

Année 2014-2015

THESE N° : 366



Université de Ouagadougou
Ecole Doctorale de Santé
Laboratoire de Toxicologie,
Environnement et Santé



Université Victor Segalen,
Bordeaux 2
Laboratoire de Toxicologie et
d'Hygiène Appliquée

THESE UNIQUE

Doctorat ès Sciences d'Application Pharmaceutique
Spécialité : Toxicologie Appliquée

Par

OUEDRAOGO Geoffroy G.

**ETUDE DE LA TOXICITE D'EXTRAITS DE POUDRE D'ECORCES DE
RACINES DE *CALOTROPIS PROCERA* (AIT.) R.Br. (ASCLEPIADACEAE),
COMPOSANTE DU FACA®, PHYTOMEDICAMENT UTILISE AU
BURKINA FASO**

Soutenue publiquement le 21/12/2015

Devant le jury :

**Président du Jury : Pr Patrice ZABSONRE, Professeur Titulaire de Cardiologie,
Université de Ouagadougou**

Membres du Jury :

- Pr Innocent Pierre GUISSOU, Professeur Titulaire de Pharmacologie/Toxicologie,
Université de Ouagadougou, Directeur de thèse**
- Pr Edmond E. CREPPY, Professeur Titulaire de Toxicologie, Université de Bordeaux,
Co-Directeur de thèse**
- Pr Mamadou FALL, Professeur Titulaire de Toxicologie, Université Cheick Anta
Dioup de Dakar, Sénégal, Rapporteur**

DEDICACES

Je dédie ce travail :

- A DIEU, le père tout puissant et miséricordieux pour m'avoir donné la santé et la force de mener à bien ce travail.

- A MON PERE ET MA MERE

Pour toute l'attention et l'amour dont vous avez fait preuve à mon égard.

Pour tous les conseils que vous m'avez prodigués, les efforts consentis, les souffrances que vous avez endurées. Je vous dis infiniment merci. Le vœu de mon cœur et ma prière à DIEU pour vous, c'est qu'il vous comble de toutes les grâces dont vous avez besoin. Trouvez dans cet ouvrage, l'aboutissement de vos efforts. Ce travail est le vôtre. Merci pour tout et que Dieu vous accorde longue vie pour qu'à mon tour je puisse vous témoigner ma gratitude. Amen !

- A MA GRANDE SŒUR MELANIE (in memoriam),

J'ai beaucoup bénéficié de ton amour, de tes conseils et de ton soutien depuis ma tendre enfance. Que ton âme repose en paix dans le Royaume des Cieux !

- A MES FRÈRES AINÉS, Clément Rodrigue et Justin

Vous avez toujours fait preuve de dévouement et d'optimisme pour mon succès dans les études. Puissiez-vous trouver dans ce travail, le fruit de tant de sacrifices que vous avez investis en moi. Je ne peux trouver meilleur mot pour vous exprimer ma profonde gratitude que de vous dire : Merci ! Que Dieu nous guide tout au long de notre vie.

- A mon épouse Clémentine wendinmalegdé OUEDRAOGO/NIKIEMA et sa famille

A force de courage et de persévérance, j'achève aujourd'hui un travail qui est aussi le vôtre. Ce travail est le fruit de ton amour, ton soutien moral et tes encouragements. Que Dieu nous aides à atteindre nos objectifs futurs. La thèse est terminée mais la recherche continue !

A mes enfants, Lionel Renaud Wendinmi et Graciella Bernadette Pègdwendé

Votre venue dans ce monde me comble de joie et me donne la force d'aller de l'avant. Que Dieu vous protège. J'espère que vous ferez mieux que votre papa !

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont encadré, soutenu, encouragé et/ou ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à l'évaluation de cette thèse. Mes remerciements s'adressent particulièrement :

AU BURKINA FASO

Au corps professoral des UFR/SVT et UFR/SDS pour les enseignements et la formation reçue.

Au Dr Sylvin Ouédraogo, Directeur de Recherche et Directeur de l'Institut de Recherche des Sciences de la Santé (IRSS). Pour votre disponibilité, votre sympathie, vos conseils et les soutiens multiformes dont nous avons bénéficié. Nous vous exprimons toute notre profonde gratitude et notre parfaite reconnaissance.

Au Dr Félix B KINI, Maître de Recherche à l'IRSS, Chef de Département de Médecine et Pharmacopée Traditionnelles et Pharmacie, enseignant vacataire à l'UFR/SEA. Pour votre facilité d'approche, votre disponibilité, votre compréhension. Qu'il nous soit permis de vous exprimer nos sentiments de parfaite et sincère gratitude.

Au Dr Marius LOMPO, Maître de Recherche de pharmacologie à l'IRSS, Directeur Adjoint chargé des Programme de l'IRSS. Pour votre encadrement lors de mes travaux de DEA et le suivi de mes travaux de thèse, votre sympathie, votre esprit d'ouverture, et votre constante disponibilité tout au long de ce travail.

Aux Dr Aristide TRAORE, Dr Noya Somé, Dr Richard W. Sawadogo, Dr Hassanata Millogo/Koné, Dr Sidiki Traoré, Dr Seydou Sourabié, Dr André Tibiri, Dr Moussa Ouédraogo, Dr Estelle Noëla Youl, Dr Noufou Ouédraogo, Dr Jean Claude Ouédraogo, Dr Lazare Belemnaba, Dr Raïnatou Sondé/Boly, Dr Almamy Konaté, Dr Nicole Joelle Guissou, M. Roger G. Kaboré, M. Boubacar Yaro, M. Sylvain Ilboudo, M. Mathieu Nitiéma, M. Mohamed Belemilga. Nos sincères remerciements pour votre franche contribution à la construction de ce travail, pour votre esprit de collaboration et pour l'ambiance qui a régné durant les mois de travail à vos côtés.

A Docteur Moustapha Ouédraogo (in memoriam). Merci pour votre soutien inestimable dans la construction de ce travail. Que ton âme repose en paix dans le royaume des cieux.

Aux Dr Salfo Ouédraogo, Dr Inna Tata Yaro/Traoré, M. Issa S. Tissologo, M. Aubin Bationo, M. Aboubacar Traoré, Mme Mouhibatou Yougbaré/Ziebrou, M. Compaoré Souleymane, Mme Alimata Bancé, Mlle KABORE P. Lydia, M. Moussa Compaoré, M. Salfo Sawadogo, M. Boly A. Gilchrist, Mlle Kadiatou Tata Traoré. Pour la collaboration, les encouragements, les conseils et les suggestions. Nous vous exprimons toute notre gratitude pour la chaleureuse et franche collaboration.

A Dr Benoît Benon. Pour avoir accepté de conduire nos travaux de suivi de toxicovigilance des patients sous traitement FACA®. Nous vous témoignons notre parfaite reconnaissance et notre profonde gratitude.

Aux patients drépanocytaires qui ont participé à l'étude de suivi de toxicovigilance de FACA®

A BORDEAUX (FRANCE)

Au Professeur Edmond E. Creppy, Directeur du laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée de l'Université Victor Segalen, Bordeaux 2 pour avoir accepté de nous accueillir dans son laboratoire, de diriger ce travail de recherche et pour avoir mis à notre disposition tous les outils nécessaires à la réalisation de ce travail.

A toute l'équipe du laboratoire, particulièrement aux Dr Serge Moukha, Théophile Mobio, Cyril Ferandon et à Mme Brigitte Latournerie pour leur encadrement et leurs soutiens multiformes lors notre stage.

A Daniel Galy pour son accueil, ses encouragements et son soutien lors de mon séjour à Bordeaux.

A BAMAKO (MALI)

Au Pr Drissa Diallo, Chef de Département de Médecine Traditionnelle de Bamako au Mali ;

A l'ensemble du personnel du Département de Médecine Traditionnelle, particulièrement au Pr Rockia Sanogo, au Dr Adiaratou TOGOLA, à Mr SANOGO Fagnan et à Mme MAIGA Tapa FANE ; pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Toute ma gratitude aux Organismes internationaux qui m'ont permis de réaliser ce travail. Il s'agit notamment :

De l'Organisation Ouest Africaine de la Santé (OOAS) pour avoir financé ce travail de recherche à travers la Subvention de recherche « small grants » que nous avons bénéficié.

Du Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France au Burkina Faso pour nous avoir octroyé une bourse de stage de trois mois à Bordeaux en France à travers le Projet « FSP RESEAU ».

A NOS MAÎTRES ET JUGES

A notre très honorable Maître et Président du jury, le Pr Patrice ZABSONRE, Professeur titulaire de cardiologie à l'Université de Ouagadougou, Chef du service de Cardiologie du Centre Hospitalo Universitaire Yalgado Ouédraogo. Nous sommes sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de Thèse. La spontanéité avec laquelle vous avez répondu favorablement pour juger ce travail et de nous fournir un rapport de notre thèse constitue l'une de vos qualités scientifiques et vous nous permettez du même coup, de pouvoir profiter de vos connaissances. Veuillez accepter l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre très honorable Maître et Directeur de thèse ; le Pr Innocent Pierre GUISSOU, Professeur titulaire de Pharmacologie-Toxicologie, Directeur du Centre de Recherche sur le Médicament de l'Université de Ouagadougou, Chef de département de la pharmacie hospitalière du Centre Hospitalo Universitaire Yalgado Ouédraogo (CHU-YO), Coordonnateur de la formation doctorale de toxicologie et de pharmacologie appliquées à l'Ecole Doctorale de Santé de l'Université de Ouagadougou. Merci pour la confiance que vous avez bien voulu placer en nous. Votre amour du travail bien fait, votre esprit d'ouverture, votre constante disponibilité et votre assistance multiforme sans faille tout au long de ce travail. Merci d'avoir guidé nos premiers pas dans la recherche, d'avoir accepté nous encadrer malgré vos diverses tâches et d'avoir toujours répondu à notre moindre sollicitation. Vos remarques et suggestions ont été les pièces maîtresses de l'accomplissement de cette thèse. Vous resterez à jamais pour nous une référence non seulement pour la recherche scientifique mais aussi pour la gestion des responsabilités. Nous espérons ne pas vous décevoir ! Veuillez trouver dans cette thèse le fruit de tant de sacrifices et notre parfaite reconnaissance.

A notre très honorable Maître et Directeur de thèse, le Pr Edmond E. CREPPY, Professeur titulaire de toxicologie, Directeur du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée, Université de Bordeaux, France. Pour avoir accepté de nous accueillir dans votre laboratoire, de co-diriger ce travail de recherche et pour avoir mis à notre disposition tous les outils nécessaires à la réalisation de ce travail. Vous avez une fois de plus accepté de juger notre travail de Thèse et nous permettre de profiter de vos enseignements. Vos remarques et

suggestions ont été les pièces maîtresses de l'accomplissement de cette thèse. Vous êtes pour nous un modèle pour la recherche et pour l'encadrement. Veuillez trouver dans cette thèse, l'expression de notre profonde gratitude et notre parfaite reconnaissance.

A notre très honorable Maître et Juge ; le Pr Mamadou FALL, Professeur Titulaire de Toxicologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar Sénégal.

Nous sommes honorés par votre présence au sein de notre jury de thèse. La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail et de nous fournir un rapport de notre thèse malgré vos nombreuses occupations nous a profondément touché. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la Recherche sont pour nous une source de motivation supplémentaire pour la poursuite de notre formation. Veuillez recevoir dans cette thèse, toute notre gratitude et notre reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

<i>DEDICACES</i>	ii
<i>REMERCIEMENTS</i>	iii
<i>LISTE DES FIGURES</i>	xvii
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	xix
<i>LISTE DES PHOTOS</i>	xxi
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	xxii
<i>LISTE DES PUBLICATIONS</i>	xxiv
<i>RESUME</i>	xxvi
INTRODUCTION-PROBLEMATIQUE.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	5
CHAPITRE I: LE PHYTOMEDICAMENT FACA® ET SES COMPOSANTES	6
I. <i>CALOTROPIS PROCERA</i> COMME COMPOSANTE DU FACA®	6
II. DONNEES SUR LE FACA®	6
II.1. Données pharmacothérapeutiques	6
II.1.1. Données précliniques	6
II.1.2. Données clinique de FACA®	7
II.2. Données toxicologiques sur le FACA®	7
II.3. Donnée sur la tolérance de FACA® chez les patients drépanocytaires.....	7
II.4. Présentations galéniques de FACA®	8
II.5. Indications thérapeutiques et posologies de FACA®	9
III. LES PROPRIETES PHARMACO-TOXICOLOGIQUES DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i> (PLANTE DE L'ETUDE (description en annexe 1))	9
III.1. Utilisations en médecine traditionnelle	9
III.1.1. En Afrique	9
III.1.2. Au Burkina Faso.....	10
III.2. Données pharmacologiques.....	11

III.2.1. Effets antifalcémiantes	11
III.2.2. Propriétés anti-inflammatoire.....	11
III.2.3. Effet vasodilatateur.....	12
III.2.4. Effets antimicrobiens.....	13
III.2.5. Effets Sanguins.....	13
III.2.6. Autres effets	13
III.3. Données toxicologiques.....	14
IV. DONNEES PHYTOCHIMIQUES DE DIFFERENTES PARTIES DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i>	15
IV.1. Constituants chimiques isolés des racines de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.....	15
IV.2. Constituants chimiques isolés des tiges de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.....	16
IV.3. Constituants chimiques isolés des feuilles de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.	16
IV.4. Constituants chimiques isolés des fruits de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.....	17
IV.5. Substances chimiques isolées des fleurs de <i>Calotropis procera</i> Ait.	18
IV.6. Composition chimique du latex de <i>Calotropis procera</i> Ait.	18
IV.7. Composition chimique des graines de <i>Calotropis procera</i> Ait.	20
IV.8. Structures chimiques de quelques composés de <i>Calotropis procera</i> Ait. R. Br. (Neuwinger, 1996).....	20
CHAPITRE II. METHODES D'ETUDES TOXICOLOGIQUES.....	23
I. NOTION CONCEPTUELLE DE LA TOXICOLOGIE.....	23
I.1. Notion de la toxicologie	23
I.2. Notion de poison ou toxique	23
I.3. Le toxique et l'organisme	24
I.4. Les effets toxiques	24
I.4.1. Notion d'effet toxique.....	24
I.4.2. La dose et ses relations avec les effets toxiques.....	25
I.4.3. Classification des effets toxiques	26
I.4.4. Organes cibles	27

II. METHODES D'EVALUATIONS TOXICOLOGIQUES	27
II.1. Essai de toxicite <i>in vivo</i> chez l'animal.....	27
II.1.1. La toxicité aiguë d'une substance.....	29
II.1.2. Toxicité subaiguë et toxicité subchronique	30
II.1.3. Toxicité chronique.....	32
II.2. Essai de toxicite <i>in vitro</i>	32
II.2.1. Le concept des tests de toxicité <i>in vitro</i>	32
II.2.2. Les tests de cytotoxicité <i>in vitro</i>	34
II.2.2.1. Le test au rouge neutre.....	35
II.2.2.2. Le test au MTT	36
II.2.2.3. Le dosage de la LDH	37
II.2.3. La toxicité au niveau d'un organe cible.....	37
CHAPITRE III : TOXICITE DES PLANTES MEDICINALES	38
I. LES PLANTES TOXIQUES	38
II. LES CIRCONSTANCES DE L'INTOXICATION.....	38
III. QUELQUES METABOLITES SECONDAIRES TOXIQUES DES PLANTES MEDICINALES	39
III.1. Les alcaloïdes	39
III.2. Les Saponosides	39
III.3. Les hétérosides cardiotoniques.....	40
III.4. Les glycosides cyanogéniques.....	40
III.5. Les coumarines.....	41
III.6. Les glucosinolates	41
IV. TOXICITE DES PLANTES A HETEROSIDES CARDIOTONIQUES	41
IV.1. Caractéristiques structurales des hétérosides cardiotoniques	41
IV.2. Mécanisme d'action toxique des hétérosides cardiotoniques.....	45
DEUXIEME PARTIE : NOTRE TRAVAIL	47
OBJECTIF DE L'ETUDE.....	49
Objectif général	49

Objectifs spécifiques	49
CADRE DE L'ETUDE	50
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES	51
I. MATERIEL	51
I.1. Matériel végétal.....	51
I.2. Matériel biologiques	51
I.3. Le témoin Digoxine	52
I.4. Matériel techniques.....	52
I.4.1. Matériel de l'étude phytochimique	52
I.4.1.1 Matériel d'extraction et de caractérisation.....	52
I.4.1.2. Solvants et réactifs	53
I.4.2. Matériel de l'étude de la toxicité aiguë et subchronique.....	54
I.4.3. Matériel de l'étude de la toxicité cardiovasculaire.....	55
I.4.4. Matériel de l'étude de la cytotoxicité.....	56
I.4.4.1. Matériel de laboratoire	56
I.4.4.2. Milieux de culture, solvants et réactifs	56
II. METHODES.....	56
II.1. ETUDES PHYTOCHIMIQUES.....	56
II.1.1. Réactions de caractérisation en tube.....	56
II.1.1.1. Caractérisation des Alcaloïdes.....	57
II.1.1.2. Caractérisation des substances polyphénoliques.	57
II.1.1.3. Caractérisation des dérivés anthracéniques	58
II.1.1.4. Caractérisation des stérols et triterpènes.....	60
II.1.1.5. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques	60
II.1.1.6. Caractérisation des Saponosides	61
II.1.1.7. Autres caractérisations.....	61
a. Caractérisation des composés réducteurs	61
b. Caractérisation des oses et holosides.....	62

c. Caractérisation des Mucilages	62
d. Caractérisation des coumarines	62
e. Caractérisation des hétérosides cyanogénétiques	62
II.1.2. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de <i>C. procera</i> par chromatographie sur couche mince (CCM)	62
II.1.2.1. Préparation d'extraits	62
a. Extraits aqueux et éthanolique de poudre d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	62
b. Extraits concentrés en hétérosides cardiotoniques de poudre d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	65
c. Extraction des hétérosides cardiotoniques de référence	66
II.1.2.2. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM	67
II.1.3. Dosage de quelques substances de la drogue «poudre d'écorces de racines de <i>C. procera</i> »	68
II.1.3.1. Dosage de l'eau	68
II.1.3.2. Dosage des cendres	70
II.1.3.2. Dosage des Cardénolides des extraits aqueux et hydroalcoolique	71
a. Extraction des cardénolides des extraits aqueux et éthanolique	71
b. Dosage des Cardénolides	72
II.2. ETUDES TOXICOLOGIQUES	73
II.2.1. Préparation des extraits aqueux et hydroalcooliques	73
II.2.2. Evaluation de la toxicité générale aiguë d'extraits d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> chez la souris NMRI	74
II.2.1.1. Traitement des animaux d'étude	74
II.2.1.2. Modalité d'évaluation de la toxicité générale aiguë	74
a. Evaluation de la toxicité générale aiguë des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	74
b. Evaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	74
II.2.3. Etude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> chez le rat Wistar	75
II.2.3.1. Traitement des animaux d'étude	76
II.2.3.2. Mesure des paramètres physiques	77
II.2.3.3. Analyses des paramètres hématologiques	77

II.2.3.4. Analyses des paramètres biochimiques	77
II.2.3.5. Examen histopathologique de quelques organes vitaux	78
II.2.4. Evaluation des effets toxiques cardiovasculaires.....	78
II.2.4.1. Traitement des animaux d'étude.....	79
II.2.4.2. Procédure expérimentale.....	79
II.2.5. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	80
II.2.5.1. Méthodes générales de culture de lignées cellulaires	80
a. Principales caractéristiques des cellules	80
b. Culture et entretien des lignées cellulaires.	82
b.1. Composition du milieu de culture	82
b.2. Décongélation des cellules	83
b.3. Mise en culture et entretien des cellules.....	83
b.4. Ensemencement des plaques	84
II.2.5.2. Les tests de viabilité cellulaire.....	85
a. Le test de viabilité cellulaire au MTT.....	85
b. Le test de viabilité cellulaire au rouge neutre.....	86
II.2.5.3. Test de fragmentation de l'ADN	87
II.2.5.4. Analyse morphologique des cellules	88
III. METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS	88
III.1. Données phytochimiques.....	88
III.1.1. Caractérisation des groupes phytochimiques	88
III.1.2. Analyse CCM.....	88
III.2. Données toxicologiques.....	88
III.2.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë	88
III.2.2. Evaluation de la toxicité subchronique.....	89
III.2.3. Evaluation des effets toxiques cardiovasculaire	89
III.2.4. Evaluation de la cytotoxicité	89
IV. ASPECT ETHIQUE DE L'ETUDE	90
CHAPITRE II : RESULTATS DE L'ETUDE.....	92

I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES	92
I.1. La drogue végétale.....	92
I.2. Teneur en eau et en cendres	92
I.3. Rendements d'extraction.....	93
I.4. Réaction de caractérisation en tubes	93
I.5. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM.....	95
I.6. Dosage des cardénolides	98
II. ETUDES TOXICOLOGIQUES	99
II.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë d'extraits d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> chez la souris NMRI.....	99
II.1.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	99
II.1.2. Evaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	99
II.1.2.1. Toxidrome.....	99
II.1.2.2. DL ₅₀ orale	100
II.2. Etude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> chez le rat Wistar	100
II.2.1. Effet de l'extrait sur les paramètres physiques	100
II.2.2. Effet de l'extrait sur les paramètres hématologiques :.....	102
II.2.3. Effet de l'extrait sur les paramètres biochimiques sériques :.....	104
II.2.4. Examen histopathologique de quelques organes	105
II.3. Evaluation des effets toxiques cardiovasculaires.....	107
II.4. Evaluation de la cytotoxicité.....	115
II.4.1. Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur la viabilité cellulaire	115
II.4.1.1. Profil de la croissance cellulaire par le test au MTT	115
II.4.1.2. Profil de la croissance cellulaire par le test au rouge neutre.....	116

II.4.1.3. Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur les cellules Caco-2 et Neuro-2A par le test au MTT et au RN	118
II.4.2. Aspect morphologique des cellules	120
II.4.2.1. Aspect morphologique du tapis cellulaire des cellules Caco-2.....	120
II.4.2.2. Aspect morphologique du tapis cellulaire des cellules Neuro-2a.....	121
II.4.3. Test de fragmentation de l'ADN	122
CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE.....	125
I. LIMITE DE L'ETUDE.....	125
II. ETUDES PHYTOCHIMIQUES.....	125
II.1. Teneur en eau et en cendres.....	125
II.2. Réaction de caractérisation en tubes.....	126
II.3. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM	127
II.4. Dosage des cardénolides.....	128
III.EVALUATION DE LA TOXICITE GENERALE AIGÛE.....	129
III.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	129
III.2. Evaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i>	130
IV. ETUDE DE LA TOXICITE SUB-CHRONIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DES ECORCES DE RACINES DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i>	130
V. EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES CARDIOVASULAIRE.....	133
VI. EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE.....	134
CONCLUSION	138
PERSPECTIVES.....	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140
ANNEXES	a
.....	a
ANNEXE 1 : AMM DE FACA®	b
ANNEXE 2 : DESCRIPTION DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i> AIT. R.BR. (ASCLEPIADACEAE).....	d

ANNEXE 3 : ATTESTATION DE DEPOT D'ECHANTILLONS DE PLANTE DE <i>CALOTROPIS PROCERA</i> (AIT.) R.BR.....	j
ANNEXE 4 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR LE REACTIF DE KEDDE	k
ANNEXE 5 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR LA CHLORAMINE-ACIDE TRICHLOROACETIQUE	l
ANNEXE 6 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR LE SbCl ₃	m
ANNEXE 7 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR H ₂ SO ₄	n
ANNEXE 8 : SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG (OCDE, 2001) ...	o
ANNEXE 9 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES CELLULAIRE POUR LA CYTOTOXICITE.....	p
ANNEXE 10 : ARTICLES PUBLIES	q

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Caractéristiques structurales des hétérosides cardiotoniques (D'après Juncker, 2010, modifié)	42
Figure 2: Illustrations des structures chimiques de quelques cardénolides	45
Figure 3: Coopération entre la pompe à sodium et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dans l'effet de digitaliques (D'après Joly, 2010 modifié).....	46
Figure 4: Méthode de préparation de l'extrait aqueux (Adapté par le laboratoire de chimie de MEPHATRA/PH de l'IRSS).....	63
Figure 5 : Méthode de préparation de l'extrait hydroalcoolique (Adapté par le laboratoire de chimie de MEPHATRA/PH de l'IRSS).....	64
Figure 6 : Méthode de préparation de l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques	66
Figure 7: Schéma d'extraction des cardénolides de l'extrait aqueux et hydroalcoolique	72
Figure 8 : Plan de la microplaque pour l'étude de la cytotoxicité	86
Figure 9 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> révélés par le réactif de Kedde.....	95
Figure 10 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> révélé par chloramine-T acide trichloroacétique.	96
Figure 11 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> révélé par le SbCl_3	97
Figure 12 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> révélé par le H_2SO_4	98
Figure 13: Evolution de la pression artérielle systolique chez les rats mâles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps	107
Figure 14: Evolution de la pression artérielle systolique chez les rats Femelles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps	108
Figure 15 : Evolution de la pression artérielle diastolique chez les rats mâles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps	109
Figure 16 : Evolution de la pression artérielle diastolique chez les rats femelles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps	110

Figure 17 : Evolution de la pression artérielle moyenne chez les rats mâles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps	111
Figure 18 : Evolution de la pression artérielle moyenne chez les rats femelles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps	112
Figure 19 : Evolution de la fréquence cardiaque chez les rats mâles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps.....	113
Figure 20 : Evolution de la fréquence cardiaque chez les rats Femelles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>C. procera</i> en fonction du temps	114
Figure 21: Effet cytotoxique de l'extrait aqueux d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur les cellules Caco-2 (a) et Neuro-2a (b) par le test au MTT.....	115
Figure 22: Comparaison de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur les cellules Caco-2 et Neuro-2a	116
Figure 23 : Effet cytotoxique de l'extrait aqueux d'écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur les cellules Caco-2 (a) et Neuro-2a (b) par le test au Rouge Neutre.....	117
Figure 24 : Comparaison de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur les cellules Caco-2 et Neuro-2a par le test au RN.....	118
Figure 25 : Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur les cellules Caco-2 par le test au MTT et au RN	119
Figure 26 : Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur les cellules Neuro-2a par le test au MTT et au RN.....	120
Figure 27: Carte de répartition de <i>Calotropis procera</i> (sauvage) en Afrique (D'après Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013, modifié)	i

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: constituants chimiques isolés des racines de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.....	15
Tableau II: constituants chimiques isolés des tiges de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.	16
Tableau III : Constituants chimiques isolés des feuilles de <i>Calotropis Procera</i> Ait.....	17
Tableau IV: Constituants chimiques isolés des fruits de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.	18
Tableau V : Constituants chimiques isolés des fleurs de <i>Calotropis procera</i> Ait.....	18
Tableau VI: Constituants chimiques isolés du latex de <i>Calotropis procera</i> Ait	19
Tableau VII: Les formes d'intoxication	28
Tableau VIII: Durée de l'étude de toxicité chez l'animal en fonction de l'utilisation clinique (OMS, 2000).....	28
Tableau IX: Catégories de danger de toxicité aiguë et estimations de toxicité aiguë (ETA) définissant les différentes catégories (Nation Unis (2011)).....	30
Tableau X : Réactifs de révélation et composés correspondants (Jork <i>et al.</i> , 1990).	68
Tableau XI: Réalisation de la droite d'étalonnage avec une solution mère (SM) de digoxine (digoxine® injectable 0,5mg/2mL)	73
Tableau XII: Comparaison entre l'activité de certaines enzymes dans les entérocytes non cancéreux et celles des cellules Caco-2.....	82
Tableau XIII: Teneur en eau et en cendres de la poudre d'écorces de racines de <i>C. procera</i>	92
Tableau XIV: Rendements des différentes procédures d'extraction de la poudre d'écorces de racines de <i>C. procera</i> ($n = 2-3$)	93
Tableau XV: Principaux groupes chimiques caractérisés par les réactions en tube dans la poudre d'écorces de racines de <i>C. procera</i>	94
Tableau XVI: Teneur en Cardénolides d'extrait des écorces de racines de <i>C. procera</i> selon la droite d'étalonnage (exprimé en équivalent digoxine)	99
Tableau XVII: Résultats du test de détermination de la DL ₅₀ orale de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de <i>C. procera</i>	100
Tableau XVIII: Moyenne hebdomadaire du gain de poids corporel (en gramme) chez les rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de <i>C. procera</i> pendant 3 et 6 semaines	101

Tableau XIX: Poids relatif des organes des rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de <i>C. procera</i> pendant 3 et 6 semaines.....	102
Tableau XX: Valeurs des paramètres hématologiques ($M \pm SD$) des rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de <i>C. procera</i> pendant 3 et 6 semaines.....	103
Tableau XXI: Valeurs des paramètres biochimiques ($M \pm SD$) des rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de <i>C. procera</i> pendant 3 et 6 semaines	104

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Boîte de FACA® 80 mg	8
Photo 2 : Boîte de FACA® 160 mg	8
Photo 3: Gélules de FACA® 80 mg.....	8
Photo 4: Gélules de FACA® 160 mg.....	8
Photo 5 : Evaporateur rotatif, (laboratoire de chimie du MEPHATRA-PH/IRSS, 2011).....	53
Photo 6: Dispositif de mesure de la Pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Blood Pressure Recorder 58500) <i>in vivo</i>	55
Photo 7 : Ecorces de racines séchées de <i>C. procera</i>	92
Photo 8: Poudre des écorces de racines de <i>C. procera</i>	92
Photo 9 : Examen histopathologique des organes au microscope optique (Hématoxyline et éosine x 5).	106
Photo 10 : Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur la morphologie des cellules Caco-2 après 48h d'exposition (G = x 40) : A= Contrôle; B= EA (15mg/mL).	121
Photo 11 : Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> sur la morphologie des cellules Neuro-2a après 48h d'exposition (G = x 40) : A= Contrôle; B= EA (15mg/mL).	122
Photo 12 : Effet de l'extrait des écorces de racines de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br sur la fragmentation de l'ADN des cellules Caco-2.....	123
Photo 13: Image montrant la fragmentation d'ADN de cellules en apoptose (D'après Erkan E. <i>et al.</i> , 2001, modifié)	123
Photo 14: <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.	g
Photo 15: Feuilles, fleurs et fruits de <i>Calotropis procera</i> (Arbonier, 2002)	g
Photo 16 : Schéma botanique de la plante de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br. (D'après Hélène Lamourdedieu dans Adjanohoun E.J. <i>et al.</i> , 1985, modifié).....	h

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALAT: Alanine Aminotransférase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
APG : Angiosperm Phylogeny Group
ARN : Acide Ribonucléique
ASAT: Aspartate Aminotransférase
ATCC : American Type Culture collection
C. procera : *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Asclepiadaceae)
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CHU-YO : Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouédraogo
CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50%
CNRST : Centre National de Recherche Scientifique et Technologique
CREAT : Créatinine
D.E.A. : Diplôme d'Etudes Approfondies
DL₅₀ : Dose Létale 50%
DMEM: Duplecco's Modified Eagle's Medium
DMENO : Dose Minimale avec Effet Nocif Observé
DMM : Dose Minimale Mortelle
DMSO: Diméthyle Sulfoxyde
DSENO : Dose sans effet nocif observé
EA: Extrait Aqueux
ECACC : European Collection of Cell Cultures
ECVAM : *European Center for the Validation of Alternatives Methods*
EDS : Ecole Doctorale de Santé
EHA : Extrait hydroalcoolique
FC : Fréquence cardiaque
g : gramme
H₂SO₄ : Acide sulfurique
HCl : Acide chlorhydrique
ICCVAM : *Interagency Coordinating Committee on the validation of alternative methods*
ICH : *International Conference on Harmonisation*
IRSS : Institut de Recherche en Sciences de la Santé

JaCVAM : *Japanese center for the validation of alternative methods*

KCl : Chlorure de potassium

kg : Kilogramme

LTHA : Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée

MEPHATRA/PH : Médecine-Pharmacopée Traditionnelle et Pharmacie

min : minute

mL : Millilitre

MTT : Bromure de tétrazolium, [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) – 2,5 diphenyltetrazolium bromure]

NFS : Numération formule sanguine

NH₄OH : Ammoniaque

NMRI : Naval Medical Research Institute

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAD : Pression artérielle diastolique

PAM : Pression artérielle moyenne

PAS : Pression artérielle systolique

Pb : Plomb

PBS : Phosphate Buffer saline

Per os : Voie orale

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

RN : Rouge Neutre

SbCl₃ : Chlorure d'antimoine

SCAC : Service de Coopération et d'Action Culturelle

THR : Taux d'humidité relative

UE : Union européenne

UFR/SDS : Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé

UFR/SVT : Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre

UV : Ultra-violet

µg : Microgramme

µL : Microlitre

µm: Micromètre, micron

LISTE DES PUBLICATIONS

✓ ARTICLES

- Articles tirés de la thèse

Geoffroy G. Ouédraogo, Serge Moukha, Théophile A. Mobio, Moustapha Ouedraogo, Pierre I. Guissou and Edmond E. Creppy (2014). Cytotoxicity assessment of aqueous extract from root barks of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. in human intestinal Caco-2 and mouse neuroblastoma Neuro-2a cell lines. *J App Pharm Sci* ; 4 (04): 001-007.

Geoffroy G. Ouédraogo, Moustapha Ouedraogo, Assita Lamien-Sanou, Marius Lompo, Olga M. Goubri-Lompo and Pierre I. Guissou (2013). Acute and Subchronic Toxicity Studies of Roots Barks Extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br Used in the Treatment of Sickle Cell Disease in Burkina Faso. *British Journal of Pharmacology and Toxicology* 4(5): 194-200.

Geoffroy G. Ouedraogo, Sylvain Ilboudo, Noufou Ouedraogo, Sylvain Ouedraogo, Drissa Diallo and Pierre I. Guissou. Phytochemical study and cardiovascular toxic effects investigation of root barks powder and extracts from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. (***En préparation***)

- Article hors thèse

Judith. F. Ahounou, **Geoffroy G. Ouédraogo**, Joachim D. Gbenou, Sylvain Ouedraogo, Wilfrid K.D.D. Agbodjogbe, Pierre H. Dansou and Mansourou Moudachirou. Spasmolytic effects of aqueous extract of mixture from *Aframomum melegueta* (K Schum) – *Citrus aurantifolia* (Christm and Panzer) on isolated trachea from rat. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* (2012), 9(2): 228-233.

✓ **COMMUNICATION ORALES**

Ouédraogo G.G., Lompo M., Ouédraogo S., Somé N., Ouattara B., Ouédraogo M., Guissou I.P. Étude de la toxicité générale aiguë et respiratoire d'extraits de *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae), une plante de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. *2^{ème} congrès international de phytothérapie de Ouagadougou (CIPO), Octobre 2009, Burkina Faso.*

Geoffroy G. Ouédraogo, Serge Moukha, Théophile A. Mobio, Moustapha Ouedraogo, Pierre I. Guissou and Edmond E. Creppy. Effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br (Asclepiadaceae), plante de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. *17^{ème} journées des sciences de la santé de Bobo- Dioulasso, 06-09 Mai 2014, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.*

✓ **POSTERS**

Geoffroy G. Ouédraogo, Marius Lompo, Aristide Traore, Noya Somé, Félix B. Kini et Pierre I. Guissou. Etude phytochimique et toxicologique de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae), une plante à usage alimentaire et médicinal. *5^{ème} édition des Journées Porte Ouvertes et Scientifiques de l'université de Ouagadougou, 25-30 Novembre 2013, Ouagadougou, Burkina Faso.*

Geoffroy G. Ouédraogo, Serge Moukha, Théophile A. Mobio, Sylvain Ouedraogo, Pierre I. Guissou and Edmond E. Creppy. Cytotoxic effects of aqueous extract of root bark of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. (Asclepiadaceae), plant used in traditional medicine in Burkina Faso. *6th scientific WANNPRES meeting, 3-7 August, 2014. Osogbo, NIGERIA (Lauréat du 1^{er} prix du meilleur poster).*

RESUME

Calotropis procera (Ait.) R.Br. ou Pomme de Sodome en français ; « put-puuga » en Moore appartenant à la famille des *Asclepiadaceae* est une espèce largement utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies dont la drépanocytose, l'asthme et le cancer. Elle entre dans la composition de FACA[®], phytomédicament développé au Burkina Faso et utilisé pour le traitement de la maladie drépanocytaire. L'objectif de la présente étude était de contribuer à une meilleure connaissance du risque toxique d'extraits de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera* pour une sécurité d'emploi en thérapeutique des formulations pharmaceutiques contenant des produits de cette plante médicinale comme le FACA[®]. Pour ce faire, des études phytochimiques et toxicologiques d'extraits de la poudre d'écorces de racines de la plante ont été réalisées. L'étude phytochimique a révélé la présence des coumarines et dérivés, des glucosides stéroïdiques ou terpéniques, des cardénolides et des saponosides dans la poudre des écorces de racine de la plante. L'étude de la toxicité aiguë générale a montré que les extraits aqueux, hydroalcoolique et l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques des écorces de racines de la plante sont faiblement toxiques par voie orale selon les classifications de l'OCDE, (2001), de l'OMS, (2002) et des Nations Unis, (2011) avec des DL₅₀ de l'ordre de 2000 mg/kg chez la souris per os. L'étude de la toxicité subchronique (42 jours) de l'extrait aqueux des écorces de racines a montré que la dose sans effet est inférieure à 20 mg/kg chez le rat. L'évaluation des effets toxiques cardiovasculaires *in vivo* chez le rat wistar de l'extrait aqueux a montré que l'extrait induit une élévation transitoire de la pression artérielle systolique suivi d'un retour à la pression de base au bout d'une semaine jusqu'à l'arrêt du traitement.

L'évaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* sur des lignées de cellules cancéreuses Caco-2 et Neuro-2a a révélé que l'extrait possède un fort potentiel cytotoxique sur les cellules Caco-2 d'origine intestinale (CI 50% 11 µg/mL pour le RN et 33 µg/mL pour le MTT) et beaucoup moins sur les cellules Neuro-2a d'origine cérébrale (CI 50% 234 µg/mL pour le RN et 1802 µg/mL pour le MTT).

L'ensemble de ces résultats nous permettent de conclure à une innocuité acceptable des écorces de racines de *Calotropis procera* et des extraits divers qui en dérivent et qui constituent la partie essentielle du phytomédicament FACA[®].

Mots Clés: *Calotropis procera* Ait., Extraits d'Ecorces de Racines, Toxicité aiguë orale, Toxicité sub-chronique per os, Effets toxiques cardiovasculaires, Cytotoxicité.

ABSTRACT

Calotropis procera (Ait.) R.Br. commonly called “Sodom Apple” in French; belonging to the Asclepiadaceae family is a species widely used in traditional medicine for the treatment of various diseases such as sickle cell disease, asthma and cancer. It enters in the composition of FACA[®], drug developed in Burkina Faso and used for sickle cell disease treatment. The objective of this study was to contribute to a better knowledge of the toxic risk of roots bark powder from *Calotropis procera* for a security use of drug containing this part of plant such as FACA[®]. For this, phytochemical and toxicological studies of extracts from root barks powder of the plant were carried out. The phytochemical study was revealed the presence of coumarins and derivatives, steroid or terpene glycosides, cardenolides and saponins in the powder from root barks of the plant. The acute oral toxicity study showed that the aqueous extracts, hydroalcoholic and the extract concentrated with cardiac glycosides of root barks powder from the plant, are low toxicity according to the classifications of the OECD, (2001) WHO, (2002) and the United Nations, (2011), with LD50 in order of 2000 mg/kg per os in mouse. The subchronic study (42 days) of aqueous extract of root bark powder of the plant showed that the no observed effect level is below 20 mg/kg in rats. The evaluation of cardiovascular toxic effects in vivo in Wistar rats of the aqueous extract showed that the extract induced a transient increase of systolic blood pressure followed by a return to the basal pressure after one week until the end of treatment.

The cytotoxicity evaluation of the aqueous extract of root bark powder of *C. procera* on cancer cell lines Caco-2 and Neuro-2a revealed that the extract has potential cytotoxicity effect on the Caco-2 cells of intestinal origin (IC50 value of 11 µg/mL for NR and 33 µg/mL for MTT) and much less on Neuro-2a cells of cerebral origin (IC50 value of 234 µg/mL for NR and 1802 for MTT).

These results allow us to conclude on a acceptable safety of the roots barks powdered of *Calotropis procera* and the various extracts derived from them which constitute the essential part of phytomedicine FACA[®].

Keywords: *Calotropis procera* Ait, Root barks extracts, Acute oral toxicity, Subchronic oral toxicity, Cardiovascular toxic effects, Cytotoxicity.

INTRODUCTION-PROBLEMATIQUE

Au cours des dernières années, les utilisations des produits naturels, en particulier ceux d'origine végétale, sont en constante augmentation car, à tort ou à raison, les populations les croient efficaces et moins dangereux pour la consommation humaine (Meena *et al.*, 2011). Les plantes ont constitué la base des mélanges complexes de la médecine traditionnelle qui existe depuis des milliers d'année et qui continue de fournir à l'humanité de nouveaux remèdes (Gurib-Fakim, 2006). Selon l'OMS, «la médecine traditionnelle est la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales » (OMS, 2013). Pendant la dernière décennie, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt dans le monde. En Chine par exemple, 40% environ de l'ensemble des soins de santé relèvent de la médecine traditionnelle. Au Chili et en Colombie, 71% et 40% de la population, respectivement, ont recours à la médecine traditionnelle et, en Inde, 65% de la population rurale y font appel au niveau des soins de santé primaires. Dans les pays développés, les médecines traditionnelles, dites « médecine douce » complémentaires et parallèles connaissent un succès croissant. Ainsi, le pourcentage de la population ayant eu recours à ces médecines au moins une fois est de 48% en Australie, 31% en Belgique, 70% au Canada, 49% en France et 42% aux Etats-Unis d'Amérique. En Afrique et plus particulièrement dans les pays en voie de développement, environ 80% de la population a recours à la médecine traditionnelle pour répondre à certains de leurs besoins de soins de santé primaire (OMS, 2002). En plus des croyances socioculturelles et de la facilité d'accès, les faibles revenus des populations de ces pays face aux coûts élevés des médicaments conventionnels peuvent aussi expliquer le recours à la médecine traditionnelle. Compte tenu de cette situation l'OMS à travers le plan d'action de la décennie de la médecine traditionnelle (2001-2010) pour l'Afrique, avait recommandé « l'acceptation, le développement et l'intégration de la médecine traditionnelle par tous les Etats membres, dans leur système de soins de santé publique dans la région » (Union Africaine, 2001). En 2012, 40 pays au total avaient élaboré des politiques de médecine traditionnelle et 19 des plans stratégiques nationaux ; 28 instituts nationaux de recherche menaient des recherches sur les produits de la médecine traditionnelle utilisés dans le traitement du paludisme, du VIH/sida, de la drépanocytose, du diabète et de l'hypertension artérielle (OMS, 2013).

Cependant, des travaux scientifiques ont fait ressortir que des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle depuis des siècles contenaient des traces significatives de composés toxiques voire cancérigènes (Philomena, 2011). Des travaux *in vitro* et *in vivo* ont révélé que de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle ont des effets cytotoxiques, génotoxiques et mutagènes (Plewa et Wagner, 1993 ; Higashimoto *et al.*, 1993 ; Schimmer *et al.*, 1994 ; Zink et Chaffin, 1998).

Au Burkina Faso, la thérapeutique en médecine traditionnelle est le plus souvent basée sur l'utilisation des plantes médicinales. Pour cela, des structures de recherche ont orienté leurs programmes vers la valorisation des plantes médicinales locales en s'appuyant sur les recettes de la médecine traditionnelle africaine, en vue de développer des phytomédicaments de qualité et accessibles aux populations. Ainsi l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) à travers son département de médecine et pharmacopée traditionnelle-pharmacie (MEPHATRA/PH) s'est vu assigner comme mission de la part de l'état burkinabé de valoriser les données de la médecine traditionnelle, et les plantes médicinales d'intérêt pour les pathologies reconnues prioritaires pour la santé publique comme les maladies infectieuses, la drépanocytose, l'asthme, l'hypertension artérielle et les maladies non transmissibles émergentes.

La drépanocytose, maladie génétique qui affecte l'hémoglobine et les globules rouges est un problème majeur de santé publique au Burkina Faso et en Afrique ; le taux de prévalence atteignant entre 10 et 40% dans les populations de certaines régions (OMS, 2006).

L'inflammation, les douleurs articulaires intenses et récurrentes, l'anémie et les complications causées par la maladie peuvent avoir un impact sur bien des aspects de la qualité de vie des malades, y compris sur les plans de l'éducation, de l'emploi et du développement psychosocial et économique. Dans la plupart des pays où la drépanocytose est un problème majeur de santé publique, il n'existe pas de programmes nationaux de lutte, en particulier il n'existe pas de schéma thérapeutique approprié. Les structures de base nécessaires pour prendre en charge les patients font généralement défaut, le dépistage systématique de la drépanocytose n'est pas une pratique courante et le diagnostic de la maladie n'est habituellement posé que lorsque survient une complication grave. En conséquence, plus de 50% des enfants atteints de la forme la plus sévère de la maladie décèdent avant l'âge de cinq ans, le plus souvent d'une infection ou d'une anémie grave (OMS, 2006).

Calotropis procera (Ait.) R. Br. (*C. procera*) est une plante très utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies dont la drépanocytose, l'asthme et le cancer (Ouattara, 1991 ; Nacoulma, 1996 ; Guissou, 2008 (*communication CAMES*)). De

nombreux travaux de recherche conduits par les laboratoires de pharmacologie et toxicologie de l'Université de Ouagadougou et du département MEPHATRA/PH de l'Institut de Recherche en Science de la Santé de Ouagadougou ont permis le développement d'un phytomédicament contenant le *Calotropis procera*, dénommé FACA[®] et utilisé pour la prise en charge de la maladie drépanocytaire après obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) nationale. Ce phytomédicament qui est un mélange de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera* et de poudre d'écorces de racines de *Zanthoxylum xanthoxyloïdes* Lam. (Rutaceae) s'est révélé cliniquement efficace pour le traitement de la crise drépanocytaire et la prévention de la maladie chez l'enfant lors d'une évaluation clinique contrôlée au Centre Hospitalo-Universitaire Yalgado OUEDRAOGO de Ouagadougou au Burkina Faso (Ouattara, 1991 ; Guissou *et al.*, 1995 ; Ouédraogo, 2001). *C. procera* qui est la composante principale de FACA[®] possède de nombreuses propriétés pharmacologiques entre autres bactéricides, antifongiques, antifalcémiantes, analgésique, antipyrétique, anti-inflammatoires et des effets sur la motricité musculaire lisse (Mascolo *et al.*, 1988 ; Ouédraogo, 2001 ; Koudougou, 2004 ; Koussoubé, 2004 ; Nikiéma, 2005 ; Bajpayee, 2015).

