018) a été pratiquée. Un aliquote de 100 µl de l'échantillon d'extrait à 1 mg/mL a été mélangé avec 750 µL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1/10. Après cinq minutes d'incubation à 25°C, 750 µL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 20% furent ajoutés. Le mélange obtenu a été incubé pendant 90 minutes dans l'obscurité et le changement d'absorbance a été suivi à 765 nm. L'eau distillée a été testée dans les mêmes conditions que l'extrait comme blanc de la mesure. Une gamme de l'acide gallique de 0 à 500 µg/mL a été utilisée comme standard pour la calibration et les résultats ont été exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg EAG/mg).

Dosage des flavonoïdes

La méthode décrite par Saloufou et al. (2018) a été utilisée. La teneur totale en flavonoïdes des échantillons a été estimée par une méthode colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium colorimétrique (AlCl₃). Un aliquote de 100 µL de solution des différents extraits à 1 mg/mL a été ajouté à 400 µL d'eau distillée ; 30 µL de nitrite de sodium à 5% ont été ajoutés au mélange. Après cinq minutes d'incubation à température ambiante, 20 µL d'une solution aqueuse de AlCl₃ à 10% ont été ajoutés. Ensuite, 200 µL de solution aqueuse de Na₂CO₃ (1M) ont été ajoutés au mélange puis cinq minutes plus tard, 250 µL d'eau distillée. Le mélange a été remué au

vortex et l'absorbance a été mesurée à 510 nm au spectrophotomètre. La concentration de flavonoïdes totaux a été déduite de la courbe d'étalonnage établie avec une gamme de quercétine de 0 à 500 µg et les résultats ont été exprimés en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec (µg EQ/mg).

Dosage des tanins

Les tanins ont été évalués par la méthode de complexation par la caséine adaptée à partir de celles de Dieng et al. (2015), Li et al. (2011) et Galvão et al. (2018). A 0,3 g de caséine introduit dans un flacon de 50 mL, 12,5 mL de l'extrait à 1 mg/mL ont été ajoutés. Le mélange a été conservé au bain marie à 30°C pendant 1 heure. Après filtration, 2 mL du mélange ont été ajoutés à 10 mL d'eau distillée puis son absorbance est mesurée à 765 nm. L'absorbance mesurée a été retranchée de l'absorbance des phénols totaux déterminée comme décrite précédemment (Saloufou et al., 2018) mais sur un mélange de 2 mL du mélange sont ajoutés à 10 mL d'eau distillée. La teneur en tanins a été déterminé par la formule suivante : Teneur des extraits de tanins = (Teneur en phénols totaux) - (Teneur en polyphénols non adsorbés).

Méthode expérimentale sur les rats Wistar

Quatre lots de cinq rats chacun ont été constitués dans lesquels étaient administrés quotidiennement de l'eau distillée (lot 1 : groupe témoin), l'extrait à 100 mg/kg de poids (lot 2), l'extrait à 200 mg/kg de poids (lot 3) et l'extrait à 400 mg/kg de poids (lot 4). L'administration des extraits de *Ip* avait débuté 48 heures après un prélèvement sanguin (J0) pour la réalisation d'un bilan biologique initial comprenant un examen cyto-hématologique et biochimique. Pour l'examen cyto-hématologique, environ 0,5 mL de sang a été collecté dans un tube EDTA. Pour l'examen biochimique, le sérum surnageant a été décanté à partir de 1,5 mL de sang collecté des rats dans un tube sec, centrifugé après deux heures à 3000 tours par minute pendant 10 minutes. Les prélèvements sanguins ont été réalisés au

niveau de la veine retro-orbitaire après anesthésie des rats avec l'éther. Le bilan cyto-hématologique a été contrôlé après deux semaines (J15) et quatre semaines (J29) de gavage avec les extraits. Le bilan biochimique a été contrôlé à J29.

Le poids des rats était contrôlé chaque semaine à J1, J8, J15 et J22 afin d'ajuster les quantités d'extrait à administrer et à J29.

Examen cyto-hématologique

L'examen cyto-hématologique a été réalisé sur l'analyseur automatique d'hématologie Sysmex XN-550 (Sysmex Corporation, Japon). Il comprenait la numération des globules rouges ou NGR et des plaquettes et l'hématocrite (mesure par impédancemétrie avec focalisation hydrodynamique), la numération des globules blancs (mesure par cytométrie en flux), la numération des réticulocytes, des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes (mesure par fluorocytométrie en flux), le taux d'hémoglobine (mesure par spectrophotométrie avec méthode sodium lauryl sulfate sans cyanure), volume globulaire moyen ou VGM (calcul : hématocrite / NGR), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (calcul : taux d'hémoglobine / NGR), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (calcul : taux d'hémoglobine / hématocrite).