C. procera, reconnue pour les vertus thérapeutiques de ses extraits, est également réputée pour sa toxicité, notamment vis-à-vis du système cardio-vasculaire, en raison de la présence d'hétérosides cardiotoniques dans la plante (Neuwinger, 1996). Des études antérieures de toxicité générale aiguë ont permis d'évaluer les doses létales 50% (DL₅₀) d'extraits de différentes parties de la plante par voie intra-péritonéale (Ouédraogo, 2001 ; Ouédraogo, 2009). Ces valeurs de DL₅₀ ont permis de classer ces extraits comme étant faiblement à moyennement toxiques par voie intra-péritonéale. Les symptômes d'intoxications étaient essentiellement de types neuromusculaires caractérisés par des convulsions. Dès lors des questions se posent pour son usage en thérapeutique.

Rappelons que les effets toxiques observés sont notés à fortes doses et par voie intrapéritonéale alors que le produit est destiné à être utilisé *per os* et à des doses nettement plus faibles, cependant il est normal de se demander

- si une utilisation de doses fortes des produits de la plante ne pourrait pas engendrer une toxicité aiguë?

- et si l'utilisation prolongée des produits de la plante ne pourrait pas occasionner des effets toxiques chroniques chez les patients drépanocytaires?

Le présent travail de recherche participe à une meilleure connaissance du risque toxique des produits dérivés de *C. procera* pour une sécurité d'emploi en thérapeutique des formulations pharmaceutiques contenant des produits de cette plante médicinale comme le FACA®.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

CHAPITRE I: LE PHYTOMEDICAMENT FACA® ET SES COMPOSANTES

La recherche et le développement de médicaments anti-drépanocytaires est une priorité en Afrique, où entre 10 et 40% de personnes souffrent de drépanocytose (OMS, 2006). C'est dans ce sens que le *C. procera* a été inclus dans le FACA® développé au Burkina Faso, à partir de la pratique de la Médecine Traditionnelle pour traiter cette pathologie et a reçu une AMM nationale en 2010 (Nikiéma *et al.*, 2010).

I. CALOTROPIS PROCERA COMME COMPOSANTE DU FACA®

Des observations thérapeutiques réalisées par Ouattara (1991) au cours d'un stage rural lors de ses études de médecine ont permis d'identifier une recette préparée par un tradipraticien de santé à partir de deux plantes, qui ajoute au *Calotropis procera* (Ait). R. Br. (Asclepiadaceae), le *Zanthoxylum xanthoxyloides* Lam. (ex. *Fagara xanthoxyloides* (Rutaceae)) pour le traitement des douleurs articulaires chez l'enfant. Des études pharmacologiques, toxicologiques et cliniques ont conduit à la mise au point d'un phytomédicament dénommé FACA® à base de ces deux plantes. Le FACA® est une association de poudres d'écorces de racines de *C. procera* et de *Zanthoxylum xanthoxyloides* (Dembélé, 2001). Le développement pharmaceutique a abouti à l'obtention d'une AMM nationale en 2010. AMM N°0516520105T00000 pour FACA 80 mg gélule, B/100 et AMM N°0516420100T00000 pour FACA 160 mg gélule, B/100 (Cf. annexe1).

II. DONNEES SUR LE FACA®

II.1. Données pharmacothérapeutiques

II.1.1. Données précliniques

Les évaluations précliniques ont porté sur les tests pharmacologiques et toxicologiques réalisés à partir d'extraits aqueux, hydro-alcooliques et à l'acétate d'éthyle. Les propriétés antifalciformantes, anti-inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques et myorelaxantes, ont été évaluées non seulement sur la recette, mais également sur les produits de chaque plante prise isolément (Dembélé, 2001 ; Ouédraogo, 2001 ; Koudougou, 2004 ; Koussoubé, 2004 ; Ouattara *et al.*, 2004 ; Ouattara *et al.*, 2009).

II.1.2. Données clinique de FACA®

Une étude pharmaco-clinique comparative entre la dihydroergotoxine (HYDERGINE®) d'une part, et les poudres d'écorces de racines de *Zanthoxylum xanthoxyloides* et de *C. procera* en gélules en association et isolément d'autre part a été réalisée chez des enfants en crise drépanocytaire au CHU-YO de Ouagadougou (Ouattara, 1992 ; Guissou *et al.*, 1995)

La poudre de deux plantes associées sous forme de gélules s'est révélée significativement inhibitrice de la falciformation *in vitro*, et active sur la crise drépanocytaire en clinique. L'effet des produits des deux plantes en association ou isolement avait un profil pharmacologique similaire. L'association s'est révélée synergique et il n'a pas été observé d'effets secondaires notables lors des essais (Guissou *et al.*, 1995).

II.2. Données toxicologiques sur le FACA®

Une étude de la toxicité générale aiguë du phytomédicament FACA® a été réalisée chez la souris NMRI. La DL₅₀ obtenu était de 600 mg/kg par voie intra-péritonéale chez la souris et a permis de classer ce phytomédicament comme étant un produit faiblement toxique sur l'échelle de Hodge et Sterner, 1943 (Lompo *et al.*, 1998). Une récente étude de toxicité générale aiguë du phytomédicament FACA® par voie orale chez la souris a permis d'estimer une DL₅₀ orale de 5000 mg/kg et a permis de classer le produit dans la catégorie 5 du système de classification globalement harmonisé de l'OCDE (2001) et du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nation Unis (2011), c'est-à-dire des produits faiblement toxiques (Ouédraogo *et al.*, 2015, *communication personnelle*).

II.3. Donnée sur la tolérance de FACA® chez les patients drépanocytaires.

Une évaluation clinique contrôlée réalisée dans le but d'évaluer la tolérance de FACA® chez des enfants drépanocytaires sous traitement préventif et curatif a montré qu'il n'y avait pas de perturbation sur les fonctions d'organes vitaux et des paramètres sanguins après un traitement subchronique (Dembélé, 2001).

Un suivi de toxicovigilance de patients sous traitement par FACA® sur une période de douze (12 mois) selon un protocole établi afin d'identifier les effets et/ou évènements indésirables de type cardiovasculaire qui peuvent survenir chez des patients drépanocytaires d'hémoglobine SS et SC a été réalisée. Durant cette étude, aucun évènement indésirable n'a

été observé ni rapportés chez tous les patients (N=33) enrôlés qui ont suivi l'observance au traitement à l'issu des examens cliniques et biologiques. Par ailleurs une nette diminution de la fréquence de survenue des crises, leurs intensités et une amélioration de l'état de santé chez tous les patients suivis a été observé (Ouedraogo *et al.*, 2015, *communication personnel*).

II.4. Présentations galéniques de FACA®

Le FACA® est conditionné en gélule de 80 mg (photo 1 et 3) pour la forme enfant (âge compris entre 30 mois et 15 ans) et de 160 mg (photo 2 et 4) pour la forme adulte (plus de 15 ans).



OUEDRAOGO Geoffroy G. (2015)

Photo 1 : Boîte de FACA® 80 mg



OUEDRAOGO Geoffroy G. (2015)

Photo 2 : Boîte de FACA® 160 mg



OUEDRAOGO Geoffroy G. (2015)

Photo 3: Gélules de FACA® 80 mg



OUEDRAOGO Geoffroy G. (2015)

Photo 4: Gélules de FACA® 160 mg

II.5. Indications thérapeutiques et posologies de FACA®

Le FACA® est indiqué pour le traitement symptomatique de la crise drépanocytaire chez l'enfant et l'adulte et pour le traitement préventif des manifestations morbides liées à la maladie drépanocytaire.

La posologie est de 4 à 6 gélules par jour pendant au minimum dix (10) jours en traitement curatif et de 1 à 2 gélules par jour pendant un mois en traitement préventif.

III. LES PROPRIETES PHARMACO-TOXICOLOGIQUES DE *CALOTROPIS PROCERA* (PLANTE DE L'ETUDE (description en annexe 2))

III.1. Utilisations en médecine traditionnelle

III.1.1. En Afrique

Les usages médicaux de *Calotropis procera* sont nombreux en Afrique. Les racines, l'écorce de tige, le latex, les feuilles et les fleurs sont tous utilisés dans de très nombreuses préparations en médecine traditionnelle (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).

La décoction ou l'infusion d'écorce de tige et d'écorce de racine, ou la poudre d'écorce dans de l'eau, se prend pour soigner la diarrhée, la dysenterie, les vers intestinaux, les coliques, les troubles de la rate, les maux d'estomac, les problèmes cardiovasculaires, la pneumonie, la fièvre, la jaunisse, l'éléphantiasis et la lèpre (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).

La poudre de racine séchée mélangée à de l'eau se prend pour favoriser la lactation des mères allaitantes et est administrée aux femmes pour faciliter l'accouchement (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).

La poudre de racine mélangée avec du piment *Capsicum sp* est appliquée en bain pour traiter les rhumatismes et l'arthrose (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013). Le calcinat des racines, les écorces des racines sont employées pour le traitement du rhumatisme (Berhaut, 1971).

L'écorce de racine avec du latex est fumée comme remède pour la toux (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).

Le suc caustique est utilisé comme résolutif, rubéfiant contre les douleurs rhumatismales ou comme anti-tussif en application sur la poitrine (Berhaut, 1971).

L'écorce de tige est considérée dans certains pays comme aphrodisiaque. Le latex est également utilisé comme antiseptique, vermifuge, émétique et purgatif, et s'applique sur les

piqûres, le cordon ombilical, et en cas de maux de dents, de caries, de teigne, de ver de Guinée, de panaris, de furoncles, de plaies, de lèpre, de syphilis, de rhumatismes et de tumeurs. Le jus des feuilles est utilisé comme antidote contre les poisons, est frictionné sur les piqûres de scorpion et sur les blessures infectées par des flèches empoisonnées ; la pâte de feuille se prend pour traiter les morsures de serpent. Ils sont parfois pris par les femmes pour provoquer l'avortement et comme utéro-tonique. Le latex s'utilise en gouttes nasales pour provoquer des éternuements afin de réduire les maux de tête (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).

Le décocté aqueux des feuilles est bu pour traiter la coqueluche et la tuberculose. Les racines sont mâchées (sans avaler) pour calmer les maux de dent (Berhaut, 1971).

Les racines sont utilisées comme anti-asthmatiques (Adjanohoun *et al.*, 1985 et 1986 ; G.R.I.P.T, 2001).

La décoction des parties aériennes est utilisée dans le traitement de certaines maladies à manifestations fébriles, douloureuses et spasmodiques (Mossa *et al.*, 1991).

Au Bénin, les feuilles en décoction aqueuse *per os*, sont indiquées pour le traitement de la toux, des filarioses et de l'anasarque.

Au Bénin toujours, l'infusion et le décocté des feuilles sont utilisés respectivement dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'œdème (G.R.I.P.T, 2001). La poudre de racine est conseillée à la femme présentant une dystocie (G.R.I.P.T, 2001).

Au Sénégal, les racines sont absorbées en poudre, dans du lait frais ou caillé comme purgatif, émétique et contrepoison, elles font partie de nombreuses compositions anti-lépreuses et antisiphilitiques, en usage externe. L'emploi du latex est constant comme antiseptique et sédatif (G.R.I.P.T, 2001). Le latex est utilisé pour soigner les plaies des chameaux, ou encore pour débarrasser les animaux de leurs tiques. On l'utilise également comme antivomitif (Kerharo et Adam, 1974).

III.1.2. Au Burkina Faso

Le latex en usage externe est antiseptique, cicatrisant, antifilariose et antiprotozoose (Nacoulma, 1996).

Le macéré aqueux des feuilles de *C. procera* avec le fruit de *Cola nitida* est conseillé en cas de menace d'avortement. Les feuilles sont mâchées et avalées dans les envenimations par

morsure de serpent. Séchées et pulvérisées les feuilles sont proposées en poudre à délayer dans de l'eau ou de la boisson dans les crises d'asthme (Parvais, 2000).

Les racines de *C. procera* en macération associées aux racines sèches de *Nauclea latifolia* Sm. (Rubiaceae) et de *Gardenia ternifolia* Schum. (Rubiaceae) en quantités égales, sont utilisées contre les douleurs ostéo-articulaires de la crise drépanocytaire en bain et massage des articulations (Parvais, 2000).

Les feuilles, les écorces et les racines sont employées pour combattre divers maux au plateau mosi : douleurs rhumatismales, céphalées, diarrhées, syphilis, épilepsie, dermatose, asthme etc. (Nacoulma, 1996, Parvais, 2000). Les écorces des racines entrent dans les produits destinés au traitement de la drépanocytose au Burkina Faso (Ouattara, 1991 ; Nacoulma, 1996 ; Guissou, 2008, *communication CAMES*). Tout ceci justifie l'étude détaillée des effets toxiques des écorces de racines et des extraits qui en dérivent.

III.2. Données pharmacologiques

III.2.1. Effets antifalcémiantes

Le macéré aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* présente une activité antifalcémiantes (Ouédraogo, 2001)

III.2.2. Propriétés anti-inflammatoire

a. Effet sur l'œdème inflammatoire

L'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* a développé une activité contre l'œdème inflammatoire chez la souris après administration de la carragénine (Mascollo *et al.*, 1988 ; Ouédraogo, 2001 ; Dembélé, 2001). Il en a été de même avec les extraits aqueux et hydro-alcoolique de *C. procera* réalisés au Mali avec une relation dose-dépendante sur une durée d'au moins six heures (Nikiéma, 2005). Les activités anti-inflammatoires du macéré aqueux et de l'extrait hydro-alcoolique ont la même cinétique d'action que celle de la bétaméthasone (Nikiéma, 2005).

L'extrait chloroformique des écorces de racines de la plante présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat en utilisant des modèles pharmacologiques de l'œdème

induit par la carraghénine, l'essai des granulomes provoqués par des boulettes de coton et l'arthrite induite par le formaldéhyde (Basu et Chaudhuri, 1991).

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fleurs de *C. procera* possèdent des propriétés anti-oedémateuses (Mascolo *et al.*, 1988).

Le latex de la plante possède une activité anti-inflammatoire en utilisant des modèles pharmacologiques de l'oedème induit par la carraghénine chez le rat (Kumar et Basu, 1994).

b. Effet analgésique

Les macérés aqueux des écorces de racines de *C. procera* ont montré une activité analgésique de type non morphinique chez la souris après induction de syndrome douloureux à l'acide acétique 2 % (Koussoubé, 2004).

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fleurs de *Calotropis procera* possèdent des propriétés analgésiques (Mascolo *et al.*, 1988).

c. Effet antipyrétique

Les macérés aqueux des écorces de racines de *C. procera* ont présenté une activité antipyrétique chez le rat après hyperthermie (température rectale) à la solution aqueuse de levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae* 20%) (Koudougou, 2004).

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fleurs de *C. procera* possèdent des propriétés antipyrétiques (Mascolo *et al.*, 1988).

III.2.3. Effet vasodilatateur

Une étude a révélé que le macéré aqueux des écorces de racines de *C. procera* présente une activité vasodilatatrice. Cette propriété vasculaire du *C. procera* peut être impliquée dans la modification de la crise drépanocytaire par l'inhibition du processus de vaso-occlusion (Ouédraogo *et al.*, 2011).

III.2.4. Effets antimicrobiens

- Les extraits (décocté, macéré et extrait méthanolique) d'écorces de racines de *C. procera* n'ont montré aucune activité antibactérienne sur les souches (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi B*, *Staphylococcus aureus* ; *Haemophilus influenzae*) ni antifongique sur *Candida albicans* (Zomy-Gueu, 2005 ; Nikiéma, 2005).

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fleurs de *C. procera* possèdent des propriétés antimicrobiennes (Mascolo *et al.*, 1988).

- L'extrait éthanolique des feuilles présente une activité insecticide contre *Sarcophaga haemorrhoidalis* (Le, 1997 ; Kerharo et Adam, 1994).

- Les extraits aqueux et éthanolique de poudre d'écorces présente une activité antifongique contre *Candida albicans*, *Tinea capitis*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* (Bajpayee, 2015).

- L'extrait aqueux des écorces de tige est doué d'une activité antitussive *per os* chez le cobaye (Dieye *et al.*, 1993).

- L'extrait éthanolique des écorces de racines exerce un effet antibactérien contre *Enterobacter cloacae* (Kerharo et Adam, 1974).

III.2.5. Effets Sanguins

Les extraits de *C. procera* n'ont pas présenté d'activité hémolytique sur les hématies en milieu isotonique ni d'effet significatif sur la coagulation sanguine chez les enfants SS et SC (N=19) (Dembélé, 2001). La présence d'oligoéléments comme le fer et le cuivre dans les extraits de *C. procera* sont d'intérêt pour l'anémie.

III.2.6. Autres effets

- Le macéré aqueux des écorces de racines de la plante développe une activité biphasique myorelaxante et contracturante en fonction des concentrations de produit sur le muscle lisse intestinal de rat (Ouédraogo, 2001). L'extrait hydroalcoolique des écorces de racines de la plante a provoqué une contraction de type cholinergique concentration-dépendante des anneaux de trachée de lapin aux faibles concentrations suivi d'une relaxation aux fortes concentrations (Ouédraogo, 2009).

- Les extraits aqueux et alcooliques des racines ont une action stimulante sur la respiration et la pression sanguine du chien et ont un effet spasmogène sur les muscles lisses du lapin et du rat, ainsi que sur l'utérus de rate non gestante (Kerharo et Adam, 1974).
- Aussi une modification des contractions cardiaques de type cardiotonique (inotrope positif, chronotrope négatif) de l'extrait aqueux lyophilisé des écorces de racines de *C. procera* a été observée sur le cœur isolé de rat Wistar (Zomi-Gueu, 2005)
- Chez la souris et le rat, l'extrait chloroformique des racines a montré un effet hépatoprotecteur (Kerharo et Adam, 1974).
- L'extrait chloroformique des racines de *C. procera* inhibe les ulcères gastriques provoqués par l'aspirine, l'indométacine, l'éthanol ou par le stress. Il inhibe par ailleurs le métabolisme de l'acide arachidonique (Sen *et al.*, 1988).

Les extraits aqueux (macéré, hydro-alcoolique, décocté) des écorces de racines de *C. procera* du Mali possèdent des activités antioxydante par le test au DPPH (Nikiéma, 2005).

III.3. Données toxicologiques

- Les extraits aqueux et alcooliques des racines de *Calotropis procera* ne présentent pas de toxicité notable contrairement aux feuilles et aux tiges qui renferment du latex dont la toxicité est bien connue et redoutable (Kerharo et Adam, 1974).
- Le latex contient de la calotropine, un dangereux cardiotoxique. La toxicité du latex, ancien ingrédient de poison de flèche est bien connue et persiste même après coagulation sous l'action de la chaleur qui le transforme en une masse résineuse. De même, l'application du latex sur les conjonctives provoque d'abord une congestion et une anesthésie locale, puis des effets plus marqués dus à sa résorption (Kerharo et Adam, 1974).
- Le latex est particulièrement toxique pour le rein alors que les écorces des tiges débarrassées de leur suber et les feuilles séchées étaient atoxiques (Kerharo et Adam, 1974).
- Les macérés aqueux et hydroalcoolique des écorces des écorces de racines ont donné respectivement une DL₅₀ % de 973 et 109 mg/kg par voie intra-péritonéale chez la souris NMRI et a permis de classer ces extraits comme étant faiblement à moyennement toxique selon le système de classification globalement harmonisé de l'OCDE, (2001) de l'OMS, (2002) et du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nation Unis, (2011) (Ouédraogo, 2001 ; Ouédraogo, 2009).

IV. DONNEES PHYTOCHIMIQUES DE DIFFERENTES PARTIES DE *CALOTROPIS PROCERA*

Des investigations phytochimiques réalisés sur différentes parties de la plante de *C. procera* a révélée qu'elle contient des composés tels que des cardénolides, des saponosides, des stérols et triterpènes, des alcaloïdes, des tanins et des flavonoïdes (Al-Yahia, 1986 ; Malik et Chughtai, 1979 ; Saleh *et al.*, 1993). La plante est riche en acide aminés (18 acides aminés détectés), en hydrates de carbone et en minéraux. Les feuilles sont riches en protéines (17,7%) (Erdman, 1983).

IV.1. Constituants chimiques isolés des racines de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Le tableau I présente les principaux groupes chimiques isolés des racines de *Calotropis procera* rapportés par Neuwinger (1996). Les composés majeurs présents dans les racines sont les glycosides et triterpènes avec une faible teneur en flavonoides. Les principaux glycosides étant la Calotoxine et la Calactine (Neuwinger, 1996).

Tableau I: constituants chimiques isolés des racines de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Groupe de substances	Substances isolées	Références
	Mudarine	Duncan (1829)
	Calotoxine	"
	Calactine	"
Glycosides	Glycoside C21-stérolique	Chandler et al (1967)
	Benzoyllinéolone	"
	Benzoylisolinéolone	"
Flavonoïdes	Rutine (quercétine-3-rhamnose)	Saxena et al. (1979)
Triterpène	α -amyrine	"

IV.2. Constituants chimiques isolés des tiges de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Le tableau II présente les principaux groupes chimiques isolés des tiges de *Calotropis procera* rapportés par Neuwinger (1996). Les composés majeurs isolés étant les glycosides cardiotoniques et les cardénolides.

Tableau II: constituants chimiques isolés des tiges de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Groupe de substances	Substances isolées	Références
Glycosides cardiotoniques	Ucharidine (4%)	
	Calotropine (2%)	Erdman (1983)
	Proceroside (1%)	
	Calotoxine	
Cardénolides	Calactine	
	Ascléposide	Erdman (1983)
	Uzarigénine	
	Calotropagénine	
	Coroglaucigénine	

IV.3. Constituants chimiques isolés des feuilles de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Le tableau III présente les principaux groupes chimiques isolés des feuilles de *Calotropis procera* rapportés par Neuwinger (1996). Les composés isolés étant constitués principalement des cardénolides et polysaccharides. Les glycosides majeurs sont l'Ucharidine et la Proceroside

Tableau III : Constituants chimiques isolés des feuilles de *Calotropis Procera* Ait.

Groupe de substances	Substances isolées	Références
	Calotropine 0,165%	Hesse et
	Calotropagénine 0,087%	Reicheneder (1936)
	Ucharine	
	Ucharidine	
Cardénolides	Calotropine	Brüschweiler (1969)
	Calotoxine	
	Uzarigénine	
	Acide -19 –calotropine	
	Calactine (0,25%)	Erdman (1983)
	Coroglaucigenine (1%)	
	Proceroside	Qudrat-I-khuda et Amir
Polysaccharide	D-glucose + D-arabinose +	(1969)
	D-glucosamine +	"
	L- rhamnose	

NB : la Calotoxine est tantôt Glycosides et tantôt Cardenolides.

IV.4. Constituants chimiques isolés des fruits de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Le tableau IV présente les cardénolides isolés des fruits de *Calotropis procera* rapportés par Neuwinger (1996).

Tableau IV: Constituants chimiques isolés des fruits de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Groupe de substances	Substances isolées	Références
Cardénolides	Coroglaucigénine 1%	Erdman (1983)
	Uzarigénine 0,17%	"
	Calactine 0,17%	"
	Calotropine 0,08%	"
	Calotropagénine 0,08%	"

IV.5. Substances chimiques isolées des fleurs de *Calotropis procera* Ait.

Le tableau V présente les flavonoides, anthocynines et stérols isolés des fleurs de *Calotropis procera* rapportés par Neuwinger (1996).

Tableau V : Constituants chimiques isolés des fleurs de *Calotropis procera* Ait.

Groupe de substances	Substances isolées	Références
Flavonoïde	Rutine 7,63%	Lal et coll. (1985)
Anthocyanine	Cyanidine-3-rhamnoglucoside	Khan et al. (1989)
Stérol	Procestérol	"

IV.6. Composition chimique du latex de *Calotropis procera* Ait.

Le tableau VI présente les principaux groupes chimiques isolés du latex de *Calotropis procera* rapportés par Neuwinger (1996). Les composés présents sont les stérols et triterpènes, les hétérosides cardiotoniques, les alcaloïdes et des enzymes protéolytiques.

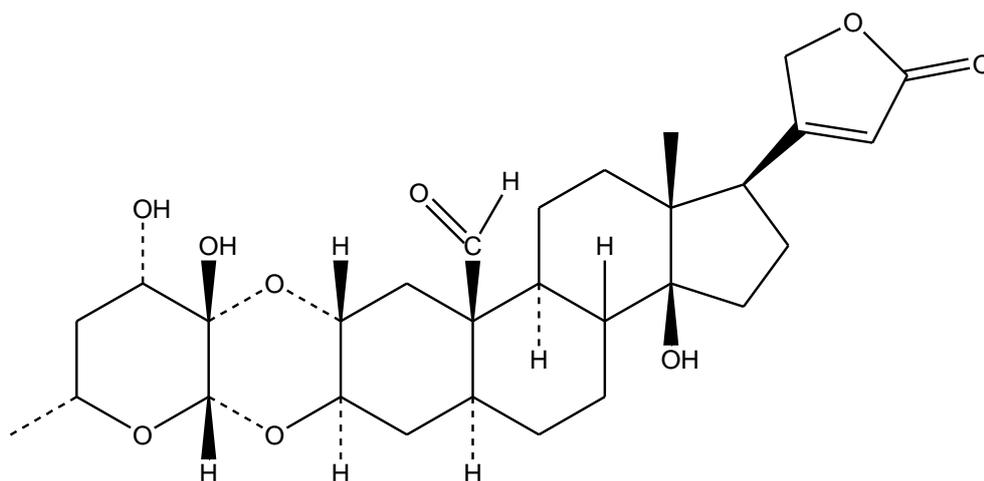
Tableau VI: Constituants chimiques isolés du latex de *Calotropis procera* Ait

Groupe de substances	Substances isolées	Références
Stérols	Taraxastérol	Lewin (1913)
	(α - lactucérol)	
	β -sitostérol	Hilal et Youngken (1983)
	Stigmastérol	"
	Taraxastérol	"
Acides triterpéniques	O-acéthyl-taraxastérol	Saber (1968)
	Acide isovalérique	Lewin (1913)
	Acides pyrotérébiques	"
	Acide méthylréductique	"
Hétérosides cardénolides	Calotropine	Hesse et coll. (1941)
	Calotropagénine	"
	Calotoxine (0,15%)	"
	Calactine (0,20%)	"
Alcaloïdes	Uscharine (0,45-0,80%)	Hesse et coll. (1941)
	Uscharidine	"
	Voruscharine (0,1%)	"
Triterpènes pentacycliques	Calotoxine	Brüschweiler (1969)
	Calactine	"
Alcaloïdes	α -amyrine et β -amyrine	Khan (1990)
Protéase Enzyme protéolytique	Choline	Atal et Sethi (1962)
	Calotropaine (2-3%)	"

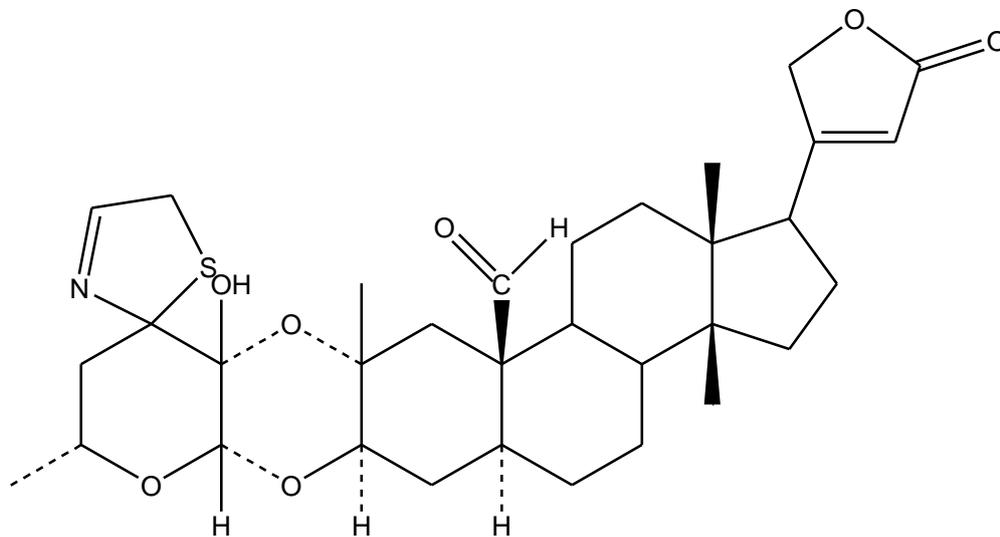
IV.7. Composition chimique des graines de *Calotropis procera* (Ait.)

Les graines contiennent des glucosides cardiotoniques (Nikéma, 2005).

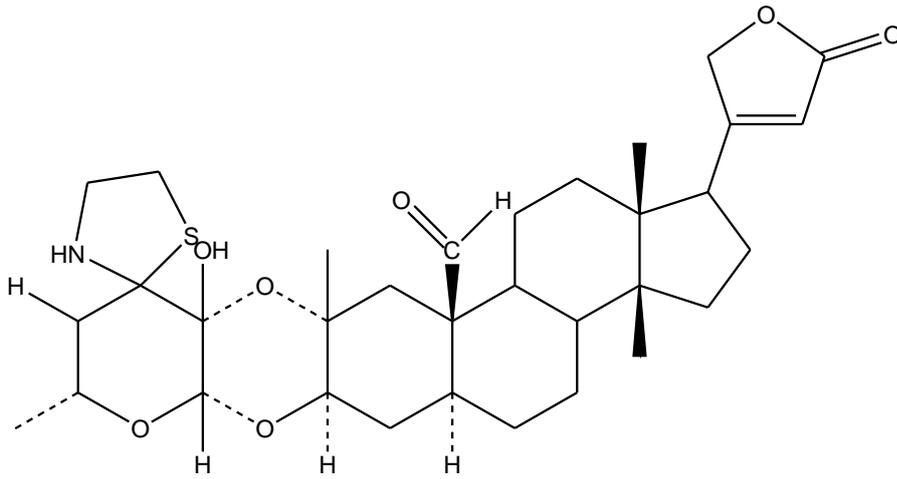
IV.8. Structures chimiques de quelques composés de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.



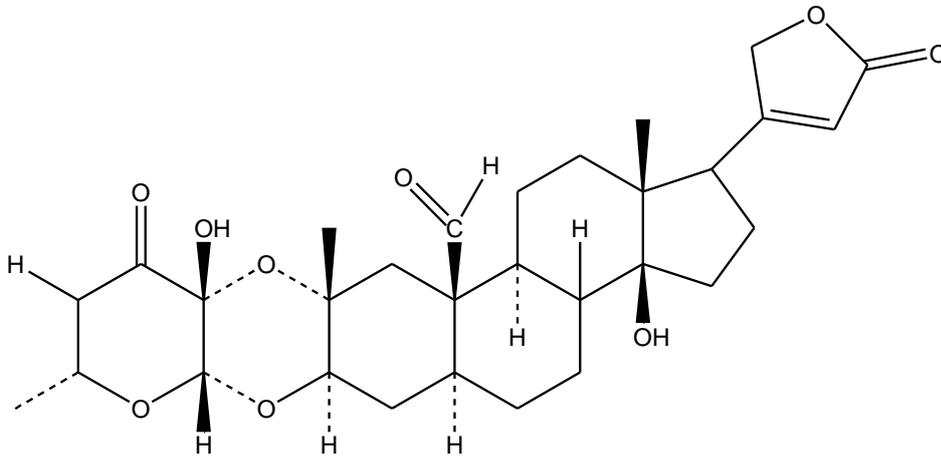
Calotropine



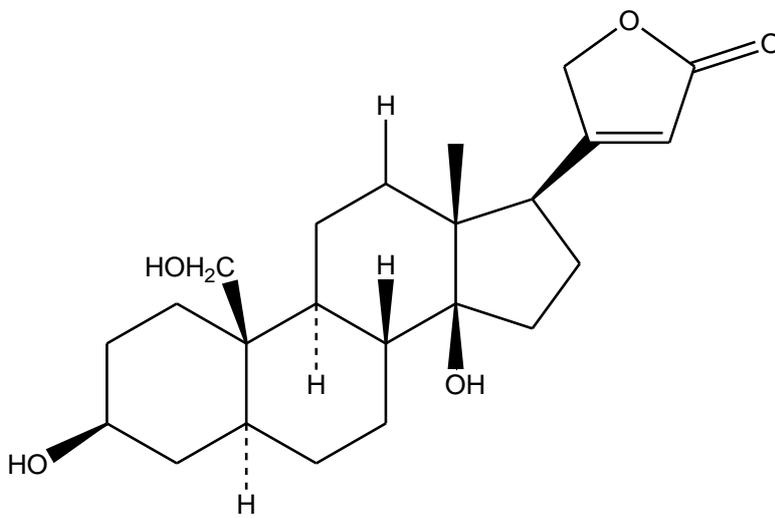
Uscharine



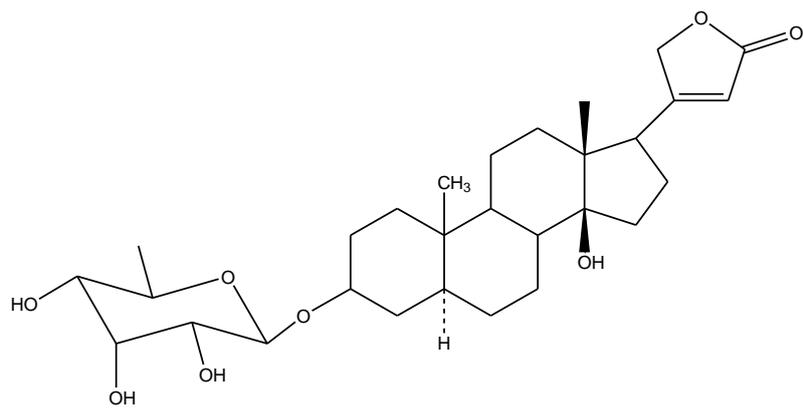
Voruscharine



Ucharidine



Coroglaucigenine



Ascléposide

CHAPITRE II. METHODES D'ETUDES TOXICOLOGIQUES

I. NOTION CONCEPTUELLE DE LA TOXICOLOGIE

I.1. Notion de la toxicologie

La toxicologie est l'étude des substances toxiques et, plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature. Elle fait appel, tant pour ses connaissances que pour sa démarche de recherche ou ses méthodes, à la plupart des sciences biologiques fondamentales, aux disciplines médicales, à l'épidémiologie et à divers domaines de la chimie et de la physique. Elle s'étend de la recherche fondamentale sur le mécanisme d'action des agents toxiques à la mise au point et à l'interprétation de tests normalisés permettant de caractériser les propriétés toxiques de ces agents. Elle fournit à la médecine et à l'épidémiologie des informations indispensables pour comprendre l'étiologie et établir le lien entre les expositions, y compris professionnelles, et les pathologies observées (Casarett et Doull's, 2008).

La toxicologie s'intéresse à plusieurs secteurs de l'activité humaine : l'agriculture, l'alimentation, l'industrie pharmaceutique, l'environnement, les milieux de travail, etc. (Lapointe, 2004 ; Casarett et Doull's, 2008). Elle peut être scindée en spécialités : toxicologie clinique, toxicologie médico-légale, toxicologie fondamentale et toxicologie réglementaire, être présentée selon les organes cibles (par exemple, immunotoxicologie, toxicogénétique) ou encore selon ses objectifs (recherche, expérimentation et évaluation du risque) (Silbergeld, 2000).

L'étude de la toxicologie sert à la société de plusieurs manières, non seulement pour protéger les êtres humains et l'environnement contre les effets délétères des produits toxiques mais aussi pour faciliter le développement de substances toxiques plus sélectifs comme les anticancéreux et autres drogues utilisés en médecine cliniques et les pesticides (Hodgson, 2010).

I.2. Notion de poison ou toxique

Un poison, ou toxique, est une substance capable de perturber, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, le fonctionnement normal d'un organisme vivant en occasionnant

des troubles d'une ou plusieurs fonctions de l'organisme, pouvant aller jusqu'à leur suppression complète et entraîner la mort (Viala, 1998).

Les toxiques sont très divers et peuvent être de source naturelle (ex. : poussières, pollen) ou artificielle (ex. : gaz polluant l'air, formaldéhyde), ou de nature chimique (ex. : acétone, pesticides) ou de nature physique (ex. : ondes ou rayonnement, vibration, bruit) ou biologique (ex. : aflatoxines, anthrax) (Casarett et Doull's, 2008).

I.3. Le toxique et l'organisme

L'organisme doit être exposé à un produit toxique pour qu'un effet nocif se manifeste. Dans ce cas, le produit peut agir au point de contact (effet local) ou pénétrer dans l'organisme pour provoquer des effets nuisibles (effet systémique). La réponse de l'organisme à un toxique dépend, entre autres, de la quantité du produit présent dans un tissu ou un organe. Plusieurs facteurs interviennent dans les processus d'action toxique, notamment les phases de toxicocinétiques et toxicodynamiques (Baynes et Hodgson, 2010).

La phase toxicocinétique englobe l'absorption des toxiques dans l'organisme et tous les processus ultérieurs : transport par les fluides de l'organisme, distribution et accumulation dans les tissus et les organes, biotransformation en métabolites et élimination (excrétion) des toxiques ou des métabolites en dehors de l'organisme.

La phase toxicodynamique fait référence à l'interaction des toxiques (molécules, ions, colloïdes) avec des sites spécifiques d'action à la surface ou à l'intérieur des cellules-récepteurs, responsables de l'effet toxique ultérieur.

I.4. Les effets toxiques

I.4.1. Notion d'effet toxique

Lorsqu'un individu absorbe un produit chimique ou un mélange de produits chimiques, divers effets biologiques peuvent se produire et se révéler bénéfiques ou néfastes. La notion d'effet toxique suppose des conséquences nocives pour l'organisme. Les effets toxiques, très divers par leur nature, l'organe cible et mécanisme d'action ; résultent de l'interaction biochimiques entre le toxique et l'organisme. L'effet toxique est donc le résultat d'un processus souvent

complexe et il peut entraîner une série de réactions physiologiques et métaboliques (Casarett et Doull's, 2008, Ababsa, 2009).

L'absorption d'une substance en faible quantité peut s'avérer très toxique et provoquer des lésions graves, tandis que l'absorption en grande quantité d'une autre substance peu toxique peut produire un effet bénin ou pas d'effet du tout. L'effet toxique est ainsi lié à la notion de toxicité. Il s'agit de la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse.

L'effet néfaste est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion (Casarett et Doull's, 2008).

Un effet toxique est dit local lorsqu'il survient au point de contact et systémique lorsqu'il survient ; après la distribution du toxique dans l'organisme ; à un endroit éloigné du point de contact initial. Certains effets toxiques sont réversibles, ils disparaissent plus ou moins rapidement après l'arrêt de l'exposition, tandis que d'autres sont irréversibles, ils persistent ou même s'intensifient après l'arrêt de l'exposition (Viala, 1998).

Un effet aigu ou immédiat se fait sentir dans un temps relativement court (minutes, heures, jours), tandis qu'un effet chronique ou retardé ne se manifeste qu'après un temps d'exposition relativement long et de façon permanente (semaines, mois, années) (LeBlanc, 2010).

Un effet morphologique aboutit à un changement de la morphologie d'un tissu visible en microscopie optique ou électronique (nécroses, néoplasies, etc) et est en général irréversible, tandis qu'un effet fonctionnel détermine un changement dans les fonctions d'un organe (foie, rein, etc.) et est le plus souvent réversible (Viala, 1998).

I.4.2. La dose et ses relations avec les effets toxiques

Un principe important en toxicologie veut que toutes les substances chimiques soient toxiques, car il existe toujours une dose pouvant causer un effet nocif. La dose est la quantité d'une substance à laquelle un organisme est exposé. Des doses croissantes résultent généralement en une augmentation de l'intensité et de la diversité des effets toxiques. C'est ce qu'on appelle la relation dose-effet ou exposition-effet (relation entre l'exposition et l'intensité d'un effet). La notion de seuil toxique est importante, car elle peut servir à fixer des normes. La valeur seuil représente la quantité minimale sous laquelle il ne se produit pas d'effet. Au-dessus de ce seuil, l'effet observé dépend de la dose, et ce, bien qu'il y ait

théoriquement des exceptions. Ce seuil s'explique par le fait que le corps humain est constitué d'un grand nombre de cellules, de tissus et d'organes ayant une sensibilité variable et qu'il possède des mécanismes de défense ou d'adaptation. Le même principe s'applique à une population d'individus, car l'effet ou les nombreux effets possibles peuvent se manifester différemment chez plusieurs personnes exposées à une même dose d'un toxique. C'est ce qu'on appelle la relation dose-réponse, ou la relation entre l'exposition et le nombre d'individus qui présentent un effet donné dans la population exposée (Viau et Tardif, 2003).

I.4.3. Classification des effets toxiques

Les effets toxiques peuvent être classés de différentes façons, selon, par exemple :

- le type d'action: locale, systémique;
- la réversibilité ou non
- le mécanisme d'action: stimulant, inhibiteur;
- la voie de pénétration: respiratoire, cutanée, digestive, voie parentérale;
- le tissu ou l'organe affecté: sang (hématotoxique), foie (hépatotoxique), rein (néphrotoxique), le système nerveux (neurotoxique);
- la nature de l'effet: irritant, sensibilisant, asphyxiant, cancérigène, nécrose, inflammation, apoptose, atrophie.

Les effets toxiques chroniques sur les organismes vivants peuvent se manifester par : la génotoxicité, la mutagenèse, la cancérigénicité, la neurotoxicité, des effets sur la reproduction et le comportement (Descotes, 1992 ; Timbrell, 2000).

Il est fondamental de rappeler que les trois dimensions de la toxicologie sont :

- la dose (faible ou élevée)
- le temps qui s'écoule entre la prise d'une dose unique et l'apparition des effets, ou le temps qui s'écoule entre les expositions répétées à de faibles doses d'un toxique et l'apparition des effets chronique et
- le temps pendant lequel dure l'exposition à un toxique gazeux par exemple ; travaux de Haber (Nobel de chimie) sur les gaz et les armes de guerre.

Enfin, retenir qu'il y a deux types de toxiques, ceux qui sont fonctionnels (exemple des psychotropes) et ceux qui sont lésionnels (exemple du paracétamol).

I.4.4. Organes cibles

Un toxique n'affecte pas tous les organes avec la même intensité. Ils agissent plus spécifiquement sur certains organes (organes cibles) du fait d'une plus grande sensibilité de ces organes ou d'une concentration plus élevée de la molécule toxique ou de ses métabolites à leur niveau (Viala, 1998). Des organes tels que le rein et le foie sont bien approvisionnés avec le sang et sont métaboliquement actifs, parce qu'ils ont un rôle important dans la biotransformation et l'excrétion des toxiques. Ces organes sont appelés organes cibles puisqu'ils sont plus vulnérables et plus exposés aux toxiques que les organes ou les tissus mal irrigués ou métaboliquement moins actifs tels que la peau et l'os (Timbrell, 2000 ; Casarett et Doull's, 2008).

II. METHODES D'EVALUATIONS TOXICOLOGIQUES

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives (non mesurable) ou quantitatives (mesurables) validées. Il existe plusieurs types d'études qui permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer en plusieurs catégories :

- les études théoriques par modélisation (bio-informatique) ;
- les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux (Exemple : souris, rat, lapin);
- les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de cellules, de tissus ou des tranches d'organes (ex-vivo) ;
- les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus pour d'éventuelles pathologies en rapport ou non avec un toxique donné ou les études de cas (Casarett et Doull's, 2008)

II.1. Essai de toxicité *in vivo* chez l'animal

Les études de toxicité d'un produit chez l'animal, permettent d'en déterminer l'innocuité relative (l'évaluation du risque) et de proposer les mesures préventives appropriées (restriction d'emploi, utilisation en circuit fermé ...).

On utilise fréquemment une terminologie pratique mais arbitraire pour désigner les diverses formes d'intoxication selon la fréquence et la durée de l'exposition (tableau VII).

Tableau VII: Les formes d'intoxication

Forme d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée de l'exposition (Rongeurs)
Aiguë	Unique	< 24 heures
Répétée à court terme	Répétée	= 28 jours
Subchronique	Répétée	De 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	> 3 mois

La durée d'administration de la substance expérimentale dépendra de la durée d'utilisation clinique prévue. Le tableau VIII présente les durées d'administration les plus fréquentes en fonction de l'utilisation clinique prévue selon les lignes directrices concernant l'étude de la toxicité potentielle des médicaments à base de plantes de l'OMS, (2000).

Tableau VIII: Durée de l'étude de toxicité chez l'animal en fonction de l'utilisation clinique (OMS, 2000)

Durée prévue de l'utilisation clinique	Durée d'administration aux fins de l'étude de toxicité
Prise unique ou répétée pendant moins d'une semaine	2 semaines à 1 mois
Prise répétée pendant une à quatre semaines	4 semaines à 3 mois
Prise répétée pendant un à six mois	3 à 6 mois
Prise répétée pendant plus de six mois	9 à 12 mois

Il existe également des lignes directrices régulièrement mises à jours présentant les modalités d'évaluation de la toxicité *in vivo* chez l'animal de produits chimiques ; ligne directrice portant sur les essais de toxicité orale aiguë et de toxicité orale à dose répétée (OCDE, 1998, 2001, 2008)

II.1.1. La toxicité aiguë d'une substance

Elle caractérise les manifestations toxiques après administration d'une dose unique, ou de plusieurs doses réparties sur un intervalle de temps de 24 heures d'une substance chez des animaux. Les espèces les plus fréquemment utilisées sont le rat (voie orale ou inhalation), le lapin (voie cutanée), on y ajoute la souris et quelquefois le chien. La toxicité peut être immédiate si les manifestations toxiques sont observées dans les deux heures suivant l'administration de la substance ou retardée si les manifestations toxiques sont observées dans les 24 heures ou plus. Elle se traduit par un toxidrome et une atteinte des organes à fonction vitale. Les principaux effets recherchés sont la létalité (ou mortalité), la baisse de la consommation de nourriture et/ou de boisson, les variations de poids du corps ou des organes, les signes cliniques et les modifications pathologiques visibles à l'œil nu. L'évaluation de la toxicité aiguë permet d'apprécier les doses qui entraînent la mort de l'animal et les circonstances de la mort. A cet effet, la dose minimale mortelle (DMM) et la dose létale 50% (DL₅₀) sont généralement déterminées.