Examen biochimique

L'examen biochimique était réalisé sur l'analyseur automatique de biochimie Cobas 311 (Roche, Allemagne) selon les fiches techniques des réactifs correspondants. Il comprenait le dosage sérique de l'urée (mesure enzymatique utilisant l'uréase et la glutamate déshydrogénase en présence de 2-oxoglutarate et du NADH avec lecture spectrophotométrique cinétique à 340 nm), du glucose (mesure enzymatique utilisant l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de ATP et de NADP⁺ avec lecture spectrophotométrique en point final à 340 nm), de la créatinine (mesure en point final utilisant la créatininase, la créatinase, la sarcosine oxydase et la

peroxydase en présence d' amino-4 phénazone avec lecture spectrophotométrique en point final à 546 nm), de la glutamyl-oxaloacétate transférase ou SGOT (mesure de l'activité enzymatique utilisant la malate déshydrogénase en présence de L-aspartate, du 2-oxoglutamte et du NADH avec lecture spectrophotométrique cinétique à 340 nm), de la glutamyl-pyruvate transférase ou SGPT (mesure de l'activité enzymatique utilisant la lactate déshydrogénase en présence de L-alanine, du 2-oxoglutamte et du NADH avec lecture spectrophotométrique cinétique à 340 nm), de la lactate déshydrogénase ou LDH (mesure colorimétrique de l'activité enzymatique en présence du pyruvate et du NADH avec lecture spectrophotométrique cinétique à 450 nm) et des phosphatases alcalines ou PAL (mesure de l'activité enzymatique en présence du p-nitrophénylphosphate, du 2-oxoglutamte et du NADH avec lecture spectrophotométrique cinétique à 340 nm).

Analyse statistique

Les données ont été enregistrées dans une feuille de calcul Excel (Microsoft) et analysées à l'aide du logiciel statistique Rstudio version 4. Les résultats de la quantification des composés phytochimiques ont été exprimés sous forme de moyenne +/- erreur-type de la moyenne. Le test de Kruskal Wallis suivi du test de Dunn avec correction de FDR (false discovery rate) a servi à déterminer les différences à un seuil de significativité statistique de 5%. Les variations ont été décrites pour chaque paramètre et pour chaque lot de rats par rapport à la valeur initiale de J0 ou de J1.

Considérations éthiques

Le protocole de cette étude a reçu l'approbation du comité de bioéthique pour la recherche en santé (CBRS) du Ministère de la santé, de l'hygiène publique et de l'accès universel aux soins du Togo, dans l'avis 034/2021/CBRS du 25 juin 2021. Les

posologies des extraits administrés étaient celles évaluées pour d'autres propriétés thérapeutiques dans la littérature.

RESULTATS

Composition phytochimique des extraits

La détermination des composés phytochimiques a permis de révéler la présence de saponosides (+), de triterpènes et de stérols (+), et de coumarines (++) dans les extraits d'*Ip*. Ces extraits contenaient $136,56 \pm 3,17 \mu\text{g}$ EAG/mg pour les phénols totaux, $214,80 \pm 3,46 \mu\text{g}$ EQ/mg pour les flavonoïdes et $123,29 \pm 1,55 \mu\text{g}$ EAG/mg pour les tanins.

Poids

Le poids initial des rats variait de 150 à 209 grammes sans différence significative entre les moyennes des différents lots de rats. Aucune différence n'avait été observée en gain de poids aux jours 8 et 15 de suivi dans les différents lots de rats par rapport au lot 1. Seul le lot 2 de rats a marqué un moindre gain de poids par rapport au lot 1 respectivement au jour 22 ($0,20 \pm 3,8 \text{ g}$ versus $17,2 \pm 7,4 \text{ g}$; $p = 0,046$) et au jour 29 ($2 \pm 6,1 \text{ g}$ versus $24 \pm 6,7 \text{ g}$; $p = 0,047$) de suivi (Figure 1).

Paramètres hématologiques et biochimiques

Les paramètres hématologiques et biochimiques de base n'étaient pas statistiquement différents entre lots de rats (Tableaux 1 et 2). Aucune différence significative n'a été notée entre les moyennes des paramètres hématologiques et biochimiques entre les différents lots de rats, quel que soit le jour de suivi (Tableaux 3 et 4).

Parmi les paramètres biologiques étudiés, seules les variations de la numération des globules rouges, du VGM, de la TCMH et de l'urée sérique différaient entre les lots de rats. Ces différences de variation étaient observées principalement entre le lot 1 (témoins) et le lot 4 (400 mg/kg) avec notamment une augmentation du VGM et de la TCMH dès le jour 15 de suivi dans le lot 4 et une stabilité de l'urée dans le lot 4 alors qu'elle augmentait dans le lot 1 (Figure 2).

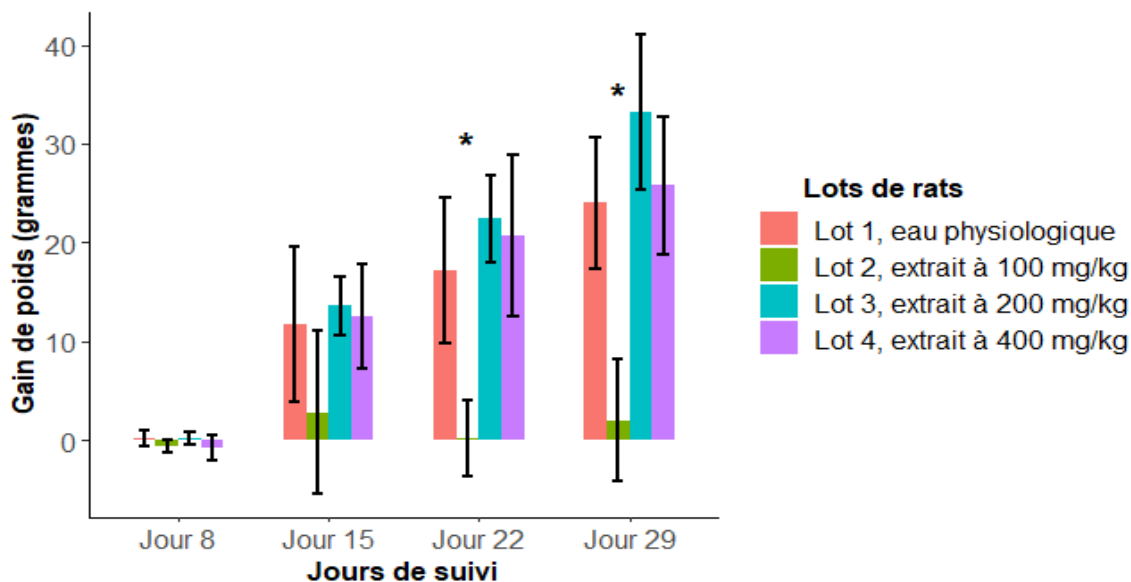


Figure 1 : Variation du poids entre les lots de rats, selon les jours de suivi

* Différence significative de gain du groupe 2 par rapport au groupe 1 le jour 22 (p = 0,046) et le jour 29 (p = 0,047)

Tableau 1 : Paramètres hématologiques de base des différents lots de rats

	Eau distillée (lot 1) *	Extrait hydro-méthanolique de <i>Indigofera pulchra</i> (mg/kg)			p **
		100 (lot 2) *	200 (lot 3) *	400 (lot 4) *	
Globules rouges ($10^6/\text{mm}^3$)	7,98 +/- 0,32	8,10 +/- 0,23	8,35 +/- 0,20	8,51 +/- 0,38	0,5
Hémoglobine (g/dL)	13,98 +/- 0,28	14,34 +/- 0,22	14,54 +/- 0,29	14,18 +/- 0,38	0,6
Hématocrite (%)	42,50 +/- 1,02	43,82 +/- 0,87	44,00 +/- 0,87	42,44 +/- 1,21	0,5
Volume globulaire moyen (fL)	53,42 +/- 1,18	54,16 +/- 0,64	52,76 +/- 1,16	50,06 +/- 1,13	0,14
TCMH (pg)	17,58 +/- 0,44	17,72 +/- 0,22	17,42 +/- 0,41	16,74 +/- 0,34	0,2
CCMH (g/dL)	32,90 +/- 0,27	32,74 +/- 0,19	33,04 +/- 0,17	33,42 +/- 0,27	0,2
Réticulocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	0,32 +/- 0,04	0,34 +/- 0,02	0,34 +/- 0,03	0,37 +/- 0,03	0,4
Plaquettes ($10^3/\text{mm}^3$)	668 +/- 69	652 +/- 59	679 +/- 30	660 +/- 11	>0,9
Globules blancs ($10^3/\text{mm}^3$)	11,06 +/- 2,50	8,61 +/- 1,37	7,41 +/- 0,82	8,54 +/- 0,63	0,5
PNN ($10^3/\text{mm}^3$)	1,00 +/- 0,11	1,27 +/- 0,06	1,10 +/- 0,12	1,65 +/- 0,28	0,14
Lymphocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	9,18 +/- 2,47	6,34 +/- 1,34	5,61 +/- 0,68	6,22 +/- 0,84	0,6
Monocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	0,102 +/- 0,012	0,068 +/- 0,015	0,084 +/- 0,010	0,062 +/- 0,010	0,13

TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; PNN : Polynucléaires neutrophiles

* Moyenne +/- erreur standard de la moyenne ; ** Test de Kruskal-Wallis

Tableau 2 : Paramètres biochimiques de base des différents lots de rats.