La Dose Minimale Mortelle (DMM) est la dose minimale de la substance capable de tuer un animal (l'arrêt cardiaque signe la mort). Elle peut servir à faire le choix des niveaux de doses retenues pour la détermination de la DL₅₀ (Claude, 1988). Ceci concerne les toxiques à effet cardiotoxique, l'arrêt d'une des fonctions vitales suffit à entraîner la mort. La DL₅₀ est un terme qui a été introduit et développé par Trevan en 1927. Elle est définie comme étant la dose de substance capable de provoquer par la voie d'administration choisie la mortalité cumulée de 50% des animaux d'une population mise en expérience. Elle s'évalue à partir de lots d'animaux auxquels correspondent des doses croissantes de la substance. Elle s'exprime en mg de produit par kg de poids corporel (p.c). La DL₅₀ pour une substance chimique doit toujours être indiquée pour une espèce animale donnée et pour une voie d'administration déterminée (voie orale, intraveineuse, sous-cutanée ou cutanée, intrapéritonéale, par inhalation ...).

L'observation des manifestations de la toxicité aiguë ou toxidrome est nécessaire au cours de l'étude de toxicité aiguë d'une substance. Il s'agit de faire un examen d'organes (foie, rein, poumons, cœur ...) et de décrire toutes les modifications de comportement ou d'état observés (Claude, 1988 ; OCDE, 2008b).

La valeur de la DL₅₀ d'une substance par voie orale permet de la situer sur un niveau de toxicité chimique (catégorie de danger) selon le système de classification globalement

harmonisé de l'OCDE (2001) de l'OMS (2002) ou du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nation Unis (2011).

Tableau IX: Catégories de danger de toxicité aiguë et estimations de toxicité aiguë (ETA) définissant les différentes catégories (Nation Unis (2011))

Voie d'exposition	Catégorie 1	Catégorie 2	Catégorie 3	Catégorie 4	Catégorie 5
Orale (mg/kg de poids corporel)	5	50	300	2000	5000
Cutanée (mg/kg de poids corporel)	50	200	1000	2000	5000

Les valeurs seuil de la catégorie 1, catégorie de danger le plus sévère s'adresse aux produits très toxiques tandis que la catégorie 5 s'adresse aux substances qui sont relativement peu toxique mais qui peuvent sous certaines conditions s'avérer dangereuse pour des populations vulnérables, (Nation Unis, 2011).

II.1.2. Toxicité subaiguë et toxicité subchronique

Alors que la toxicité aiguë concerne les effets nocifs dus à des doses uniques, une forme plus commune de l'exposition humaine à de nombreux produits chimiques se fait par la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes, et il est important d'identifier toute possibilité de ce genre par des études de toxicité subchronique ou chronique. Les tests de toxicité par administration répétée ont pour objet de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou organiques consécutives aux administrations répétées de la substance testée et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la dose. Ces tests fournissent des informations sur les risques pour la santé que peut entraîner une exposition répétée durant une période de temps relativement limitée, notamment pour le système nerveux, le système immunitaire et le système endocrinien. De plus, ces tests devraient permettre d'identifier des produits chimiques potentiellement neurotoxiques, pouvant justifier des études plus approfondies de cet aspect, et des produits chimiques qui interfèrent avec la physiologie de la thyroïde. Elles pourraient également fournir des données sur les produits chimiques qui affectent les organes

reproducteurs mâles et/ou femelles des jeunes animaux adultes et donner des indications sur leurs effets immunologiques.

La détermination de la toxicité à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë. On distingue classiquement des études à court terme avec administration de doses répétées sur des périodes relativement courtes de 14 et 28 jours (toxicité subaiguë) et des études à court terme avec administration de doses répétées sur des périodes de 90 jours (toxicité subchronique). D'autres durées d'étude ont été utilisées en toxicologie, mais on considère que le choix de ces trois durées principales (14, 28 et 90 jours) qui ont le soutien de l'expérience ou pour lesquelles il existe des prescriptions en matière de réglementation, représente une approche raisonnable (OCDE, 1998 ; OCDE 2008).

Les expérimentations se font sur deux espèces de mammifères dont un non rongeur. Le choix de la ou des voies d'administration doit tenir compte de celles prévues pour l'emploi et des possibilités de résorption. Le mode et le rythme des administrations ne sont pas codifiés strictement mais doivent être clairement indiqués ainsi que la durée des essais.

La substance à tester est administrée quotidiennement à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux, à raison d'un niveau de dose par groupe. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés. La dose la plus élevée doit provoquer des effets toxiques, sans être létale ou causer de sévères souffrances. Une séquence de doses décroissantes doit ensuite être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose et d'objectiver une absence d'effets adverses à la dose la plus faible (OCDE, 2008a).

Une étude de toxicité par dose répétée permet normalement de déterminer une dose sans effet nocif observé (DSENO) et une dose minimale avec effet nocif observé (DMENO), tous les effets dangereux qui pourraient être observés à la fois chez l'homme et chez l'animal étant pris en compte, quelle que soit leur gravité. Il est en général admis que la DSENO décroît lorsque la durée d'exposition de l'étude augmente. Lorsque plusieurs DSENO sont disponibles pour le même effet, c'est la valeur la plus basse qui est utilisée pour l'évaluation des risques.

II.1.3. Toxicité chronique

Le but d'une étude de toxicité chronique est de déterminer les effets d'une substance d'essai, chez une espèce de Mammifère donnée, à la suite d'une exposition prolongée et/ou répétée (OCDE, 2009).

La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies (6, 9, 12, 18, 24 ou 30 mois), en fonction des exigences réglementaires. Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés (OCDE, 2009).

II.2. Essai de toxicité *in vitro*

II.2.1. Le concept des tests de toxicité *in vitro*

Des progrès scientifiques considérables ont permis le développement de modèles *in vitro* pertinents pour évaluer les effets toxiques des médicaments ou produits chimiques sur la santé humaine et la qualité de l'environnement.

Au cours des quatre-vingt dernières années, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus aux systèmes d'essais de toxicité *in vitro* (Goldberg et Frazier, 1989). Les techniques *in vitro* présentent en effet certains avantages. En premier lieu, ils sont de par leurs natures susceptibles d'être plus rigoureusement normalisés que les essais *in vivo*. Il s'agit d'un avantage considérable car ils permettent de générer des informations dont la qualité est vérifiable. Il n'en est généralement pas de même pour les essais de toxicité *in vivo* en raison du coût prohibitif des contrôles tant positifs que négatifs des protocoles d'essai. Les essais *in vitro*, en revanche, se prêtent à de tels contrôles qui permettent ainsi de normaliser les essais individuellement. En deuxième lieu, les essais de toxicité *in vitro* sont habituellement plus rapides et moins chers : on peut pour le même prix effectuer un plus grand nombre d'essais de produits chimiques.

En outre, les essais de toxicité *in vivo* posent un gros problème d'extrapolation des informations à l'homme et à d'autres organismes. Le problème des différences entre espèces ne se pose plus avec les essais *in vitro*, car on peut utiliser directement des cellules de l'espèce concernée. Lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité pour l'homme, on peut utiliser des cellules humaines dans les essais de toxicité *in vitro*. Un autre avantage est qu'on peut doser exactement la quantité de produit chimique apportée aux cellules, ce qui permet de déterminer avec précision les concentrations nocives de produit toxique. Par contre, *in vivo*, chez l'homme comme chez l'animal, il est souvent difficile de déterminer avec précision la dose de produit chimique présente dans les tissus affectés. Lorsque cette information est indispensable, on doit avoir recours à des analyses toxicocinétiques approfondies. Par ailleurs, on peut pratiquer des analyses *in vitro* sur des échantillons de cellules dans leur milieu naturel au contact direct du produit chimique et de ses métabolites. De plus il est possible d'effectuer des analyses à différents intervalles afin de suivre l'ordre chronologique des événements et de déceler les mécanismes associés aux réponses pathologiques. Un avantage supplémentaire des systèmes d'essais *in vitro* est qu'ils nécessitent de faibles quantités de substances d'essai. Ceci permet d'entreprendre des essais sur des composés qui sont au stade du développement et qui ne sont souvent disponibles qu'en quantités limitées. Enfin, les essais de toxicité *in vitro* ont l'avantage de réduire le nombre d'animaux requis pour les essais d'évaluation de toxicité, une amélioration que le public souhaite vivement (OCDE, 1990). Les toxicologues et toxinologues le souhaitent depuis plus longtemps (Meier *et al.*, 1986).

Cependant, dans l'état actuel de nos connaissances, les méthodes alternatives ne peuvent pas se substituer à l'animal lorsque les études portent sur l'organisme entier. En effet, les méthodes *in vitro*, même utilisées en batterie complémentaire, ne peuvent reproduire les mécanismes de régulation complexes et d'interactions entre cellules et organes. En revanche, la mise en place de stratégies dites « intelligentes » intégrant le principe des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement), telles que celles proposées dans le programme européen REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*), permettront de réduire de manière significative l'expérimentation animale. Des collaborations plus efficaces au niveau international doivent maintenant se mettre en place aussi bien au niveau des structures de validation, ECVAM (*European Center for the Validation of Alternatives Methods*), ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the validation of alternative methods*), JaCVAM (*Japanese center for the validation of alternative methods*) qu'au niveau des autorités réglementaires que sont l'UE (Union européenne), l'OCDE (Organisation de

Coopération et de Développement Economique), l'ICH (*International Conference on Harmonisation*), pour que les méthodes validées soient réellement appliquées. Enfin, la collaboration entre les différents secteurs industriels, de la chimie, du médicament, doit être encouragée afin d'éviter la répétition des efforts de recherche, de favoriser le partage des données sur les substances mais également le partage de l'expérience acquise sur les méthodes alternatives à l'expérimentation animale (Fabre, 2008).

II.2.2. Les tests de cytotoxicité *in vitro*

La cytotoxicité est définie comme étant les effets néfastes résultant de l'interaction d'une substance chimique ou agent physique avec les structures et/ou les processus essentiels à la survie cellulaire, la prolifération et/ou la fonction cellulaire (Eisenbrand *et al.*, 2002). Ces effets peuvent impliquer l'intégrité des membranes et le cytosquelette, le métabolisme cellulaire, la synthèse, la dégradation ou la libération de constituants ou de produits cellulaires, la régulation ionique, et la division cellulaire.

La plupart des tests de cytotoxicité sont essentiellement conçus pour estimer les réponses cellulaires à trois niveaux différents :

- (i) les réponses cellulaires de base, telles que la prolifération cellulaire, la viabilité et la mort cellulaire ;
- ii) les voies de transduction du signal (par exemple, les canaux ioniques et les messagers secondaires) ;
- (iii) la transcription de l'ADN/ la traduction des ARN (par exemple, protéines, métabolites cellulaires) (Kunz-Schutghart *et al.*, 2004).

Les tests de cytotoxicité *in vitro* sont utiles et nécessaires pour définir la cytotoxicité basale (par exemple la capacité intrinsèque d'un composé à provoquer la mort cellulaire à la suite de dommages aux fonctions cellulaires de base). Ils sont également nécessaires pour définir la plage de concentration toxique *in vitro* pour fournir des informations utiles sur les paramètres (génétoxicité, mutagénicité, apoptose). Ces tests sont, pour la plupart, faciles à réaliser et automatisables.

Plusieurs méthodes sont couramment utilisées pour l'évaluation de la cytotoxicité. Ces méthodes sont fondées essentiellement sur des perturbations de la perméabilité membranaire, des altérations de la prolifération cellulaire...

Après avoir recueilli, par l'une de ces méthodes, des données sur une série de produits chimiques, il est possible de déterminer leur toxicité relative. La toxicité relative d'un agent chimique, dans un test *in vitro*, est exprimée par la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) qui correspond à la concentration de produit entraînant une inhibition de 50% d'un processus cellulaire (par exemple la capacité d'absorption du rouge neutre) comparativement à des cellules non traitées. Cette valeur de CI₅₀ est utilisée pour comparer la toxicité *in vitro* de différents produits chimiques.

Il n'est pas facile de comparer la toxicité relative *in vitro* d'un produit chimique à sa toxicité relative *in vivo*, car de nombreux facteurs de confusion interviennent *in vivo*, tels que les facteurs toxicocinétiques (absorption, distribution, métabolisme, accumulation et excrétion), les mécanismes de réparation et les résultantes d'interaction systémiques. Par conséquent, il est seulement possible d'établir une corrélation entre les toxicités relatives *in vitro* et *in vivo*. Il faudra toutefois considérer potentiellement dangereux *in vivo* des substances pour lesquelles un certain niveau de toxicité a été trouvé *in vitro* (OCDE, 1990). En dépit de la complexité et des nombreuses difficultés que présente l'extrapolation des données obtenues *in vitro* aux fins d'une exploitation *in vivo*, ces tests *in vitro* se sont révélés très utiles en raison de leur simplicité et de leur faible coût. Ils peuvent être utilisés comme moyen de dépistage dans le développement de produits et également dans des stratégies séquentielles d'essais visant à obtenir des données requises par la réglementation. Dans certains cas, des recherches *in vitro* peuvent être, et sont, utilisées pour fournir des informations précieuses sur l'action de substances chimiques au niveau de la cellule. Dans certains cas, la toxicité cellulaire intrinsèque permet de prévoir la réponse toxicologique humaine (OCDE, 1990).

Les méthodes d'évaluation de la cytotoxicité couramment utilisées sont : le test au rouge neutre, le test au MTT et le test de la LDH.

II.2.2.1. Le test au rouge neutre.

L'utilisation du rouge neutre (RN) en tant qu'indicateur de cytotoxicité a été d'abord décrite dans un test viral de cytopathogénocité (Zhang *et al.*, 1990 ; Reddivari *et al.*, 2007). Le test au RN est un test reproductible et sensible spécifiquement développé pour le criblage de substances toxiques. Il est basé sur l'incorporation *in vitro* d'un colorant supravital, le rouge neutre, dans les lysosomes des cellules vivantes de mammifères. Ce test est réalisé sur des cultures de cellules. Le test au RN est capable de mesurer la mort cellulaire ou un dommage

provoqué par des produits chimiques toxiques. Les dommages à la surface des cellules ou des membranes lysosomales dues à l'action des produits chimiques diminue l'absorption du colorant.

Dans la plupart des applications, les cellules sont placées dans des boîtes de culture comportant 96 puits de 6,4 mm de diamètre. Chaque puits ne pouvant être utilisé que pour une seule détermination, cette disposition permet de tester en double échantillon de multiples concentrations du produit chimique avec des contrôles positifs et négatifs. Après traitement des cellules par des concentrations du produit chimique à tester croissantes d'au moins deux ordres de grandeur (de 0,01 mM à 1 mM, par exemple) et par des produits chimiques contrôles positifs et négatifs, les cellules sont rincées et traitées au rouge neutre, colorant absorbé et retenu par les cellules vivantes uniquement. Le colorant peut être ajouté immédiatement après élimination du produit chimique testé pour déterminer les effets immédiats, ou à des intervalles variables après son élimination pour préciser les effets cumulatifs ou différés. L'intensité de la coloration correspond au nombre de cellules vivantes dans chaque puits. On utilise pour cela un spectrophotomètre équipé d'un lecteur de plaque programmé qui mesure l'intensité de chacun des 96 puits de la boîte de culture. Cette méthode automatisée permet de réaliser rapidement une étude concentration-réponse et d'obtenir des données statistiques.

II.2.2.2. Le test au MTT

Le test MTT (3[4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium bromure) est une méthode relativement simple couramment utilisées pour évaluer la viabilité cellulaire (Mueller *et al.*, 2004 ; Patel et Patel, 2010). Le MTT est un colorant de type tétrazolium qui est réduit par les enzymes mitochondriales en un produit formazan bleu qui précipite. Seules les cellules dont les mitochondries sont viables vont donner cette réaction ; en conséquence, l'intensité de la couleur est directement proportionnelle au degré d'intégrité des mitochondries. Lorsque les cellules sont détruites ou endommagées, la réduction du MTT en formazan est réduite. Il s'agit d'un test utile pour détecter des composés cytotoxiques en général ainsi que les agents ayant les mitochondries pour cible spécifique.

II.2.2.3. Le dosage de la LDH

La mesure de l'activité de la lactico-déshydrogénase (LDH) est également très utilisée pour étudier la cytotoxicité (Patel et Patel, 2010 ; Lobner, 2000). Cette enzyme, normalement présente dans le cytoplasme des cellules vivantes, est libérée dans le milieu de culture lorsque les membranes cellulaires sont lésées par un agent toxique. Des prélèvements de petites quantités de milieu de culture effectués à différents moments après le traitement chimique des cellules permettent de mesurer la quantité de LDH libérée dans le milieu et de suivre le déroulement de la toxicité en fonction du temps. Bien que la libération de LDH constitue une évaluation très générale de la cytotoxicité, elle n'en est pas moins utile parce qu'elle est facile à réaliser, et ce en temps réel. Une libération continue de LDH dans une culture signe aussi une mort par nécrose.

II.2.3. La toxicité au niveau d'un organe cible

On peut également utiliser les tests *in vitro* pour évaluer la toxicité au niveau d'un organe cible. La conception de ces tests pose de nombreuses difficultés, la plus notable étant l'impossibilité de maintenir à terme les particularités de l'organe *in vivo* au moyen d'un système *in vitro*. Il arrive très souvent qu'une fois prélevées sur l'animal et mises en cultures, les cellules se dégradent rapidement ou qu'elles se différencient, c'est-à-dire qu'elles perdent les fonctions spécifiques de l'organe pour reprendre un état indifférencié. En très peu de temps, généralement quelques jours, les cultures ne permettent plus d'évaluer les effets toxiques spécifiques d'une substance sur un organe donné (Zurlo, 2000).

CHAPITRE III : TOXICITE DES PLANTES MEDICINALES

I. LES PLANTES TOXIQUES

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves voire mortels (Fournier, 2001).

Les plantes toxiques peuvent occasionner des lésions, internes ou externes, à l'organisme humain ou animal en cas de contact ou d'ingestion d'une quantité relativement faible de graines, de racines, de feuilles, de fruits ou de sève.

La toxicité d'une plante dépend de nombreux facteurs, comme par exemple de la partie de la plante incriminée, de la façon dont l'organisme est entré en contact avec cette plante, de la dose à laquelle l'organisme a été exposé, de l'état général de cet organisme, etc. Certaines substances toxiques de plantes peuvent être neutralisées sous l'effet de la cuisson ou du séchage. Mâcher ou broyer une plante peut libérer des substances toxiques qui peuvent par la suite être absorbées par la muqueuse buccale.

II. LES CIRCONSTANCES DE L'INTOXICATION

Les plantes sont à l'origine de nombreuses intoxications à travers le monde. Ces intoxications concernent principalement l'enfant et sont généralement bénignes en raison, soit de la faible quantité ingérée, soit d'une toxicité peu importante du végétal consommé. Chez l'adulte, elles sont rares et surviennent soit dans un contexte suicidaire, soit par confusion avec une plante comestible, soit par utilisation de la plante dans un but addictif ou thérapeutique. Ces intoxications peuvent être graves et mettre en jeu le pronostic vital (Flesch, 2012).

D'après les centres antipoisons et de toxicovigilance (CAPTV) en France, les plantes sont à l'origine d'environ 5% des intoxications signalées (Flesch, 2005). Au Maroc, les plantes étaient impliquées dans 3 à 5% de l'ensemble des intoxications selon le Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM), mais entraînaient une mortalité assez élevée (17 %) (Khattabi *et al.*, 2000 ; Ouammi *et al.*, 2009).

Les intoxications volontaires ou accidentelles sont dues à des métabolites secondaires produits dans les plantes appartenant à de nombreuses familles botaniques. Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

III. QUELQUES METABOLITES SECONDAIRES TOXIQUES DES PLANTES MEDICINALES

Les plantes produisent un grand nombre de composés dont on ignore souvent le rôle exact dans la plante. Certains de ces composés appelés métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. On a découvert récemment que bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes mais ces métabolites peuvent se révéler bénéfique ou toxique pour l'homme et les animaux (Harborne, 1993 ; Hopkins, 2003).

La plupart des plantes incriminées dans des cas d'intoxication contiennent une ou plusieurs substances toxiques et une bonne proportion de celles-ci renferment des poisons non identifiés à ce jour (Fournier, 2002).

Les principaux métabolites secondaires toxiques des plantes sont les alcaloïdes, les saponosides, les hétérosides cardiotoniques, les glycosides cyanogéniques...

III.1. Les alcaloïdes

Ce sont des substances organiques communément rencontrées chez 15 à 20 % des plantes vasculaires. Le goût amer de ces substances en plus de leur toxicité sont généralement suffisants pour repousser les herbivores. On retrouve dans ce groupe la quinine, la nicotine, la strychnine ainsi que la morphine, la cocaïne, la mescaline qui sont des drogues puissantes. Elles peuvent affecter le fonctionnement du système nerveux et provoquer des tremblements, de l'incoordination, des bradycardies, le coma et la mort par arrêt respiratoire (Fournier, 2002).

III.2. Les Saponosides

Les saponosides ou saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très répandus dans le règne végétal (Bruneton, 1993). Ils ont en commun leur structure et surtout un ensemble de propriétés physico-chimiques et physiologiques (Charpentier, 2008). Ce sont des glucosides qui ont la caractéristique de produire une mousse. La racine des plantes contenant ce type de toxine était utilisée à l'origine pour faire du savon (Fournier, 2002). Les saponosides en plus de leur propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoire, anti-oedémateux, analgésiques, immunomodulatrice...) sont également toxiques.

Les effets toxiques des saponosides sont très variables. Bien qu'ils ne soient pas particulièrement toxiques pour les mammifères, les saponosides sont des irritants cellulaires sur différents organes, diurétique (sur les cellules rénales), expectorants sur le parenchyme pulmonaire, hémolytiques (sur les hématies par contact direct et non par ingestion). Ils sont toxiques sur les organismes unicellulaires et animaux à sang froid et cytotoxiques (Hopkins, 2003 ; Charpentier, 2008 ; Bruneton, 2009).

L'intoxication par des saponosides provoquerait la perte d'appétit, l'apathie chez l'animal, des pertes de poids, des gastro-entérites et des diarrhées.

III.3. Les hétérosides cardiotoniques

Les hétérosides cardiotoniques sont un groupe de composés dont la structure est semblable aux saponosides (Malcolm, 1991). Ils diffèrent des autres hétérosides stéroïdiques par la présence d'un cycle lactone à 4 ou 5 carbones (lié sur le C17).

Les hétérosides cardiotoniques ont une action tonique sur le cœur et les vaisseaux. Ils provoquent également une contraction des fibres musculaires lisses du tractus gastro-intestinal, des bronches et de l'utérus à dose toxique par un mécanisme d'accroissement des mouvements transmembranaires du calcium et d'inhibition des transports de sodium et potassium (Roux et Catier, 2007 ; Cohen et Jacquot, 2008). Ils agissent également sur le système nerveux central (SNC) au niveau du centre du vomissement et du centre de la vision, provoquant des nausées, vomissements et des troubles visuels. Ils ont aussi une action diurétique sur les reins (Joly, 2010).

III.4. Les glycosides cyanogéniques

Cette substance une fois altérée en présence d'enzymes dans la plante produira de l'acide cyanhydrique (HCN) qui est hautement toxique pour l'animal car il interfère avec le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Fournier, 2002).

III.5. Les coumarines

La dicoumarine produite par des microorganismes tels que les moisissures est un puissant anticoagulant qui peut entraîner chez l'animal une hémorragie interne mortelle (Fournier, 2002).

III.6. Les glucosinolates

Ils peuvent causer une réduction de la croissance, des lésions aux reins et au foie, si consommés en grande quantité (racine, graines ou feuilles) (Fournier, 2002).

IV. TOXICITE DES PLANTES A HETEROSIDES CARDIOTONIQUES

Les plantes à hétérosides cardiotoniques sont des plantes qui renferment des substances toxiques pour le cœur et mortelles à certaines doses en provoquant un arrêt cardiaque. Les molécules extraites de ces plantes servent à préparer des médicaments cardiotoniques dans l'industrie pharmaceutique.

IV.1. Caractéristiques structurales des hétérosides cardiotoniques

La molécule de base des hétérosides cardiotoniques est constituée de trois parties : un noyau stéroïde, un groupement glycoside et un groupement lactone. Selon le type du groupement lactone, on distingue les cardénolides (avec un groupement butyrolactone insaturé) et les bufadiénolides (avec un groupement pyrone insaturé) (Juncker, 2010) (figure 1). De plus la fraction osidique des hétérosides cardiotonique est constituée d'oses particulièrement rares, dont certains ne sont présents naturellement que dans ce type de molécules (exemple du digitoxose de la digitoxine, un hétéroside cardiotonique de la digitale) (Figure 2).

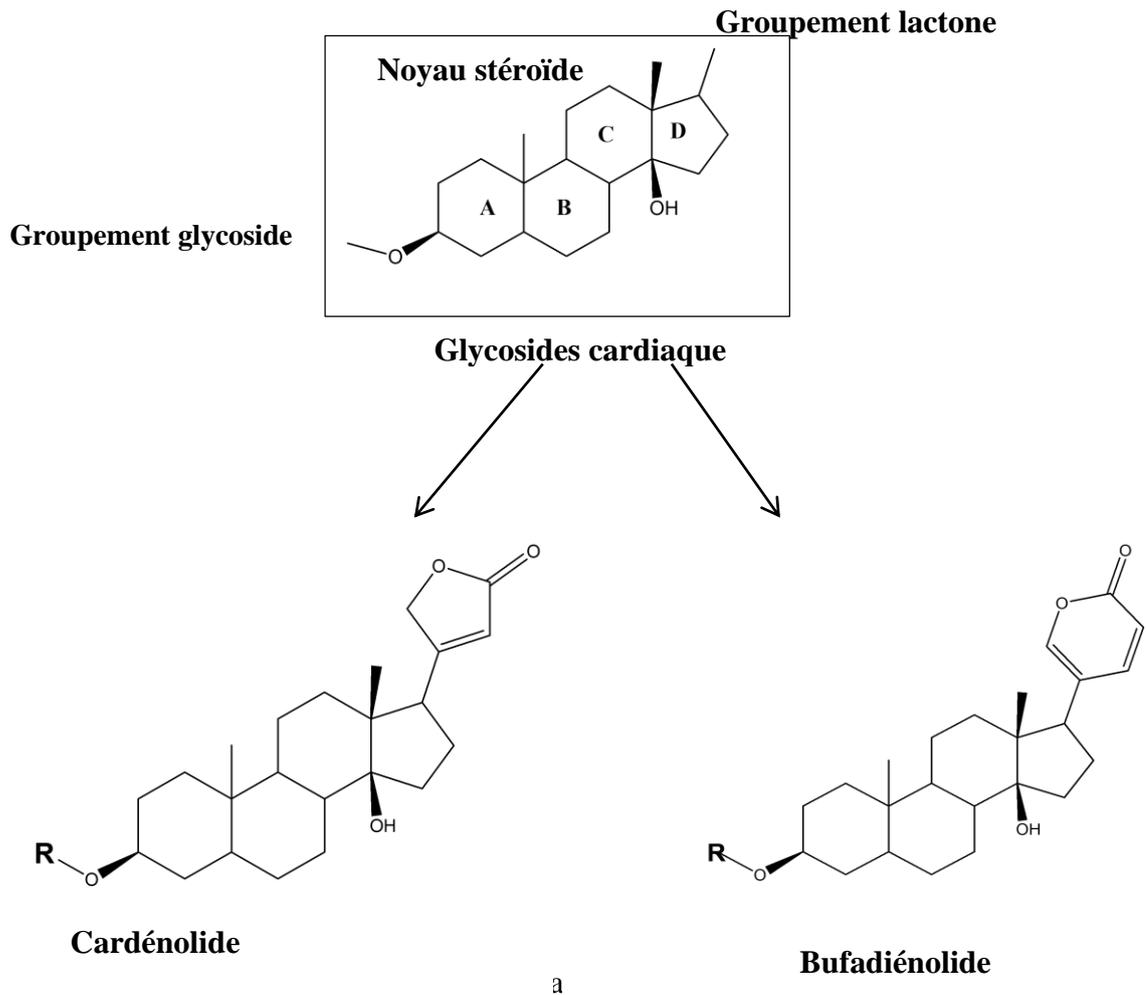


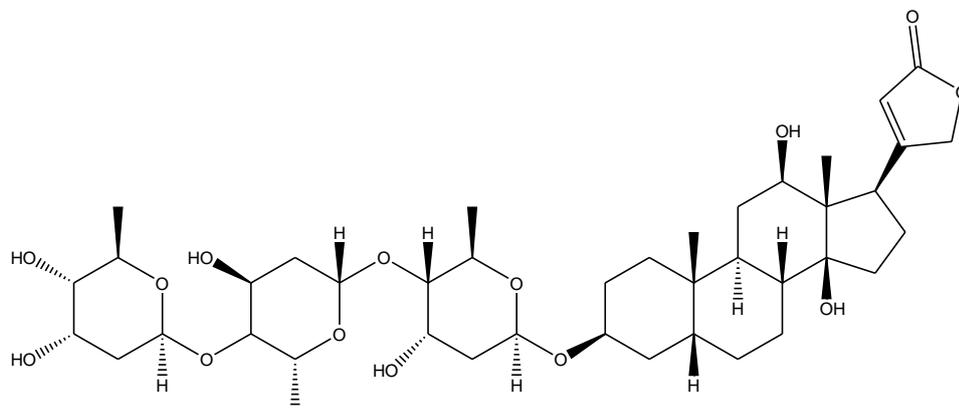
Figure 1 : Caractéristiques structurales des hétérosides cardiotoniques (D'après Juncker, 2010, modifié)

La partie non glucidique appelée génine ou aglycone composé d'un noyau cyclopentanoperhydrophenenthrène, d'un cycle lactonique non saturé en C17 et d'un radical hydroxyle en C14 est responsable de l'activité cardiotonique des hétérosides (Joly, 2010). L'élimination du cycle lactonique pentagonal ou la saturation de la double liaison induit une forte diminution de l'activité.

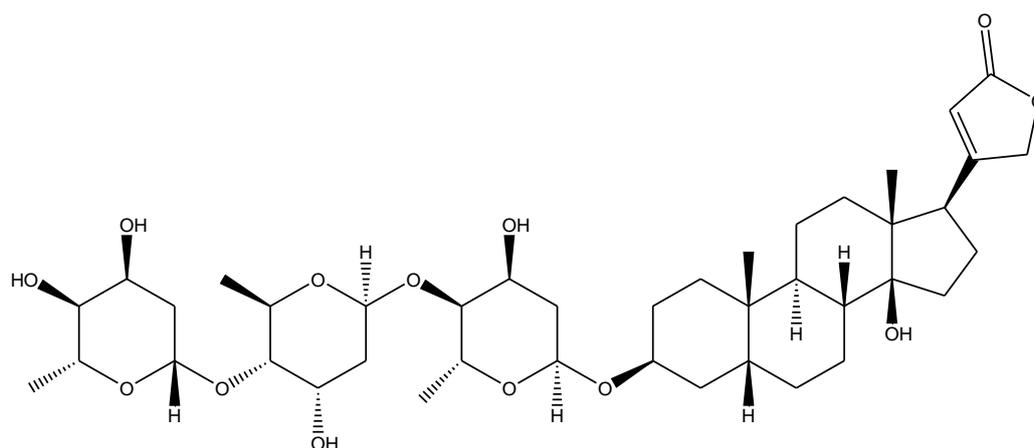
La configuration spatiale des cycles A, B intervient également dans l'activité. Habituellement, l'enchaînement des quatre cycles A, B, C et D du noyau stéroïdique est de types *cis-trans-cis*. La présence des cycles C, D en *cis* est obligatoire, en configuration *trans*, la molécule est inactive. Les molécules dont les noyaux A et B sont en configuration *trans* ont une activité

bien moindre qu'en configuration *cis*. Exemple : l'uzarigénine isomère *trans* de la digitoxigénine est moins active.

La partie osidique n'intervient pas directement dans l'activité des hétérosides mais sa présence l'augmente et la module en faisant varier la polarité de la molécule et par conséquent sa liposolubilité (nombre de groupements OH de la molécule) (Joly, 2010).

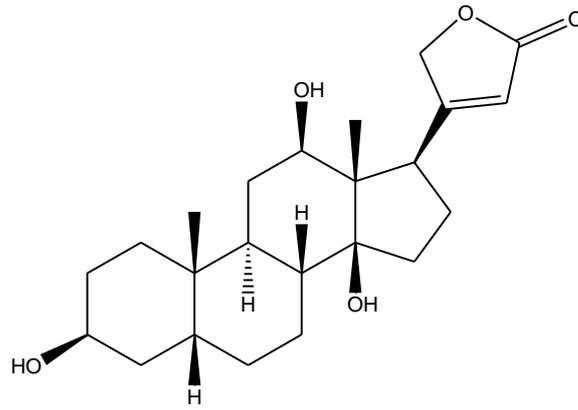


Digoxine

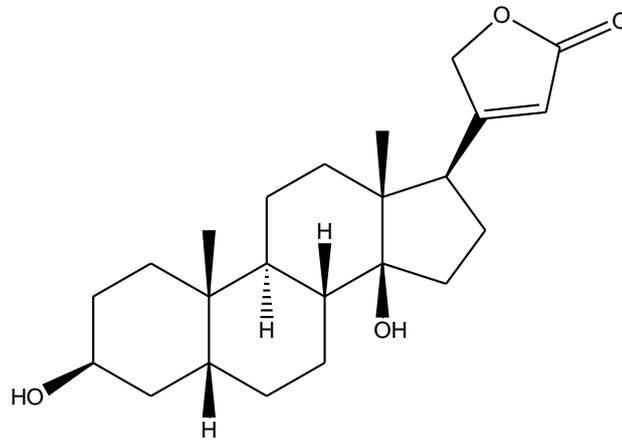


Digitoxine

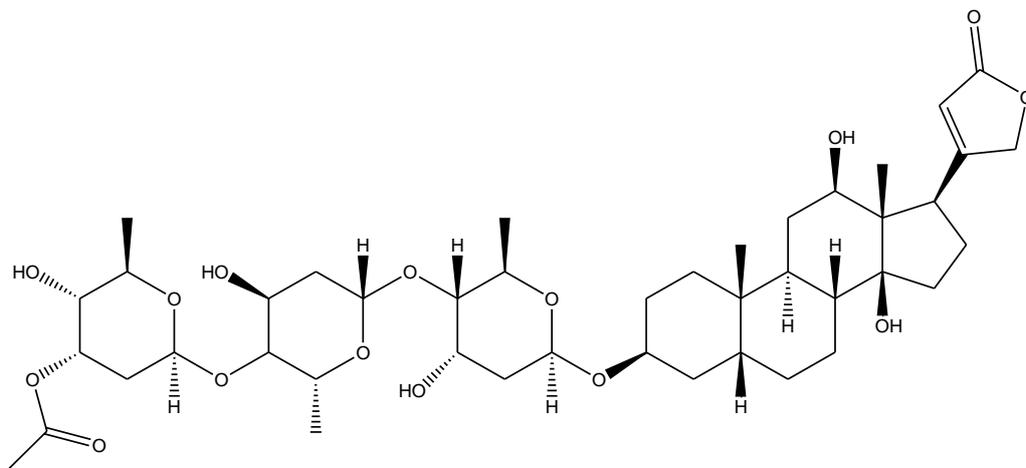
Exemple : Les feuilles de la digitale laineuse (*Digitalis lanata* Ehrh., famille des Scrophulariaceae) cultivée servent pour l'extraction de la digoxine, digitoxine, médicaments cardiotoniques utilisés en médecine (Joly, 2010).



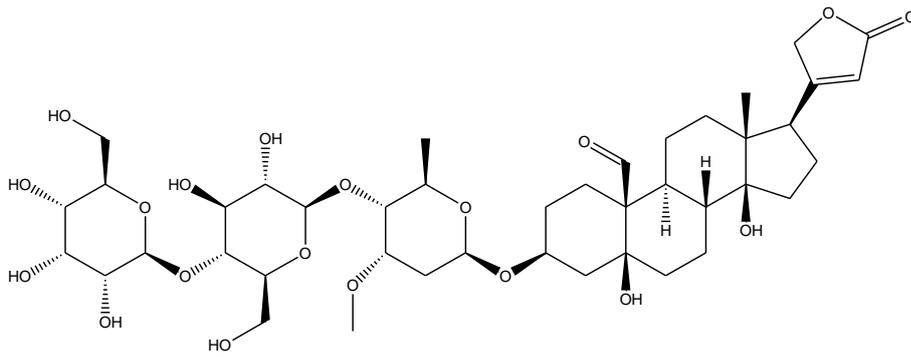
Digoxigénine



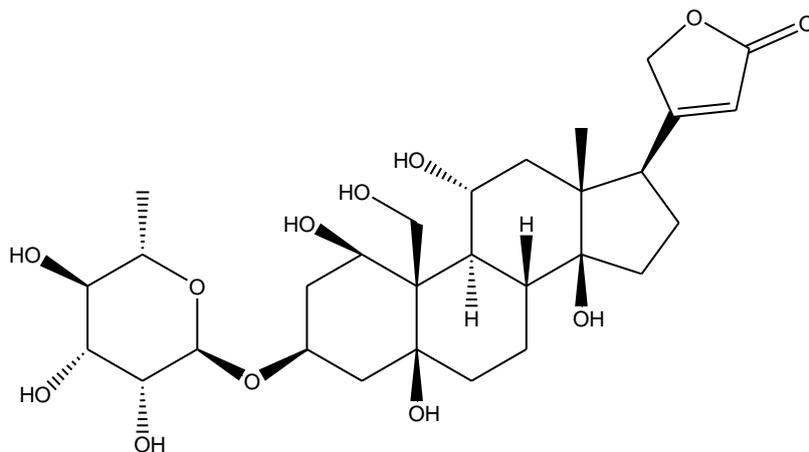
Digitoxigénine



Acétyldigoxine



K-strophantine



Ouabaine (ou G-Strophantine)

Exemple : l'Ouabaine est extraite de la stropane (*Strophantus grattus* (Wall. & Hook.) Baill., famille des Apocynaceae) (Joly, 2010)

Figure 2: Illustrations des structures chimiques de quelques cardénolides

IV.2. Mécanisme d'action toxique des hétérosides cardiotoniques

Contrairement à de nombreux autres composés toxiques des plantes, les cardénolides agissent d'une manière très spécifique, car ils sont des inhibiteurs spécifiques de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, une enzyme transmembranaire de type P qui utilise l'énergie libérée par la dégradation de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) et ADP (Adénosine Di-Phosphate) et phosphore inorganique pour transporter des ions à travers la membrane. Elle permet d'échanger activement (contre le gradient de concentration) 3 ions sodium (Na^+) intracellulaires contre 2 ions potassium (K^+) extracellulaire participant ainsi au maintien du potentiel de repos de la cellule et le transport actif secondaire (Jorgensen et al., 2003 ; Joly, 2010) (Figure 3a). La pompe Na^+/K^+ -ATPase est présente au sein de la membrane plasmique

de toutes les cellules et est composée de trois sous unités, α , β et γ . La sous unité α comporte le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, assure les transports ioniques et fixe les digitaliques (Landry et Gies, 2014). Les Cardénolides se lient aux segments extracellulaires des sous-unités α de l'enzyme, avec le cycle lactone profondément insérée dans le domaine transmembranaire et le fragment glucidique en regard du milieu extracellulaire (Ogawa et al, 2009 ; Yatime et al, 2011). L'inhibition de la pompe Na^+/K^+ -ATPase par les cardénolides entraîne une augmentation du sodium cytosolique qui provoque un ralentissement, voire une inversion de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou NCX, responsable d'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol. L'augmentation du calcium dans les fibres musculaires cardiaques entraîne une augmentation de la contraction myocardique (effet inotrope positif). L'effet chronotrope négatif correspond à la diminution de la conductibilité ce qui entraîne un ralentissement de la vitesse de conduction auriculo-ventriculaire (Joly, 2010 ; Landry et Gies, 2014) (figure 3b).

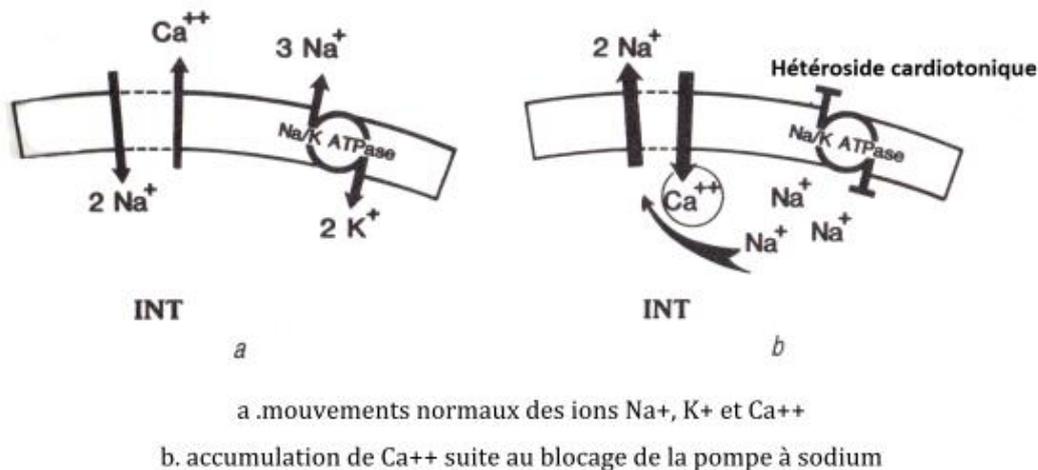


Figure 3: Coopération entre la pompe à sodium et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dans l'effet de digitaliques (D'après Joly, 2010 modifié)

**DEUXIEME PARTIE : NOTRE
TRAVAIL**

OBJECTIFS DE L'ETUDE

OBJECTIF DE L'ETUDE

Objectif général

Etudier la toxicité d'extraits des écorces de racines de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (ASCLEPIADACEAE) pour une meilleure sécurité d'emploi thérapeutique des formulations pharmaceutiques contenant les produits de cette plante médicinale.

Objectifs spécifiques

- ☞ Mener une étude phytochimique d'extraits type d'écorces de racines de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. ;
- ☞ Déterminer la toxicité générale aiguë des extraits totaux (aqueux et hydroalcoolique) et de l'extrait enrichie en hétérosides cardiotoniques des écorces de racines de la plante chez la souris NMRI ;
- ☞ Evaluer la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux total des écorces de racines de la plante chez le rat Wistar ;
- ☞ Evaluer les effets toxiques cardiovasculaires de l'extrait aqueux de la plante chez le rat Wistar ;
- ☞ Réaliser des tests de cytotoxicité de l'extrait aqueux total des écorces de racines de la plante sur des lignées cellulaires.

CADRE DE L'ETUDE

Notre étude a été réalisée dans des laboratoires de trois pays (Burkina Faso, Mali et France) dans le cadre d'une collaboration inter-laboratoires de types universitaire. Ce sont :

➤ **Au Burkina Faso**

- Le laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé à l'Ecole Doctorale de Santé de l'Université de Ouagadougou. Ce laboratoire a servi de cadre pour les études de toxicologie expérimentale *in vivo* ;

- Le laboratoire d'anatomie et cytopathologie du Centre Hospitalier Universitaire-Yalgado Ouédraogo (CHU-YO) de Ouagadougou pour les examens histologiques des organes lors de l'étude de la toxicité sub-chronique sur animale ;

- Le laboratoire de chimie du Département MEPHATRA/PH de l'IRSS/CNRST de Ouagadougou pour une partie de l'étude phytochimique ;

➤ **Au Mali**, nos travaux ont été conduits au sein du Département de Médecine Traditionnelle (DMT) de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) de Bamako où une étude phytochimique complémentaire a été réalisée.

➤ **En France** et plus particulièrement à Bordeaux, notre travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée de l'Université Victor Ségalen de Bordeaux 2 (Bordeaux). Dans ce laboratoire nous avons conduit les tests de cytotoxicité *in vitro* de nos extraits.

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué des écorces de racines fraîches de *C. procera* récoltées à Roumtemga, localité située à 25 km au nord-est de la ville de Ouagadougou, capitale du Burkina Faso, pays de savane, en Juillet 2010 (saison de pluie, température d'environ 30°C avec une humidité relative élevée). L'échantillon de la plante a été identifié et authentifié à l'Herbier National du Burkina (HNBU) au Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (CNRST) où un spécimen de référence a été déposé sous le numéro HB 8716 (Attestation de dépôt, annexe 3).

Les écorces ont été lavées à l'eau du robinet destinée à la consommation humaine, séchées sous ventilation à l'abri du soleil et de la poussière pendant deux semaines puis broyées à l'aide d'un broyeur de laboratoire (Broyeur à lames, Gladiator Est. 1931 Type BN 1 Mach. 40461 1083). La poudre obtenue a servi à la préparation des extraits et à la caractérisation des différents groupes chimiques.

I.2. Matériel biologiques

Ils étaient constitués :

➤ Des Souris mâles et femelles de souche NMRI (poids moyen 27 ± 4 g) et des Rats Wistars mâles et femelles (poids moyen 160 ± 42 g). Ils ont été utilisés pour les différents tests de toxicologie expérimentale *in vivo*. Ces animaux provenaient du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone subhumide (CIRDES) de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Ils ont été stabulés dans des cages en polystyrène avec un accès libre à l'eau courante et des granulés alimentaires standards de laboratoire (tourteaux de blé enrichi avec 29% de protéines). Les animaux sont acclimatés dans un environnement contrôlé à l'animalerie de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (Université de Ouagadougou, Burkina Faso) à la température de 23-25°C, 50 à 60% d'humidité et un cycle de lumière-obscurité de 12 heures deux semaines avant l'utilisation pour le respect de leur cycle nyctéméral.

➤ Des lignées de cellules Caco-2 (Human Caucasian colon adenocarcinoma, ($\Delta p53$:mut p53)) et Neuro-2a (Mouse Albino neuroblastoma) ont été utilisées pour les tests de cytotoxicité. Ces cellules proviennent de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures) pour les cellules Caco-2 et de l'ATCC (American Type Culture collection) pour les cellules Neuro-2a. Ces cellules sont congelées dans des cryotubes et conservées dans de l'azote liquide à -196°C avant d'être décongelées et mises en culture.

I.3. Le témoin Digoxine

Il était constitué de :

- digoxine en comprimé sécables à 0,25 mg (blanc) (DIGOXINE NATIVELLE® 0,25 mg, boîte de 30 comprimés, sous plaquette thermoformée) utilisée pour les réactions de caractérisation des cardénolides par CCM et

- de digoxine en solution injectable IV adulte à 0,5 mg/2 ml (Ampoules de 2 ml, boîte de 6, laboratoire TEOFARMA) utilisé pour témoins de référence pour le dosage des cardénolides par spectrophotométrie UV.