	Eau distillée (lot 1) ¹	Extrait hydro-méthanolique de <i>Indigofera pulchra</i> (mg/kg)			p ²
		100 (lot 2) ¹	200 (lot 3) ¹	400 (lot 4) ¹	
Urée (g/L)	0,23 +/- 0,02	0,32 +/- 0,03	0,29 +/- 0,04	0,35 +/-0,03	0,091
Glycémie (g/L)	1,21 +/- 0,04	1,04 +/- 0,08	1,20 +/- 0,05	1,24 +/-0,04	0,13
Créatininémie ((mg/L)	5,24 +/- 0,15	6,20 +/- 0,34	5,54 +/- 0,03	5,56 +/-0,35	0,2
SGOT (UI/L)	139 +/- 3	152 +/- 10	148 +/- 6	143 +/-3	0,4
SGPT (UI/L)	54 +/- 4	50 +/- 3	55 +/- 7	56 +/-4	0,7
PAL (UI/L)	176 +/- 36	193 +/- 23	253 +/- 61	213 +/-35	0,7
LDH (UI/L)	1680 +/- 182	2816 +/- 414	1916 +/- 207	1726 +/- 194	0,068

SGOT *serum glutamyl-oxaloacétate transférase* ; SGPT *serum glutamyl-pyruvate transférase* ; PAL phosphatases alcalines ; LDH lactate déshydrogénase ;

* Moyenne +/- erreur standard de la moyenne ; ** Test de Kruskal-Wallis

Tableau 3 : Paramètres hématologiques des rats selon les doses d'extrait hydro-méthanolique de *Indigofera pulchra* reçues.

	Suivi	Eau distillée (lot 1) *	Extrait hydro-méthanolique de <i>Indigofera pulchra</i> (mg/kg)			p **
			100 (lot 2) *	200 (lot 3) *	400 (lot 4) *	
Globules rouges (10 ⁶ /mm ³)	Jour 15	8,47 ± 0,22	8,29 ± 0,20	8,11 ± ,025	8,24 ± 0,25	0,8
	Jour 29	9,25 ± 0,31	8,98 ± 0,38	8,54 ± 0,35	8,62 ± 0,31	0,4
Hémoglobine (g/dL)	Jour 15	14,7 ± 0,28	14,82 ± 0,16	14,84 ± 0,24	15,08 ± 0,44	>0,9
	Jour 29	15,68 ± 0,19	15,70 ± 0,41	15,38 ± 0,34	15,65 ± 0,38	>0,9
Hématocrite (%)	Jour 15	44,36 ± 0,79	45,10 ± 0,65	44,98 ± 0,87	45,62 ± 1,19	0,8
	Jour 29	48,82 ± 0,55	49,00 ± 1,40	47,18 ± 1,28	48,40 ± 0,92	0,7
Volume globulaire moyen (fL)	Jour 15	52,46 ± 1,43	54,48 ± 0,96	55,54 ± 0,99	55,40 ± 1,02	0,3
	Jour 29	52,94 ± 1,34	54,72 ± 1,20	55,40 ± 1,17	56,33 ± 1,50	0,3
TCMH (pg)	Jour 15	17,36 ± 0,52	17,90 ± 0,38	18,34 ± 0,37	18,30 ± 0,36	0,3
	Jour 29	17,02 ± 0,45	17,56 ± 0,37	18,06 ± 0,38	18,23 ± 0,54	0,2
CCMH (g/dL)	Jour 15	33,08 ± 0,13	32,88 ± 0,19	33,00 ± 0,14	33,02 ± 0,17	0,8
	Jour 29	32,14 ± 0,11	32,06 ± 0,26	32,64 ± 0,22	32,33 ± 0,19	0,3

	Suivi	Eau distillée (lot 1) *	Extrait hydro-méthanolique de <i>Indigofera pulchra</i> (mg/kg)			p **
			100 (lot 2) *	200 (lot 3) *	400 (lot 4) *	
			Réticulocytes (10 ³ /mm ³)	Jour 15	310 ± 40	
	Jour 29	320 ± 30	270 ± 40	270 ± 20	290 ± 70	0,6
Plaquettes (10 ³ /mm ³)	Jour 15	669 ± 15	733 ± 39	675 ± 25	701 ± 23	0,4
	Jour 29	537 ± 101	678 ± 66	687 ± 51	607 ± 33	0,4
Globules blancs (10 ³ /mm ³)	Jour 15	11,33 ± 1,36	8,38 ± 0,68	8,29 ± 1,16	8,47 ± 1,29	0,4
	Jour 29	14,9 ± 1,5	12,9 ± 2,3	14,3 ± 2,6	12,8 ± 1,0	0,7
Polynucléaires neutrophiles (10 ³ /mm ³)	Jour 15	1,70 ± 0,33	1,59 ± 0,14	1,46 ± 0,22	2,25 ± 0,59	0,7
	Jour 29	1,99 ± 0,19	2,03 ± 0,35	3,11 ± 0,50	2,44 ± 0,28	0,2
Lymphocytes (10 ³ /mm ³)	Jour 15	8,94 ± 1,17	6,01 ± 0,61	6,17 ± 1,05	5,46 ± 0,58	0,13
	Jour 29	11,5 ± 1,4	10,1 ± 2,2	9,7 ± 1,9	9,0 ± 0,7	0,6
Monocytes (10 ³ /mm ³)	Jour 15	0,15 ± 0,03	0,21 ± 0,14	0,09 ± 0,02	0,22 ± 0,12	0,3
	Jour 29	0,19 ± 0,09	0,32 ± 0,15	0,46 ± 0,24	0,38 ± 0,15	0,5

TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ;

* Variation : moyenne ± erreur-type de la moyenne ; ** Test de Kruskal-Wallis

Tableau 4 : Paramètres biochimiques des rats au jour 29 de suivi selon les doses d'extrait hydro-méthanolique de *Indigofera pulchra* reçues.

	Eau distillée (lot 1) *	Extrait hydro-méthanolique de <i>Indigofera pulchra</i> (mg/kg)			p **
		100 (lot 2) *	200 (lot 3) *	400 (lot 4) *	
		Urée (g/L)	0,46 ± 0,06	0,39 ± 0,05	
Glycémie (g/L)	1,20 ± 0,10	1,27 ± 0,11	1,24 ± 0,07	1,46 ± 0,15	0,5
Créatininémie (mg/L)	4,68 ± 0,21	4,40 ± 0,24	4,60 ± 0,24	4,75 ± 0,25	0,7
SGOT (UI/L)	127 ± 9	122 ± 11	109 ± 6	119 ± 7	0,6
SGPT (UI/L)	36 ± 3	33 ± 4	33 ± 3	37 ± 3	0,9
PAL (UI/L)	147 ± 32	159 ± 43	155 ± 31	183 ± 44	0,7
LDH (UI/L)	1159 ± 134	1451 ± 222	1355 ± 97	1210 ± 187	0,6

SGOT *serum glutamyl-oxaloacétate transférase* ; SGPT *serum glutamyl-pyruvate transférase* ; PAL : phosphatases alcalines ; LDH : lactate déshydrogénase ;

* Variation : moyenne ± erreur-type de la moyenne ; ** Test de Kruskal-Wallis.

A = Globules rouges, B = Volume globulaire moyen, C = Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, D = Urée

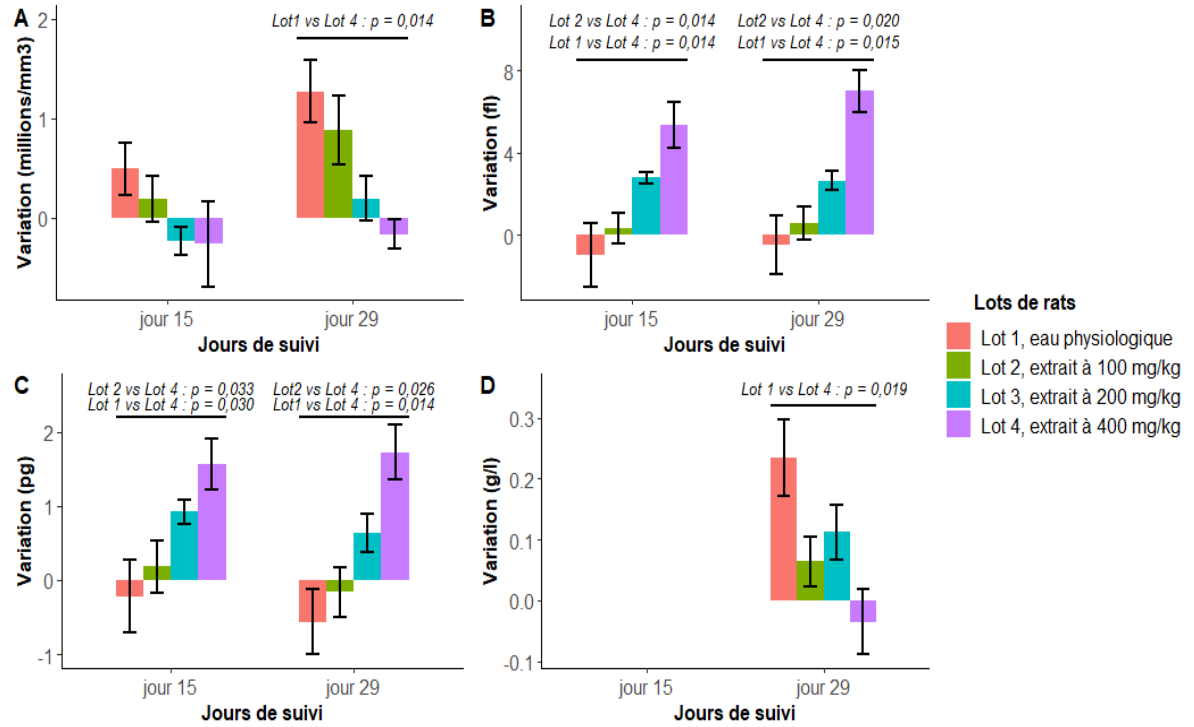


Figure 2 : Paramètres hématologiques et biochimiques avec variation significative selon les jours de suivi.