I.4. Matériel techniques

I.4.1. Matériel de l'étude phytochimique

I.4.1.1 Matériel d'extraction et de caractérisation

Le matériel d'extraction et de caractérisation était constitués de :

- Broyeur à lames (Gladiator Est. 1931 Type BN 1 Mach. 40461 1083)
- Verreries diverses de laboratoire (ballons, erlenmeyers, fioles, béchers, éprouvettes graduées, entonnoirs en verre, pipettes, flacons, ampoule à décanter, tubes à essai etc.)
- Etuve de marque Memmert Type UL30 F-Nr. 840 452 ($30-220^{\circ}\text{C}$)
- Evaporateur rotatif de type Büchi RE 11, Rotavapor muni d'un Büchi436 Water Bath (photo 5)
- Centrifugeuse (Type 4225 Centrifuge) non réfrigérée (maximum 6000 RPM avec le rotor ALC 5883)
- Balance de précision type Sartorius modèle 1702 001 (sensibilité 1/10 mg ; portée maximale 202 grammes)
- Chromatoplaque (support aluminium ; adsorbant : gel de silice 60F254)

- Détecteur Lampe Ultra-Violet (CAMAG CAT.No 29010 SER.No. 890664 ; $\lambda = 254$ et 366 nm)
- Lyophilisateur Marque CHRIST® Type ALPHA 1-2 (BIOBLOCK SCIENTIFIC) muni d'une pompe (Marque ROTARY VANE VACUUM PUMP Type RZ2 série21525419).
- Spectrophotomètre (Agilent type 8453)
- Mortier et pilon en porcelaine
- Distillateur pour eau distillée (distillation simple)
- Bain-marie type Fischer scientifique Polytest 20 (plage de température : 20 à $99,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$)
- Cuves pour CCM type CAMAG (20x10cm) avec couvercles en inox
- Papiers filtres Wattman
- Chauffe-ballon



Photo 5 : Evaporateur rotatif, (laboratoire de chimie du MEPHATRA-PH/IRSS, 2011)

I.4.1.2. Solvants et réactifs

Les réactifs des tests de caractérisation étaient constitués de :

- solution d'anhydride acétique (Sigma-Aldrich, France)
- réactif de Dragendorff
- réactif de Mayer
- réactif de Shibata

- solution de méthanol 95% (Prolabo, France)
- solution d'éthanol 90% (CARLO ERBA, France)
- solution d'ammoniaque 25% (Merck, Allemagne)
- solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) (Sigma-Aldrich, France)
- carbonate de calcium anhydre (Sigma-Aldrich, France)
- pastilles de soude (Merck, Allemagne)
- solution d'acide 3,5-dinitrobenzoïque 1% (Sigma-Aldrich, France)
- trichlorure de fer (FeCl₃) (LABOSI, France)
- solution d'acétate d'éthyl à 99,5 % (CARLO ERBA, France)
- solution d'acide acétique glacial à 99,8 % (Prolabo, France)
- solution d'acétone à 99,7 % (Sigma-Aldrich, France)
- solution de Chloroforme à 99 % (Sigma-Aldrich, France)
- solution de 2-butanol (Sigma-Aldrich, France)
- solution d'acide acétique (Sigma-Aldrich, France)
- solution d'acide chlorhydrique (Prolabo, France)
- acétate de plomb (Merck, Allemagne)
- Toluène (Sigma-Aldrich, France)
- Digoxine[®] 0,25

Les solvants étaient constitués de :

- Eau distillée
- Méthanol (Prolabo, France)
- Ethanol (50°, 60°, 70°, absolu) (CARLO ERBA, France)
- Buthanol (Prolabo, France)
- Dichlorométhane (Sigma-Aldrich, France)
- Ether de pétrole (CARLO ERBA, France)

Les révélateurs étaient constitués du réactif de Godin, de l'AlCl₃ et du réactif de Dragendorff).

Tous les réactifs et solvants utilisés étaient de grade analytique.

I.4.2. Matériel de l'étude de la toxicité aiguë et subchronique

Le matériel d'étude de la toxicité générale aiguë et subchronique chez les souris et rats était constitué de :

- seringues de gavage (sonde gastro oesophagienne) et seringues de 1 cm³ graduées pour l'administration des extraits ;
- verreries diverses ;
- balance Sartorius modèle 1702 001 (sensibilité 1/10mg ; portée maximale 220 grammes) pour la pesée des poudres de drogues ;
- Balance Berkel (Type E 811709 ; portée maximale 5kg, minimale 0,005kg) pour la pesée des souris et des rats.

I.4.3. Matériel de l'étude de la toxicité cardiovasculaire

Le matériel de l'étude de la toxicité cardiovasculaire était constitué du Dispositif de mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque Blood Pressure Recorder 58500 (Ugo Basile, Italie, Photo 6)



Photo: G. OUEDRAOGO, U.O. (2011)

Photo 6: Dispositif de mesure de la Pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Blood Pressure Recorder 58500) *in vivo*

I.4.4. Matériel de l'étude de la cytotoxicité

I.4.4.1. Matériel de laboratoire

Le matériel de l'étude de la cytotoxicité était constitué de :

- Flasque Nunc T-75 (PolyLabo- Nunc, Strasbourg, France) pour la culture et l'entretien des cellules ;
- Plaques 6 et 96 puits (PolyLabo- Nunc, Strasbourg, France) ;
- Hotte à flux laminaire ESI FLUFRANCE EUROPEENNE ;
- Incubateur (Jouan IG 150, France) avec CO₂;
- Microscope à phase inversé ;
- Micropipettes automatiques
- Centrifugeuse réfrigéré (Eppendorf 5804 R)
- un agitateur de plaques
- balance analytique ;
- Microplate Reader LT-4000 (Labtech, France) couplé à un système informatique de recueil de données ;
- Spectrophotomètres Nano Drop 2000c (Thermo Scientific, USA) couplé à un système informatique de recueil de données.

I.4.4.2. Milieux de culture, solvants et réactifs

Les milieux de culture étaient constitués de milieux complet et non complet DMEM et RPMI (voir composition en annexe 5).

Les solvants et réactifs étaient constitués de : Trypsine, Tampon PBS, MTT, Rouge Neutre, DMSO...

II. METHODES

II.1. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

II.1.1. Réactions de caractérisation en tube

Les réactions de caractérisation en tube ont été réalisées selon une adaptation de la méthode classique proposée par Ciulei en 1982.

II.1.1.1. Caractérisation des Alcaloïdes

a. Solution à analyser

Dix grammes (10 g) de poudre végétale ont été introduits dans un erlenmeyer de 250 mL et macéré pendant 24 h dans 50 mL d'une solution d'acide sulfurique concentré diluée au 10^{ème}. Ce mélange a été filtré sur de la compresse puis du coton, et le volume du filtrat a été ajusté à 50 mL à l'aide de l'eau distillée.

b. Caractérisation : réaction de précipitation

Une caractérisation par précipitation a été réalisée en introduisant dans 2 tubes à essai 1 mL de filtrat. Dans chacun des deux tubes, on a ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer ou celui de Dragendorff. Au bout de 15 min d'observation, l'apparition d'un précipité dans l'un ou l'autre tube permet de conclure à la présence des alcaloïdes dans le filtrat. L'apparition d'un précipité blanc en présence du réactif Mayer indique la présence d'alcaloïdes vrais. L'apparition d'un précipité rouge à orangé en présence du réactif de Dragendorff indique la présence d'alcaloïdes et ammoniums quaternaires (bétaines).

Un test négatif permet de conclure à l'absence d'alcaloïde sous toute forme (alcaloïdes vrais ou alcaloïdes quaternaires) (Ciulei, 1982).

II.1.1.2. Caractérisation des substances polyphénoliques.

a. Solution à analyser

Un infusé de 15 min avec 5 g de poudre végétale dans 100 mL d'eau distillée bouillante a été réalisé dans un erlenmeyer de 250 mL. Le mélange a été filtré à chaud sur de la compresse et le filtrat a été ajusté à 100 mL à l'aide d'eau distillée chaude.

b. Caractérisation

➤ Les tanins

Cinq millilitres (5 mL) d'infusé à 5% ont été introduits dans un tube à essai. On y a ajouté 1 mL d'une solution aqueuse diluée de FeCl₃ à 1%. En présence de tanins il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre (Ciulei, 1982).

➤ **Les flavonoïdes**

A 5 mL d'infusé présentant une coloration plus ou moins foncée, 5 mL d'une solution d'acide Sulfurique à 10% et 5 mL d'une solution de NH₄OH à 50% ont été successivement ajoutées. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique (addition de 5 mL de NH₄OH à 50%), on peut conclure à la présence d'anthocyane.

➤ **La réaction à la cyanidine pour la caractérisation des flavones, flavanones, flavonones, flavanonols, des hétérosides flavoniques**

On a introduit 5 mL d'infusé dans un tube à essai, puis on a ajouté 5 mL d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95°alcoolique, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volume) et 1 mL d'alcool isoamylique ainsi que quelques copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de crépitation pendant quelques minutes.

L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose- violacée (flavanones) ou rouge (Flavonones, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageant l'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine).

Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques.

La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les catéchines et les isoflavones.

La réaction à la cyanidine a été effectuée sans ajout des copeaux de magnésium, mais en chauffant pendant 15 mn au bain-marie.

En présence de leucoanthocyane, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée tandis que les catéchols donnent une teinte brun-rouge.

II.1.1.3. Caractérisation des dérivés anthracéniques

a. Solution à analyser

➤ **Extrait chloroformique**

A un gramme (1 g) de poudre de racine de *C. procera*, 10 mL de chloroforme ont été ajoutés et le mélange chauffé prudemment au bain-marie bouillant pendant 3 min. Après filtration à chaud, le filtrat a été ajusté à 10 mL par le même solvant.

➤ **Hydrolyse acide**

A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, 10 mL d'eau distillée et 1 mL d'acide chlorhydrique concentré ont été ajoutés dans un tube à essai. Le tube à essai a été

maintenu dans le bain-marie bouillant pendant 15 min, puis a été refroidi sous un courant d'eau et le contenu filtré. Le filtrat a été ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée.

b. Caractérisation (Réaction de Bornträger)

➤ **Dérivés anthracéniques libres**

Un millilitre (1 mL) d'extrait chloroformique et 1 mL de NH₄OH 50% dilué au ½ ont été introduits dans un tube à essai puis le mélange agité. L'apparition d'une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'antraquinones libres.

➤ **Dérivés anthracéniques combinés**

▪ **O-Hétérosides**

Cinq millilitres (5 mL) d'hydrolysate acide ont été agités avec 5 mL de chloroforme dans un tube à essai. Après repos, la phase organique a été prélevée et introduite dans un autre tube à essai. Une solution diluée au ½ de NH₄OH y a été ajoutée et l'ensemble agité.

La présence d'antraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense. Si la réaction est négative ou faiblement positive, rechercher les O-hétérosides à génine réduite.

A 5 mL d'hydrolysate acide ont été ajoutées 3 à 4 gouttes de solution de FeCl₃ à 10 % puis le mélange chauffé pendant 5 min au bain-marie à 90°C. Après refroidissement, 5 mL de chloroforme ont été ajoutés et le mélange agité. La phase chloroformique prélevée a été agitée dans un tube à essai en présence d'un millilitre (1 mL) de NH₄OH dilué au ½. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou anthrones, la coloration rouge devient plus intense que précédemment.

▪ **C-hétérosides**

La phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides a été reprise par 10 mL d'eau distillée et 1 mL de FeCl₃ à 10% a été ajouté au mélange. Le tube à essai a été maintenu dans un bain-marie bouillant pendant 30 min. Après refroidir et agitation avec 5 mL de chloroforme, la phase chloroformique a été soutirée et mélangée à 1 mL de NH₄OH 50% dilué au ½ dans un tube à essai. Une agitation fait apparaître une coloration rouge plus ou moins intense qui indique la présence de génines de C-hétérosides.

II.1.1.4. Caractérisation des stérols et triterpènes

a. Solution à analyser

Dans un tube à essai, 1 g de poudre de racine de *C. procera* a été macéré (au réfrigérateur) pendant 24 heures en présence de 20 mL d'éther de pétrole. Le mélange a été filtré sur papier filtre et le filtrat ajusté à 20 mL avec de l'éther de pétrole.

b. Caractérisation

➤ Réaction de Liebermann-Buchard

Dix millilitres (10 mL) d'extrait chloroformique ont été évaporés à sec dans une capsule. Le résidu a été dissout à l'aide de 2 mL du mélange anhydride acétique et CHCl_3 (1 : 1 v/v). La solution obtenue a été partagée entre 2 tubes à essai dont un a servi de référence. A l'aide d'une pipette, 1 à 2 mL de H_2SO_4 concentré ont été déposés au fond du tube. A la zone de séparation des deux liquides il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et de triterpènes.

➤ Caractérisation chimique des caroténoïdes

L'extrait chloroformique (5 mL) a été évaporé dans une capsule, puis au résidu on a ajouté 2 à 3 gouttes de solution saturée de SbCl_3 dans le chloroforme. Il se développe une coloration bleue devenant rouge par la suite en cas de réaction positive.

II.1.1.5. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques

a. Solution à analyser

Introduire 1 g de poudre de racine de *C. procera* dans un tube à essai, ajouter 10 mL d'éthanol à 60° et 5 mL d'une solution d'acétate neutre de Pb à 10%. Porter au bain-marie bouillant pendant 10 min, filtrer sur du coton.

b. Caractérisation

Agiter le filtrat avec 10 mL de CHCl_3 (en évitant la formation d'émulsion). Laisser décanter, soutirer la phase chloroformique et la partager entre 3 tubes à essai. Evaporer au bain-marie bouillant à sec, reprendre les résidus par 0,4 mL d'isopropanol. Ajouter dans les 3 tubes :

- tube n°1 : 1 mL de réaction de Baljet
- tube n°2 : 1 mL de réactif de Kedde
- tube n°3 : 1 mL de réactif de Raymond-Marthoud

Puis introduire dans chacun des 3 tubes 4 gouttes de KOH à 5% dans l'alcool. En cas de réaction positive il se développe les colorations suivantes :

-tube n°1 : orangée

-tube n°2 : rouge violacée

-tube n°3 : violet fugace.

II.1.1.6. Caractérisation des Saponosides

a. Solution à analyser

Introduire 1 g de poudre de racine de *C. procera* dans un erlenmeyer de 250 mL. Ajouter 100 mL d'eau distillée. Maintenir à ébullition dans un bain marie bouillant pendant 15 min puis filtrer et après refroidissement, ajuster à 100 mL.

b. Caractérisation

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire successivement 1, 2, 3,...,10 mL de décocté de racine de *C. procera*. Ajuster le volume de chaque tube à 10 mL avec de l'eau distillée.

Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde en maintenant le tube fermé. Laisser reposer 15 min et mesurer la hauteur de la mousse. Si celle-ci est inférieure à 1 cm dans tous les tubes l'indice est moins de 100. La dilution dans le tube où la hauteur de la mousse est égale à 1 cm représente l'indice recherché.

Si la hauteur de la mousse est supérieure à 1 cm dans tous les tubes, il est nécessaire de préparer une nouvelle série de dilution de la décoction et recommencer le processus de détermination. L'indice de mousse est donné par la formule suivante :

$$\text{Indice de mousse} = \frac{1000}{\text{Numéro de tube (ayant 1cm de mousse)}}$$

II.1.1.7. Autres caractérisations

a. Caractérisation des composés réducteurs

Introduire 5 mL de décocté aqueux dans une capsule puis évaporer au bain-marie jusqu'à sec. Au résidu ajouter 1 mL de réactif de Fehling (0.5 mL de réactif A + 0.5 mL de réactif B, mélange extemporané). L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs.

b. Caractérisation des oses et holosides

Introduire 5 mL de décocté aqueux à 10 % dans une capsule et évaporée à sec au bain-marie. Ajouter au résidu 2 à 3 gouttes de H₂SO₄ concentré. Après 5 min ajouter 3 à 4 gouttes d'alcool saturé avec du thymol. Le développement d'une coloration rouge révèle la présence d'oses et holosides.

c. Caractérisation des Mucilages

Introduire 1 mL de décocté aqueux à 10 % dans un tube à essai et ajouter 5 mL d'alcool absolu, attendre 10 min. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilage.

d. Caractérisation des coumarines

Evaporer 5 mL d'extrait éthérique de racine de *C. procera* (macération pendant 24 heures) dans une capsule à l'air libre. Ajouter au résidu 2 ml d'eau chaude. Partager la solution entre 2 tubes et ajouter au contenu de l'un des tubes 0,5 ml de NH₄OH à 25%, mélanger et observer la fluorescence sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté du NH₄OH indique la présence de coumarines, l'autre tube sert de témoin.

e. Caractérisation des hétérosides cyanogénétiques

Introduire dans un tube à essai 1 g de poudre. Ajouter 5 mL d'un mélange à volume égal d'eau et de toluène. Bien agiter et nettoyer la partie supérieure du tube à essai. Le papier picrosodé fraîchement préparé est fixé à l'aide d'un bouchon à la partie supérieure du tube (sans tremper dans la solution)

La présence d'hétérosides cyanogénétiques est indiquée par la coloration rouge plus ou moins rapide du papier picrosodé.

II.1.2. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de *C. procera* par chromatographie sur couche mince (CCM)

II.1.2.1. Préparation d'extraits

a. Extraits aqueux et éthanolique de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera*

Vingt grammes (20 g) de poudre d'écorces de racines de *C. procera* ont été macérés dans un erlenmeyer avec 200 mL d'eau distillée ou d'éthanol 70° pendant 24 heures sous agitation

magnétique. Le mélange a été filtré sur de la compresse puis du coton hydrophile et le filtrat a été centrifugé pendant 10 min à 3000 tours/min. Les marcs de cette première extraction ont subits 2 fois le même processus d'extraction. Les filtrats centrifugés (solution d'extrait aqueux ou éthanolique) ont été rassemblés et concentré à l'évaporateur rotatif sous pression réduite à la température de 55° C puis lyophilisé (figure 4 et 5). Les résidus secs ont servi aux réactions de caractérisation de groupes chimiques par CCM.

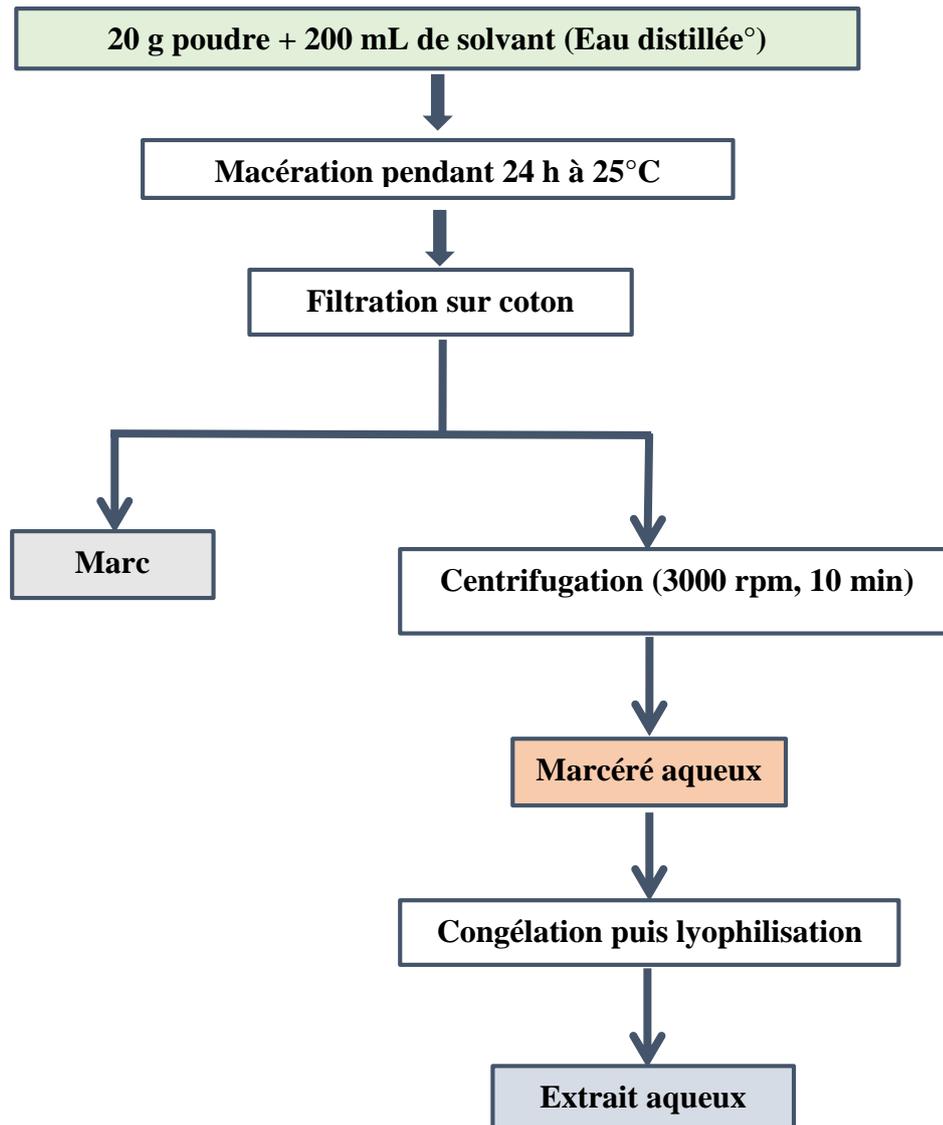


Figure 4: Méthode de préparation de l'extrait aqueux (Adapté par le laboratoire de chimie de MEPHATRA/PH de l'IRSS)

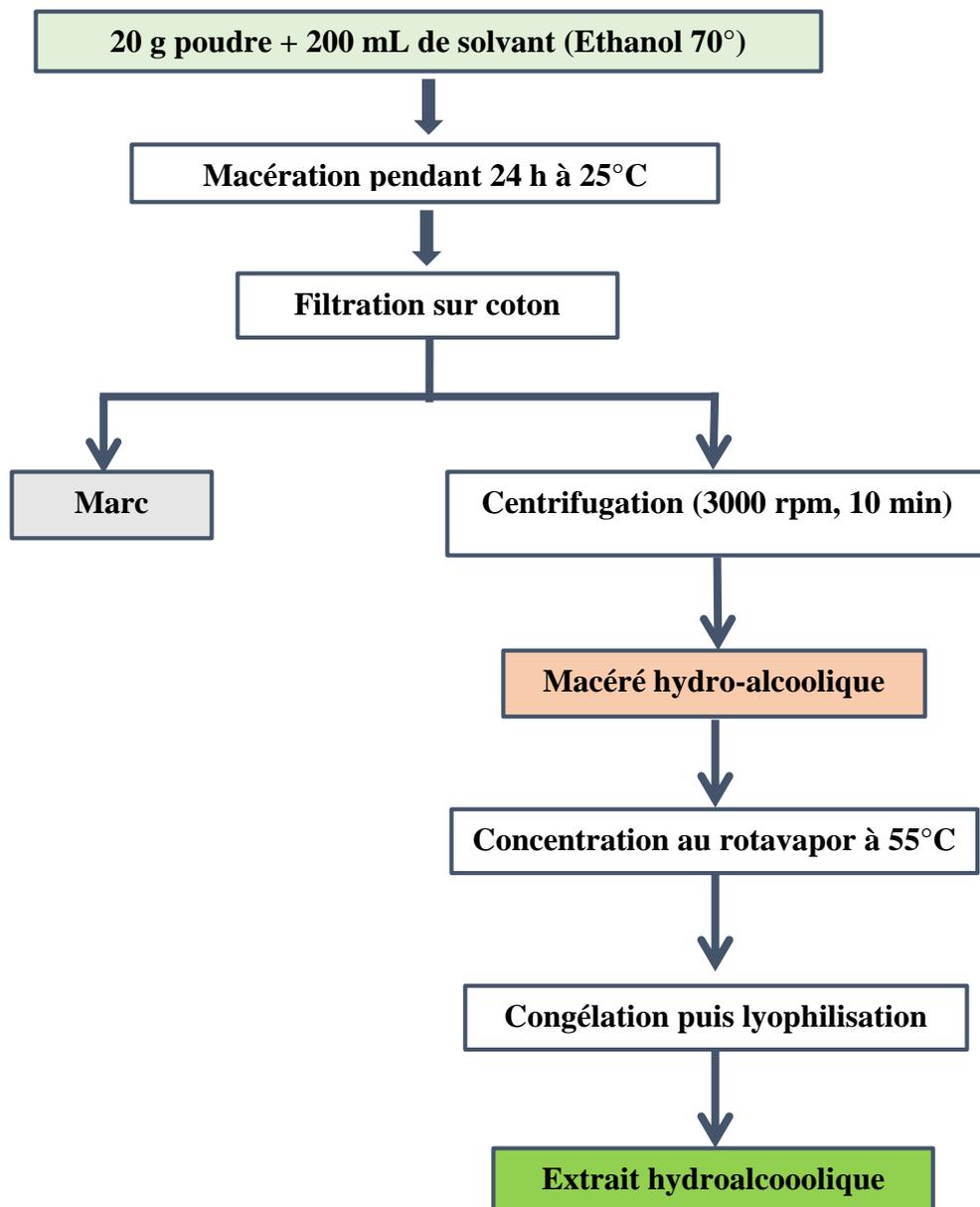


Figure 5 : Méthode de préparation de l'extrait hydroalcoolique (Adapté par le laboratoire de chimie de MEPHATRA/PH de l'IRSS)

b. Extraits concentrés en hétérosides cardiotoniques de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera*

Dix grammes (10 g) de poudre d'écorces de racine de *C. procera* ont été extraits avec 100 mL d'éthanol 50° par chauffage sous reflux pendant 15 min avec addition de 10 mL d'une solution d'acétate de plomb neutre à 10%. Après refroidissement et filtration sur de la compresse et du coton hydrophile, la solution est extraite (3 x 15 mL) avec le mélange dichlorométhane-isopropanol (3 : 2) dans une ampoule à décanter (mélanger doucement de façon à éviter la formation d'émulsion). Les phases organiques ont été mélangées et filtrées sur du sulfate de sodium anhydre et évaporées à sec (figure 6). Le résidu sec a été pesé pour le calcul du rendement avant d'être repris avec 5 mL du mélange dichlorométhane-isopropanol (3 : 2) pour la caractérisation des groupes chimiques par CCM (Wagner et Bladt, 1996). Une partie du résidu sec a été utilisé pour l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait.

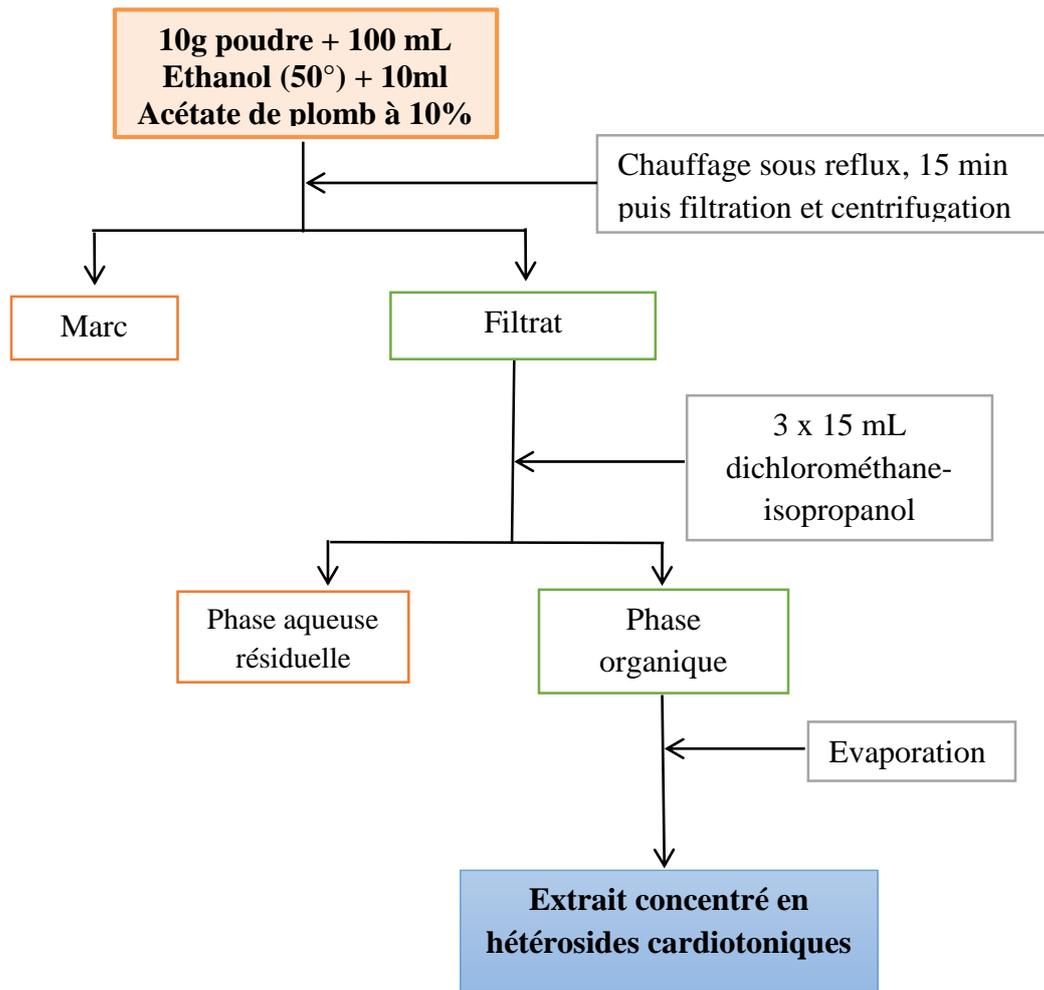


Figure 6 : Méthode de préparation de l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques

c. Extraction des hétérosides cardiotoniques de référence

Dix comprimés de digoxine (Digoxine Nativelle® 0,25mg, laboratoire TEOFARMA) ont été pulvérisés dans un mortier puis une extraction avec 15 mL d'un mélange dichlorométhane-éthanol (1 : 1) a été réalisé par chauffage à 60°C (bain-marie) pendant 5 min. Après refroidissement, l'ensemble a été filtré sur du papier filtre et le filtrat clair a été concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 2 mL et gardé pour les CCM (Wagner et Bladt, 1996).

II.1.2.2. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM

Les tests de caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM ont été réalisés selon les méthodes courantes décrites par Ciulei (1982) et Wagner et Bladt (1996).

a. Principe : La chromatographie sur couche mince est une méthode physico-chimique de séparation utilisée pour l'identification et le dosage des substances chimiques. Elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. L'absorbant ou phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme de 0,25 mm d'épaisseur, d'une substance séchée et finement pulvérisée, appliquée sur un support approprié (dans notre cas, nous avons utilisé une feuille d'aluminium). La phase mobile ou éluant migre à la surface de la plaque par capillarité. C'est une méthode analytique de contrôle qui, à chaque stade de séparation permet de :

- suivre l'efficacité des extractions avec différents solvants,
- suivre la composition des différentes fractions obtenues au cours des séparations,
- vérifier la pureté des produits isolés.

Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures, par exemple : fluorescence, coloration, « Realising factor ou R_f = facteur de rétention ».

b. Solutions à analyser : les résidus secs des différents extraits (10 mg) ont été dissouts dans 1 mL d'un solvant approprié : l'extrait aqueux dans l'eau distillée, l'extrait éthanolique dans l'éthanol 50%, les extraits d'hétérosides cardiotoniques dans le mélange dichlorométhane-isopropanol (3 : 2 (v/v)).

c. Technique : A l'aide d'une micropipette, 10 μ l de chaque solution ont été déposés sur une plaque sous forme de spot en bande horizontale de 1 cm. Les traces du solvant des dépôts ont été complètement évaporées à l'aide d'un séchoir. Nous avons ensuite placé les plaques dans les cuves de migration contenant le système de solvant Acétate d'éthyl-méthanol-eau (81 : 11 : 8 (v/v)).

La migration du solvant d'éluion s'est faite sur 8 cm à partir du point de dépôt des spots. Après cette migration, les plaques ont été retirées des cuves, séchées et les substances ont été caractérisées en présence de réactifs plus ou moins spécifiques (Tableau X), avant et après révélation sous lampe UV ou non.

Tableau X : Réactifs de révélation et composés correspondants (Jork *et al.*, 1990)

Réactifs	Types de composés recherchés
Godin	
Anisaldéhyde	Stéroïdes, carbohydrates (sucres), phénols, glycosides (cardiotoniques et diterpéniques), sapogenines, huiles essentielles.
FeCl ₃	Flavonoïdes, tanins, alcaloïdes de l'ergot.
Kedde	Glycosides stéroïdiques et aglycones (γ -lactone)
Baljet	
SbCl ₃	Caroténoïdes, terpènes/triterpènes, stérols, stéroïdes, saponosides/stéroïdes sapogenines, glycosides stéroïdiques, flavonoïdes
Chloramine-T	Glycosides digitaliques
H ₂ SO ₄	Stéroïdes, sapogenines/saponosides, glycosides cardiotoniques, alcaloïdes.

L'observation a été faite à l'UV 254 et 366 nm et la révélation a été faite avec le réactif de Godin ou AlCl₃.

Calcul du facteur de rétention (Rf) pour chaque extrait.

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance totale parcourue par le solvant}}$$

II.1.3. Dosage de quelques substances de la drogue « poudre d'écorces de racines de *C. procera* »

II.1.3.1. Dosage de l'eau

a. Méthode gravimétrique ou pondérale :

Principe : il consiste à déterminer la perte en masse d'une quantité connue de poudre par dessiccation à l'étuve à la température de 105°C pendant 24 heures (OUA, 1988).

Mode opératoire : Des prises d'essai (P₀) de la poudre de racine de *C. procera* (3 g) ont été introduites chacune dans un creuset préalablement pesé. Les creusets avec leur contenu séché ont également été pesés puis placés l'étuve à 105°C pendant 24 heures. Après étuvage les creusets avec leur contenu sont de nouveau pesé (P₁). Le pourcentage d'eau est ensuite calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage en eau} = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100$$

P₀ = prise d'essai de la drogue végétale

P₁ = masse résiduel de la prise d'essai

Nous avons considéré la moyenne des cinq prises d'essai pour déterminer la teneur en eau de notre échantillon par la méthode pondérale.

b. Méthode par entraînement azéotropique

Principe : il consiste à entraîner l'eau contenue dans une prise d'essai de la drogue « poudre d'écorces de racines de *C. procera* » par distillation avec un solvant non miscible (OUA, 1988).

Mode opératoire : dans un ballon de 500 mL, nous avons introduit 100 mL de toluène et 1 mL d'eau distillée et l'ensemble est porté à ébullition pendant une heure sous réfrigérant. Après 30 min de repos, nous avons lu le niveau d'eau (V₁). Ensuite, nous avons introduit 5 g de poudre dans le contenu du ballon et engagé une ébullition d'une heure. Après 30 mn de refroidissement, nous avons lu le niveau d'eau (V₂). Le volume d'eau contenu dans la prise d'essai est calculé selon la formule :

$$V = V_2 - V_1$$

Le pourcentage d'eau est calculé selon la formule :

$$\text{Pourcentage en eau} = \frac{V_2 - V_1}{P_e} \times 100$$

II.1.3.2. Dosage des cendres

a. Cendres totales

Principe : il repose sur la détermination des substances résiduelles non volatiles contenues dans une drogue lorsque cette dernière est calcinée (OUA, 1988).

Mode opératoire : Une prise d'essai de la drogue (M) « poudre de racine de *C. procera* » est introduite dans un creuset en silice préalablement taré (T). Après incinération au four à une température d'environ 600°C pendant 6 heures et refroidissement dans un dessiccateur, la masse du creuset contenant la prise d'essai a été déterminée et notée M'. Le pourcentage des cendres totales est donné par la formule :

$$\text{Pourcentage cendres totales} = \frac{M' - M}{P_e} \times 100$$

Nous avons réalisé 5 essais de la même manière afin de déterminer un pourcentage moyen.

b. Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique à 10%

Principe : C'est une méthode d'évaluation des substances inorganiques de la drogue végétale. Les cendres chlorhydriques sont obtenues après une attaque de la drogue par du HCl. La teneur est déterminée par dosage pondéral des sulfates non volatils obtenus par calcination de la matière végétale préalablement traitée avec du HCl dilué à 50%. Les sulfates résultent de la conversion des sels organiques (OUA, 1988).

Mode opératoire : La détermination des cendres chlorhydriques s'est faite sur les cendres totales. Nous avons introduit les cendres totales dans un erlenmeyer et ajouté 20 mL de HCl à 10%. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15 min au bain-marie. Après refroidissement, nous avons recueilli et lavé la matière non soluble sur un papier filtre sans cendre, et le filtre a été transféré dans un creuset sec. Le creuset contenant le papier filtre a ensuite été séché à l'étuve pendant 24 heures, pesé (M) et calciné pendant 6 heures au four à la température de 600°C. Après refroidissement dans un dessiccateur, nous avons pesé le creuset contenant les cendres résiduelles et le papier filtre calciné (M').

Le pourcentage des cendres chlorhydriques est donné par la formule :

$$\text{Pourcentage cendres chlorhydriques} = \frac{M' - M}{P_e} \times 100$$

Pe est la prise d'essai utilisée pour la détermination des cendres totales.

c. Cendres sulfuriques

Principe : Ces cendres sont les substances résiduelles non volatilisées recueillies lorsque l'échantillon de drogue est calciné avec du H₂SO₄. Ces cendres déterminent la quantité de substances inorganiques contenues dans la drogue (OUA, 1988).

Mode opératoire : Dans un creuset sec préalablement taré (T), nous avons introduit une prise d'essai (3 g) de la poudre et l'ensemble est pesé (M). La poudre a ensuite été humectée avec du H₂SO₄ à 50% et laissée à l'étuve pendant 24 heures à la température de 100° C, puis le creuset a été porté à calcination dans un four à la température de 600° C pendant 6 heures avant d'être pesé après refroidissement (M'). La masse des cendres sulfuriques (M Cs) est donnée par la formule :

$$M \text{ Cs} = M' - T$$

Le pourcentage des cendres sulfuriques (% Cs) est donné par :

$$\text{Pourcentage cendres sulfuriques} = \frac{M' - M}{Pe} \times 100$$

II.1.3.2. Dosage des Cardénolides des extraits aqueux et hydroalcoolique

a. Extraction des cardénolides des extraits aqueux et éthanolique

Dix (10) g de poudre de racine de *C. procera* ont été macérés dans 100 mL de solvant (éthanol à 50% ou eau distillée) pendant 24 heures suivi d'une percolation avec le même solvant jusqu'à épuisement. Après centrifugation du filtrat, 100 mL d'une solution d'acétate de plomb à 5% (w/v) a été ajouté au surnageant puis porter à ébullition pendant 2 min. Le mélange a été ensuite centrifugé et le surnageant limpide recueilli dans un ballon à décanter et extrait avec du chloroforme (3x15 mL). La phase chloroformique a été séchée avec du sulfate de sodium anhydre, filtré et évaporé (Figure 7). Le résidu a été repris avec 2 mL d'éthanol absolu (Bruneton, 2009).

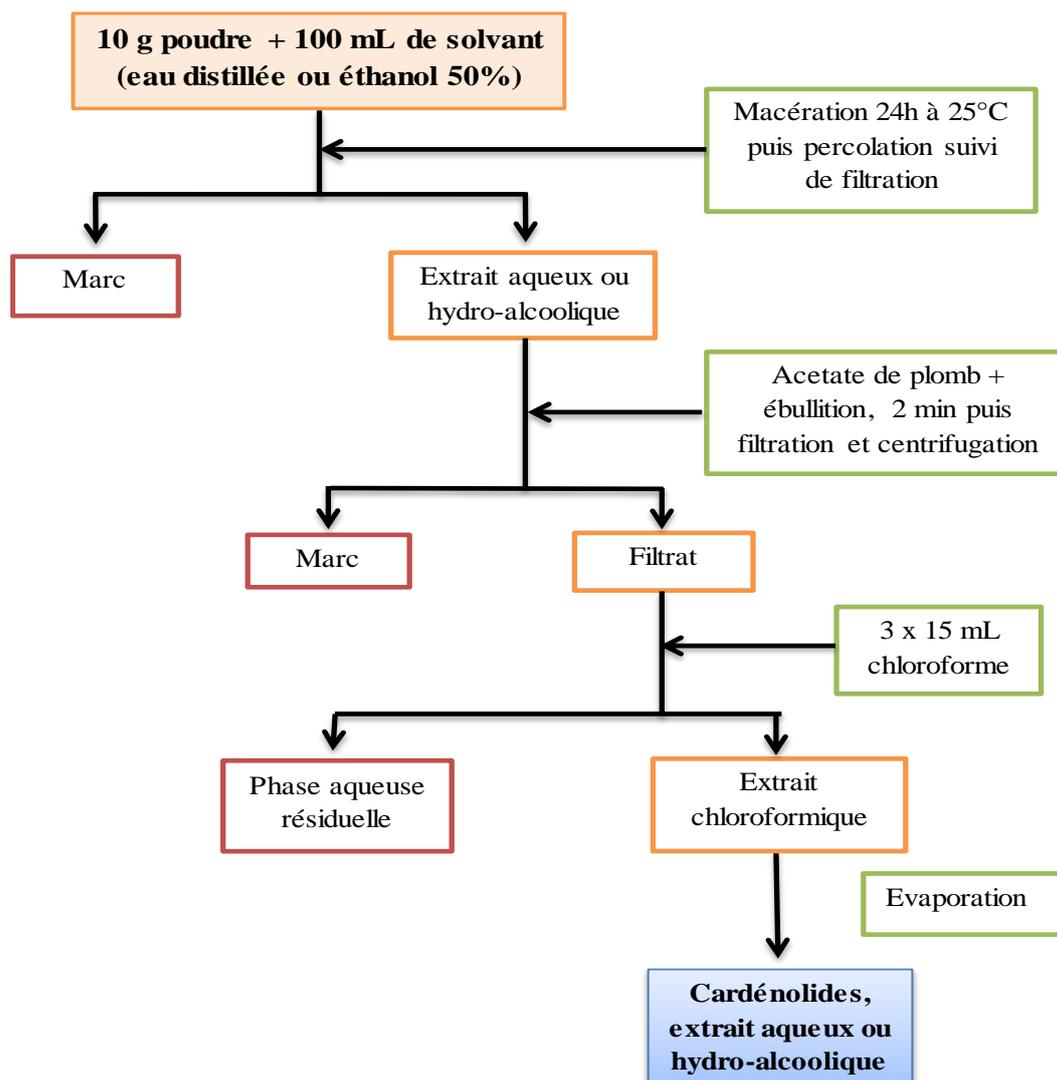


Figure 7: Schéma d'extraction des cardénolides de l'extrait aqueux et hydroalcoolique

b. Dosage des Cardénolides

Le dosage des cardénolides des extraits aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de la plante a été effectué selon une adaptation de la méthode décrite par Bruneton (2009).

Les extraits secs de cardénolides des extraits aqueux et hydroalcooliques ont été dissous dans de l'éthanol absolu. Le dosage des cardénolides a été ensuite réalisé par spectrophotométrie UV. L'absorbance des extraits obtenus a été mesurée à la longueur d'onde de 550 nm après ajout d'une solution d'acide 3,5-dinitrobenzoïque et de KOH. Simultanément une solution mère de digoxine (digoxine® injectable 0,5mg/2mL) a été utilisée pour préparer une série de dilution (Tableau XI). L'absorbance des différentes dilutions a servi à l'établissement de la

droite d'étalonnage. La teneur en cardénolide est ensuite calculer à partir de l'absorbance des extraits à la même longueur d'onde (550nm) et de l'équation de la droite.

Tableau XI: Réalisation de la droite d'étalonnage avec une solution mère (SM) de digoxine (digoxine® injectable 0,5mg/2mL)

Dilution	Témoin blanc	T1	T2	T3	T4	T5
SM (mL)	0	0,6	1,2	2,4	3,6	3,84
Quantité correspondante en digoxine (mg)	0	0,15	0,30	0,60	0,90	0,96
KOH 1 N (mL)	2	2	2	2	2	2
Ac. 3,5 dinitrobenzoïque à 1 % (mL)	1	1	1	1	1	1
Absorbance à 550 nm						

NB : solution de KOH et d'acide 3,5-dinitrobenzoïque à constituer avec de l'éthanol 95° ou absolu

II.2. ETUDES TOXICOLOGIQUES

II.2.1. Préparation des extraits aqueux et hydroalcooliques

Une portion de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera* a été pesé (250 g) et macérer dans 2,5 L de solvant (eau distillée ou un mélange méthanol/eau (70/30 v/v), respectivement pour l'extrait aqueux et l'extrait hydro-alcoolique pendant 24 heures à la température ambiante. Le mélange a été ensuite filtré sur du coton hydrophile et le filtrat a été centrifugé à 2000 tours par minute pendant cinq minutes. Le surnageant recueilli de l'extrait aqueux a été ensuite lyophilisé, conditionnée dans un flacon et stocké dans un dessiccateur. Pour l'extrait hydro-alcoolique, le surnageant recueilli a été concentré à basse température (65°C) sous vide en utilisant un évaporateur rotatif (Photo 5), avant d'être lyophilisé et conditionné dans un flacon et stocké dans un dessiccateur.

Les extraits aqueux et hydro-alcooliques lyophilisés ont été ensuite utilisés pour les tests toxicologiques.

II.2.2. Evaluation de la toxicité générale aiguë d'extraits d'écorces de racines de *Calotropis procera* chez la souris NMRI

II.2.1.1. Traitement des animaux d'étude

Des souris mâles et femelles ont été utilisées pour l'évaluation de la toxicité générale aiguë des extraits de la plante. Les souris ont été mises à jeun pendant 16 heures avant le test. Des lots de souris ont été constitués de la façon la plus homogène possible (poids moyen 27 ± 4 g) et selon le sexe. Les femelles étaient nullipares et non gravides.

II.2.1.2. Modalité d'évaluation de la toxicité générale aiguë

a. Evaluation de la toxicité générale aiguë des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de *Calotropis procera*

L'évaluation de la toxicité générale aiguë des extraits aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de *C. procera* a été effectuée séparément chez des souris mâles et femelles selon la ligne directrice 420 de l'OCDE pour les essais de toxicité de produits chimiques, ligne directrice portant sur l'étude de la toxicité orale aiguë selon la méthode de la dose prédéterminée et adapté par le laboratoire de toxicologie, environnement et Santé de l'Université de Ouagadougou (OCDE, 2001).

Après un jeûne de 16 heures, l'essai limite à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel a été réalisé. Le produit a été administré par voie orale (gavage) à l'aide d'une sonde gastrique à six souris mâles et six souris femelles par extrait. Les animaux des différents groupes ont été observés individuellement pendant les 2 heures qui ont suivi l'administration des extraits à l'issue desquelles ils ont été alimentés. Ils sont ensuite observés au moins une fois par jour pendant 14 jours au cours desquelles la mortalité et les symptômes d'intoxications tels que des changements de la peau et de la fourrure, des yeux, des muqueuses, les convulsions, la salivation, la diarrhée, la léthargie, la somnolence et le coma sont notés.

b. Evaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques des écorces de racines de *Calotropis procera*

Le résidu sec de l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques préparé suivant la méthode décrite par Wagner et Bladt (1996) (figure 6) a servi pour le test de toxicité générale aiguë.

L'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques des écorces de racines de *C. procera* a été effectuée chez des souris femelles selon la méthode décrite par la ligne directrice numéro 423 de l'OCDE pour les essais de toxicité de produits chimiques, ligne directrice portant sur l'étude de la toxicité orale aiguë selon la méthode par classe de toxicité aiguë et adapté par le laboratoire de toxicologie, environnement et Santé de l'Université de Ouagadougou (OCDE, 2001).

Le principe de cet essai est basé sur l'utilisation d'un processus séquentiel, utilisant trois (3) animaux par étape, et qui génère des informations sur la toxicité aiguë de la substance, lesquelles informations sont suffisantes pour les besoins de classification.

Dans la conduite du test, une des doses prédéterminées suivantes (5, 50, 300 et 2000 mg/kg p.c.) de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée selon un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un seul sexe sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire :

- arrêt de l'essai,
- administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

Après un jeûne de 16 heures, l'extrait a été administré chez les souris selon le processus séquentiel décrit ci-dessus. Les animaux de chaque lot ont été observés individuellement pendant les 2 heures qui ont suivi l'administration des extraits à l'issue desquelles ils sont alimentés. Ils sont ensuite observés au moins une fois par jour pendant 14 jours au cours desquelles la mortalité et les symptômes d'intoxications tels que des changements de la peau et de la fourrure, des yeux, des muqueuses, les convulsions, la salivation, la diarrhée, la léthargie, la somnolence et le coma sont notés.

II.2.3. Etude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* chez le rat Wistar

L'étude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* a été réalisée selon les directives de l'OCDE pour les essais de produits chimiques avec une légère modification (OCDE, 1998).

La sélection de la dose de l'étude de la toxicité sub-chronique a été basée sur la dose létale limite obtenue à partir de l'étude de la toxicité générale aiguë. La dose choisie dans la présente étude est de 20 mg/kg de poids corporel. Cette dose correspond à 1/100 de la dose létale limite obtenue au cours des tests de toxicité générale aiguë.

II.2.3.1. Traitement des animaux d'étude

Un nombre total de 42 rats Wistars, des deux sexes, poids moyen 160 ± 42 g ont été sélectionnés au hasard pour les études de toxicité sub-chronique. Les femelles étaient nullipares et non gravides. Les rats ont été divisés en trois groupes et les mâles et les femelles ont été répartis séparément dans des cages en polypropylène.

Groupe I (5 mâles et 5 femelles) a servi de lot témoin et a reçu une administration quotidienne du véhicule (eau distillée) pendant 6 semaines.

Groupe II (6 mâles et 6 femelles) ont reçu une administration quotidienne de l'extrait aqueux des écorces des racines de *C. procera* à la dose 20 mg/kg de poids corporel pendant 3 semaines.

Groupe III (10 mâles et 10 femelles) ont reçu une administration quotidienne de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg de poids corporel pendant 6 semaines.

Au cours de la période d'expérimentation, les animaux ont été observés deux fois par jour pour des signes éventuels de toxicité et de mortalité. A la fin du traitement les animaux ont été mis à jeun une nuit avant le sacrifice terminal. Ils ont été ensuite anesthésiés avec de la kétamine et un prélèvement sanguin a été réalisé par ponction cardiaque chez chaque animal. Le sang a été prélevé dans deux tubes de prélèvement, le premier contenant de l'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) qui a servi à l'analyse des paramètres hématologiques et le second dans un tube sec (sans anticoagulant).

Les échantillons de sang contenus dans les tubes secs ont été centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes en utilisant une centrifugeuse de table et les sérums obtenus ont été conservés dans des tubes stériles et stockés à -4°C . Les sérums ont été ensuite utilisés pour le dosage des paramètres biochimiques.

Après la collecte de sang, les organes internes tels que le foie, le cœur, les reins, les poumons, l'estomac, les testicules et les ovaires ont été prélevés, pesés pour déterminer le poids relatif

des organes puis examinés à l'état frais pour les lésions macroscopiques. Les organes ont été ensuite tranchés et conservés dans du formol à 10% pour les examens histopathologiques ultérieurs.

II.2.3.2. Mesure des paramètres physiques

Une mesure du poids corporel de chaque animal a été effectuée quotidiennement durant la période de traitement des animaux. Les gains de poids moyens (g) hebdomadaires chez les rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de la plante pendant 3 et 6 semaines ont été ensuite calculés.

Après la pesée des organes, le poids relatif de chaque organe a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Poids relatif de l'organe(\%)} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids corporel de l'animal (g)}} \times 100$$

II.2.3.3. Analyses des paramètres hématologiques

L'analyse des paramètres hématologiques a été effectuée en utilisant les échantillons de sang contenus dans les tubes EDTA. La numération des globules rouges (RBC), la numération des globules blancs (WBC), la numération plaquettaire (PLT), le taux d'hémoglobine (Hb, HGB), l'hématocrite (HCT), le plateletcrit (PCT), le volume globulaire moyen (VGM), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCH ou TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), le volume plaquettaire moyen (MPV), l'indice de distribution des globules rouges (IDR) et l'indice de distribution du volume plaquettaire (PDW) ont été déterminés à l'aide d'un compteur semi-automatique de cellule (Hospitex diagnostic, modèle : écran Hema 13, Italie).

II.2.3.4. Analyses des paramètres biochimiques

L'analyse des paramètres biochimiques des échantillons de sang a été effectuée à l'aide d'un analyseur biochimique semi-automatique (Hospitex diagnostic, LIHD113 écran Master, Italie). Le dosage des transaminases, Alanine amino transférase (ALAT), Aspartate amino transférase (ASAT) ; de la créatinine (CREAT) et des protéines totales a été effectué.

II.2.3.5. Examen histopathologique de quelques organes vitaux

Des échantillons de tissus du foie, des reins, des poumons et de l'estomac ont été fixés dans du formol tamponné à 10 %. Après le traitement de routine, les coupes de paraffine de chaque tissu ont été coupées à une épaisseur de 5 µm et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine pour un examen histopathologique. Les lames microscopiques ont été observées et analysées qualitativement au microscope optique, (Grossissement x5, x10).

II.2.4. Evaluation des effets toxiques cardiovasculaires

L'évaluation des effets toxiques cardiovasculaire de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* a été réalisée chez le rat Wistar *in vivo*. Il s'est agit de la mesure de la pression artérielle systolique, diastolique et de la fréquence cardiaque chez des rats témoins et traités quotidiennement avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en utilisant une méthode non invasive dite non sanglante (méthode du manchon caudale).

La mesure non invasive de la pression artérielle par la méthode du manchon caudal est basée sur le même principe que la méthode pléthysmographique utilisée en clinique humaine pour la mesure de la pression artérielle au niveau de l'artère brachiale. Le manchon est gonflé progressivement. Lorsque la pression du manchon devient supérieure à la pression systolique, la circulation sanguine dans l'artère caudale est interrompue. Le manchon est ensuite dégonflé progressivement. La pression systolique est mesurée lorsque le sang peut s'écouler à nouveau dans l'artère, c'est-à-dire lorsque la pression imposée par le manchon devient égale ou inférieure à la pression artérielle systolique.

La méthode a été préalablement validée au sein du laboratoire de toxicologie, environnement et santé de l'école doctorale de santé de l'université de Ouagadougou en s'inspirant de la méthode décrite précédemment par Gerold et Tschirky (1968). La validation de la méthode a consisté en une mesure quotidienne (n = 5) et à différents intervalles de temps pendant une semaine, de la pression artérielle systolique, diastolique et la fréquence cardiaque chez de rats non traité afin de vérifier la reproductibilité des valeurs obtenus.

II.2.4.1. Traitement des animaux d'étude

Des rats Wistar mâles et femelles de poids moyen 160 ± 42 g ont été utilisés pour l'étude. Les rats ont été répartis au hasard en 2 groupes de dix (10) rats chacun (5 mâles et 5 femelles) et gardés dans des cages en polypropylène distincts deux semaines avant l'utilisation.

Le premier groupe a servi de témoin et a reçu une administration orale quotidienne du véhicule (eau distillée) et le second groupe a reçu une administration orale quotidienne de l'extrait aqueux des écorces de racine de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg pendant deux semaines. Des mesures de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ont été ensuite effectuées deux heures après l'administration du véhicule ou de l'extrait et ceux, à J1, J2, J4, J8 et J15 en utilisant un dispositif de mesure indirecte et d'enregistrement de la pression artérielle sans effusion de sang chez des rats non anesthésiés (enregistreur de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque, Modèle 58500, UGO BASILE appareil de recherche biologique, ITALIE) (Photo 6).

II.2.4.2. Procédure expérimentale

Les rats ont été placés dans des harnais appropriés à partir de laquelle fait saillie la queue.

Afin de familiariser les animaux aux conditions de rétention, ils ont été maintenus 3 à 4 minutes dans le dispositif de rétention, leurs queues équipées de manchette et du capteur de pression. L'exercice a été répété 2 à 3 fois par jour pendant une semaine.

Avant les essais, les animaux ont été préchauffés à environ 29-30°C pendant au moins 30 minutes, afin de provoquer une vasodilatation suffisante dans l'artère caudale. Après cela, la manchette et le capteur de pression ont été bien ajusté à la queue de l'animal. La pression artérielle systolique (PAS) et la pression artérielle diastolique (PAD) ont été mesurées chez les rats non anesthésiés, préchauffé et retenus par la queue à travers le brassard de la connexion pneumatique. La pression artérielle moyenne (PAM) a été ensuite calculée selon la formule suivante :

$$PAM = \frac{2}{3} PAD + \frac{1}{3} PAS \text{ (Gupta, 2004 ; Ehrmann } et al., 2009)$$

La fréquence cardiaque (FC) de l'animal est automatiquement évaluée en temps réel par un compteur de taux d'impulsion qui capte le signal provenant du capteur de pression.

Chaque valeur représente la moyenne de 4 lectures consécutives par animal.

II.2.5. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera*

L'évaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux de *C. procera* (Ait.) R. Br. a été réalisée sur des cellules Caco-2 d'origine humaine (lignée cellulaire tumorale d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome du côlon humain ; ($\Delta p53$: mut p53)) et des cellules Neuro-2a provenant de neuroblastes de souris albinos. Le choix des cellules Caco-2 est basé sur le fait qu'elles sont largement utilisés pour les études de l'absorption intestinale et la toxicité des xénobiotiques et proviennent d'un tissu qui est directement en contact avec l'extrait de *C. procera* chez l'homme ; (Meunier *et al.*, 1995 ; Prueksaritanont *et al.*, 1996 ; Schmiedlin-Ren *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2008). De plus ce modèle de lignée cellulaire permet l'étude du métabolisme des xénobiotiques.

Le choix des cellules Neuro-2a est basé sur le fait qu'elles sont une lignée de cellules neuronales de souris qui sont largement utilisée pour étudier la différenciation neuronale, les voies de signalisation mais aussi les toxiques des neurones (Olmsted *et al.*, 1970 ; Ledreux, 2010).

II.2.5.1. Méthodes générales de culture de lignées cellulaires

a. Principales caractéristiques des cellules

➤ Cellules Caco-2

Ces modèles cellulaires *in vitro* ont pris le pas sur les modèles conventionnels chez l'animal afin d'étudier l'absorption des molécules.

Ils présentent plusieurs avantages :

- ils permettent de réaliser des études sur des cellules humaines, d'où des conditions proches de celles *in vivo* ;
- ils permettent une évaluation rapide de la perméabilité et donc de l'absorption de molécules de par leurs propriétés de transport identiques aux entérocytes ;
- ils représentent donc un gain de temps et d'argent par rapport aux modèles conventionnels ;
- enfin, ils représentent une amélioration éthique par rapport à l'expérimentation animale.

Une différenciation spontanée en cellules épithéliales se réalise dans un milieu de culture standard en vingt et un (21) jours. Les cellules présentent alors des caractéristiques proches de celles des entérocytes *in vitro* d'un point de vue morphologique, biochimique et fonctionnel.

- Sur le plan morphologique : présence d'une membrane apicale avec une bordure en brosse bien développée, de jonctions serrées intercellulaires laissant un espace d'environ 5 à 9Å.

- Sur le plan biochimique : présence d'enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques (tels que les CYP 450), de phase II (tel que des Glutathion-S-transférases, des sulfotransférases), de divers enzymes et substances antioxydantes, de transporteurs actifs (Artursson *et al.*, 1996).

Les cellules Caco-2 expriment la majorité des enzymes localisées dans les entérocytes. Dans la plupart des cas, ces enzymes sont présentes dans des proportions différentes de celles qu'on trouve «*in vivo*». Le métabolisme des xénobiotiques au niveau intestinal étant relativement faible, on peut considérer que celui-ci le sera encore plus avec les cellules Caco-2. L'effet de premier passage intestinal peut être négligé dans l'estimation de la perméabilité cellulaire.

Le tableau XII montre la comparaison entre l'activité de certaines enzymes présentes sur la bordure en brosse des cellules Caco-2 et des entérocytes non cancéreux. Les cellules Caco-2, issues d'un adénocarcinome de colon humain, permettent par leur différenciation spontanée en monocouche épithéliale, l'étude du passage intestinal de certaines molécules (Chantret *et al.*, 1994).

Tableau XII: Comparaison entre l'activité de certaines enzymes dans les entérocytes non cancéreux et celles des cellules Caco-2.

Enzymes	Activités Caco-2 (mUI/mg)	Activités Entérocytes (mUI/mg)
Saccharose Isomaltase	1560	1230
Lactase	10	189
Dipeptidylpeptidase	1200	160
Phosphatase alcaline	1800	9700
Aminopeptidase	210	1095

• Sur le plan fonctionnel : le passage de molécules suit plusieurs modes différents, qui peuvent être regroupés en 2 grands groupes : passage transcellulaire et passage paracellulaire.

➤ Cellules Neuro-2a

Ce sont des cellules adhérentes qui, une fois en culture dans des conditions favorables, se développent et forment un tapis sur le fond de la flasque (boîte de culture) (Ledreux, 2010). Ces cellules produisent des protéines microtubulaires qui sont censées jouer un rôle dans le système contractile donnant un flux axoplasmique dans les cellules nerveuses (ATCC).

b. Culture et entretien des lignées cellulaires.

b.1. Composition du milieu de culture

Les milieux de culture employés sont un milieu synthétique RPMI 1640 (Sigma, France) pour les cellules Neuro-2a et un milieu synthétique Dublecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, France) pour les cellules Caco-2.

Ces milieux de base contiennent des nutriments indispensables à la survie cellulaire, des ions minéraux pour le maintien des potentiels de membrane, des cofacteurs de réactions enzymatiques, des vitamines, des acides aminés et surtout du glucose (substrat énergétique essentiel) à 4,5g/L de milieu.

Quel que soit le type de milieu, il faut toujours ajouter du L-glutamine (4% de L-glutamine (8mM) pour les cellules Caco-2 et 2% de L-glutamine (4mM) pour les cellules Neuro-2a)

(Sigma, France) (Source d'énergie indispensable, facteur limitant dans le cycle de Krebs) ainsi que 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Sigma, France), qui apporte des facteurs de croissance indispensables.

Pour éviter d'éventuelles proliférations bactériennes, un mélange de pénicilline (100 U/mL) – streptomycine (100 µg/mL) (Sigma, France) est ajouté au milieu de culture.

Ces milieux ainsi préparés constituent les milieux de culture complet (RPMI et DMEM complet).

b.2. Décongélation des cellules

La décongélation des cellules est réalisée rapidement pour éviter que les cellules décongelées ne restent trop longtemps en contact avec le glycérol ou le DMSO qui sont très cytotoxiques.

Les cryotubes sont placés dans un bain-marie à 37°C, 1 à 2 minutes puis la suspension cellulaire est transférée dans 10 mL de milieu DMEM ou RPMI préchauffé à 37°C et centrifugée à froid (10°C) à 1800 tr/min pendant 5 min.

Après centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension par homogénéisation dans 10 mL de milieu complet, les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture (flasques Nunc stériles de 75 cm²).

b.3. Mise en culture et entretien des cellules

Les cultures ont été effectuées dans des boîtes de culture (flasques Nunc stériles de 75 cm²) et incubées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie avec 5% de CO₂.

Les cellules Caco-2 et Neuro-2a sont cultivées en monocouches dans des boîtes en polystyrène de 75 cm² (PolyLabo- Nunc, Strasbourg, France), ainsi que dans des plaques de 6 à 96 puits (PolyLabo- Nunc, Strasbourg, France) dans du milieu complet.

Les cellules sontensemencées à raison de (2 à 3) x 10⁵ cellules /mL de milieu de culture complet et incubées à 37°C dans un incubateur (Jouan, IG 150, France) en atmosphère enrichie avec le mélange 5% CO₂ – 95% air.

L'apport en éléments nutritifs est assuré par un changement de milieu toutes les 48 heures, ce qui présente également l'avantage d'éliminer les endotoxines cellulaires susceptibles d'inhiber la croissance cellulaire.

Dès que les cellules arrivent en confluence, elles sont repiquées dans un milieu de culture frais, ce qui les maintient en phase exponentielle de croissance et permet d'éviter l'inhibition qui survient à confluence.

Dans nos conditions de laboratoire, les cellules ont été repiquées tous les trois (3) jours pour les cellules Caco-2 et cinq (5) jours pour les cellules Neuro-2a (ce qui correspond à une confluence de 80 à 90%), sous une hotte à flux laminaire, en conditions stériles. Le repiquage a été effectué par décollement des cellules grâce à l'action de la trypsine pour les cellules Caco-2 et à une projection de milieu de culture pour les cellules Neuro-2a. Les cellules décollées sont ensuiteensemencées dans de nouvelles boîtes de culture stériles.

b.4. Ensemencement des plaques

Des boîtes de culture (75 cm²)ensemencées depuis 3 jours pour les cellules Caco-2 et 5 jours pour les cellules Neuro-2a ont été utilisées. Le milieu de culture est d'abord éliminé et le tapis cellulaire est lavé une fois avec du PBS 0,1M. Après élimination du PBS par aspiration, les cellules Caco-2 sont décollées par ajout de la trypsine dans les flasques et incubation à 37°C pendant au maximum 20 minutes. Du milieu de culture complet est ensuite additionné dans les boîtes de culture et la suspension cellulaire homogénéisée à l'aide de la pipette.

Pour les cellules Neuro-2a, après élimination du PBS, du milieu de culture complet est additionné dans les boîtes et les cellules sont décollées de façon mécanique. La suspension cellulaire est ensuite homogénéisée à l'aide de la pipette en faisant des allers et retours.

Une partie aliquote de la suspension cellulaire est diluée au 1/10^{ème} avec une solution de bleu trypan à 0,4%. Cet homogénat cellulaire est monté dans une cellule de Neubauer et les cellules sont comptées à l'aide d'un microscope inversé, les cellules vivantes se différenciant des mortes qui sont entièrement colorées en bleu.

Une fois la concentration cellulaire (nombre de cellules par millilitre) déterminée et ajuster au besoin avec du milieu de culture, 100 µl de suspension cellulaire sont déposés dans les puits de la microplaque selon le plan décidé.

II.2.5.2. Les tests de viabilité cellulaire

a. Le test de viabilité cellulaire au MTT

La viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant le test MTT.

➤ *Principe*

Le test MTT est un test colorimétrique rapide avec une grande précision largement utilisé pour mesurer la croissance cellulaire et la cytotoxicité, en particulier dans le développement de nouveaux médicaments (Akhir *et al.*, 2011). Elle est basée sur l'aptitude des cellules vivantes actives à métaboliser un sel de tétrazolium ((bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) en un produit formazan bleu-violet dans les mitochondries (Loveland *et al.*, 1992). L'accumulation de formazan est proportionnelle au nombre de cellules viables et inversement proportionnelle au degré de cytotoxicité (Berridge *et al.*, 2005).

➤ *Protocole*

Les cellules sontensemencées dans des plaques à 96 puits à raison de (2 à 3) x 10⁵ cellules/mL de milieu complet de culture cellulaire. Les cellules ont été incubées (incubateur Jouan IG 150, France) à 37°C dans une atmosphère humidifiée enrichie avec 5% de CO₂ pendant 24 heures avant l'exposition à l'extrait. Le milieu de culture a été ensuite éliminé et après 48 heures d'exposition dans les mêmes conditions de culture avec une gamme de concentration de l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante (allant de 0,15 à 15x10³µg/mL préparée dans du milieu sans sérum) ou du véhicule (milieu de culture cellulaire) ou du contrôle (cellules avec du milieu sans sérum) (Figure 8), le milieu de culture a été éliminé de nouveau avant d'ajouter 100 µL d'une solution de MTT à 1 mg/mL. Les plaques ont été incubées pendant 1 heure à 37°C, l'excès de MTT a été enlevé et 100 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été ajoutés à chaque puits pour dissoudre les cristaux de formazan, précipités résultant de la conversion du MTT par la succinate déshydrogénase mitochondriale. Les plaques ont été agitées au vortex 5 min et lues à 540 nm avec un lecteur de microplaques LT- 4000 (Labtech, France).

La viabilité a été exprimée comme étant les valeurs de densité optique obtenue à partir d'échantillons traités par rapport aux valeurs de densité optique des puits témoins (cellules non traitées) corrigée par les deux mesures du blanc et des puits sans cellules.

Chaque expérience a été répétée trois fois de façon indépendante avec pour chaque point de concentration, n = 6.

		Concentration (µg/ml)										
		0	0,15	1,5	15	50	150	500	1500	15000		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A												
B	DMEM - SVF	Contrôle (Cellule + DMEM - SVF)										
C												
D												
E												
F												
G												
H			Cellules + Extraits aqueux de la plante à différentes concentrations									

Figure 8 : Plan de la microplaque pour l'étude de la cytotoxicité

b. Le test de viabilité cellulaire au rouge neutre

Le test au Rouge neutre (RN) a été également utilisé pour évaluer la cytotoxicité de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera*.

➤ *Principe.*

Le test au RN est un test de viabilité cellulaire basé sur la capacité des cellules vivantes à incorporer et à se lier au rouge neutre. La cytotoxicité est exprimée comme une réduction de l'absorption dépendant de la concentration du RN, fournissant ainsi un signal intégré sensible à la fois de l'intégrité cellulaire et l'inhibition de la croissance (Borenfreund et Puerner, 1985).

➤ *Protocole*

Les cellules ont étéensemencées à une densité de (2 à 3) x 10⁵ cellules/mL dans des plaques à 96 puits transparentes (100 µL par puits) et incubées à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂. Après 24 heures de culture, le milieu a été éliminé des puits et les cellules ont été exposées à une concentration de l'extrait de plante allant de 0,15 à 15x10³µg/mL (dans du milieu sans sérum) ou du véhicule (milieu de culture cellulaire) ou du contrôle (cellules

avec du milieu sans sérum) pendant 48 heures. Ensuite, les milieux ont été éliminés et la couche de cellules lavées avec 150 µL de PBS suivit de l'ajout de 150 µL d'une solution pré-chauffé à 37°C de rouge neutre fraîchement préparé dans du milieu de culture cellulaire (3.3×10^{-2} g/L) dans chaque puits. Après 3 heures d'incubation à 37°C (5 % de CO₂), les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS, puis lysées avec 150 µL du mélange d'une solution d'acide acétique/éthanol 50 % (1 : 99 v/v). Les plaques ont été secouées pendant 15 minutes avec un vortex à plaque avant la lecture de l'absorbance à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques LT- 4000 Labtech, France (Kouadio *et al.*, 2005). La viabilité cellulaire a été calculée à partir de l'intensité relative d'absorption du colorant par rapport à des échantillons non traités.

Chaque expérience a été répétée trois fois de façon indépendante avec pour chaque point de concentration, n = 6.

II.2.5.3. Test de fragmentation de l'ADN

Un test de fragmentation de l'ADN a été effectué sur les cellules Caco-2.

Protocole

Les cellules ont été inoculées à la densité de (2 à 3) x 10⁵ cellules/mL dans des plaques 6 puits (3 mL par puits) et incubées à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂. Au bout de 24 heures de culture, le milieu de culture a été éliminé et la plaque a été traitée avec des concentrations adaptées d'extrait de plante (10, 50 et 100 µg/mL). Après 24 heures d'exposition à 37°C (5 % CO₂), le milieu a été éliminé suivi d'un rinçage du tapis cellulaire avec 5 mL de PBS. Les cellules adhérentes ont ensuite été lysées avec un tampon de lyse (Tris-EDTA (20 : 5) pH 8 à 8,5 et du SDS 1%). Les protéines ont été digérées avec de la protéinase K (100 µg/mL pendant 1 heure à 37°C) et l'ARN par la RNase A (10 µg/mL à 37°C pendant 15 min). L'extraction de l'ADN a été effectuée avec un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 : 1 (v/v)) suivie d'une précipitation par addition d'acétate de sodium (3M, pH 4,8) et d'éthanol absolu froid (1v : 2v) et centrifugé à 6000 g pendant 45 min à 4°C. Le culot d'ADN a été séché à l'air et remis en suspension dans de l'eau ultrapure stérile. La quantité et la pureté de l'ADN a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm avec un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). La fragmentation de l'ADN a été analysée sur gel d'agarose à 2 %, en présence de 1 µg/mL de bromure d'éthidium.

II.2.5.4. Analyse morphologique des cellules

La morphologie des cellules a été analysée en utilisant un microscope inversé. Les changements morphologiques des cellules Caco-2 et Neuro-2a ont été observés 48 heures après exposition à la gamme de concentrations de l'extrait de plante ou d'un véhicule (100 µL par puits) par rapport au témoin et des photos ont été prises (Grossissement 40x).

III. METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS

III.1. Données phytochimiques

III.1.1. Caractérisation des groupes phytochimiques

L'interprétation des résultats du criblage phytochimique a été faite en se référant aux réactions attendues respectivement des tests de caractérisation des principaux groupes chimiques et leur coloration spécifique.

III.1.2. Analyse CCM

Chaque substance a été identifiée par sa fluorescence sous lampe UV à la longueur d'onde λ (254 et 366 nm), par son facteur de rétention (Rf) dans un système de solvant précis, par sa couleur après révélation par un réactif spécifique et en comparaison avec un témoin de référence.

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance totale parcourue par le solvant}}$$

III.2. Données toxicologiques

III.2.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë

La DL₅₀ obtenu est comparée avec les niveaux de toxicité du système de classification globalement harmonisé de l'OCDE (2001), de l'OMS, 2002 et du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nation Unis (2011). Ainsi, les extraits étudiés sont classés selon le niveau de toxicité chimique (toxicité extrême, très toxique, moyennement toxique, légèrement toxique, pratiquement sans toxicité).

III.2.2. Evaluation de la toxicité subchronique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm déviation standard (SD). Les moyennes et les déviations standards ont été calculées séparément pour les rats mâles et femelles. Les données statistiques ont été traitées avec le logiciel Graph Pad Prism Version 5.0. Tous les groupes ont été comparés en utilisant une analyse unidirectionnelle de la variance (One way-ANOVA), suivie d'une comparaison entre les groupes traités et contrôle par le test de comparaison multiple de Dunett. Les différences ont été considérées comme étant statistiquement significative à $p < 0,05$.

III.2.3. Evaluation des effets toxiques cardiovasculaire

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm Erreur Standard sur la Moyenne (ESM).

Les différences statistiques entre les rats témoins et traités avec l'extrait végétal ont été analysés en utilisant une analyse bidirectionnelle de la variance (two-way ANOVA), suivie du test de comparaison de Bonferroni à l'aide du logiciel Graph Pad Prism Version 5.0. Les différences ont été considérées comme étant statistiquement significative à $p < 0,05$. Les seuils de signification ont été notés comme suit : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

III.2.4. Evaluation de la cytotoxicité

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm ESM de trois expériences indépendantes avec six (6) répétitions pour chaque concentration. Les différences statistiques entre le contrôle et les cellules traités avec l'extrait végétal à différentes concentrations ont été analysées en utilisant une analyse unidirectionnelle de la variance (One way-ANOVA), suivie du test de comparaison multiple de Dunett. Les différences ont été considérées comme étant statistiquement significative à $p < 0,05$. Les seuils de signification ont été notés comme suit: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Les valeurs de CI_{50} ont été obtenues par régression non linéaire en utilisant le logiciel Graph Pad Prism Version 5.0.

IV. ASPECT ETHIQUE DE L'ETUDE

En absence de comité d'éthique nationale au Burkina Faso, concernant les études chez les animaux de laboratoires, tous les protocoles d'études et d'expérimentation *in vivo* sur animal ont été effectués conformément aux protocoles déjà validés par l'Institut de Recherche des Sciences de la Santé (IRSS, Burkina Faso) et qui respectent les normes internationales en la matière (ligne directrices établies par l'Union européenne sur la protection des animaux (CCE Conseil 86/609) (Zimmermann, 1983, Meier *et al.*, 1986).

CHAPITRE II : RESULTATS DE L'ETUDE

CHAPITRE II : RESULTATS DE L'ETUDE

I. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

I.1. La drogue végétale.

Les écorces de racines de *C. procera* sont rugueuses et de couleur ocre (Photo 7).

La poudre des écorces de racines a une couleur ocre (Photo 8), une odeur faible et un goût amer.



Photo 7 : Ecorces de racines séchées de *C. procera*



Photo 8: Poudre des écorces de racines de *C. procera*

I.2. Teneur en eau et en cendres

Le tableau XIII présente les teneurs en eau, en cendres totales, chlorhydriques et sulfuriques de la poudre des écorces de racines de *C. procera*.

Tableau XIII: Teneur en eau et en cendres de la poudre d'écorces de racines de *C. procera*

Eau (méthode pondérale)	8,54 ± 0,65% (n = 4)
Eau (méthode azéotropique)	8%
Cendres totales	6,5%
Cendres chlorhydriques	3,93%
Cendres sulfuriques	7,67%

Le pourcentage d'eau de la poudre est inférieur à 10% pour chacune des méthodes utilisées. La poudre peut être conservée sans grande dénaturation.

I.3. Rendements d'extraction

Les rendements des différentes procédures d'extraction de la poudre des écorces de racines de *C. procera* sont consignés dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Rendements des différentes procédures d'extraction de la poudre d'écorces de racines de *C. procera* (n = 2-3)

Types d'extrait	Rendement d'extraction (%)
Extrait aqueux	9,58 ± 1,10
Extrait éthanolique	13,14 ± 2,9
Extrait concentré en hétérosides cardiotoniques	2,17 ± 0,63

I.4. Réaction de caractérisation en tubes

Les réactions de caractérisation en tube ont permis de mettre en évidence les différents groupes chimiques de la poudre des écorces de racines de *C. procera*. Le tableau XV présente les résultats obtenus.

Tableau XV: Principaux groupes chimiques caractérisés par les réactions en tube dans la poudre d'écorces de racines de *C. procera*

Groupes chimiques recherchés	Résultats
Hétérosides cyanogénétiques	-
Caroténoïdes	-
Coumarines	+
Anthacénosides libres (Borntrager)	-
Anthacénosides combinés (C-hétérosides : Borntrager)	-
Anthacénosides combinés (O-hétérosides : Borntrager)	-
Flavonoïdes : Génines flavoniques (Shibata)	-
Flavonoïdes : hétérosides flavoniques (Shibata)	-
Alcaloïdes	-
Saponosides : présence de mousse	+
Saponosides : indice de mousse	-
Tanins (FeCl ₃)	-
Composés réducteurs	-
Oses et holosides	+
Polyuronides (mucilages)	+
Stérols et triterpènes : hétérosides triterpéniques	+
Stérols et triterpènes : stéroïdiques	+
Hétérosides cardiotoniques (Raymond Matourd)	+
Hétérosides cardiotoniques (Kedde)	+
Hétérosides cardiotoniques (Baljet)	+
Anthocyanes	-
Leucoanthocyanes	-

+ : Réaction a été positive ; - Réaction négative

Pour la détermination de l'indice de mousse, aucun tube n'a présenté une hauteur de mousse atteignant 1 cm. La hauteur la plus élevée a été 0,8 cm.

I.5. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM

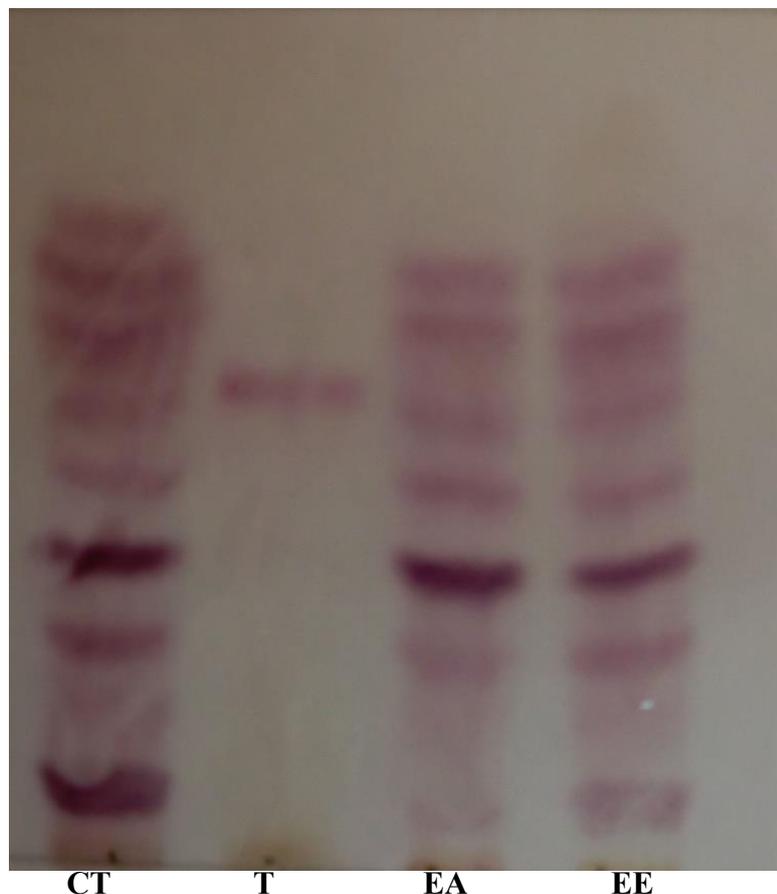


Figure 9 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera* révélés par le réactif de Kedde.

CT : Cardiotoniques Totaux (Extrait concentré en hétérosides cardiotoniques) ;

T : Témoin digoxine (Digoxine commerciale) ; EA : Extrait aqueux, EE : Extrait éthanolique

L'analyse du chromatogramme de la figure 9 montre que la solution de référence, la Digoxine utilisée présente un spot violet de $R_f = 0,625$. Les trois extraits de la poudre des écorces de racines de *C. procera* ont révélé des spots de même coloration (violette), à des R_f différents (annexe 4), indiquant la présence de cardénolides dans ces extraits.

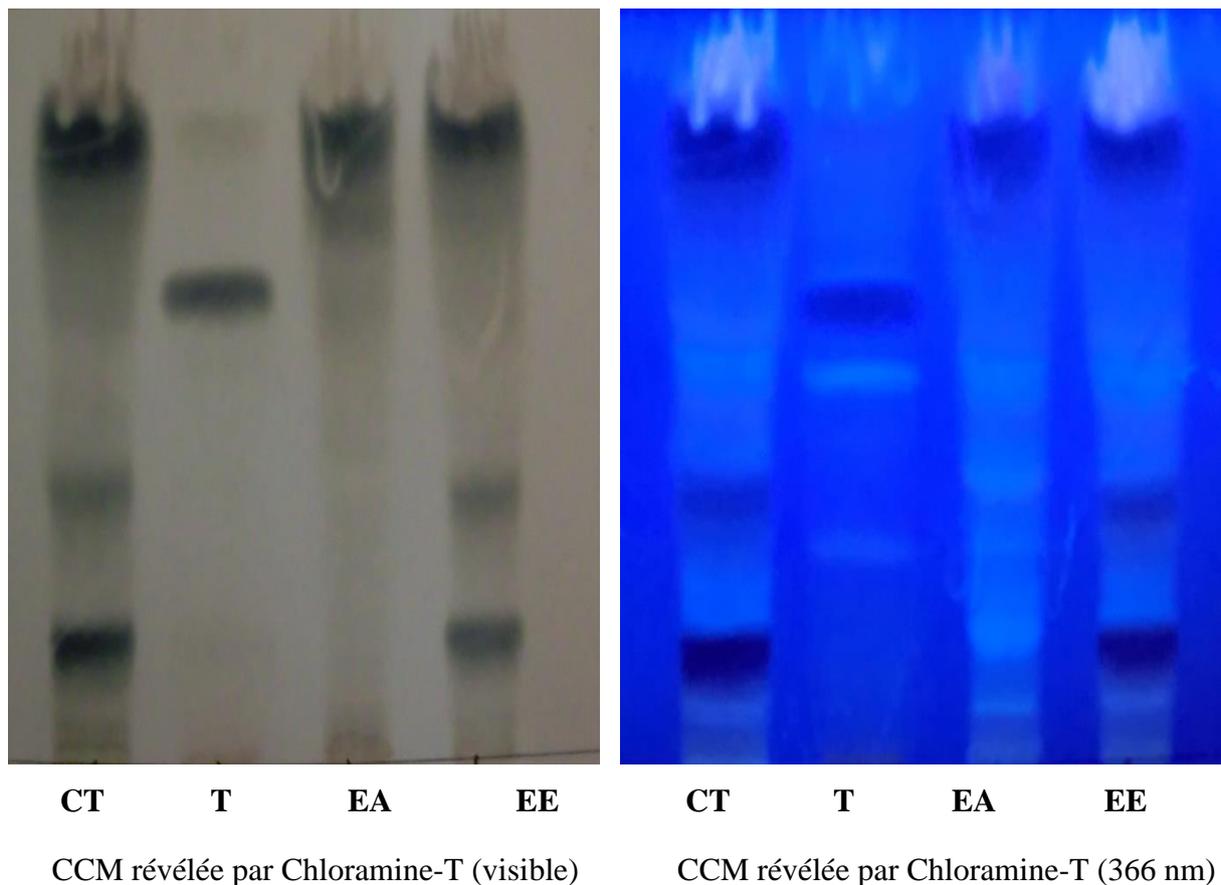


Figure 10 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera* révélé par chloramine-T acide trichloroacétique.

CT : Cardiotoniques Totaux (Extrait concentré en hétérosides cardiotoniques) ;

T : Témoin digoxine (extrait de Digoxine commerciale) ; EA : Extrait aqueux, EE : Extrait éthanolique

La révélation avec la chloramine-T acide trichloroacétique a permis de mettre en évidence plusieurs spots avec chaque extrait (figure 10). Ce réactif est spécifique aux glycosides digitaliques. Le témoin de référence constituée d'extrait de comprimés de commerce (Digoxine[®] 0,25) a permis de mettre en évidence 5 spots dont un spot gris (dans le visible) et marron (UV à 366 nm) de $R_f = 0,625$ indiquant la présence de glycosides digitaliques (digoxine). On note également que les extraits aqueux, éthanolique et celui concentré en hétérosides cardiotoniques présentent des spots de même coloration (grise dans le visible) à des R_f différent du témoin digoxine (annexe 5).

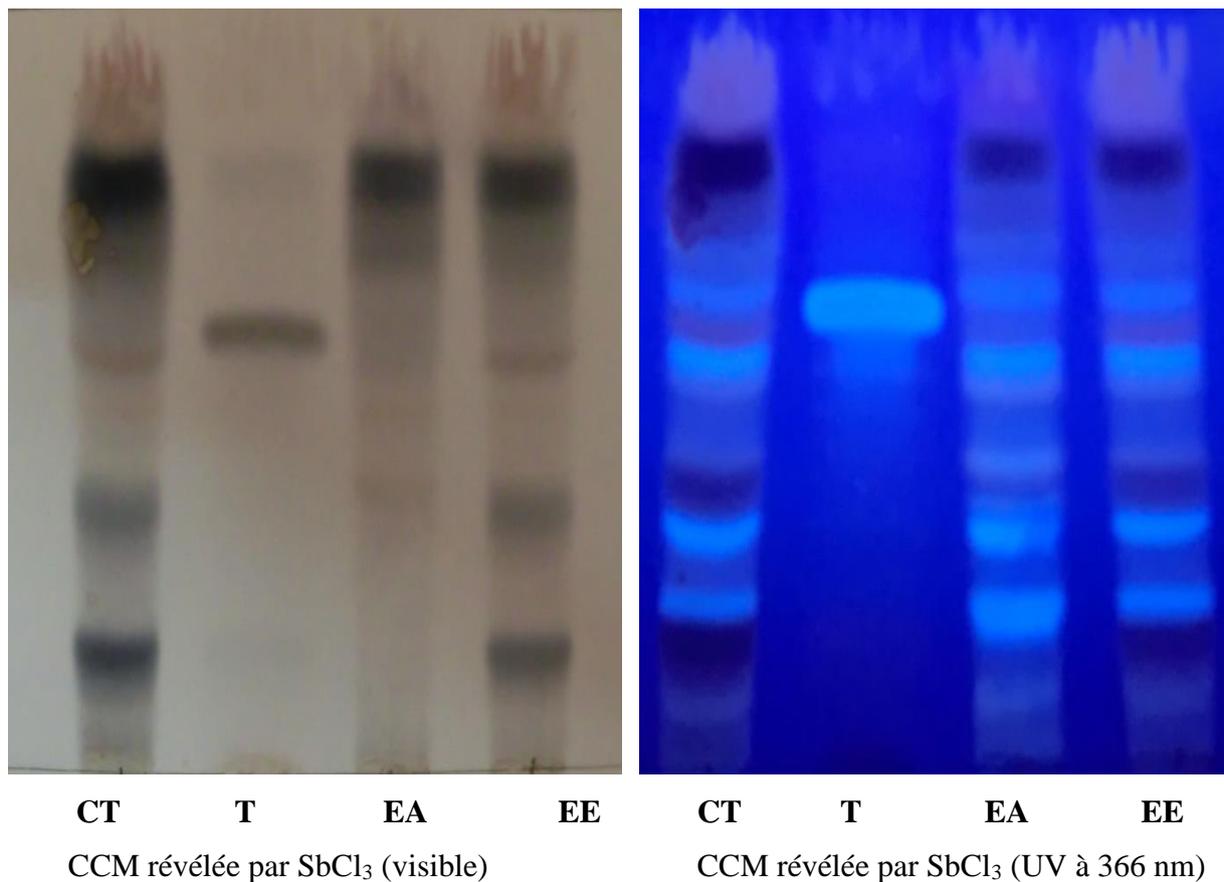


Figure 11 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera* révélé par le SbCl₃

CT : Cardiotoniques Totaux (Extrait concentré en hétérosides cardiotoniques) ;

T : Témoin digoxine (extrait de Digoxine commerciale) ; EA : Extrait aqueux, EE : Extrait éthanolique

Le trichlorure d'antimoine (SbCl₃) n'est pas spécifique aux hétérosides cardiotoniques mais permet de mettre en évidence une gamme variée de composés chimiques des plantes (Tableau XI). Le chromatogramme de la figure 11 et le tableau (annexe 6) nous indique qu'un spot de fluorescence bleu (Rf = 0,575) est présents dans tous les quatre extraits mais plus intense dans l'extrait de référence (Digoxine). Il y a également un spot bleuâtre plus intense dans les extraits de *C. procera* que dans l'extrait du comprimé de digoxine (Rf = 0,5). L'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques présente également le plus de spots que les autres extraits. Les réactions de caractérisation en tube avaient noté l'absence de caroténoïdes et de flavonoïdes.

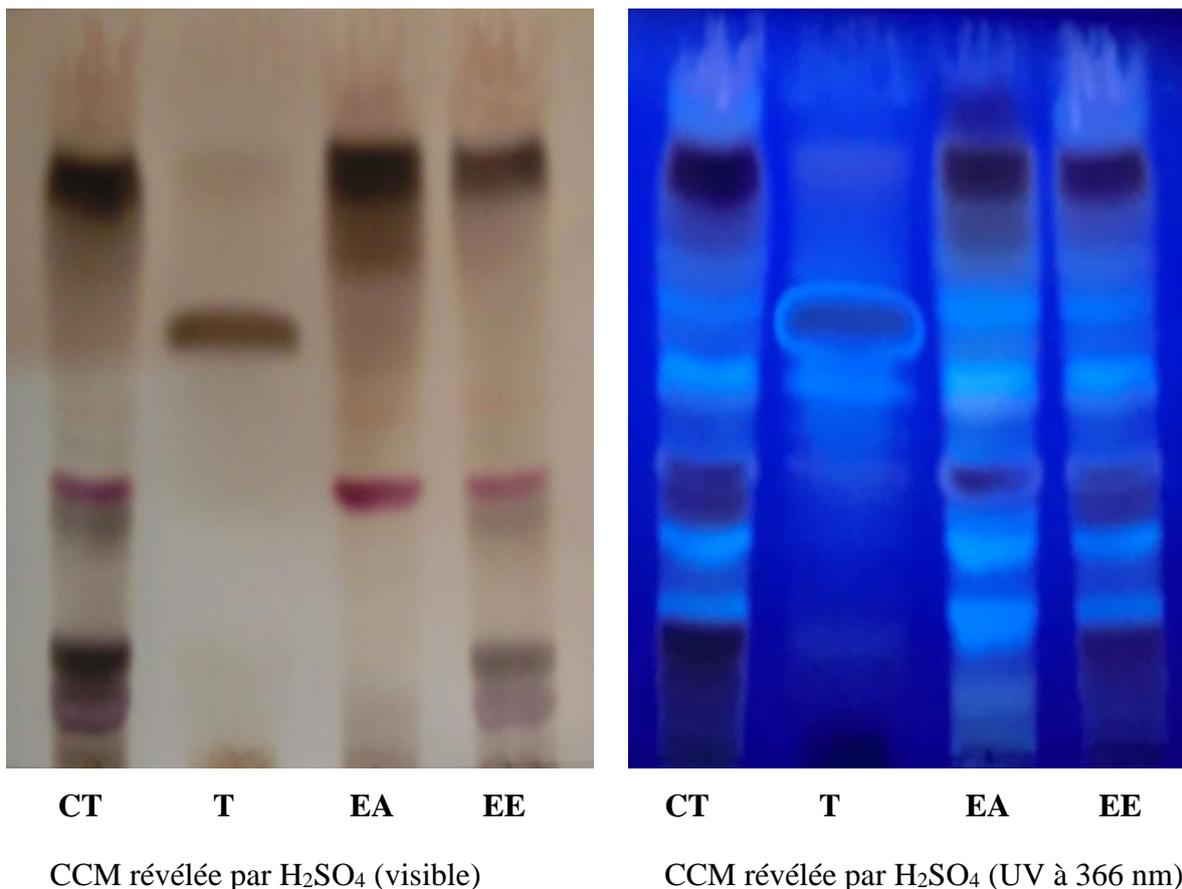


Figure 12 : Chromatogrammes des hétérosides cardiotoniques des extraits de poudre d'écorces de racines de *Calotropis procera* révélé par le H₂SO₄

CT : Cardiotoniques Totaux (Extrait concentré en hétérosides cardiotoniques) ;

T : Témoin digoxine (extrait de Digoxine commerciale) ; EA : Extrait aqueux, EE : Extrait éthanolique

La révélation avec le H₂SO₄ a permis de détecter 5 spots avec l'extrait de référence dont 2 communs avec les autres extraits et les autres spécifique (figure 12). Le spot gris (Rf = 0,575) du témoin de référence n'est pas présent dans les extraits de la plante. Il s'agit du spot de la digoxine. Des spots similaires au spot du témoin de référence de Rf = 0,575 sont présents dans les trois autres extraits mais à des Rf différents (annexe 7).