DISCUSSION

L'étude des extraits hydro-méthanoliques de *Ip* a révélé dans notre étude, la présence de flavonoïdes, de saponosides, de triterpènes et stérols, de tanins et de phénols comme dans les extraits acétoniques de *Ip* recueilli au Burkina-Faso (Bakasso et al., 2008) et les extraits chloroformiques de la même plante récoltée dans l'état de Katsina au Nigéria (Yilwa et al., 2022). Les extraits hydro-méthanoliques dans notre étude contenaient en outre des coumarines contrairement aux extraits acétoniques (Bakasso et al., 2008). Musa et al. (2008) avaient également noté la présence de flavonoïdes, de saponosides, de stérols, de tanins dans les extraits méthanoliques de *Ip* au Niger. Les tanins ont été quantifiés dans notre étude. Par ailleurs, les extraits dans notre étude contenaient deux fois moins de phénols totaux (136,56 versus 282,2 µg EAG/mg) mais trois fois plus de flavonoïdes (214,80 versus 68,3 µg EQ/mg)

que ceux traités par Bakasso et al. (2008) au Burkina-Faso. Ces différences phytochimiques pourraient être liées à la nature des sols sur lesquels les plantes ont été récoltées, au climat et au mode d'extraction (Kumar et al., 2017; Safari et al., 2019; Ogundola et al., 2022).

Les doses d'extrait de *Ip* administrées aux rats dans cette étude étaient celles utilisées pour en évaluer les propriétés antipaludiques (100 et 200 mg/kg) des extraits méthanoliques de *Ip* (Ibrahim et al., 2011) et des effets de ses extraits hydro-méthanoliques sur les lésions de la muqueuse gastrique et la sécrétion acide gastrique entre 100 et 400 mg/kg (Saleh et al., 2017) administrés par voie orale à des rats. Birru et al. (2016) avaient aussi étudié les effets anti-diarrhéiques de ces mêmes posologies de *Indigofera spicata* chez les rats.

Le poids corporel des rats est un indicateur critique des effets toxicologiques (Denny et Stewart, 2017). Une perte de poids supérieure à 5% par rapport au groupe de

contrôle est un marqueur fort de toxicité (Silva et al., 2021). Le gain de poids n'était pas significativement différent pour les lots de rats 3 et 4 par rapport au lot témoin dans notre étude. Ainsi, le manque de gain pondéral du lot 2 recevant la dose la plus faible d'extrait ne saurait s'expliquer par l'administration de l'extrait et pourrait être lié à un biais de conditionnement des rats.

L'administration orale de 100 et 200 mg/kg aux rats n'a pas altéré les paramètres hématologiques notamment la numération des globules rouges, globules blancs et plaquettes sanguines et les paramètres biochimiques en rapport avec les fonctions rénales et hépatiques.

La numération des globules rouges augmente physiologiquement chez les rats Wistar passant de $6 \pm 1 \times 10^6$ /mm³ à respectivement $9 \pm 1 \times 10^6$ /mm³ et $8 \pm 1 \times 10^6$ /mm³ chez les mâles et les femelles entre 1 mois et 2 ans d'âge (Jacob Filho et al., 2018). Dans ces limites physiologiques, l'augmentation significative de la numération des globules rouges notée à J29 dans le lot de rats témoin par rapport au lot 4 ayant reçu la plus forte dose d'extrait était sans conséquence fonctionnelle car il n'y avait pas d'influence sur le taux d'hémoglobine. La conséquence en était une augmentation relative du VGM et de la TCMH dans le groupe 4. Les moyennes des VGM étaient stables au sein des lots de rats 1, 2 et 3 contrairement au lot 4 où on notait une augmentation significative dans le temps par rapport lot témoin. Les autres paramètres de l'héogramme et la numération des réticulocytes n'avaient montré aucune variation significative sur les 4 semaines de gavage, indiquant ainsi une absence de toxicité hématologique des extraits hydro-méthanoliques de *Ip*

L'augmentation de l'urée sérique à J29 dans le lot témoin par rapport au groupe 4 n'était pas en rapport avec une altération de la fonction rénale ; aucune variation n'avait été observée sur la créatininémie et les valeurs de l'urée sérique ne dépassaient pas les limites supérieures de références (Boehm et al., 2007). L'urée sérique est un marqueur moins fiable du taux de filtration glomérulaire que la créatinine

car ses valeurs sont plus susceptibles de changer pour des raisons non liées au taux de filtration glomérulaire. Un régime riche en protéines peut notamment entraîner une augmentation de l'urée plasmatique (Traynor et al., 2006). L'apport protéique des extraits de *Ip* devrait être évaluée d'autant plus qu'il s'agit d'une plante fourragère (Jayeola, 1988). L'absence de variation des paramètres biochimiques comme les transaminases SGOT et SGPT, la lactate déshydrogénase et les phosphatases alcalines traduisait une intégrité des organes notamment le foie, les reins et le cœur (Dzoyem et al., 2014).

Conclusion

Les modifications hématologiques et biochimiques liées à l'administration orale des extraits hydro-méthanoliques de *Indigofera pulchra* pendant 4 semaines étaient marginales et sans conséquences fonctionnelles. Les paramètres critiques de toxicité étudiés étaient stables dans le temps quelle que soit la dose d'extrait administrée. On notait ainsi une absence de toxicité hématologique, hépatique ou rénale.

CONFLITS D'INTERETS

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

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

YL : conduite des manipulations techniques, de la collecte et analyse des données, rédaction de l'article ; HM : conduite des manipulations techniques, de la collecte des données ; KD : rédaction de l'article ; NT : conduite des manipulations techniques, de la collecte des données ; DMIK : rédaction de l'article ; AA : initiation de l'étude et rédaction de l'article.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel du Laboratoire de Microbiologie et de Contrôle de qualités des denrées Alimentaires (LAMICODA) de l'Université de Lomé (Togo) pour leur contribution à la réalisation des tests phytochimiques.

REFERENCES

- Aboudou AD, Koudouvo K. 2021. Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans la prise en charge traditionnelle des maladies infectieuses dans la région sanitaire Lomé-Commune du Togo. *Eur. Sci. J. ESJ*, **17**(21): 46-46. DOI: <https://doi.org/10.19044/esj.2021.v17n21.p46>
- Abubakar MS, Musa AM, Ahmed A, Hussaini IM. 2007. The perception and practice of traditional medicine in the treatment of cancers and inflammations by the Hausa and Fulani tribes of Northern Nigeria. *J. Ethnopharmacol.*, **111**(3): 625-629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.011>
- Adamu HM, Abayeh OJ, Agho MO, Abdullahi AL, Uba A, Dukku HU, Wufem BM. 2005. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, **99**(1): 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.025>
- Adomou AC, Yedomonhan H, Djossa B, Legba SI, Oumorou M, Akoegninou A. 2012. Etude Ethnobotanique des plantes médicinales vendues dans le marché d'Abomey-Calavi au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **6**(2): 745-772. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v6i2.18>
- Agyare C, Obiri DD, Boakye YD, Osafo N. 2013. 19 - Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of African Medicinal Plants. In *Medicinal Plant Research in Africa*, Kuete V (éd.). Elsevier: Oxford; 725-752.
- Asase A, Oteng-Yeboah AA, Odamtten GT, Simmonds MSJ. 2005. Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *J. Ethnopharmacol.*, **99**(2): 273-279. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.020>
- Atta E, Al faifi T, El-Shabasy A. 2022. Chemotaxonomic and morphological classification of six Indigofera species in Jazan region, KSA. *J. Saudi Chem. Soc.*, **26**(3): 101476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101476>
- Bakasso S, Lamien-Meda A, Lamien CE, Kiendrebeogo M, Millogo J, Ouedraogo AG, Nacoulma OG. 2008. Polyphenol contents and antioxidant activities of five Indigofera species (Fabaceae) from Burkina Faso. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS*, **11**(11): 1429-1435. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1429.1435>
- Birru EM, Asrie AB, Adinew GM, Tsegaw A. 2016. Antidiarrheal activity of crude methanolic root extract of Idigofera spicata Forssk. (Fabaceae). *BMC Complement. Altern. Med.*, **16**(1): 272. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1252-4>
- Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K. 2007. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol. Chem.*, **388**(5): 547-554. DOI: <https://doi.org/10.1515/BC.2007.061>
- Camara AA, Mbaye MS, Bassene C, Sambou H, Sarr M, Ka SL, Ngom A, Mballo R, Ngom PI, Diop D, Noba K. 2019. Une nouvelle espèce du genre *Indigofera* L. *Fabaceae* Lindl. (*Leguminosae* Juss.) Faboideae pour la flore du Sénégal. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **13**: 399. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i1.31>
- Ciulei I. 1982. Practical Manuals on the Industrial Utilization of Medicinal and Aromatic Plants: Methodology for analysis of vegetable drugs. Bucharest, Romania, 1-62.
- Denny KH, Stewart CW. 2017. Chapter 5 - Acute, Subacute, Subchronic, and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* (Second Edition), Faqi AS (éd.). Academic Press: Boston; 109-127.
- Dieng M, Fall A, Diatta K, Diatta W, Bassene E. 2015. Dosage des polyphénols et activité anti-oxydante de feuilles et d'inflorescences mâles de *Borassus aethiopicum*, Mart. (Arecaceae). *Int. J.*