I.6. Dosage des cardénolides

Le tableau XVI présente la teneur en cardénolides (exprimé en équivalent digoxine) dans les extraits aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de *C. procera*.

Tableau XVI: Teneur en Cardénolides d'extrait des écorces de racines de *C. procera* selon la droite d'étalonnage (exprimé en équivalent digoxine)

Type d'extrait	Teneur en cardénolide (équivalent digoxine en %)
Extrait aqueux	0,01
Extrait hydroalcoolique	0,43

Ce résultat indique que la teneur en cardénolides est faible dans l'extrait aqueux comparativement à l'extrait hydroalcoolique.

II. ETUDES TOXICOLOGIQUES

II.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë d'extraits d'écorces de racines de *Calotropis procera* chez la souris NMRI

II.1.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de *Calotropis procera*

Au cours de l'étude de la toxicité générale aiguë chez la souris, l'essai limite à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel en administration unique par voie orale de l'extrait aqueux et de l'extrait hydroalcoolique n'a provoqué aucune mortalité 72 heures après le traitement chez les souris mâles et femelles. De même aucun changement de comportement, ou des changements dans la peau et la fourrure, la couleur des yeux, des muqueuses, aucune convulsion, ni salivation, ni diarrhée ni léthargie n'ont été observés durant les 14 jours qui ont suivi le traitement dans les groupes traités comparativement au groupe témoins.

II.1.2. Evaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de *Calotropis procera*

II.1.2.1. Toxidrome

Au cours de l'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait enrichie en hétérosides cardiotonique, nous avons noté chez les souris traitées à la dose de 2000 mg/kg l'apparition précoce (5 à 10 minutes après l'administration de l'extrait) de signes de toxicité dont notamment des troubles respiratoires, des atteintes neuromusculaires et des convulsions suivis

d'une mort des animaux. Les survivants voient leur état s'améliorer dès trente (30) minutes après l'administration de l'extrait jusqu'à une récupération totale au bout de deux (2) heures.

II.1.2.2. DL₅₀ orale

Le tableau XVII récapitule les doses testées, le nombre d'animaux mort par dose et par test ainsi que le délai de survenu de la mortalité.

Tableau XVII: Résultats du test de détermination de la DL₅₀ orale de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de *C. procera*

Doses	Mortalité premier test	Mortalité deuxième test	Délai de mortalité
300 mg/kg	0/3	0/3	30 min
2000 mg/kg	1/3	2/3	

A la lumière des résultats du tableau XVII et des consignes du schéma d'essai de l'OCDE (2001) (Annexe 9), la DL₅₀ de l'extrait est estimée à **2000** mg/kg de poids corporel.

II.2. Etude de la toxicité sub-chronique de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* chez le rat Wistar

L'administration quotidienne de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à des rats Wistars mâles et femelles pendant 3 et 6 semaines, à la dose de 20 mg/kg/jour, n'a induit aucune mortalité dans les deux sexes. L'observation générale ne montre aucun signe de toxicité grave liée au traitement chez les rats exposés à l'extrait.

II.2.1. Effet de l'extrait sur les paramètres physiques

a- Effet sur le poids corporel des animaux d'étude

Le tableau XVIII présente la moyenne du gain de poids corporel hebdomadaire des rats témoins et des rats traités quotidiennement avec l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante pendant 3 et 6 semaines. L'analyse statistique de ces résultats a révélée qu'il n'y a pas de différence significative entre le gain de poids des rats traités et témoins ($p > 0,05$).

Tableau XVIII: Moyenne hebdomadaire du gain de poids corporel (en gramme) chez les rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de *C. procera* pendant 3 et 6 semaines

Jours	Sexe	Dose (20 mg/kg/jour p.c.)		Témoins
		3 Semaines ^a	6 Semaines ^b	6 semaines ^c
0 - 7	M	3,5 ± 0,84	10,1 ± 3,87	5,8 ± 1,30
	F	8,17 ± 1,72	6,5 ± 2,76	6 ± 2,35
7 - 14	M	4,33 ± 1,97	8,6 ± 3,98	5,2 ± 2,17
	F	5,67 ± 2,25	7,4 ± 2,99	5,4 ± 2,61
14 - 21	M	3,83 ± 1,17	7,6 ± 3,89	4,6 ± 2,88
	F	5,83 ± 1,07	5,6 ± 2,91	5,8 ± 2,39
21 - 28	M		5,4 ± 3,13	4,2 ± 2,95
	F		4,4 ± 1,35	3,8 ± 1,92
28- 35	M		5 ± 2,16	5 ± 2,88
	F		3,6 ± 1,96	3,4 ± 1,34
35 - 42	M		3,8 ± 2,20	4,8 ± 2,39
	F		3,8 ± 1,32	3,6 ± 1,52

Moyenne ± SD (a : n = 6 ; b : n = 10 ; c : n = 5)

Pas de différence significative entre les rats témoins et traités ($p > 0,05$).

M= Mâle ; F= Femelle

b- Poids relatif des organes

Les poids relatifs des différents organes (foie, coeur, reins, poumons, estomac, testicules et ovaires) des rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de la plante sont illustrés dans le tableau XIX. Ce résultat montre qu'il n'y a pas de changement significatif des différentes valeurs entre les groupes traités et les groupes témoins ($p > 0,05$).

Tableau XIX: Poids relatif des organes des rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de *C. procera* pendant 3 et 6 semaines

Organes	Sexe	Dose (20 mg/kg/jour p.c.)		Témoins
		3 Semaines ^a	6 Semaines ^b	6 Semaines ^c
Foie	M	2,91 ± 0,20	2,88 ± 0,34	2,95 ± 0,44
	F	3,22 ± 0,15	3,19 ± 0,26	2,85 ± 0,22
Cœur	M	0,33 ± 0,03	0,38 ± 0,05	0,36 ± 0,05
	F	0,34 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,34 ± 0,05
Reins	M	0,53 ± 0,02	0,57 ± 0,09	0,62 ± 0,01
	F	0,53 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,56 ± 0,06
Poumons	M	0,49 ± 0,06	0,54 ± 0,07	0,52 ± 0,12
	F	0,52 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,48 ± 0,07
Estomac	M	2,38 ± 0,54	2,37 ± 0,64	2,81 ± 0,94
	F	2,58 ± 0,52	2,45 ± 0,42	2,78 ± 0,14
Testicules	M	1,58 ± 0,19	1,95 ± 0,43	1,73 ± 0,24
Ovaires	F	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,03

Moyenne ± SD (a : n = 6 ; b : n = 10 ; c : n = 5)

Pas de différence significative entre les rats témoins et traités ($p > 0,05$).

M= Mâle ; F= Femelle

II.2.2. Effet de l'extrait sur les paramètres hématologiques :

Les résultats des analyses hématologiques des échantillons de sang des rats témoins et traités quotidiennement avec l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante pendant 3 et 6 semaines sont illustrés dans le tableau XX. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes témoins et traités ($p > 0,05$).

Tableau XX: Valeurs des paramètres hématologiques (M ± SD) des rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de *C. procera* pendant 3 et 6 semaines

Paramètres	Sexe	Dose (20 mg/kg/jour p.c.)		Témoins
		3 Semaines ^a	6 Semaines ^b	6 Semaines ^c
RBC (×10 ⁶ /μL)	M	8,52 ± 0,91	7,96 ± 0,54	8,21 ± 0,90
	F	7,37 ± 0,45	7,83 ± 0,95	7,41 ± 0,64
MCV (fL)	M	49,33 ± 2,50	46,30 ± 0,67	46,2 ± 1,92
	F	50,67 ± 1,03	48,60 ± 2,07	48,00 ± 1,00
HCT (%)	M	42,02 ± 3,47	36,93 ± 2,76	38,12 ± 5,41
	F	37,17 ± 2,57	38,05 ± 3,90	35,66 ± 3,38
MCH (pg)	M	20,02 ± 1,58	20,04 ± 0,99	19,04 ± 2,14
	F	20,22 ± 0,75	19,75 ± 2,12	19,32 ± 1,65
MCHC (g/dL)	M	40,47 ± 2,43	43,20 ± 1,95	41,32 ± 5,85
	F	40,07 ± 1,46	40,49 ± 3,43	40,22 ± 3,63
RDW (%)	M	25,60 ± 1,48	27,03 ± 0,78	27,20 ± 1,42
	F	24,80 ± 0,66	29,13 ± 3,61	26,58 ± 1,07
WBC (×10 ³ /μL)	M	6,38 ± 3,48	7,08 ± 1,88	6,34 ± 0,80
	F	6,63 ± 3,97	5,62 ± 1,15	5,92 ± 1,55
HGB (g/dL)	M	16,95 ± 0,90	15,94 ± 1,40	15,50 ± 0,58
	F	14,88 ± 0,87	15,33 ± 1,09	14,26 ± 0,75
PLT (×10 ³ /μL)	M	513,33 ± 97,01	479,90 ± 96,37	520,80 ± 38,09
	F	487,00 ± 40,32	529,30 ± 87,89	492,60 ± 75,57
MPV (fL)	M	8,42 ± 0,33	8,16 ± 0,37	8,16 ± 0,39
	F	8,02 ± 0,15	8,08 ± 0,52	7,94 ± 0,27
PCT (%)	M	0,43 ± 0,08	0,39 ± 0,07	0,42 ± 0,03
	F	0,39 ± 0,04	0,43 ± 0,08	0,39 ± 0,07
PDW (fL)	M	43,00 ± 15,18	39,52 ± 13,30	43,96 ± 12,32
	F	55,05 ± 1,40	42,32 ± 12,11	40,92 ± 2,31

Moyenne ± SD (a : n = 6 ; b : n = 10 ; c : n = 5)

Pas de différence significative entre les rats témoins et traités (p > 0,05).

M= Mâle ; F= Femelle

II.2.3. Effet de l'extrait sur les paramètres biochimiques sériques :

Les résultats obtenus du dosage des transaminases (ALAT, ASAT), de la créatinine et des protéines totales sont illustrés dans le tableau XXI. Ces résultats indiquent une élévation non significative des transaminases ALAT au bout de 6 semaines de traitement et des transaminases ASAT au bout de 3 et 6 semaines de traitement chez les rats traités comparativement aux rats témoins ($p > 0,05$).

Pour les valeurs de la créatinine et des protéines totales, il n'y a pas de changement significatif entre les groupes traités et témoins ($p > 0,05$).

Tableau XXI: Valeurs des paramètres biochimiques ($M \pm SD$) des rats témoins et traités avec l'extrait des écorces de racines de *C. procera* pendant 3 et 6 semaines

Paramètres	Sexe	Dose (20 mg/kg/jour p.c.)		Témoins
		3 Semaines ^a	6 Semaines ^b	6 Semaines ^c
ALAT (U/L)	M	29,10 \pm 13,67	58,19 \pm 29,5	31,72 \pm 18,45
	F	32,29 \pm 12,08	53,32 \pm 26,76	35,75 \pm 10,42
ASAT (U/L)	M	124,18 \pm 53,04	121,64 \pm 64,76	77,52 \pm 23,59
	F	130,88 \pm 62,28	147,44 \pm 62,05	92,93 \pm 21,90
CREAT (mg/dL)	M	0,81 \pm 0,08	0,8 \pm 0,10	0,88 \pm 0,13
	F	0,81 \pm 0,06	0,79 \pm 0,07	0,87 \pm 0,05
Protéines totales (g/dL)	M	5,98 \pm 0,52	6,02 \pm 1,86	5,66 \pm 0,35
	F	7,26 \pm 0,66	6,24 \pm 1,13	6,31 \pm 0,30

Moyenne \pm SD (a : n = 6 ; b : n = 10 ; c : n = 5)

Pas de différence significative entre les rats témoins et traités ($p > 0,05$).

M= Mâle ; F= Femelle

II.2.4. Examen histopathologique de quelques organes

Les examens histologiques des coupes d'organes (Estomac, Foie, Rein, et Poumons) au microscope optique ont montré qu'il n'y avait pas d'importantes altérations histologiques chez les rats traités comparativement aux témoins.

Néanmoins, de légères congestions de l'estomac, des poumons, du foie et une dilatation des veines centrales du foie et des alvéoles pulmonaires ont été observés chez certains rats traités au bout de 3 et 6 semaines (Photo 9).

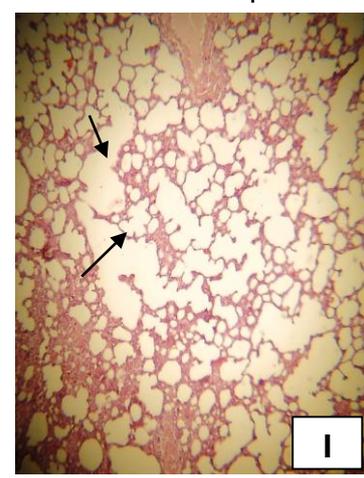
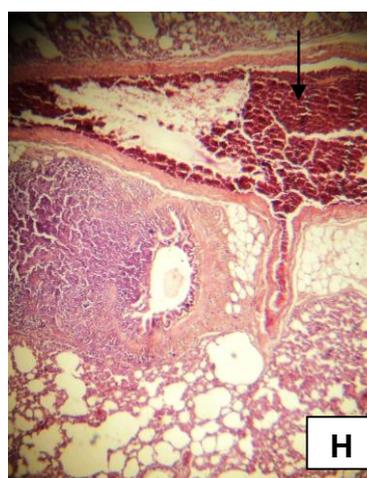
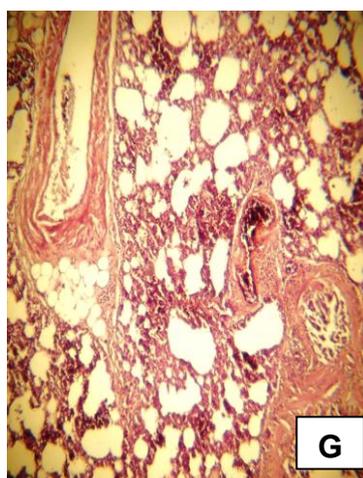
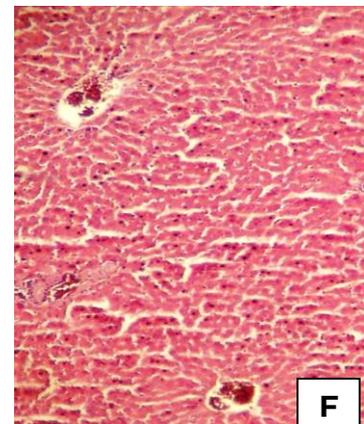
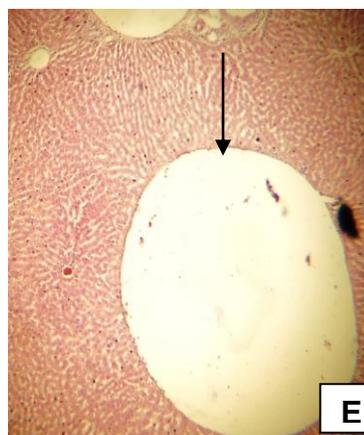
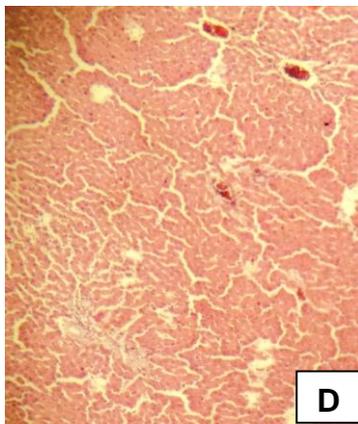
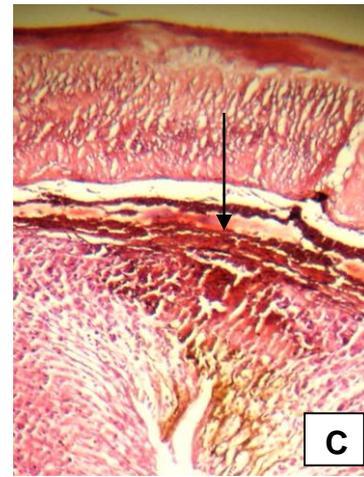
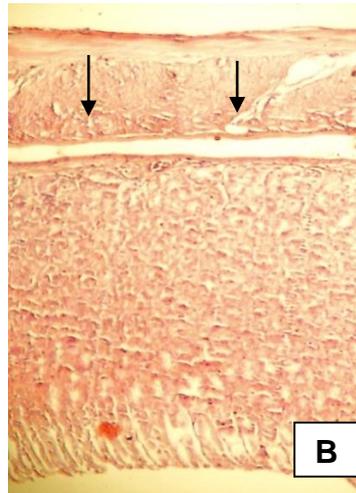
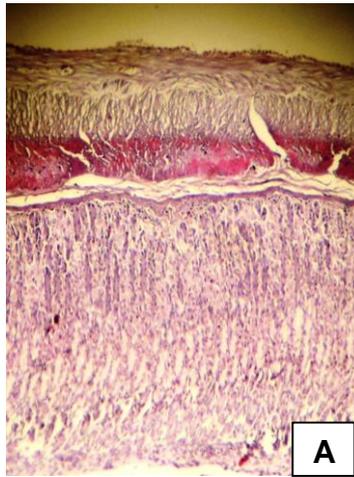
Témoins**Traités**

Photo 9 : Examen histopathologique des organes au microscope optique (Hématoxyline et éosine x 5)

A : Estomac normal ; B : Atrophie de la muqueuse; C : Congestion de l'estomac ;
D : Foie normal ; E : Dilatation des veines centrales du foie ; F : Légère congestion du foie ;
G : Poumon normal ; H : Congestion des poumons ; I : Dilatation des alvéoles pulmonaires.

II.3. Evaluation des effets toxiques cardiovasculaires

II.3.1. Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* sur la Pression artérielle systolique des rats

Les figures 13 et 14 présentent l'évolution de la pression artérielle systolique (PAS) des rats mâles et femelles témoins et traités quotidiennement avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg p.c. pendant 2 semaines.

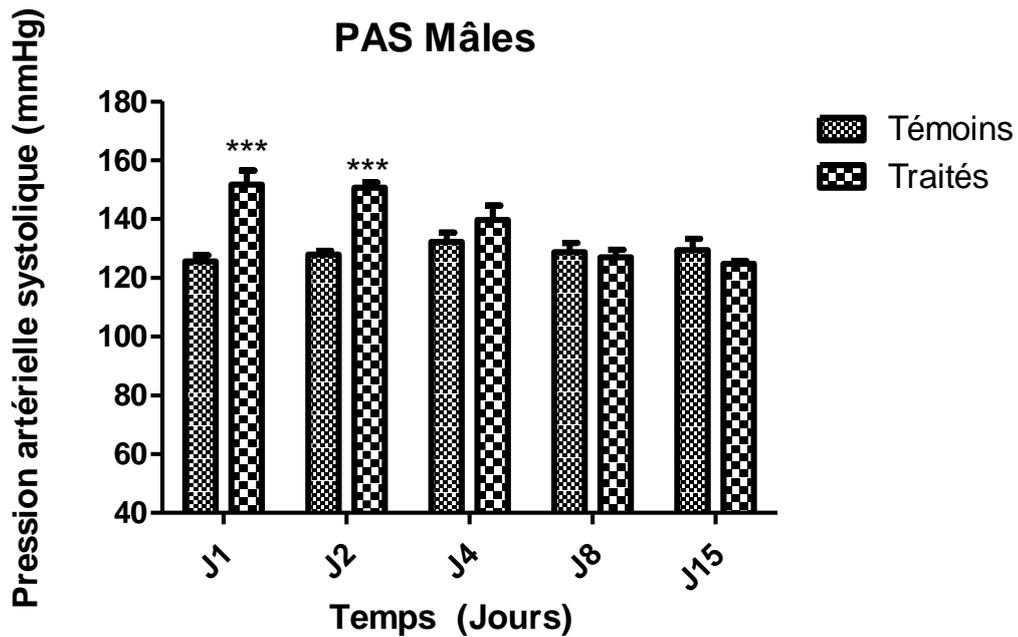


Figure 13: Evolution de la pression artérielle systolique chez les rats mâles témoins (n = 5) et traités (n = 5) avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * p<0,05 ; **p <0,01 ; *** P <0,001 par rapport aux témoins.

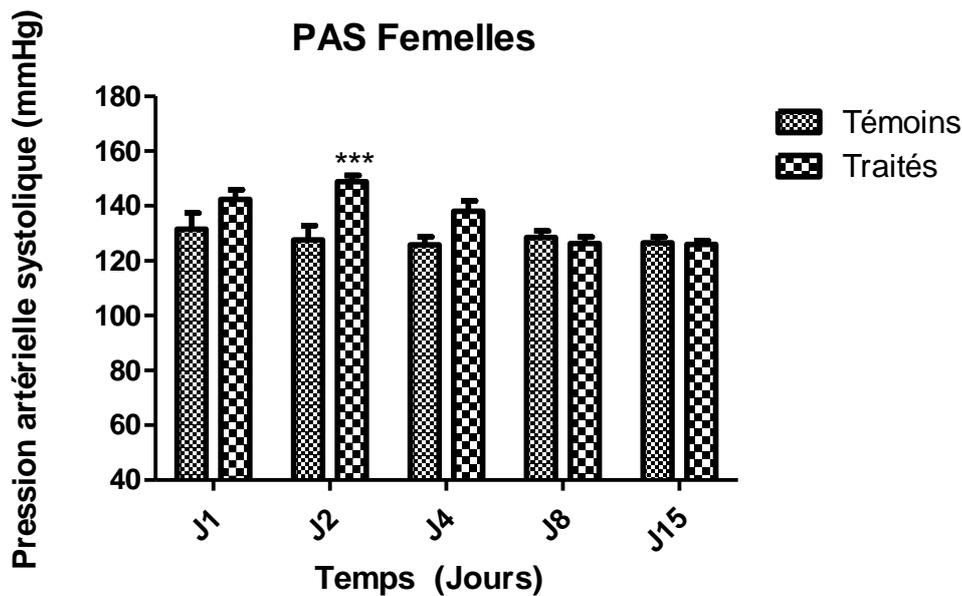


Figure 14: Evolution de la pression artérielle systolique chez les rats Femelles témoins (n = 5) et traités (n = 5) avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$ par rapport aux témoins.

L'analyse de ces figures (13 et 14) montre que l'administration quotidienne de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg chez les rats mâles et femelles induit une élévation de la PAS durant les trois (3) premiers jours de traitement suivi d'un retour aux valeurs de bases aux bout d'une semaine de traitement. Cette élévation a été statistiquement significative à J1 et J2 chez les rats mâles (figure 13) et à J2 chez les rats femelles traités (figure 14) comparativement aux rats témoins.

II.3.2. Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* sur la Pression artérielle diastolique des rats

Les figures 15 et 16 illustrent l'évolution de la pression artérielle diastolique (PAD) des rats mâles et femelles témoins et traités quotidiennement avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg p.c. pendant 2 semaines.

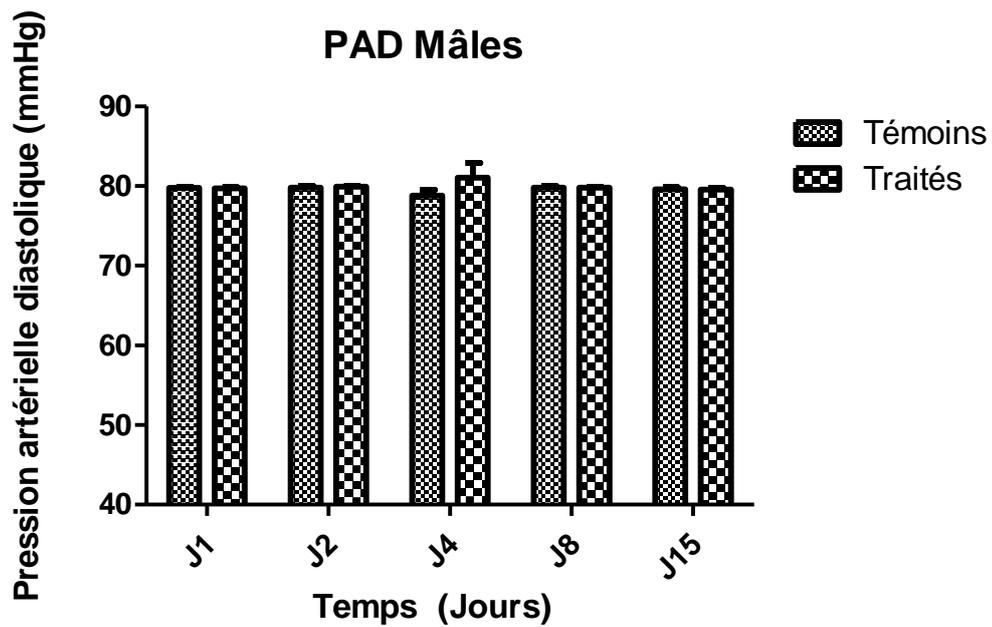


Figure 15 : Evolution de la pression artérielle diastolique chez les rats mâles témoins (n = 5) et traités (n = 5) avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * p<0,05 ; **p <0,01 ; *** P <0,001 par rapport aux témoins.

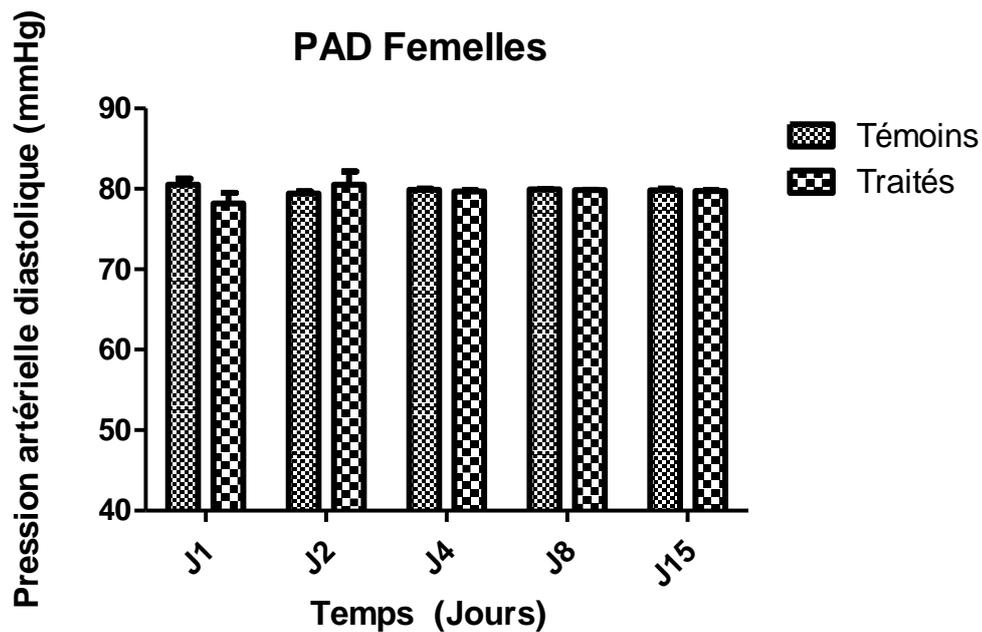


Figure 16 : Evolution de la pression artérielle diastolique chez les rats femelles témoins (n = 5) et traités (n = 5) avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * p<0,05 ; **p <0,01 ; *** P <0,001 par rapport aux témoins.

L'analyse de ces figures (15 et 16) montre que l'administration quotidienne de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg chez les rats mâles et femelles n'entraîne pas une modification de la PAD chez les rats traités comparativement aux rats témoins.

II.3.3. Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* sur la Pression artérielle moyenne des rats

Les figures 17 et 18 illustrent l'évolution de la pression artérielle moyenne (PAM) des rats mâles et femelles témoins et traités quotidiennement avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg p.c. pendant 2 semaines.

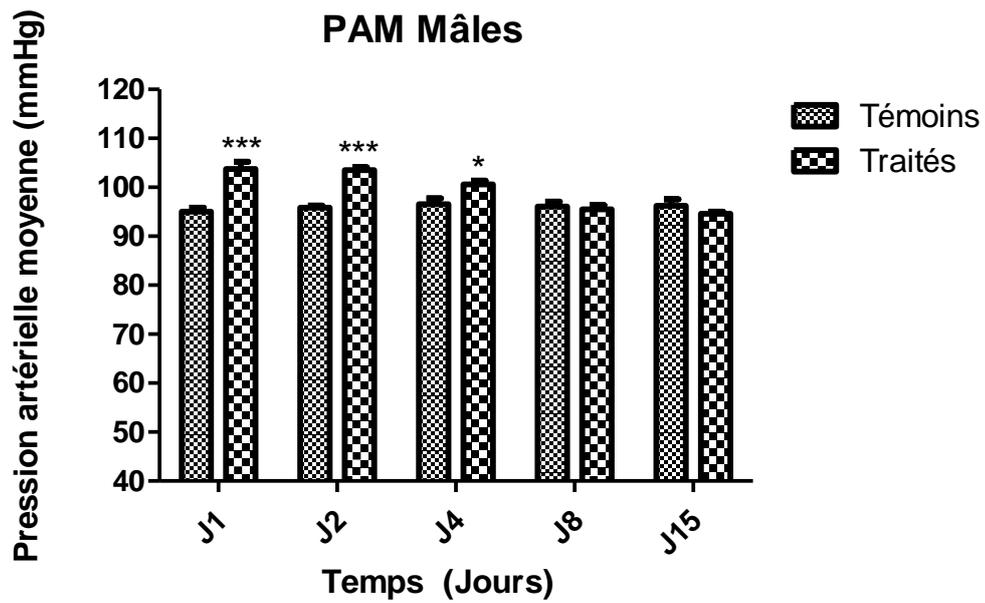


Figure 17 : Evolution de la pression artérielle moyenne chez les rats mâles témoins (n = 5) et traités (n = 5) avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$ par rapport aux témoins.

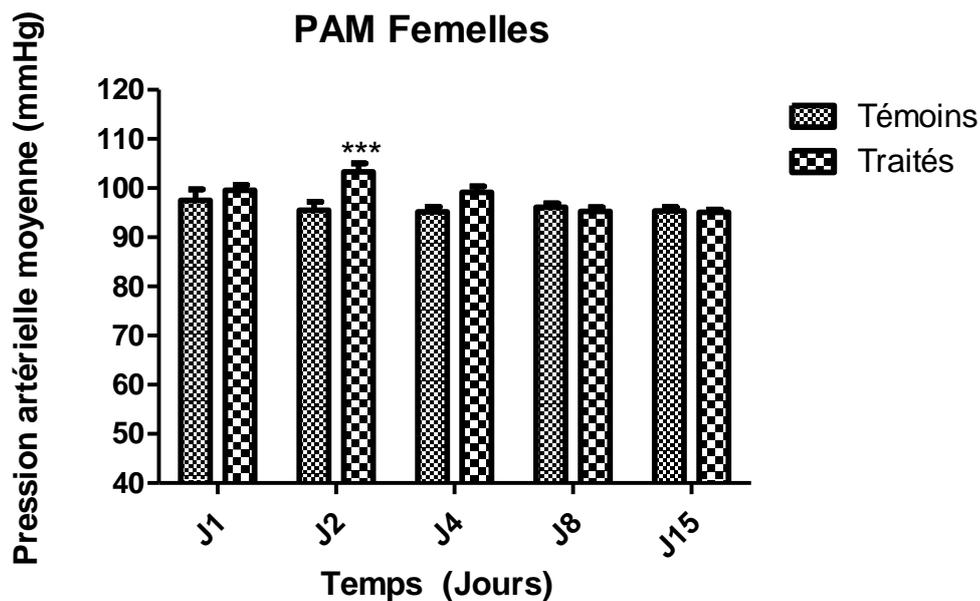


Figure 18 : Evolution de la pression artérielle moyenne chez les rats femelles témoins et traités avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$ par rapport aux témoins.

Comme présenté dans ces figures (17 et 18) l'administration quotidienne de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg chez les rats mâles et femelles entraîne une élévation significative de la PAM durant les trois (3) premiers jours de traitement chez les rats mâles (figure 17) et après 24 heures chez les rats femelles traités (figure 18) comparativement aux rats témoins, suivi d'un retour aux valeurs de bases au bout d'une semaine de traitement.

II.3.4. Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* sur la fréquence cardiaque des rats

Les figures 19 et 20 représentent l'évolution de la fréquence cardiaque (FC) des rats mâles et femelles témoins et traités quotidiennement avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg p.c. pendant 2 semaines.

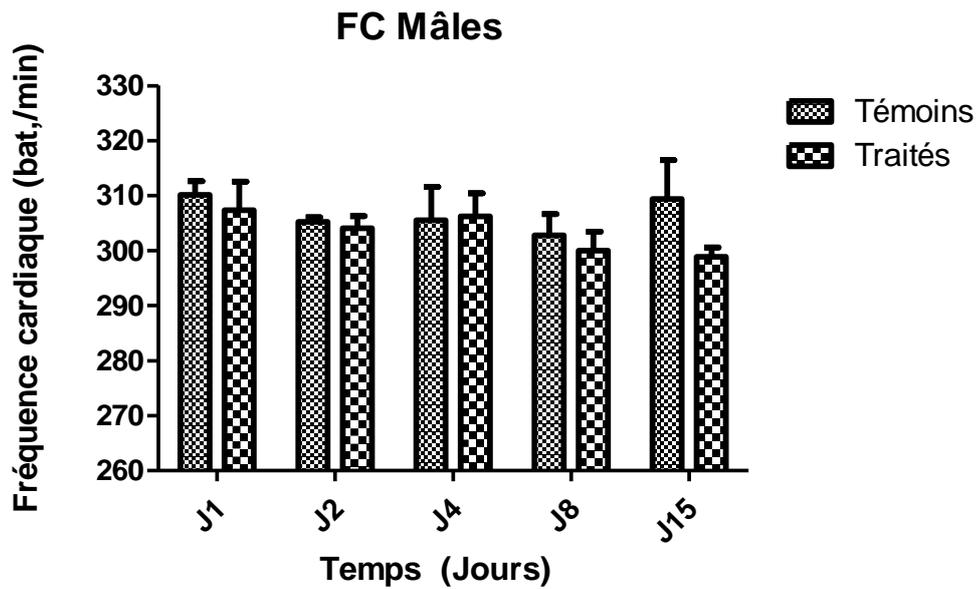


Figure 19 : Evolution de la fréquence cardiaque chez les rats mâles témoins (n = 5) et traités (n = 5) avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * p<0,05 ; **p <0,01 ; *** P <0,001 par rapport aux témoins.

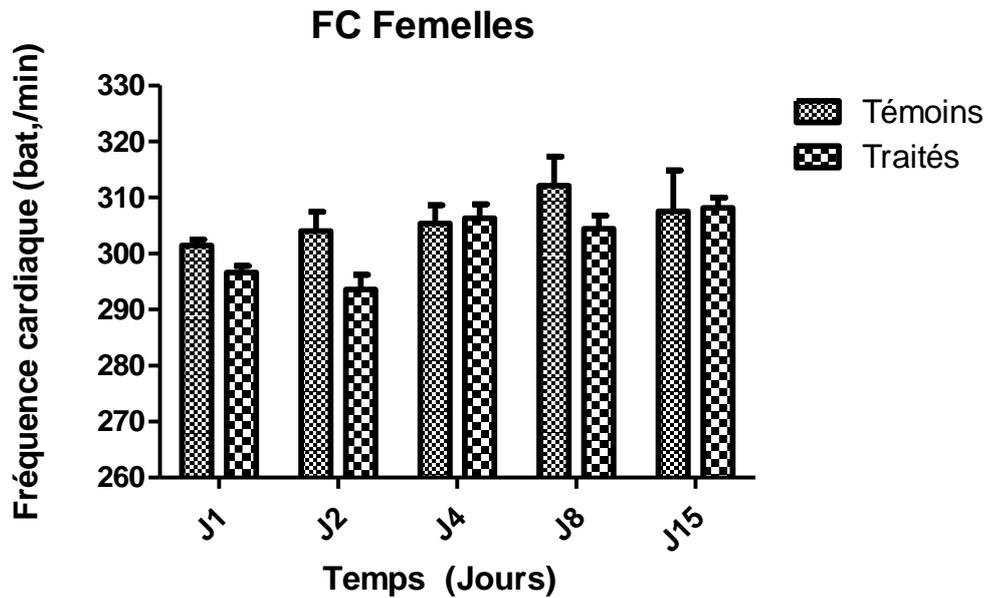


Figure 20 : Evolution de la fréquence cardiaque chez les rats Femelles témoins (n = 5) et traités (n = 5) avec l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* en fonction du temps

Les Moyennes \pm ESM sont présentées.

* Les valeurs de p : * p<0,05 ; **p <0,01 ; *** P <0,001 par rapport aux témoins.

Comme présenté dans ces figures (19 et 20) l'administration quotidienne de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* à la dose de 20 mg/kg chez les rats mâles et femelles n'a pas d'effet statistiquement significatif sur la fréquence cardiaque des rats mâles et femelles traités comparativement aux rats témoins.

II.4. Evaluation de la cytotoxicité

II.4.1. Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur la viabilité cellulaire

II.4.1.1. Profil de la croissance cellulaire par le test au MTT

L'effet des concentrations croissantes de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* sur la viabilité des cellules Caco-2 en utilisant le test MTT est représenté sur la figure 21 (a). L'extrait aqueux des écorces de racines de la plante a induit une mort cellulaire de manière concentration dépendante. La concentration entraînant une perte de 50% de la viabilité cellulaire (CI_{50}) des cellules Caco-2, est d'environ 33 $\mu\text{g/mL}$ après 48 heures d'exposition à l'extrait de plante.

L'effet des concentrations croissantes de l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante sur les cellules Neuro-2a en utilisant le test MTT est représenté sur la figure 21 (b). L'extrait aqueux provoque également la mort cellulaire d'une manière dépendante de la concentration, mais avec une CI_{50} d'environ 1802 $\mu\text{g/mL}$ après 48 heures d'exposition des cellules à l'extrait.

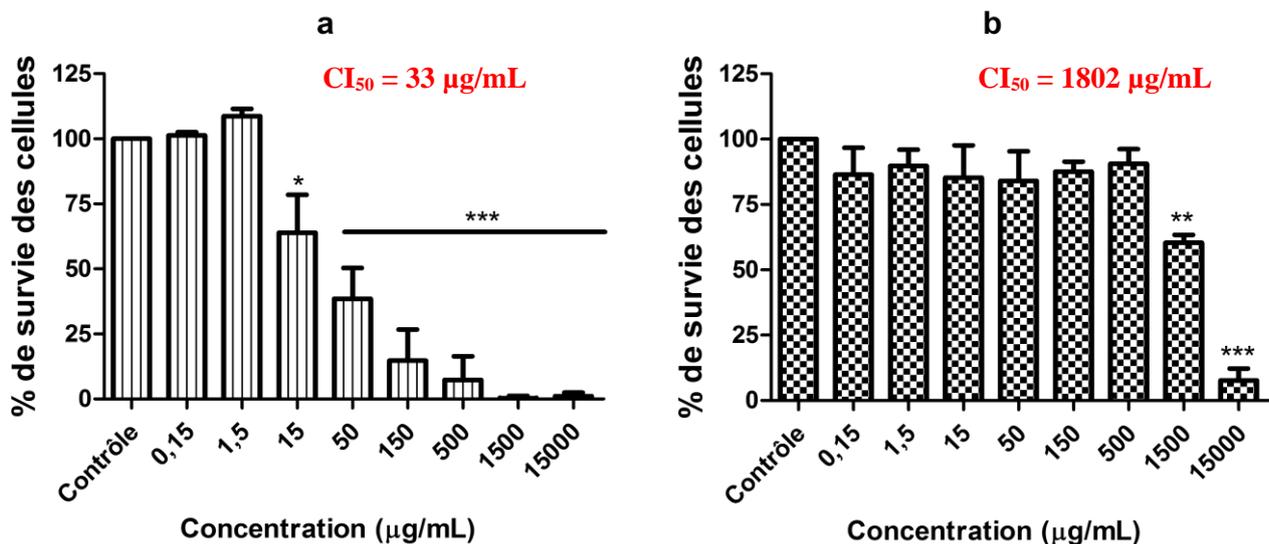


Figure 21: Effet cytotoxique de l'extrait aqueux d'écorces de racines de *Calotropis procera* sur les cellules Caco-2 (a) et Neuro-2a (b) par le test au MTT

Les Moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes sont présentées ($n = 18$).

* Les valeurs de p: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$ par rapport au contrôle.

La comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux de la plante sur les deux (2) lignées cellulaires (Figure 22) montre que les cellules Neuro -2a sont moins sensibles (55 fois moins sensible) à l'extrait aqueux de la plante comparativement aux cellules Caco-2 (CI_{50} des cellules Neuro 2a > CI_{50} des cellules Caco-2).

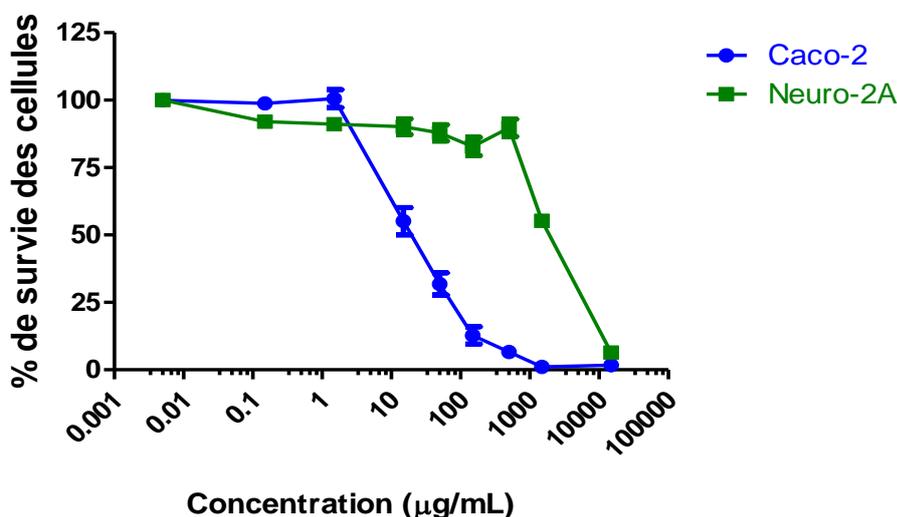


Figure 22: Comparaison de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur les cellules Caco-2 et Neuro-2a

II.4.1.2. Profil de la croissance cellulaire par le test au rouge neutre

L'effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* sur la viabilité des cellules Caco-2 et Neuro-2a en utilisant le test au rouge neutre est représenté sur la figure 23. Comme le montre cette figure, l'extrait aqueux de la plante entraîne une inhibition de la croissance cellulaire de manière concentration dépendante après 48 heures d'exposition. L'inhibition était significativement différente du témoin (cellules non traitées, $p < 0,05$) avec des concentrations inhibitrices 50 % (CI_{50}) d'environ 11 µg/mL pour les cellules Caco-2 et de 230 µg/mL pour les cellules Neuro-2a.

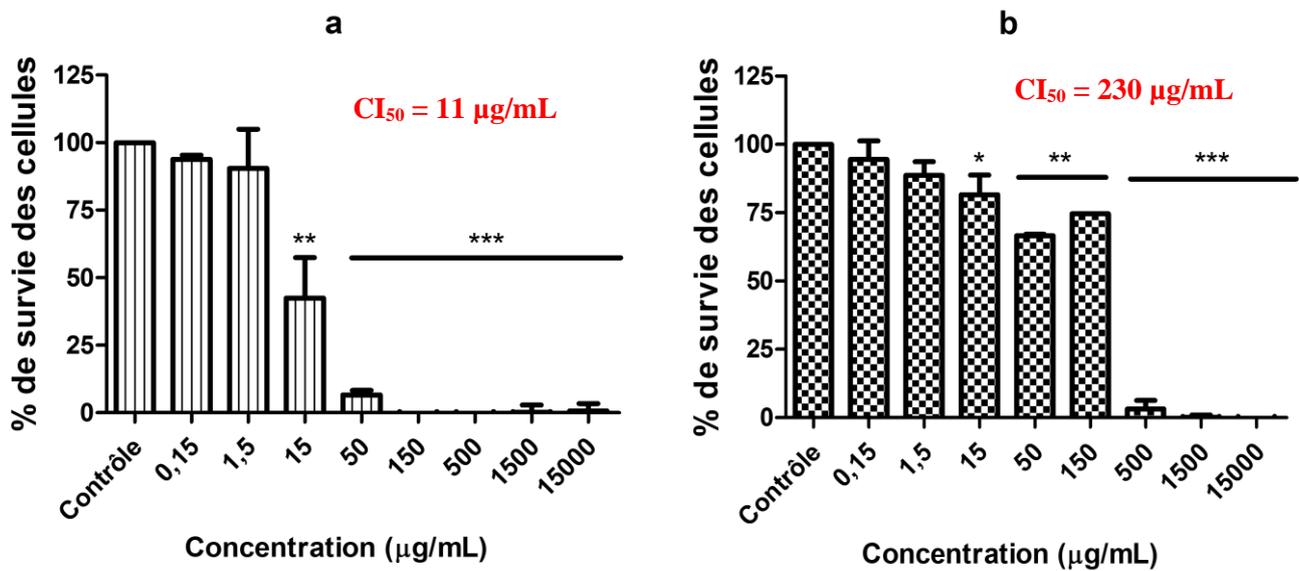


Figure 23 : Effet cytotoxique de l'extrait aqueux d'écorces de racines de *Calotropis procera* sur les cellules Caco-2 (a) et Neuro-2a (b) par le test au Rouge Neutre

Les Moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes sont présentées (n = 18).

* Les valeurs de p: * p<0,05; **p <0,01; *** P <0,001 par rapport au contrôle.

La comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux de la plante sur les deux (2) lignées cellulaires par le test au RN (Figure 24) montre encore une fois que les cellules Neuro-2a sont moins sensibles (20 fois moins sensible) que les cellules Caco-2cells (CI_{50} des cellules Neuro 2a > CI_{50} des cellules Caco- 2).

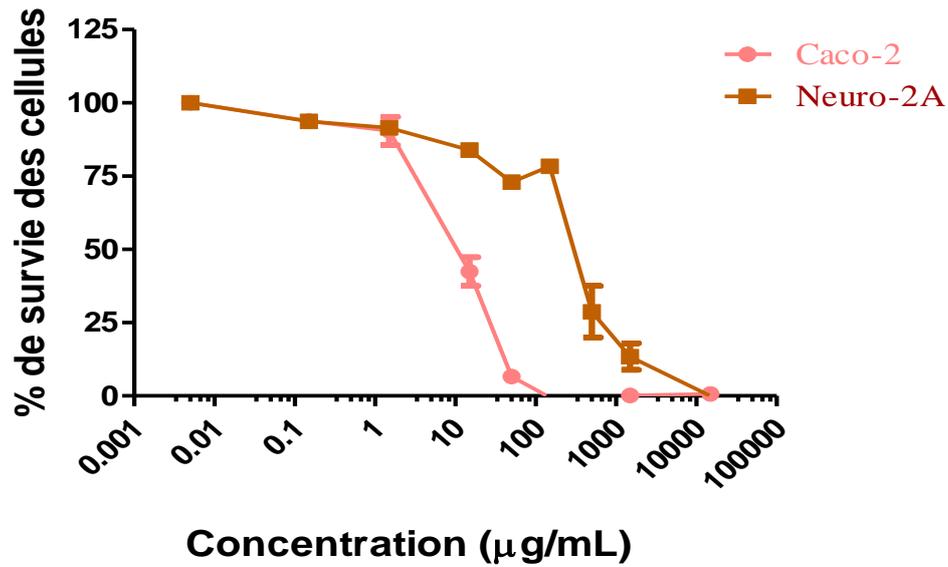


Figure 24 : Comparaison de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur les cellules Caco-2 et Neuro-2a par le test au RN

II.4.1.3. Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur les cellules Caco-2 et Neuro-2A par le test au MTT et au RN

La comparaison de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux de la plante sur la viabilité cellulaire des cellules Caco-2 par les tests au MTT et au Rouge Neutre (Figure 25) montre que les deux tests peuvent être utilisés alternativement.

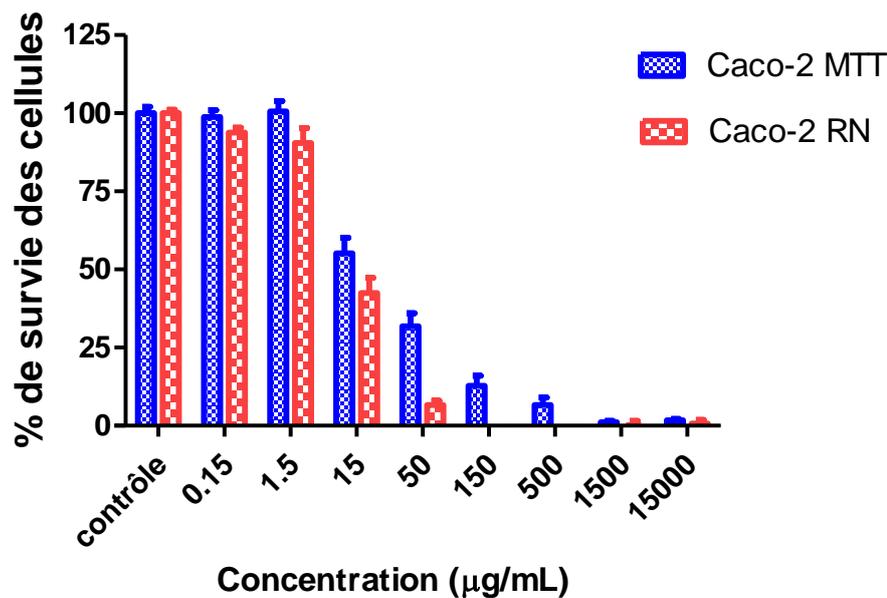


Figure 25 : Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur les cellules Caco-2 par le test au MTT et au RN

La comparaison de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux de la plante sur la viabilité cellulaire des cellules Neuro-2A par les tests au MTT et au Rouge Neutre (Figure 26) montre également une similarité entre les deux tests. L'extrait agirait donc au niveau mitochondriale par inhibition de l'activité de la succinate déshydrogénase mais aussi au niveau des membranes cellulaires par altération des membranes par un mécanisme qui reste à identifier.

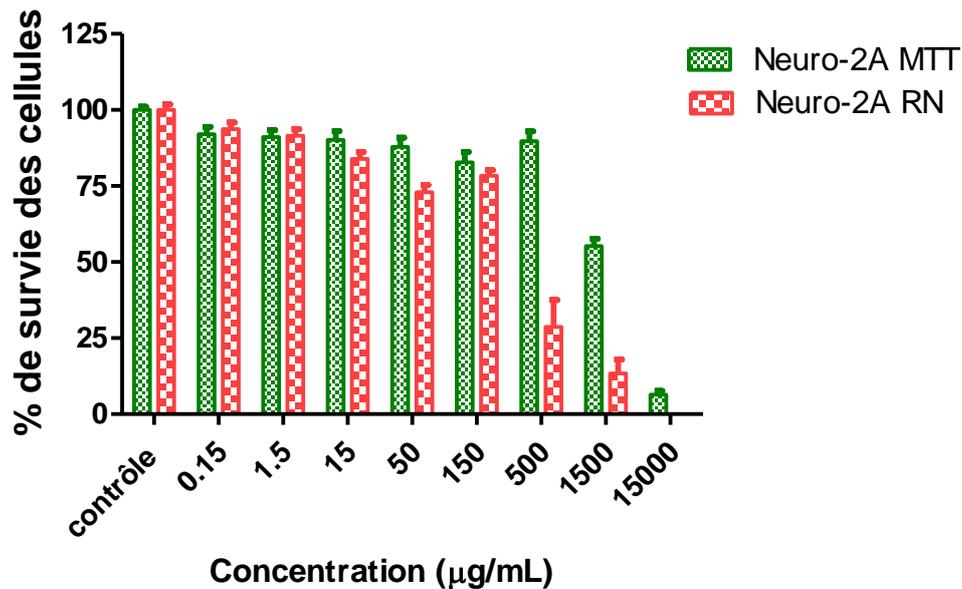
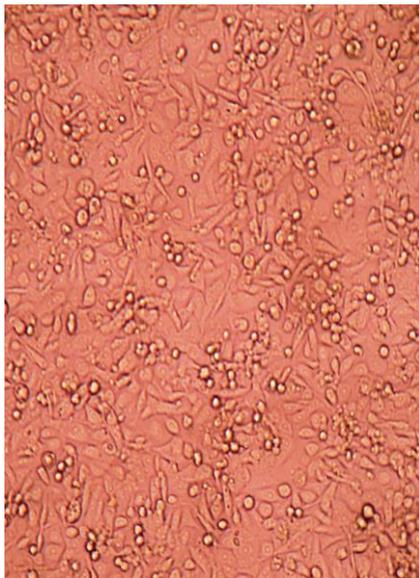


Figure 26 : Comparaison des effets cytotoxiques de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur les cellules Neuro-2a par le test au MTT et au RN

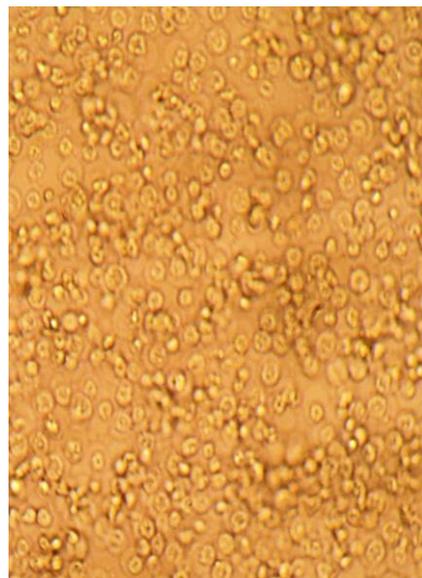
II.4.2. Aspect morphologique des cellules

II.4.2.1. Aspect morphologique du tapis cellulaire des cellules Caco-2

L'observation de l'aspect des cellules au microscope inversé après 48 heures d'exposition à l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* montre que l'extrait induit des changements morphologiques et une mort cellulaire dans les puits traités comparativement au puits témoins. Pour les cellules Caco-2 on observe clairement que l'apparence de la couche cellulaire a changé dans les puits traités comparativement aux témoins ce qui suggère fortement qu'une mort cellulaire se produit dans les puits traités avec l'extrait (Photo 10).



a: Contrôle

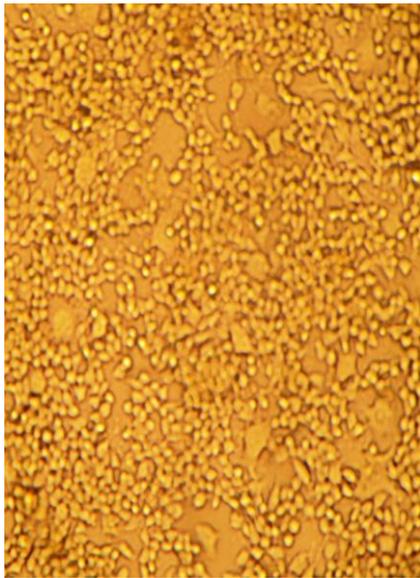


b: EA (15 mg/ml)

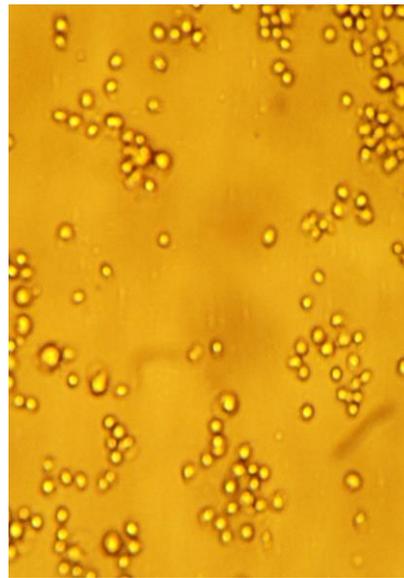
Photo 10 : Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur la morphologie des cellules Caco-2 après 48h d'exposition (G = x 40) : A= Contrôle; B= EA (15mg/mL).

II.4.2.2. Aspect morphologique du tapis cellulaire des cellules Neuro-2a

L'observation des cellules Neuro-2a au microscope inversé 48 heures après exposition montre également que l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante entraîne une mortalité des cellules dans les puits traités avec une forte concentration de l'extrait (15 mg/mL) (Photo 11 (b)) comparativement aux témoins (Photo 11 (a)). On peut voir d'après la Photo 11 (b) que la couche de cellules est plus clairsemée par rapport à la couche de cellules témoins sur la Photo 11 (a).



a : Contrôle



b: EA, (15mg/ml)

Photo 11 : Effet de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* sur la morphologie des cellules Neuro-2a après 48h d'exposition (G = x 40) : A= Contrôle; B= EA (15mg/mL).

II.4.3. Test de fragmentation de l'ADN

Pour élucider le mécanisme de la mort cellulaire, un test de fragmentation de l'ADN a été réalisé sur les cellules Caco-2. Comme le montre la Photo 12, le traitement des cellules avec des concentrations élevées de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* (50 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 24 heures abouti à une dégradation aléatoire de l'ADN qui diffuse dans le gel et non pas à une fragmentation internucléosomale de l'ADN, sous forme d'échelle, comme on peut le voir dans l'ADN de cellules apoptotiques (exemple Photo 13). Seul l'ADN provenant de cellules traitées avec 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de l'extrait est resté intact comme l'ADN des cellules non traitées (témoins) qui reste bien en haut du gel.

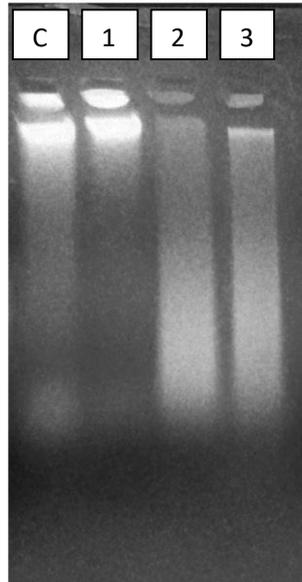
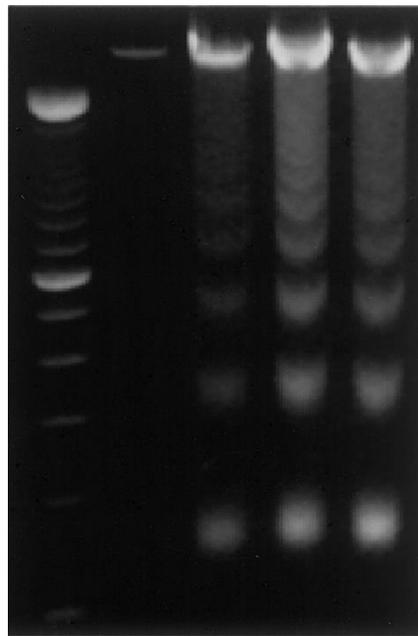


Photo 12 : Effet de l'extrait des écorces de racines de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br sur la fragmentation de l'ADN des cellules Caco-2.

(C) : Contrôle ; (1) : EA 10 µg/ml ; (2) : EA 50 µg/ml ; (3): EA 100 µg/ml



M : Marqueur
 ADN de cellules en apoptose

Photo 13: Image montrant la fragmentation d'ADN de cellules en apoptose (D'après Erkan E. *et al.*, 2001, modifié)

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE

I. LIMITE DE L'ETUDE

La non disponibilité d'animaux de laboratoire (rat) nous a obligé à utiliser une seule dose de l'extrait aqueux (20 mg/kg) pour l'évaluation de la toxicité chronique et de la toxicité cardiovasculaire de nos extraits. Cette dose correspond à environ 200 mg de poudre d'écorces de racines de la plante par kilogramme de poids corporel soit 14g de poudre végétal chez un homme de 70 kg. Comparer à la posologie de FACA[®] qui est de maximum 672 mg de poudre de *C. procera* par jour pour un adulte de 70kg, la dose de 20 mg/kg soit 200 mg/kg de poudre est près de 20 fois la dose prescrite.

II. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

II.1. Teneur en eau et en cendres

Les teneurs en eau déterminées par la méthode pondérale et la méthode azéotrope de la poudre des écorces de racines de la plante sont toutes inférieures à dix (10) %, ce qui est en faveur d'une bonne conservation de la poudre des écorces de racines de la plante sans risque d'altération majeure des principes chimiques (Paris et Moyse, 1965). En effet une teneur en eau trop élevée pourrait favoriser le développement de certaines réactions enzymatiques pouvant conduire à une modification des caractères organoleptiques et l'altération des propriétés thérapeutiques de la drogue par dégradation des principes actifs dans le temps. Aussi une humidité résiduelle élevée pourrait favoriser la prolifération de microorganismes tels que les bactéries, les levures et les moisissures au cours de la durée de la conservation de la poudre de matière végétale (Charbier, 2010). Cependant il convient de conserver nos poudres dans un dessiccateur pour éviter l'effet de l'humidité ambiante.

Les teneurs en cendres totales, cendres chlorhydriques et cendres sulfuriques de la poudre des écorces de racines de la plante ont été de 6,5 ; 3,93 et 7,67 % respectivement ce qui traduit une richesse de la poudre végétale en élément minéraux. Nikiema (2005) a trouvé des teneurs de 10,17 ; 2 ; 13,78 % respectivement pour les cendres totales, chlorhydriques et sulfuriques dans la poudre des écorces de racines de *C. procera* de Mali. Cette différence d'avec nos résultats pourrait s'expliquer par les facteurs édaphiques c'est-à-dire le milieu ou le sol dans

lequel les racines ont été récoltées ; la composition minéralogique des sols étant différente d'un milieu à un autre.

II.2. Réaction de caractérisation en tubes

Les réactions de caractérisation en tube ont permis de mettre en évidence la présence des composés tels que les coumarines, les saponosides, les oses et holosides, les polyuronides (mucilages), les stérols et triterpènes et les hétérosides cardiotoniques dans la poudre des écorces de racines de *C. procera*.

Cependant on note l'absence des alcaloïdes, des composés phénoliques et polyphénoliques dans la poudre d'écorces de racines de la plante. Ces résultats corroborent ceux de Nikiéma (2005) qui avait montré la présence de caroténoïdes, de stéroïdes, d'hétérosides cardiotoniques, d'hétérosides triterpéniques, de saponosides, d'oses et d'holosides et de polyuronides (mucilages) dans les écorces de racines de *C. procera* du Mali.

Ouédraogo (2001) a révélé la présence des alcaloïdes, des saponines, des stérols et triterpènes (sous forme hétérosidique) dans le macéré aqueux des écorces de racines de *C. procera* du Burkina Faso. Mainasara *et al.* (2012) ont également révélé la présence des alcaloïdes, des saponines, des glycosides cardiaques et des stéroïdes dans l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* du Nigéria.

Contrairement aux résultats rapportés par Malick et Chughutai (1979), Al – Yahia (1986) et Saleh *et al.* (1993) selon lesquels toutes les parties de la plante contiendraient des cardénolides, des alcaloïdes, des saponines, des stérols et triterpènes, des coumarines, des tanins et des flavonoïdes, nous n'avons caractérisé ni alcaloïdes ni tanins.

L'absence de certains composés (alcaloïdes, tanins) dans la poudre des écorces de racines de la plante pourrait s'expliquer par les facteurs climatiques et édaphiques mais aussi par la faiblesse de leur teneur dans les écorces de racines de la plante. Ces facteurs sont d'une importance capitale dans les biosynthèses végétales (Millogo, 1992).

L'absence des flavonoïdes dans les écorces de racines pourrait s'expliquer par la faiblesse de leur teneur. En effet, Lal *et al.* (1985) rapportent que les racines de *Calotropis procera* contiennent 1,66% de rutine (flavonoïde majeur dans la plante qui est la quercétine 3 – Rutinoside) alors que dans les fleurs et dans le latex, elle représente respectivement 7,63% et 9,74%.

Les principaux groupes chimiques rencontrés dans la poudre des écorces de la plante ont des propriétés pharmacologiques diverses mais dans certaines conditions peuvent engendrer des effets toxiques.

Les saponosides rencontrés au niveau des écorces de racines de la plante sont des irritants cellulaires sur différents organes, expectorants sur le parenchyme pulmonaire, hémolytiques sur les hématies par contact direct (Charpentier, 2008).

Les hétérosides cardiotoniques ont une action sur le cœur et les vaisseaux en provoquant une perte de potassium intracellulaire par inhibition de l'ATP-ase membranaire sodium-potassium dépendante. La perte de potassium est compensée par une entrée accrue de sodium. La pompe à sodium a tendance à refouler le sodium hors de la cellule. Le potassium entre dans la cellule par un mécanisme de transport actif. Ces deux transports ont besoin d'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP sous l'influence de l'ATP-ase, elle-même inhibée par les cardiotoniques (Cohen, 2008).

Les hétérosides cardiotoniques provoquent également une contraction des fibres musculaires lisses du tractus gastro-intestinal, des bronches et de l'utérus à dose toxique par un mécanisme d'accroissement des mouvements transmembranaires du calcium et d'inhibition des transports du sodium et du potassium (Cohen, 2008).

Les coumarines et dérivés quant à elles sont des hypothermisants, hypotenseurs, anticoagulants et antispasmodiques.

II.3. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM

La caractérisation des hétérosides cardiotoniques par CCM a permis de confirmer la présence de ces groupes chimiques dans les extraits de la plante et leur mise en évidence par les réactions de caractérisation en milieu liquide. En effet, l'analyse du chromatogramme de la figure 6 a montré qu'en plus des spots violets similaires proches du témoin de référence (Digoxine) de $R_f = 0,625$, les trois extraits de la plante ont présenté des spots communs de même coloration (violette). Le réactif de Kedde est spécifique aux glycosides stéroïdiques ayant un cycle γ -lactone, c'est-à-dire les cardénolides (Jork *et al.*, 1990). On peut donc dire que les solvants utilisés ont extrait les mêmes composés du groupe, et que chaque extrait contient une gamme de cardénolides.

La révélation des chromatogrammes avec la chloramine-T et l'acide trichloroacétique qui est un réactif spécifique aux glycosides digitaliques a permis de mettre en évidence un spot de couleur gris (dans le visible) et marron (UV à 366 nm) de $R_f = 0,625$ indiquant la présence de glycosides proches des glycosides digitaliques (digoxine). Des spots de même coloration sont présents dans les trois autres extraits de la plante mais à des R_f différents. Cette situation suggère que les extraits aqueux, éthanolique et le concentré en hétérosides cardiotoniques contiennent des cardénolides qui sont soit des analogues structuraux de la digoxine ou d'autre type de cardénolides. De même la révélation avec le H_2SO_4 d'une part et le $SbCl_3$ d'autre part a montré la présence de spots similaires à celui du témoin de référence de même R_f mais également de R_f différents dans les différents extraits de la plante. Ces réactifs ne sont pas spécifiques aux glycosides digitaliques mais permettent de mettre en évidence des composés tels que les stéroïdes, les sapogenines/saponosides, les glycosides stéroïdiques et cardiotoniques (Jork *et al.*, 1990).

Les résultats obtenus de l'analyse des différents chromatogrammes suggèrent qu'il y a peu de glycosides cardiotoniques similaires à la digoxine (utilisé comme témoins de référence) dans les différents extraits (extrait aqueux, extrait éthanolique, et extrait concentré en hétérosides cardiotonique). Par ailleurs, tous les extraits de la plante contiennent des cardénolides dont la structure semble proche de la digoxine mais également d'autre type de cardénolides. Nos résultats corroborent ceux d'autres auteurs qui ont auparavant rapporté que des cardénolides tels que la Calotoxine et la Calactine ont été isolés des écorces de racines de *C. procera* (Neuwinger, 1996, Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).

II.4. Dosage des cardénolides

Le dosage des cardénolides a été réalisé par spectrophotométrie UV et a permis d'évaluer leur teneur dans les extraits aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de *C. procera*. Le résultat obtenu montre que la teneur en cardénolides dans l'extrait aqueux est faible comparativement à l'extrait hydroalcoolique. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence des solvants d'extraction utilisés et par la nature physico-chimique des cardénolides présents dans la plante. En effet, les hétérosides cardiotoniques sont des composés moyennement polaires donc beaucoup plus extractibles avec des solvants moyennement polaires comme l'éthanol plus ou moins dilué (Bruneton, 2009).

III.EVALUATION DE LA TOXICITE GENERALE AIGÛE

De nombreuses investigations menées sur *C. procera* ont rapporté que la plante possède de nombreuses propriétés pharmacologiques. La toxicité des différentes parties dont les parties aériennes et le latex de la plante a déjà été évaluée. Cependant, il y a très peu d'informations sur la toxicité des écorces de racines et des cardénolides extrait de la plante qui ont fait l'objet de notre étude.

III.1. Evaluation de la toxicité générale aiguë des extraits totaux aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de *Calotropis procera*

Dans cette étude de toxicité générale aiguë chez la souris NMRI, l'essai limite à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel en administration unique par voie orale de l'extrait aqueux et hydroalcoolique des écorces de racines de la plante n'a causé ni mortalité, ni des signes de toxicité au cours de la période d'observation. Ces résultats indiquent que les deux extraits de la plante ont une DL₅₀ supérieure à 2000mg/kg et suggère que ces extraits sont des produits qui ont une faible toxicité orale selon le système de classification globalement harmonisé de l'OCDE (2001), celle de l'OMS (2002) et du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nation Unis (2011). La quantité de poudre sèche de la drogue pour une utilisation sans danger chez un homme de 70 kg (soit 1/100^{ème} de la DL₅₀) serait de 14,61 g.

Nos résultats sont similaires à ceux Mossa *et al.* (1991) qui ont montré que l'extrait à l'éthanol des parties aériennes de *C. procera* ne provoque pas de toxicité par voie orale chez la souris à des doses allant jusqu'à 3000 mg/kg.

Des travaux antérieurs d'évaluations de la toxicité générale aiguë d'extraits des écorces de racines de *C. procera* du Burkina Faso par voie intra-péritonéale ont conduit à des DL₅₀ de 973 mg/kg (Ouédraogo, 2001) et 109 mg/kg (Ouédraogo, 2009) respectivement pour l'extrait aqueux et hydrométhanolique. La différence d'avec nos résultats pourrait s'expliquer par la différence des voies d'administrations. En effet la voie intra-péritonéale offre une grande biodisponibilité de la substance toxique comparativement à la voie orale.

D'autres auteurs ont constaté que la décoction aqueuse et l'extrait à l'éthanol des écorces de racines de *C. procera* du Mali à des doses de 1500 et 2000 mg/kg a provoqué une mortalité de 20-40% chez des rats Wistar (Circosta *et al.*, 2001). La différence d'avec nos résultats peut

s'expliquer par la procédure d'extraction, le type d'animal utilisé, mais aussi les facteurs édaphiques du sol qui peuvent influencer la composition chimique des extraits.

III.2. Evaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de *Calotropis procera*

L'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de *C. procera* nous a permis d'obtenir une DL₅₀ de 2000 mg/kg chez la souris NMRI. Cette valeur de DL₅₀ permet de classer l'extrait dans la catégorie 5 du système de classification globalement harmonisé (OCDE, 2001) et du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (Nations Unis, 2011) c'est-à-dire des produits faiblement toxique.

Lohoues *et al.* (2006) ont obtenu une DL₅₀ orale de 2611,75 mg/kg chez le rat OFA avec le latex de *C. procera* dont la teneur en cardénolides serait de 162 mg/g de poids sec (Seiber *et al.*, 1982). Au cours de notre étude nous avons obtenu une teneur en hétérosides cardiotoniques totaux de 26 mg/g de poids sec avec la poudre des écorces de racines de la plante, teneur qui est inférieure à celle du latex.

Par rapport à la digoxine, qui est un cardénolide de référence, la DL₅₀ de l'extrait concentré en hétérosides cardiotonique des écorces de racines de la plante est plus de 300 fois supérieure à celle de la digoxine qui est de 7,8 mg/kg par voie orale chez la souris. Ces résultats indiquent que les cardénolides présent dans la poudre des écorces de racines de la plante sont des composés faiblement toxiques et donc différents de la digoxines.

IV. ETUDE DE LA TOXICITE SUB-CHRONIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DES ECORCES DE RACINES DE *CALOTROPIS PROCERA*

L'étude de la toxicité sub-chronique a montré que l'administration quotidienne par voie orale de l'extrait aqueux à la dose de 20 mg/kg/jour de poids corporel pendant 3 à 6 semaines n'a pas causé de mortalité ni des signes cliniques de toxicité. Le gain moyen hebdomadaire de poids corporel et le poids relatif des organes des groupes traités étaient semblable au groupe témoin. Le poids corporel et le poids relatif des organes sont connus pour être des indicateurs sensibles des effets toxiques (Michael *et al.*, 2007). Dans cette étude, le poids corporel de tous les animaux a augmenté durant la période d'administration ce qui suggère que l'extrait aqueux

n'influence pas le gain de poids de l'animal. Ces résultats corroborent ceux d'autres chercheurs qui ont également observé ce gain de poids avec l'extrait aqueux des feuilles de *C. procera* chez des lapins (Pouokam *et al.*, 2011 ; Shahat et Shihata, 2012).

Le profil hématologique est important à connaître dans le traitement de la drépanocytose.

Dans cette étude de toxicité sub-chronique nous avons trouvé qu'il n'y avait pas de changements significatifs dans les paramètres hématologiques entre les groupes traités et témoins. Selon certains auteurs, il existerait une corrélation entre la toxicité hématologique, gastro-intestinal et les effets indésirables cardiovasculaires entre les animaux et les humains (Osion *et al.*, 2000).

Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux produits chimiques toxiques et son atteinte constitue un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et l'animal (Li *et al.*, 2010).

Les indices hématologiques chez les animaux sont importants pour déterminer le risque de toxicité puisque des changements dans le système sanguin ont une valeur prédictive supérieure pour la toxicité humaine. Les indices hématologiques obtenus dans cette étude suggèrent que l'extrait aqueux de la plante n'est pas toxique sur les paramètres hématologiques parce qu'elles n'affectent pas les cellules sanguines circulantes ou leur production. Ainsi, l'ingestion de l'extrait aqueux ne doit pas avoir des effets néfastes sur les composants cellulaires du sang chez les patients drépanocytaires.

Nos résultats ont été semblables à ceux de Dada *et al.* (2002) qui ont constaté que l'administration quotidienne par voie orale du latex de *C. procera* chez le rat pendant 7 et 14 jours n'a pas d'effets significatifs sur les paramètres sanguins.

Pour les paramètres biochimiques, une légère élévation des transaminases ALAT et ASAT a été observée, mais il n'y avait pas de différences statistiquement significatives. Nos résultats sont similaires à ceux d'autres auteurs qui ont constatés une légère élévation des enzymes sériques chez des rats traités avec du latex de *C. procera* (Dada *et al.*, 2002).

L'élévation des transaminases Alanine aminotransférase (ALAT) et Aspartate aminotransférases (ASAT) est généralement liée à des dommages ou des maladies affectant le foie qui conduit à la libération de ces enzymes hépatocellulaires dans la circulation sanguine (Pagana et Pagana, 2002).

Nos résultats indiquent que le foie n'a pas été fortement endommagé pour libérer des quantités significatives de ces enzymes dans le sang en raison de la quantité d'extrait administré (Odutola, 2000). La quantité d'enzyme libérée dans le sang est directement proportionnelle au nombre de cellules endommagées et l'intervalle de temps entre la lésion et le test (Adedeji *et al.*, 2002).

La légère congestion et dilatation des veines centrales du foie observé au cours de l'examen histologique pourraient expliquer la légère élévation des transaminases ALAT et ASAT observée dans cette étude.

En ce qui concerne les valeurs de la créatinine et des protéines totales, il n'y avait aucune variation significative entre les groupes traités et groupes témoins, ce qui signifie que les reins et le foie n'ont pas été fortement endommagés, respectivement.

La créatinine est un métabolite du sérum qui est indicatif de la fonction rénale (Whitby *et al.*, 1987). Les valeurs normales de la créatinine obtenues suggèrent que les reins n'ont pas été endommagés. La cyto-architecture normale du rein trouvé au cours de l'examen histologique a confirmé ces résultats.

La dose de 20 mg/kg (soit environ 200 mg/kg de poudre sèche) utilisée dans cette étude de toxicité sub-chronique est plus de 15 fois la dose utilisée dans le FACA®. L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude de la toxicité sub-chronique indiquent que l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante est toléré en administration répétée par voie orale et qu'il n'y aurait pas de risques de toxicité chez les patients drépanocytaires sous traitement FACA®. Néanmoins une surveillance des paramètres biochimiques notamment les transaminases ALAT et ASAT est indispensable chez les patients sous traitement FACA® afin d'éviter la survenue d'effets secondaires néfastes.

Par ailleurs, une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours ou une étude de toxicité chronique de 6 mois utilisant aux moins trois doses serait utile pour déterminer la dose sans effet toxique permettant d'évaluer le risque d'une utilisation des poudres d'écorces de racines de *C. procera*.

V. EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES CARDIOVASULAIRE

L'évaluation de l'effet toxique cardiovasculaire de l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* a été réalisée grâce à une méthode non sanglante que nous avons préalablement validée au sein de notre laboratoire en s'inspirant de la méthode décrite précédemment par Gerold et Tschirky (1968). Cette méthode, contrairement aux autres techniques de mesures notamment la mesure de la pression artérielle et la fréquence cardiaque par la méthode sanglante présente des avantages. En effet, elle évite les inconvénients que pourraient causer les anesthésiques et le traumatisme opératoire dans l'installation des cathéters. Aussi elle permet d'étudier la toxicité chronique cardiovasculaire suite à une administration réitérée d'un produit ; la pression artérielle et la fréquence cardiaque pouvant être mesurées régulièrement chez le même animal durant la période d'étude. Ainsi les effets des produits qui pourraient affecter la pression artérielle et la fréquence cardiaque à court, moyen ou long terme peuvent être détectés.

Au cours de l'étude des effets toxiques cardiovasculaire de l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante, une dose unique de 20 mg/kg de l'extrait a été administrée quotidiennement par voie orale aux rats pendant deux (2) semaines. Le choix de cette dose a été basé sur le fait qu'une étude préliminaire de toxicité sub-chronique a révélé que l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante est toléré en administration quotidienne par voie orale chez le rat Wistar pendant 6 semaines à la même dose (Ouédraogo *et al.*, 2013).

L'évaluation de l'effet de l'extrait aqueux de la plante sur la pression artérielle des Rats a révélé une élévation significative de la pression artérielle systolique et moyenne chez les rats traités avec l'extrait à la dose de 20 mg/kg durant les 3 premiers jours de traitement suivi d'un retour aux valeurs de bases aux bout d'une semaine de traitement. Les valeurs de la pression artérielle systolique et moyenne des rats témoins quant à elles ont été quasiment constantes durant la période de l'étude. Les valeurs de la pression artérielle systolique obtenue chez les rats wistars témoins sont comparables à ceux d'autres auteurs ayant utilisés des méthodes similaires (méthodes non sanglante). En effet, Ratsimbason *et al.* (1984) ont montré que la pression artérielle systolique normale des rats wistar se situe entre 120 et 140 mm Hg en utilisant la méthode non sanglante. Aussi, Joshi *et al.* (2012) ont obtenue des valeurs de la PAS d'environ 139 mm Hg chez des rats wistar en utilisant la technique de mesure de la pression artérielle par le manchon caudal chez des rats non anesthésiés.

L'élévation significative de la pression artérielle systolique peut s'expliquer par la présence des cardénolides dans l'extrait aqueux des écorces de racine de la plante. En effet, les

cardénolides sont connus pour leurs actions sur le système cardiovasculaire. Ils agiraient au niveau de la membrane en inhibant la pompe Na^+/K^+ ATPase ce qui aurait pour conséquence une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ionisé (Bruneton, 2009). Cette accumulation d'ion calcium Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire conduit à un renforcement de la contraction musculaire, et notamment myocardique et à une élévation de la pression artérielle (Blaustein, 1974 ; Demiryurek et Demiryurek, 2005 ; Rahimtoola, 2004). Aussi des cardénolides isolés de la plante comme la calotropine, la calotoxine et l'uscharine auraient une action pharmacodynamique proche de celle de l'ouabaïne (Bouquet et Debray, 1974) ce qui pourrait expliquer l'élévation de la pression artérielle obtenue.

Au cours de l'évaluation de l'effet toxique cardiovasculaire de l'extrait de la plante, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre les valeurs de la pression artérielle diastolique des rats traités comparativement aux témoins. De même il n'y a pas eu de changement significatif sur la fréquence cardiaque des rats traités à la même dose de l'extrait (20 mg/kg) comparativement au rat témoin. Ces résultats pourraient s'expliquer par la dose de l'extrait utilisé, cette dose étant faible pour induire un effet chronotrope négatif chez les rats traités.

VI. EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE

La cytotoxicité est considérée essentiellement comme étant la capacité d'un composé à induire la mort cellulaire. Les tests de cytotoxicité *in vitro* sont largement utilisés pour le criblage de produits chimiques, pour la prédiction de la toxicité chez l'animal ou l'humain (Eisenbrand *et al.*, 2002) . Ils permettent une évaluation rapide de la toxicité d'un produit et également une réduction de l'utilisation des animaux pour les tests de toxicité. Certaines différences dans la mesure de la viabilité peuvent être trouvées en fonction du test utilisé dans l'essai de cytotoxicité (Weyermann *et al.*, 2005). Par conséquent, le test MTT et un test non enzymatique, le test au Rouge Neutre ont été réalisées pour évaluer l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. sur des lignées de cellules Caco-2 et Neuro-2a. Le choix des cellules Caco-2 était basée sur le fait qu'ils ont été largement utilisés pour les études de l'absorption intestinale et la toxicité des xénobiotiques (Meunier *et al.*, 1995 ; Prueksaritanont *et al.*, 1996 ; Schmiedlin-Ren *et al.*, 1997 ; Lawson-Evi *et al.*, 2008 ; Diallo *et al.*, 2009). De plus près, ce modèle de lignée cellulaire permet l'étude du métabolisme des xénobiotiques presystemiques. Enfin ce sont des cellules

d'origine intestinale, leur réactivité en présence des extraits de *C. procera* pourrait révéler une éventuelle toxicité d'organe spécifique.

Le choix des cellules Neuro-2a a été basé sur fait qu'ils sont une lignée de cellules neuronales de souris qui sont largement utilisé pour étudier la différenciation neuronale, les voies de signalisation et aussi des toxiques des neurones (Olmsted *et al.*, 1970).

Les résultats obtenus au cours de notre étude ont montrés que l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante sont cytotoxiques sur les cellules Caco-2 et les cellules Neuro-2a tant par le test de cytotoxicité au MTT que par le test au Rouge Neutre. Le plus fort effet cytotoxique de l'extrait a été observé sur les cellules Caco-2 et les résultats ont été assez similaires dans les deux tests. Les concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) ont été de 33 et 11 µg/mL respectivement pour les tests au MTT et au Rouge Neutre. Pour les cellules Neuro-2a, l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante a induit une faible cytotoxicité avec les deux méthodes. Une inhibition significative de la croissance cellulaire a été obtenue à des concentrations de l'extrait supérieures à 1,5 mg/mL.

La comparaison de l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux de la plante sur la viabilité cellulaire des cellules Caco-2 et Neuro-2a par les tests au MTT et au Rouge Neutre montre une similarité entre les deux tests. Mais le test au RN conduit à des concentrations inhibitrices 50% nettement plus faibles (3 à 8 fois) que le test au MTT, respectivement dans les cellules Caco-2 et dans les cellules Neuro-2A.

Le test au MTT montre que l'extrait aqueux de la plante induit la cytotoxicité en modifiant le métabolisme mitochondrial grâce à un effet sur l'activité de la succinate déshydrogénase tandis que le test au rouge neutre indique une altération des membranes des cellules. L'extrait agirait donc au niveau mitochondriale par inhibition de l'activité de la succinate déshydrogénase mais aussi au niveau des membranes cellulaires par altération des membranes. Ceci peut être dû à un stress oxydant suivi de peroxydation des lipides membranaires sachant que ces extraits contiennent des antioxydants qui à fortes concentration ont une faible activité prooxydante. Aussi cette toxicité mitochondriale pourrait aussi s'expliquer par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (PTPM). En effet Certaines molécules exogènes (médicaments ou toxiques), mais aussi des dérivés endogènes en excès (calcium, acides gras, acides biliaries) peuvent entraîner l'ouverture de ces pores mitochondriaux provoquant une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriale. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va induire

une profonde perturbation de la phosphorylation oxydative ayant pour conséquence une chute de la synthèse d'ATP, ce qui est susceptible d'induire la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose (Fromenty, 2010).

Ces résultats sont en accord et en parallèle avec le changement morphologique des cellules observées au microscope inversé et interprété comme étant une mort cellulaire.

Nos résultats corroborent ceux d'autres auteurs qui ont déjà rapportés l'effet cytotoxique d'extraits de différentes parties de *C. procera* sur des lignées cellulaires. Smith *et al.* (1995) ont rapportés que l'extrait des racines de *C. procera* possède un fort potentiel cytotoxique sur les cellules tumorales COLO 320. Plus récemment, Van Quaquebeke *et al.* (2005) ont montré que des cardénolides hémisynthétiques dérivés, isolée à l'origine des écorces de racines de la plante ont un fort effet cytotoxique in vitro sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines (Van Quaquebeke *et al.*, 2005). De même des composants de la plante, y compris le latex semble avoir des propriétés cytotoxiques et anticancéreuse in vivo (Choedon *et al.*, 2006).

Selon les normes de l'Institut national du cancer (NCI), un extrait est considéré comme ayant des propriétés anticancéreuses significatives si la valeur de la concentration inhibitrice 50 % (CI₅₀) est inférieure à 20 µg/mL (Cordell *et al.*, 1993). Les valeurs de CI₅₀ obtenues dans notre étude sur les cellules Caco-2 en utilisant les tests au MTT et au Rouge Neutre ont été de 33 et 11 µg/mL respectivement, ce qui signifie que l'extrait a des propriétés anticancéreuses potentielles.

Le test de fragmentation de l'ADN effectuée sur les Caco-2 a montré une dégradation aléatoire de l'ADN qui diffuse dans le gel et non pas à une fragmentation internucléosomale de l'ADN sous forme d'échelle comme on peut le voir dans l'ADN des cellules apoptotiques. Il peut s'agir ici uniquement de cellules en voie de nécrose. D'autres auteurs ont constaté que les extraits des racines de *C. procera* inhibent la prolifération des cellules Hep G-2 via l'apoptose et les mécanismes fondés sur la perturbation du cycle cellulaire (Mathur *et al.*, 2009). Il a été établi que les glycosides cardiotoniques (bufaline et digoxine, par exemple) sont capables de tuer les cellules cancéreuses grâce à l'activation des voies apoptotiques (McConkey *et al.*, 2000 ; Kurosawa *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2008). Les Cellules Caco-2 sont déficientes pour les deux copies du gène de p53, cela signifie que l'apoptose dans les cellules Hep-G2 est très probablement due à la signalisation du gène p53 après la modification des molécules d'ADN. Mais les résultats présentés ici suggèrent que l'extrait aqueux des écorces de racines de *C. procera* peut également déclencher la mort cellulaire par un mécanisme

moins sûr causant des dommages nécrotiques. L'effet cytotoxique observé dans notre étude est probablement due aux glycosides cardiotoniques tels que les cardénolides dont la présence dans la plante a été rapporté par Van Quaquebeke *et al.* (2005). Ainsi, le mécanisme de la mort des cellules pourrait être l'apoptose, mais il est nécessaire d'explicitier ce résultat par une étude plus approfondie. Il peut y avoir mort par apoptose et mort par nécrose en même temps dans la même culture de cellule et en présence du même toxique unique qui peut produire aussi des métabolites...

En effet si de nombreuses mitochondries subissent l'ouverture du PTPM, la chute des stocks d'ATP sera importante et entraînera la mort de la cellule par nécrose, en particulier par l'intermédiaire d'une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium. Si par contre quelques mitochondries sont impliquées dans le phénomène d'ouverture du PTPM, les quantités cellulaires d'ATP pourront être maintenues grâce aux mitochondries non endommagées. Cependant, les quelques mitochondries subissant l'ouverture du PTPM vont libérer dans le cytosol du cytochrome c, une protéine de la chaîne respiratoire qui va alors s'associer avec la protéine Apaf-1 et l'ATP pour initier un programme de mort cellulaire par apoptose, après activation des caspases 9 et 3 (Fromenty, 2010). Dans le cas présent l'observation des cellules semble suggérer un tel processus.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les composés actifs de *C. procera* n'ont pas beaucoup d'effet négatif sur les cellules du système nerveux, mais les doses administrées doivent être bien ajustés pour éviter les effets indésirables au niveau du tractus gastro-intestinal. Ainsi les patients sous traitement FACA[®] (médicament pris par voie orale) doivent respecter les doses prescrites pour prévenir la survenue d'effets secondaires indésirables du tractus gastro intestinal.

CONCLUSION

L'étude phytochimique a révélé la présence des coumarines et dérivés, des glycosides stéroïdiques ou terpéniques, des cardénolides et des saponosides dans la poudre des écorces de racine de *Calotropis procera*. Parmi les composés mis en évidence, les hétérosides cardiotoniques méritent une attention particulière du fait de leur teneur dans la poudre de la plante et aussi de leur toxicité sur le système cardiovasculaire.

L'étude de la toxicité aiguë a montré que l'extrait aqueux et l'extrait concentré en hétérosides cardiotoniques des écorces de racines de la plante sont faiblement toxiques par voie orale selon le système de classification globalement harmonisé de l'OCDE (2001) et du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (2011). Aussi l'étude de la toxicité sub-chronique (42 jours) a révélé que l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante est toléré jusqu'à la dose de 20 mg/kg en administration répétée pendant 6 semaines chez le rat avec une dose sans effet inférieure à 20 mg/kg.

L'étude de la cytotoxicité de l'extrait aqueux de *C. procera* sur les lignées cellulaires Caco-2 et Neuro-2a a révélé que l'extrait possède un fort potentiel cytotoxique sur les cellules Caco-2 d'origine intestinale et beaucoup moins sur les cellules Neuro-2a d'origine nerveuse. Ceci laisse penser que les substances actives de *Calotropis procera* seraient sans effet néfaste sur les cellules du système nerveux mais que les doses à administrer devraient être bien ajustées pour ne pas entraîner des effets néfastes au niveau intestinal.

Au cours de l'étude de suivi de toxicovigilance chez les patients sous traitement FACA[®], aucun événement indésirable n'a été notifié, ce qui témoigne d'une bonne tolérance de FACA[®] chez les patients sous traitement avec ce phytomédicament contenant majoritairement de la poudre d'écorces de racines de *C. procera*.

L'ensemble de ces résultats nous permettent de conclure qu'il n'y aurait pas d'effets toxiques majeurs liés à l'utilisation des écorces de racines de *Calotropis procera* dans le phytomédicament FACA[®] pour le traitement de la maladie drépanocytaire. Cependant les patients sous traitement FACA[®] doivent obligatoirement respecter la posologie prescrite pour éviter la survenue d'effets secondaires néfastes liés au traitement.