- Biol. Chem. Sci.*, **9**: 1067. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v9i2.41>
- Dohou N, Yamni K, S. T, Idrissi Hassani LM, Alain B, Najib G. 2003. Screening phytochimique d'une endémie ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull Soc Pharm Bordx.*, **142**: 61-78.
- Dzoyem JP, Kuete V, Eloff JN. 2014. Biochemical parameters in toxicological studies in africa: significance, principle of methods, data interpretation, and use in plant screenings. In *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, Kuete V (éd.). Elsevier; 659-715.
- Evans WC, Trease GE. 1989. *Trease and Evans' Pharmacognosy*. Baillière Tindall: London.
- Galvão MAM, Arruda AO de, Bezerra ICF, Ferreira MRA, Soares LAL. 2018. Evaluation of the Folin-Ciocalteu Method and Quantification of Total Tannins in Stem Barks and Pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **61**: e18170586. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170586>
- Gerometta E, Grondin I, Smadja J, Frederich M, Gauvin-Bialecki A. 2020. A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Indigofera*. *J. Ethnopharmacol.*, **253**: 112608. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112608>
- Harborne AJ. 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer Science & Business Media.
- Hassan HS, Sule MI, Musa AM, Musa KY, Abubakar MS, Hassan AS. 2012. Anti-Inflammatory Activity of Crude Saponin Extracts from Five Nigerian Medicinal Plants. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **9**(2): 250-255. DOI: <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i2.10>
- Ibrahim S, Ibrahim MA, Musa AM, Aliyu AB, Haruna NS, Okafor AI. 2011. *Indigofera pulchra* leaves extracts contain anti-Plasmodium berghei agents. *Bangladesh J. Pharmacol.*, **6**(2): 69-73. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjp.v6i2.8715>
- Jacob Filho W, Lima CC, Paunksnis MRR, Silva AA, Perilhão MS, Caldeira M, Bocalini D, de Souza RR. 2018. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *Aging Male*, **21**(2): 145-148. DOI: <https://doi.org/10.1080/13685538.2017.1350156>
- Jayeola AA. 1988. INDIGOFERA PULCHRA: A POTENTIAL FODDER IN WEST AFRICAN SAVANNA. *Ife J. Agric.*, **10**(1): 74-84.
- Kouchadé AS, Adomou AC, Tossou GM, Yédomonhan H, Dassou GH, Akoègninou A. 2016. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies infantiles et vendues sur les marchés au sud du Bénin. *JAPS*, **28**(2): 4418-38.
- Koudouvo K, Esseh K, Dénou A, Aziati-Yovo T, Ajavon C, Afanyibo Y-G, Agbonon A, Sanogo R, Dougnon J, Aklkokou K, Aguiyi JC, Diallo D, Mensah GA, Gbéassor M. 2016. Étude ethnopharmacologique des recettes médicinales antipaludiques du Togo pour la formulation d'un phytomédicament de prise en charge du paludisme. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*, **79**: 54-70.
- Kumar S, Yadav A, Yadav M, Yadav JP. 2017. Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *BMC Res. Notes*, **10**(1): 60. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2385-3>
- Larsen BHV, Soelberg J, Jäger AK. 2015. COX-1 inhibitory effect of medicinal plants of Ghana. *South Afr. J. Bot.*, **99**: 129-131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.04.004>
- Li K, Diao Y, Zhang H, Wang S, Zhang Z, Yu B, Huang S, Yang H. 2011. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, **11**(1):

86. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-86>
- Musa AM, Sule MI, Haruna AK, Ilyas M, Iliya I, Yaro AH, Magaji MG. 2008. Preliminary gastrointestinal studies of methanol extract of *Indigofera pulchra* wild in rodents. *Niger. J. Pharm. Sci.*, **7**(1): 86-92.
- Ogundola AF, Bvenura C, Ehigie AF, Afolayan AJ. 2022. Effects of soil types on phytochemical constituents and antioxidant properties of *Solanum nigrum*. *South Afr. J. Bot.*, **151**: 325-333. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.048>
- Safari K, Yadegari M, Hamedi B. 2019. Effects of climate and soil properties on phytochemical characteristics of *Ferulago angulate* (Schltdl.) Boiss. *Iran. J. Plant Physiol.*, **9**(2): 2719-2726. DOI: <https://doi.org/10.30495/ijpp.2019.664576>
- Saleh MIA, Halima H, Tanko Y, Magaji RA, Alhassan AW, Isa AI, Salami HA, Aliyu UB. 2017. Effect of hydro-methanolic leaf extract of *Indigofera pulchra* on gastric mucosal damage and acid secretion in rats. *Afr. J. Biomed. Res.*, **20**(1): 93-98.
- Saloufou K, Boyode P, Simalou O, Eloh K, Idoh K, Melila M, Toundou O, Kpegba K, Agbonon A. 2018. Chemical composition and antioxidant activities of different parts of *Ficus* sur. *J. HerbMed Pharmacol.*, **7**. DOI: <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.30>
- Sangaré MM, SINA H, Dougnon J. 2013. Étude ethnobotanique des plantes hépatotropes et de l'usage traditionnel de *Gomphrena celosioides* Mart. (Amaranthaceae) au Bénin. *Int J Biol Chem Sci*, **6**(6): 5008-5021. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v6i6.20>
- Silva AV, Norinder U, Liiv E, Platzack B, Öberg M, Törnqvist E. 2021. Associations between clinical signs and pathological findings in toxicity testing. *ALTEX*, **38**(2): 198-214. DOI: <https://doi.org/10.14573/altex.2003311>
- Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. 2006. How to measure renal function in clinical practice. *BMJ*, **333**(7571): 733-737. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.38975.390370.7C>
- Yilwa VM, Egbe NE, Hassan AU, Ozojiofor UO. 2022. Characterization and Evaluation of the Effects of *Indigofera pulchra*, *Aristolochia albida* and *Andrographis paniculata* Leaves Extract Phenolics against the Activity of *Naja nigricollis* and *Echis ocellatus* Snake Venoms. *J. Complement. Altern. Med. Res.*, **18**(3): 28-42. DOI: <https://doi.org/10.9734/jocamr/2022/v18i330353>