PERSPECTIVES

En perspective nous envisageons :

- ✓ pour compléter l'étude de la cytotoxicité: (i) élucider le mécanisme de mort cellulaire en poursuivant les tests de fragmentation de l'ADN; (ii) évaluer la génotoxicité de l'extrait aqueux et sa mutagenèse;
- ✓ poursuivre l'évaluation des effets toxiques cardiovasculaires de l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante *ex vivo* sur cœur isolé de rat en comparaison avec un cardiotoxique de référence; faire aussi des tests pharmacologiques sur cœur isolé de cobaye pour élucider les effets cardiotoniques de l'extrait.
- ✓ Tester la toxicité de l'extrait aqueux des écorces de racines de la plante sur la reproduction chez des Rats Wistars

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Ababsa Z. (2009)**. Caractérisation pharmacotoxicologique et étude phytochimique de : *Centaurea dimorpha*. Mémoire de diplôme de Magister. Université Mentouri Constantine Algérie, 99p.
2. **Adedeji O.S., Abubakar M.B., Ozegbe P.C. (2002)**. Growth-Suppressing Effect of *Calotropis procera* (Giant Milkweed)-Chronic Cyanide toxicity and urinary enzyme excretion in rabbits, *Trop. Vet.*, 1357p.
3. **Adjanohoun E.J., Adjakidje V., Ahyi M.R.A., Aké Assi.L., Dan Dicko L., Daouda H., Delmas M., De Souza S., Garba M., Guinko S., Kayongo A., N'golo D., Raynal J-L. Saadou M. (1985)**. Médecine traditionnelle et pharmacopée : Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger. 2^{ème} édition. Paris, ACCT, 142p.
4. **Adjanohoun E.J., Ahyi M.R.A., Assi L.A., Akpagana K., Chibon P., Hadji A.Al., Eyme J., Garba M., Gassita J.-N., Gbeassor M., Goudote E., Guiko S., Hodouto K.-K., Houngnon P., Keita A., Keoula Y., Kluga-Ocloo W.P., Lo I., Siamevi K. M., Taffame K.K. (1986)**. Médecine traditionnelle et pharmacopée : *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo*, 671 p.
5. **Akhir N.M., Chua L.S., Majid F.A.A., Sarmidi M.R. (2011)**. Cytotoxicity of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Ficus deltoidea* on Human Ovarian Carcinoma Cell Line. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 1(4): 397-409.
6. **Albers F. (1983)**. Cytotaxonomic studies in African Asclepiadaceae. *Bothalia* 14, 3 & 4: 795-798
7. **Al-Yahya M.A. (1986)**. Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia*, 179 – 182.
8. **APG III (2009)**. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–121.
9. **Arbonnier (2002)**. Arbres, Arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'ouest, CIRAD, 2^{ème} édition, pp 160-165.
10. **Artursson P., Palm K., Luthman K. (1996)**. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*, 22:67–84.
11. **Bajpayee K.K. (2015)**. Antifungal activities of bark extract of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.. *International Journal of Advances in Scientific Research*; 1(02): 108-110.

12. **Basu A., Chaudhuri A.K.N. (1991).** Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(3): 319-324.
13. **Baynes R.E., Hodgson E. (2010).** Absorption and Distribution of Toxicants. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 79-114.
14. **Berhaut J. (1967).** Flore du Sénégal, 2^e édition Clairafrique, Dakar, 485p.
15. **Berhaut J. (1971).** Flore illustrée du Sénégal, Tome I, Dakar, 626p.
16. **Berridge M.V., Patries M.H., Tan A.S. (2005).** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 127-152.
17. **Blaustein M. P. (1974).** The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 70, 33-82.
18. **Borenfreund E., Puerner J.A. (1985).** Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24, 119–124.
19. **Bouquet A., Debray M. (1974).** Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. Paris : ORSTOM, 1974, (32), 232 p.
20. **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et Documentation Lavoisier Paris. 915 p.
21. **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4^e ed.) Lavoisier, 1292 p.
22. **Casarett and Doull's (2008).** Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th edn; Klaassen CD (ed.) McGraw Hill Medical: New York, 1454 p
23. **Chantret, I., A. Rodolosse, A. Barbat, E. Dussaulx, E. Brot-Laroche, A. Zweibaum and M. Rousset (1994).** Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose dependent negative regulation. *J Cell Sci* 107 (Pt 1): 213-25.
24. **Charbier J.Y. (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Université Henri Poincaré- Nancy1, 183 p.
25. **Charpentier B (2008).** Guide du préparateur en pharmacie, 3^{ème} édition, Paris: Masson, 1, 1358 p.
26. **Cheng K-C., Cheng Li, Uss A.S. (2008).** Prediction of oral drug absorption in humans – from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 4:581-90.

27. **Choedon T., Mathan G., Arya S., Kumar V.L., Kumar V. (2006).** Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 12 (16), 2517-2522.
28. **Circosta C., Sanogo R., Occhiuto F. (2001).** Effects of *Calotropis procera* on oestrous cycle and on oestrogenic functionality in rats. *Il Farmaco*, 56, 373-378.
29. **Ciulei I. (1982).** Practical Manuals on the Industrial Utilization of Chemical and Aromatic Plants. Methodology for Analysis of Vegetable Drugs. 1st Edn., Ministry of Chemical Industry, Bucharest, 67p.
30. **Civeyrel (1994).** Variation et évolution des types polliniques du genre *Secamone* (Asclepiadaceae, Secamonoideae). *C.R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie*, 317, 1159-1165.
31. **Claude J.R. (1988).** Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. Dans : Giroud J. P. et Coll., Ed. Pharmacologie clinique / bases de la thérapeutique. 2ème édition. Paris : Expansion scientifique française, 3-14.
32. **Cohen Y., Jacquot C. (2008).** Abrégés de Pharmacologie. 6ème édition Masson, 487p.
33. **Cordell G.A., Kinghorn A.D., Pezzuto J.M. (1993).** Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In: Colegate S.M. and Molyneux R.J. (Eds.): Bioactive Natural Products. Boca Raton, CRC Press, USA, 195-216.
34. **Dada Y.O., Lamidi M.T., Eghianruwa K.I., Adepoju F. (2002).** Effects of oral administration of the latex of *Calotropis procera* on weight, hematology and biochemistry in rats. *Trop. Vet.*, 20, 4.
35. **Dembélé M.F. (2001).** Etude pharmacothérapeutique du phytomédicament antidrépanocytaire FACA : Propriétés pharmacologiques chez l'animal et efficacité thérapeutique chez l'enfant drépanocytaire au CHN-YO de Ouagadougou. Thèse doctorat de pharmacie, UFR/SDS université de Ouagadougou, 106p.
36. **Demiryurek A.T., Demiryurek S. (2005).** Cardiotoxicity of digitalis glycosides: roles of autonomic pathways, autacoids and ion channels. *Auton Autacoid Pharmacol* 25, 35-52.
37. **Descotes J. (1992).** Les urgences en Toxicologie – Paris: Maloine, 561, pp 13-26
38. **Dewan S., Sangraula H., Kumar V.L. (2000).** Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. *J. Ethnopharmacol*, 73 (1-2), 307–311.
39. **Diallo A., Eklu-Gadegbeku K., Mobio T., Moukha S., Agbonon A., Aklikokou K., Creppy E. E. And Gbeassor M. (2009).** Protective effect of *Moringa oleifera* Lam and

Lannea kerstingii extracts against cadmium and ethanol-induced lipid peroxidation. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 4: 160-166.

40. **Dieye A.M., Tidjani M.A., Diouf A., Bassene E., Faye B. (1993).** Pharmacopée sénégalaise : étude de la toxicité aiguë et de l'activité antitussive de *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadiaceae). Dakar médical, 67, 69-72.

41. **Dolo A. (1990).** Contribution à l'étude toxicologique des plantes médicinales. Thèse de pharmacie. Bamako, Mali, P48, 80, 89.

42. **Ehrmann S., Lakhel K., Boulain T. (2009).** Pression artérielle non invasive : principes et indications aux urgences et en réanimation. *Réanimation*, 267 – 273.

43. **Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blaauboer B.J., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J.C., Pieters R., Kleiner J. (2002).** Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 193–236.

44. **Erkan E., De Leon M., Prasad Devarajan P. (2001).** Albumin overload induces apoptosis in LLC-PK (1) cells. *American Journal of Physiology*, 280 (6), 1107-1114.

45. **Fabre I. (2008).** Méthodes Substitutives à L'expérimentation Animale : Aspects Réglementaires, État de L'art et Perspectives. *Bull. Acad. Vét. France*, Tome 161, N°5 : 403-407.

46. **Fall S.T. (1989).** Utilisation d'*Acacia albida* et de *Calotropis procera* pour améliorer les rations des petits ruminants au Sénégal. *Cellulose*, vol. 72, n°27, p. 2.

47. **Faruki M.D. Z., Rahman Jha.Md.M., Alam M.B., Mazumder M.E.H., Rana Md.S. (2011).** *In vitro* antioxidant and cytotoxic potential of *Calotropis procera* (R. Br.) root. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(8), 2132-2135.

48. **Faye B. (1985).** Contribution à l'étude de la toxicité de *Calotropis procera*. Effet d'une alimentation à base de *Calotropis procera* sur la mortalité embryonnaire et néonatale chez la souris de laboratoire. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.*; 38(1),72-75.

49. **Flesch F. (2005).** Intoxications d'origine végétale. EMC (Elsevier SAS, Paris), Traité de Médecine Akos, 7-1057, 1-11.

50. **Flesch F. (2012).** Plantes toxiques : les dangers du retour à la nature. *Réanimation*, 1-8.

51. **Fournier A. (2002).** Les plantes toxiques, un danger potentiel pour votre bétail (<http://www.agr.gouv.qc.ca/>).

52. **Fournier P. (2001).** Les quatre flores de France. Lachevalier. Paris. Vol II.2.

53. Fromenty B. (2010). Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments: mécanismes et conséquences au niveau du foie. *Réanimation*, 19(6), 552-567.

54. G.R.I.P.T. (2001). « Groupe de recherche et d'information sur la pharmacopée et l'environnement Tropical » Association Loi 1901: Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines, Vol. 15.

55. Gerold M., Tschirky H. (1968). Measurement of Blood Pressure in Unanaesthetized Rats. *Arzneimittel for-schung* 18, 1285-287.

56. Goldberg A.M., Frazier J.M. (1989). Alternatives to animals in toxicity testing. *Scientific America* n 261 (2), 24-30.

57. Gueu Z. (2005). Etude pharmacologique des écorces des racines de *Calotropis procera* Ait (Asclepiadaceae) utilisé dans le traitement de la drépanocytose au Burkina Faso : Supports des effets secondaires indésirables pulmonaires et cardiaques, activité antibactérienne. Thèse doctorat de pharmacie, UFR /SDS Université de Ouagadougou.

58. Guissou I.P., Sawadogo M., Sawadogo A., Ouattara A., (1995). Etude de l'efficacité antidrèpanocitaire de gelules FACA® chez les enfants en milieu hospitalier de Ouagadougou (chn-yo). *Pharm. Méd. trad. afro*, 29-36.

59. Guissou I.P., Traore A., Ouedraogo M., Ouedraogo G.G., Lompo M. (2008). Propriétés pharmacologiques de *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae), plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso : 15ème colloque sur la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles Africaines, 01 – 04 Décembre 2008, Libreville, Gabon.

60. Gupta S. K. (2004). Drug Screening methods. *Jaypee Brothers Medical Publisher, New Delhi*, 236-246.

61. Gurib-Fakim A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine* 27: 1-93.

62. Harborne J.B. (1993). Introduction to chemical ecology, 4ème édition, Academic press, London, 317 p.

63. Higashimoto M., Purintrapiban J., Kataoka K., Kinouch T., Vinitketkumnien U., Akimoto S., Matsumoto H., Ohnishi Y. (1993). Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand. *Mutation Research*, 303 (3), 135–142.

64. Hodge H.C., Sterner J.H. (1943). Determination of substance acute toxicity by LD₅₀. *American Industrial Hygien Association*, 10: 93.

65. Hodgson E. (2010). Introduction to toxicology. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 3-14.

66. Hopkins W.G. (2003). Physiologie végétale. Edition de Boeck, Université de Bruxelles, Belgique, 532 p.

67. Jiofack Tafokou, R.B., (2010). *Calotropis gigantea* (L.) W.T.Aiton. [Internet] Fiche de PROTA4U. Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. <<http://www.prota4u.org/search.asp>>. Visité le 10 février 2015.

68. Joly A. (2010). Intoxication digitale non médicamenteuse : un risque non négligeable. A propos de deux cas. Thèse de doctorat en médecine, Université Henri Poincaré, Nancy1, 132 p.

69. Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J.D. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology* 65: 817–849.

70. Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. (1990). Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods.

71. Joshi U.H., Solanki V.R., Desai T.R., Tirgar P.R. (2012). Investigation of Antihypertensive Mechanism Of *Curculigo Orchioides* In Doca Salt Induced Hypertensive Rats. *International Journal of Phytopharmacology*. 3(2), 178-185.

72. Juncker T. (2010). Effets anticancéreux de UNBS1450 : Cas des hémopathies malignes. Thèse doctorat, Université Henri Poincaré, 231 p.

73. Kerharo J., Adam J.G. (1974). La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle : plantes médicinales et toxiques. Edition. Vigot Frères, Paris, 1011p.

74. Khattabi A., Soulaymani R. (2000). 36 Intoxications with traditional pharmacopoeia products in Morocco. *Human and Experimental Toxicology*. Aug;19, 473 - 483.

75. Kouadio J.H., Mobio T.A., Baudrimont I., Moukha S., Danoc S.D., Creppy E.E. (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 213, 56-65.

76. Koudougou J. (2004). Etude de l'activité antipyrétique du phytomédicament FACA en comparaison avec celle de ses composantes : *Fagara zanthoxyloïdes* Lam. (Rutaceae) et *Calotropis pocera* Ait. (Asclepiadaceae). Thèse doctorat de pharmacie, UFR/SDS université de Ouagadougou, 80p.

77. Koussoubé E. (2004). Etude de l'activité analgésique du phytomédicament FACA en comparaison avec celle de ses composantes : *Fagara zanthoxyloïdes* Lam. (Rutaceae) et

Calotropis procera Ait. (Asclepiadaceae). Thèse doctorat de pharmacie, UFR/SDS université de Ouagadougou, 99p.

78. Kumar V.L., Basu N.(1994). Anti-inflammatory activity of the latex of of *Calotropis procera*. *Journal of ethnopharmacology*, 44 (2), 123-125.

79. Kunz-Schughart L.A., Freyer J.P., Hofstaedter F., Ebner R. (2004). The use of 3-D cultures for high-through- put screening: The multicellular spheroid model. *J. Biomol. Screen* 9, 273-285.

80. Kurosawa M., Tani Y., Nishimura S., Numazawa S., Yoshida T. (2001). Distinct PKC isozymes regu- late bufalin-induced differentiation and apoptosis in human monocytic cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, 459-464.

81. Lal S.D., Kumar P. Pannu D.S. (1985). Quercetin-3-rutinoside in *Calotropis procera*. *J. Sci. Res.*, 7(1), 141-142.

82. Landry Y. et J.P. Gies (2014). Pharmacologie: des cibles à la thérapeutique. 3^{ème} édition DUNOD, 499 p.

83. Lapointe G. (2004). Notions de Toxicologie. 2nd ed. Commission de la santé et de la sécurité du travail (Québec, Canada), 16-20.

84. Lawson-Evi P., Ekl-Gadegbeku K., Agbonon A., Aklikokou K., Moukha S., Creppy E.E., Gbeassor M. (2008). Toxicological assessment on extracts of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. *Scientific Research and Essay* 3: 410-415.

85. LE M. (1997). Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. *J Egypt Soc parasitol*, 27 (2), 505- 514.

86. LeBlanc G.A. (2010). Acute toxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 125-236.

87. Ledreux A. (2010). Contribution à l'évaluation du risque pour l'homme lors de l'apparition de neurotoxines émergentes : analyse de réponses cellulaires et sélection de modèles expérimentaux de criblage. Ecotoxicology. AgroParisTech.

88. Li X., Luo Y., Wang L., Li Y., Shi Y., Cui Y., & Xue M. (2010). Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 110–115.

89. Lobner D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis. *J. Neurosci. Meth.* 96, 147-152.

90. Lohoues E., Tiarou G.G., Monde A.A., Djinhi J., Sess E.D. (2006). Propriétés toxicologiques aiguës du latex de *Calotropis procera* chez le rat. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, Vol. XIV, 187-199.

91. **Lompo M, Ouedraogo S., Guissou I.P., Potchoo Y. (1998).** Evaluation de la toxicité générale aiguë de FACA[®] antirépanocyttaire. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*10, 55-62.
92. **Loveland B.E., Johns T.G., Mackay I.R., Vaillant F., Wana Z.X., Hertzog P.J. (1992).** Validation of the MTT test dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assay. *Biochem. Int.*, 27(3), 501–510.
93. **Mahmoud O.M., Adam S.E.I., Tartour G. (1979b).** The effects of *Calotropis procera* on small ruminants. II. Effects of administration of the latex to sheep and goats. *J. Comp. Pathol.* 89, 251–263.
94. **Mahmoud O.M., Adam S.E.I., Tartour G., (1979a).** The effects of *Calotropis procera* on small ruminants. I. Effects of feeding sheep with the plant. *J. Comp. Pathol.* 89, 241–250.
95. **Mainasara M.M., Aliero B. L., Aliero A. A., Yakubu M. (2012).** Phytochemical and Antibacterial Properties of Root and Leaf Extracts of *Calotropis procera*. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 20(1): 1-6.
96. **Malcolm S.B., (1991).** Cardenolide-mediated interactions between plants and herbivores. In: G. A. Rosenthal, M. R. Berenbaum (eds.). *Herbivores: their interactions with secondary metabolites*. Vol. 1. The chemical participants. 2nd ed. San Diego: Academic Press, pp. 251-296.
97. **Malik N. M., Chughtai M.I.D. (1979).** Antimicrobial activity of *Calotropis procera*. A preliminary study. *Pakistan. Sci.*, 31, 127-129.
98. **Mascolo N., Sharma R., Jain S.C., Cappasso F. (1988).** Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. *Journal of ethnopharmacology*, 22 (2), 211-221.
99. **Mathur R., Gupta K.S., Mathur S.R., Velpandian T. (2009).** Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47, 343-348.
100. **Maydell H-J.V., Chappuis J.B. (1990).** Arbres et arbustes du Sahel leurs caractéristiques et leurs utilisations. Weikersheim, J. Margraf.
101. **McConkey D.J., Lin Y., Nutt L.K., Ozel H.Z., New-Man R.A. (2000).** Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 60, 3807–3812.
102. **Meena A.k., Yadav A., Rao M.M. (2011).** Ayurvedic uses and pharmacological activities of *Calotropis procera* Linn. *Asian J. of traditional Medicines*, 6(2): 45-53.

103. Meier J., Banks B., Creppy E.E., Habermehl G., Kornalik F., Lee C.Y., Mebs D., Rosenberg P. And Theakston R.D.G. (1986). Ethical standards and guidelines for animals experiments in toxinological research. *Toxicol*, 24, 327-330.

104. Meunier V., Bourrié M., Berger Y., Fabre G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol*, 11, 187-194.

105. Michael B., Yano B.L., Sellers R.S., Perry R., Morton D., Roome N., Johnson J.K., Schafer K. (2007). Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: A review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicol Pathol* 35 (5): 742–750.

106. Millar A.G., Morris M. (1987). Plants of Dhofar; The Southern Region of Oman, Traditional, Economic and Medicinal Uses. The office of the Advisor for Conservation of the Environment, Diwan of Royal Court Sultanate of Oman, 42p.

107. Millogo H. (1992). Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. et Schinz (Apocynaceae) : étude de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes et leur évaluation toxico-pharmacologique. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle, 117p.

108. Mossa J.S., Tariq M., Mohsin A., Ageel A.M., Al-Yahya M.A., Al-Said M.S., Rafatullah S. (1991). Pharmaological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. *American journal of Chinese medicine*, 19, 223-31.

109. Mueller. H., Kassack. M.U., Wiese M. (2004). Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen.* 9, 506-515.

110. Nacoulma O.G. (1996). Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso. Cas du plateau central. Thèse de doctorat ès sciences naturelles. FA.S.T Ouagadougou. Tome I et II, 605p.

111. Nations Unies (2011). Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Quatrième édition révisée. New York et Genève. *ST/SG/AC.10/30/Rev4*.

112. Neuwinger H.D. (1996). African Ethnobotany Poisons and Drugs. Chemistry, Pharmacology, Toxicology. Chapman et Hall. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 941p.

113. Nikiema J.B., Ouattara B., Semde R., Djierro K., Compaore M., Guissou I.P., Kasilo O.M.J. (2010). Promotion de la Médecine Traditionnelle du Burkina Faso : Essai de

développement d'un médicament antirépanocyttaire, le FACA. *African Health Monitor 13 Special Issue*. 52-57.

114. Nikiéma W.P.R. (2005). Propriétés pharmacochimiques de *Calotropis procera* Ait. (ASCLEPIADACEAE) récolté au Mali : étude pré-clinique des effets antiinflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines. Thèse de pharmacie, université de Bamako, 135p.

115. OCDE (1979). Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicologie à court et à long terme. In Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris Vol 1, number 4, 1-15.

116. OCDE (1998). Test Guideline 408. Subchronic Oral Toxicity – Rodent: 90-day. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

117. OCDE (2001). Test Guideline 420. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

118. OCDE (2008a). Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris Vol 1, number 4, 1-14.

119. OCDE (2008b). Toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses. In Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris. Vol 1, number 4, 1-29.

120. OCDE (2009). Études de toxicité chronique. In Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris., Vol 1, number 4, 1-16.

121. Odutola A. (2000). Rapid Interpretation of Routine Clinical Laboratory Tests S. Asekome and Company, *Zaria*, 24-28.

122. Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 13742–13747.

123. Olmsted J.B., Carlson K., Klebe R., Ruddle F., Rosenbaum J. (1970). Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 65(1) 129-136.

124. Olson H., Betton G., Robinson D., Thomas K., Monro A., Kolaja G., et al. (2000). Concordance of toxicity of Pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 56–67.

125. Organisation Mondiale de la Santé (2000). principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relative à la médecine traditionnelle. Organisation Mondiale de la Santé, Genève.79 p.

126. Organisation Mondiale de la Santé (2002). Médecine traditionnelle : Rapport du secrétariat. Conseil exécutif. Cent onzième session. *Point 5.7 de l'ordre du jour provisoire. EB111/9 du 12 décembre 2002.*

127. Organisation Mondiale de la Santé (2002). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2000-2002.60p.

128. Organisation Mondiale de la Santé (2013). Renforcement du rôle de la médecine traditionnelle dans les systèmes de santé : une stratégie pour la région africaine. Rapport du Secrétariat. Soixante-troisième session Brazzaville, République du Congo, *Point 10 de l'ordre du jour, AFR/RC63/6, 3 septembre 2013.*

129. Organisation Mondiale de la Santé, Afrique (2006). La drépanocytose dans la région africaine: situation actuelle et perspectives: Rapport du directeur régional. Cinquante-sixième session. *Point 8.11 de l'ordre du jour provisoire. AFR/56/17.*

130. OUA (1988). Méthodes générales d'analyses. Pharmacopée africaine, Lagos, volume 2 , 264 p.

131. Ouammi L., Rhalem N., Aghandous R., Semllali I., Badri M., Jalal G. et al.(2009). Profil épidémiologique des intoxications au Maroc de 1980 à 2007. Toxicologie Maroc. Mai;1: 8-13.

132. Ouattara A. (1991). Approche thérapeutique de la maladie drépanocytaire. Etude préliminaire comparée du traitement par une présentation galénique moderne de deux plantes : *Fagara xanthoxyloïdes* lam. *Calotropis procera* Ait. et d'un médicament usuel de référence : la Dihydroergotoxine au centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou. Thèse de médecine Ouagadougou. ESSA, 19-97.

133. Ouattara B, Angenot L, Guissou IP, Fondou P, Dubois J, Frédéric M, Jansen O, Van Heugen JC, Wauters, JN, Tits M., (2004). LC/MS/NMR analysis of isomeric divanilloylquinic acids from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* Lam. *Phytochemistry*, 65: 1145–1151.

134. Ouattara B, Jansen O, Angenot L, Guissou IP, Frédéric M, Fondou P, Tits M. (2009). Antisickling properties of divanilloyl- quinic acids isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). *Phytomedicine*, 16(2-3): 125-129.

135. Ouattara, A., Guissou, I.P., Sawadogo, A., Sawadogo, M. (1992). Etude comparée du traitement de la crise drépanocytaire par une présentation galénique moderne de

deux plantes médicinales (*Fagara xanthoxyloides* Lam et *Calotropis procera* (Ait) et un médicament usuel de référence (dihydroergotoxine) chez les enfants de 5 à 15 ans à l'hôpital de Ouagadougou. *Pharmacien d'Afrique* 68, 19–27.

136. Ouédraogo G.G. (2009). Etude de la toxicité générale aiguë et respiratoire d'extraits de *Calotropis procera* Ait. (ASCLEPIADACEAE), plante médicinale du Burkina Faso. Mémoire de DEA de Toxicologie Appliquée. UFR/SDS université de Ouagadougou, 127p.

137. Ouédraogo G.G., Ouédraogo M., Lamien-Sanou A., Lompo M., Goumbri-Lompo O.M., Guissou P.I. (2013). Acute and Subchronic Toxicity Studies of Roots Barks Extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br Used in the Treatment of Sickle Cell Disease in Burkina Faso. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(5), 194-200.

138. Ouédraogo M. (2001). Etude pharmacochimique du macéré aqueux des écorces de racines de *Calotropis procera* Ait. utilisées en phytothérapie de la maladie drépanocytaire au Burkina Faso. Thèse doctorat de pharmacie, UFR/SDS université de Ouagadougou, 89p.

139. Pagana K.D., Pagana T.J. (2002). Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests. 2nd Edn., Mosby, St Louis, Missouri USA, 1-44.

140. Pahwa R., Chatterjee V.C. (1988). The toxicity of Indian *Calotropis procera* R.Br. latex in the black rat, *Rattus rattus*. *Vet. Hum. Toxicol.* 30, 305–308.

141. Paris R.R. et Moyse H. (1965). Précis de matière médicale. Ed. Masson et cie Tome I, 416 p.

142. Parvais M.P. (2000). Etude ethnobotanique de plantes utilisées pour le traitement de la drépanocytose au Burkina Faso. Mém. Pharm. Bruxelles 73p.

143. Patel R.M., Patel N.J. (2010). In vitro cytotoxicity screening of coumarin compounds on Hep2 cancer cell line. *Int. J. Pharm. Res.* 2, 88-99.

144. Philomena G. (2011). Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants- An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (06) 40-44.

145. Plewa M.J., Wagner E.D. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Annual Review of Genetics*, 27, 93–113.

146. Pouokam G.B., Ahmed H., Dawurung C., Atiku A., David S., Philippe O. (2011). Influence of age on sub-chronic toxicity of the aqueous extract of the leaves of *Calotropis procera* on rabbits. *J. Toxicolo. and Envi. Health Sci.*, 3(5), 119-126.

147. Prueksaritanont T., Gorham L., Hochman J., Tran L., Vyas K. (1996). Comparative studies of drug-metabolizing enzyme in dog, monkey, and human small intestine, and in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.*, 24, 634-642.

148. Rahimtoola S.H. (2004). Digitalis therapy for patients in clinical heart failure. *Circulation* 109, 2942-2946.

149. Ratsimbason A.M., Andriantsimba J.A., Rajaomaria M., Raharimanana Andriantsiferana R. (1984). De l'importance des constants biologiques des animaux de laboratoire: à propos des observations de l'élevage du centre national de recherches pharmaceutiques. *Archive du centre national de recherches pharmaceutiques*, vol. 3, 55-64.

150. Reddivari L., Vanamala J., Chintharlapalli S., Safe S.H., Miller Jr.J.C. (2007). Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis* 28, 2227-2235.

151. Roux D., Catier O. (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. Wolters Kluwer France, 141p.

152. Saleh F.S., Ali H.H., Mirza M. (1993). Chemical constituents of some medicinal plants growing in Bahrain. *Fitoterapia*, 251-256.

153. Schimmer O., Kruger A., Paulini H., Haefele F. (1994). An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. *Pharmazie*, 49 (6), 448-451.

154. Schmelzer G. H., Gurib-Fakim A. (2013). Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11 (2). Plantes médicinales 2. [Traduction de : Plant Resources of Tropical Africa 11(2). Medicinal plants 2. 2013]. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas/ CTA, Wageningen, Pays-Bas. 418 p.

155. Schmiedlin-Ren P., Thummel K., Fisher J., Paine M., Lown K., Watkins P. (1997). Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol. Pharmacol* 51, 741-754.

156. Seiber J.N., Nelson C.J., Lee S.M. (1982). Cardenolides in the latex and leaves of 7 *Asclepias* species and *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 21: 2343-2348.

157. Sen T., Basu A., Chaudhuri A.K. (1988). Studies on the possible mechanism of the gastric mucosal protection by *Calotropis procera* involvement of 5-lipoxygenase pathway. *Fundam clin pharmacol*, 12 (1), 82- 87.

158. Shahat M.A., Shihata A.M.A. (2012). Evaluation of the toxicological effects manifested after long term administration of aqueous *Calotropis procera* plant extract in male and female rabbits. *Egyptian Journal of Hospital Medicine* 47, 291-300.

- 159. Silbergeld, E. K. (2000).** La Toxicologie : Introduction. In Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail.Vol 1 (edited by J. M. Stellman). Organisation Internationale du Travail, Genève.pp 33.2-33.3.
- 160. Singhal A., Kumar V.L. (2009).** Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat. *J. Ethnopharmacol* 122, 172–174.
- 161. Smith H.F., Woerdenbag H.J., Singh R.H., Meulenbeld G.J., Labadie R.P., Zwaving J.H. (1995).** Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. *J Ethnopharmacol* 47, 75-84.
- 162. Timbrell J. (2000).** Principles of biochemical toxicology. 3rd ed. Taylor & Francis. Inc (London), 1-390.
- 163. Trevan J.W. (1927).** The error of determination of toxicity. *Proc. Royal. Soc.* 1927, 101 B, 483-514.
- 164. Tsiang Y., Li P-t. (1977).** Asclepiadaceae. *Fl. Reipubl. Popularis Sin* 63, 249-575.
- 165. Union Africaine (2001).** Plan d'action de la décennie de la médecine traditionnelle (2001-2010) : mise en œuvre de la décision (AHG/DEC.164 (XXXVII) de la conférence des chefs d'état et de gouvernement tenue à Lusaka. *CAMH/15(1) Addis Ababa, ETHIOPIA.*
- 166. Van Quaquebeke E., Simon G., André A., Dewelle J., Yazidi M. El., Bruyneel F., Tuti J., Nacoulma O., Guissou P., Decaestecker C., Braekman J.C., Kiss R., Darro F. (2005).** Identification of a novel cardenolide (2"-oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. *J. Med. Chem*, 48 (3), 849-856.
- 167. Verma R., Satsangi G.P., Shrivastava J.N. (2010).** Ethno-medicinal profile of different plant parts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Ethnobotanical Leaflets* 14, 721-42.
- 168. Viala A., (1998).** Elément de toxicologie. Lavoisier, Paris, 521p.
- 169. Viau C., Tardif R. (2003).** Toxicologie. In : Environnement et santé publiques Fondements et pratiques, pp. 119-143.
- 170. Vohora S.B., Khanna T., Athar M., Ahmad B. (1997).** Analgesic activity of bacosine, a new triterpene isolated from *Bacopamonnieri*. *Fitoterapia*, LXVIII N°4, 361- 365.
- 171. Wagner H., Bladt S. (1996).** Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas, Springer edition. Germany, 384p.
- 172. Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. (2005).** A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharmaceut* 288, 369-376.

173. **Whitby L.G., Percy-Robb I.W., Smith A.F. (1987).** Lecture Notes on Clinical Chemistry. 3rd Edn., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 111-137.
174. **Yatime L., Laursen M., Morth J.P., Esmann M., Nissen P., Fedosova N.U. (2011).** Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *Journal of Structural Biology* 174: 296–306.
175. **Zahoui S.O., Zirih N.G., Soro Y.T., Traore F. (2010).** Effet hypotenseur d'un extrait aqueux de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Waterman (Rutaceae). *Phytothérapie* (8), 6, 359-369.
176. **Zhang H., Qian D.Z., Tan Y.S., Lee K., Gao P., Ren Y.R., Rey S., Hammers H., Chang D., Pili R., Dang C.V., Liu J.O., Semenza G.L. (2008).** Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1_α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19579–19586.
177. **Zhang S.Z., Lipsky M.M., Trump B.F., Hsu I.C. (1990).** Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* 6, 219-234.
178. **Zimmermann M. (1983).** Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
179. **Zink T., Chaffin J. (1998).** Herbal health products: what family physicians need to know. *American Family Physician*, 58 (5), 1133–1140.
180. **Zurlo J. (2000).** Les tests de toxicité in vitro. Dans Encyclopédie de sécurité et de santé au travail. International Labour Organization, 4838 p.

ANNEXES

MINISTRE DE LA SANTE

BURKINA FASO

Unité - Progrès - Justice

Arrêté N° 2010-51.059/MS/SG/DGPML/DRP

portant autorisation de mise sur le marché
de spécialités pharmaceutiques et de médicaments génériques.

LE MINISTRE DE LA SANTE,

- VU la Constitution ;
- VU le décret n°2007-349/PRES du 04 Juin 2007 portant nomination du Premier Ministre ;
- VU le décret n°2010-105/PRES/PM du 12 mars 2010 portant remaniement du Gouvernement du Burkina Faso ;
- VU le décret n°2007-424/PRES/PM/SGG-CM du 13 juillet 2007, portant attributions des membres du Gouvernement ;
- VU la loi n°23/94/ADP du 19 Mai 1994 portant code de la santé publique ;
- VU le décret n°2009-104/PRES/PM/MS du 02 mars 2009 portant organisation du Ministère de la santé ;
- VU le décret n°2003-382 /PRES/PM/MCPEA/MFB/MS du 31 juillet 2003 portant nomenclature nationale des spécialités pharmaceutiques et médicaments génériques autorisés au Burkina Faso ;
- VU l'arrêté n°2005-231/MS/CAB du 06/07/2005 portant conditions de délivrance des autorisations de mise sur le marché des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle au Burkina Faso ;
- VU l'arrêté n°2003-340/MS/SG/DGPML du 24/12/2003 portant attribution, composition et fonctionnement de la commission technique chargée de l'examen des dossiers de demande d' autorisations de mise sur le marché des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle au Burkina Faso ;
- VU la demande d'enregistrement des laboratoires **U-PHARMA (Burkina Faso)** ;
- Sur proposition de la Commission technique d'enregistrement du médicament,
en sa séance du **15 avril 2010**;

Arrête

ARTICLE 1 : Les autorisations de mise sur le marché des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle désignées ci-après, fabriquées par les laboratoires **U-PHARMA (Burkina Faso)**, sont accordées sous le numéro conformément aux dispositions du présent arrêté.

ARTICLE 2 : L'autorisation de mise sur le marché du médicament issu de la pharmacopée traditionnelle **FACA 80 mg gélule, B/100**, est accordée sous le numéro **0516520105T000000**.

Le médicament répond à la composition suivante :

Principes actifs et dosage :

- o Ecorces de racines de Fagara zanthoxyloides.....
- o Ecorces de racines de Calotropis procera.....

Excipients : qsp.

Le médicament doit être cédé au prix grossiste hors taxe (PGHT) de **2915 FCFA**.

ARTICLE 3 : L'autorisation de mise sur le marché du médicament issu de la pharmacopée traditionnelle **FACA 160 ma aélule B/100** est accordée sous le numéro **0516420100T000000**

Ledit médicament répond à la composition suivante :

Principes actifs et dosage :

- o Ecorces de racines de Fagara zanthoxyloides.....
- o Ecorces de racines de Calotropis procera.....

Excipients : qsp.

Le médicament doit être cédé au prix grossiste hors taxe (PGHT) de **3410 FCFA**.

ARTICLE 4 : Ces autorisations sont valables pour une période de cinq (05) ans, à compter de la date de signature du présent arrêté.

Elles peuvent être renouvelées, suspendues ou retirées dans les conditions fixées par le règlement.

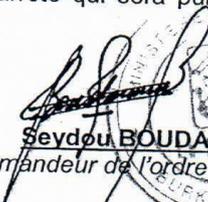
ARTICLE 5 : La présentation, la formulation, les indications et le PGHT des produits concernés doivent être conformes à celles fournies dans le dossier d'enregistrement.

Tout changement dans les éléments sus - cités rend caduc le présent arrêté.

ARTICLE 6 : Tout contrevenant aux dispositions du présent arrêté s'expose aux sanctions prévues par les textes en vigueur.

ARTICLE 7 : Le Secrétaire général du Ministère de la santé, l'inspecteur technique des services de santé, le Directeur général de la pharmacie, du médicament et des laboratoires sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'application du présent arrêté qui sera publié, enregistré et communiqué partout où besoin sera.

Ouagadougou, le


Seydou BOUDA MINISTRE
Commandeur de l'ordre national


AMPLIATIONS:

- 1 J.O.
- 1 SG/Mini. Santé
- 1 ITSS
- 1 Laboratoire intéressé
- 1 Archives/chrono.

ANNEXE 2 : DESCRIPTION DE *CALOTROPIS PROCERA* AIT. R.BR. (ASCLEPIADACEAE)

1. La famille des Asclepiadaceae

1.1. Position systématique de la famille des Asclepiadaceae (APG III : Apocynaceae).

Les Asclepiadacées sont une famille de plantes dicotylédones faisant partie de l'ordre des Gentianales. La famille des Asclepiadaceae regroupe plus de 2000 espèces de plantes réparties en près de 300 genres répandue dans les régions tropicales et subtropicales, en particulier en Afrique et en Amérique du Sud méridionale, avec une représentation modérée dans le nord et le sud-Asie (Ying et Ping-tao, 1977 ; Albers, 1983). On en trouve peu dans les régions tempérées ou en France.

La famille comprend trois sous famille caractérisées par une morphologie pollinique différente : Les *Periplocoideae* qui possèdent un pollen en tétrades ou en pollinies disposées dans un appareil translateur de forme spatulée ; les *Secamonoideae* caractérisées par la présence de quatre pollinies par étamine reliées à un appareil translateur formé d'une corpuscule et de un ou plusieurs caudicules ; les *Asclepiadoideae* qui ne possèdent plus que deux pollinies par étamine, chacune reliée par un caudicule au corpuscule (Civeyrel, 1994).

Cependant compte tenue des similitudes morphologiques antérieures proche des Apocyanaceae et des progrès dans la recherche moléculaire, la classification phylogénétique APG III a intégré les trois sous familles des Asclépiadacées dans la famille des Apocynacées abandonnant ainsi la famille des Asclépiadacées (APG III, 2009).

1.2. Caractères morphologiques des Asclepiadaceae

La famille des Asclepiadaceae est une famille cosmopolite composée en majorité de plantes herbacées, de lianes, d'arbustes, mais aussi quelques arbres, parfois à l'aspect cactoïde.

Certaines espèces peuvent être succulentes : elles ont une sève laiteuse ou même du latex. Les feuilles sont opposées ou verticillées, en général simples et entières, la plupart du temps caduques. Chez les espèces succulentes, elles sont infimes ou absentes. Les stipules, lorsqu'ils existent, sont minuscules.

Les fleurs sont généralement régulières et bi sexuées, la plupart du temps réunies en racèmes, en ombelles ou en cymes et de type 5 : 5 sépales en partie soudés, profondément découpés. Cinq (5) pétales soudés, corolle et étamines souvent soudées ensemble et formant un

gynostème. Cinq (5) étamines qui peuvent porter des appendices variés. Le pollen de chaque demi-anthère est généralement aggloméré pour former des pollinies plus ou moins cireuses, qui sont réunies au rétinacle par deux caudicules (deux branches) ou translateurs. Ceux-ci sont gluants et adhèrent aux pattes des insectes pollinisateurs. Les filets se soudent fréquemment entre eux et les anthères s'appliquent sur le bourrelet stigmatique. Il prend une forme pentagonale. Au niveau de chaque angle se forme une cavité en forme de petite cuillère sécrétant une substance visqueuse. Les espèces exotiques, plus primitives, laissent tomber les tétrades de grains de pollen dans ces petites cuillères où ils se fixent. Chez les espèces plus évoluées, comme le Dompte Venin, le pollen de chaque loge s'agglomère en une pollinie. Les deux pollinies sont réunies à la glande sécrétrice et s'y accrochent par les deux caudicules. Chez le genre *Asclépias*, le plateau stigmatique se développe et forme une aire d'atterrissage pour les insectes. Les étamines se perfectionnent : vers l'extérieur, un cornet pétaloïde se développe dans lequel se trouve une extension en forme de corne. L'ensemble anthère plus cornet donne une couronne ou coronule qui peut être double. Le système est de plus en plus attractif pour les insectes pollinisateurs.

Les deux carpelles sont presque séparés et forment un ovaire semi-infère, le stigmate est commun et à 5 lobes. Dans chaque carpelle, les ovules sont groupés en rangées verticales situées sur le même placenta. Le fruit est une paire de follicules dont un seul se développe complètement selon le genre. Les graines sont soit plates, soit ovoïdes surmontées d'un toupet de soies. Ces soies sont importantes dans certaines espèces (on en fait de la ouate).

2. Le Genre *Calotropis*

Le genre *Calotropis* (R.Br.) (Asclepiadaceae) est représenté principalement par deux espèces à savoir *Calotropis gigantea* et *Calotropis procera* et est couramment distribué dans les régions arides tropicales et subtropicales d'Asie, au Moyen-Orient et en Afrique ([Verma et al., 2010](#)).

Calotropis gigantea se distingue de *Calotropis procera* par la longueur de la couronne staminale, qui atteint 11 mm chez *Calotropis gigantea* et 5 mm chez *Calotropis procera* ([Jiofack Tafokou, 2010](#)).

3. L'espèce *Calotropis procera*

3.1. Classification

Règne : Végétal

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : Gentianales

Famille : Asclepiadaceae (APG III : Apocynaceae)

Sous famille : Asclepiadoideae

Genre : *Calotropis*

Espèce : *procera*

3.2. Description

Calotropis procera (Ait.) ou pomme de sode ou arbre à soie du Sénégal en français ; « putrepuuga » en Mooré ; « fôgo fôgo » en Peul appartient à la famille des *Asclepiadaceae* (APG : Apocynaceae) ([Berhaut, 1967](#) ; [1971](#) ; Hans Jurgen Von Maydell, 1990). C'est un arbuste à latex, au liber fibreux, à cime irrégulière de 3 à 5 m de haut, parfois sans branche jusqu'à 2 m.

L'écorce est épaisse, liégeuse, crevassée, grise à brun clair. Chaque blessure provoque une exsudation d'un latex blanc abondant.

Les feuilles sont opposées, sessiles, plus ou moins succulentes, vert glauque sur le dessus et gris-vert en dessous, largement ovales ou oblongues de 15 - 30 cm de long sur 7 – 15 cm de large à sommet arrondi ou en coin court, à base cordée pubescent en dessous ([Arbonnier, 2002](#)).

Le limbe comporte des nervures plus ou moins palmées à la base, une nervure centrale épaisse et 8–10 paires de nervures secondaires peu saillantes se raccordant vers le sommet.

Les inflorescences sont à cyme ombelliforme de 10 cm de large, disposées à l'aisselle des feuilles ([Arbonnier, 2002](#)).

Les fleurs sont de couleurs blanc-vert et violettes, de 2 à 3 cm de diamètre, à 5 pétales. Les fruits sont des gousses se présentant sous forme de gros follicules renflés, ovoïdes, de 8 à 10 cm de long, verts, mous et remplis d'air. Les gousses s'ouvrent à maturité et libère les graines.

La graine est aplatie, surmontée à un bout d'une touffe de soies blanches.

La floraison se fait toute l'année, aussi bien en saison sèche qu'en saison des pluies (Arbonnier, 2002).

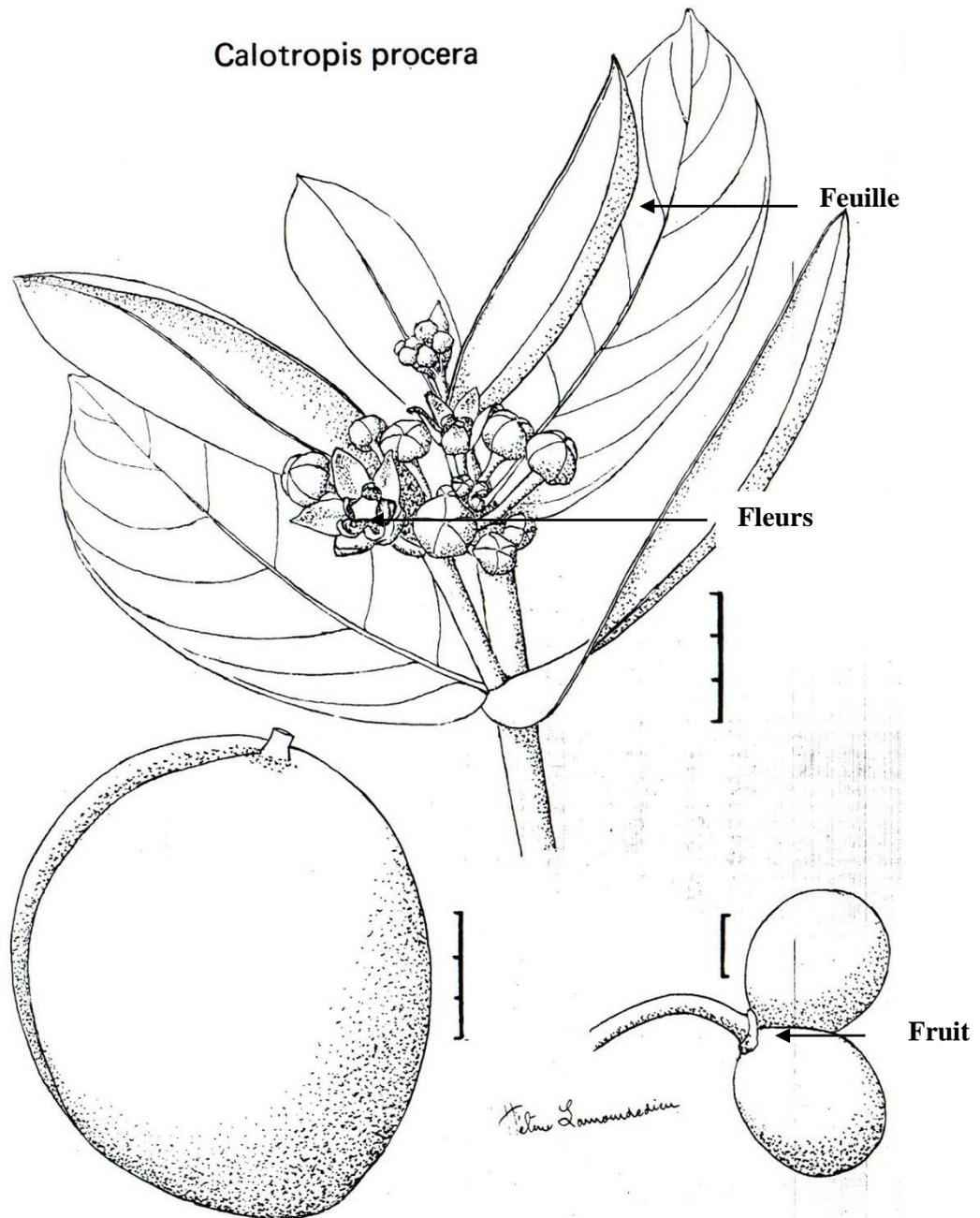
La reproduction se fait par les graines (Nacoulma, 1996).



Photo 14: *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.



Photo 15: Feuilles, fleurs et fruits de *Calotropis procera* (Arbonnier, 2002)



PL. 12

Photo 16 : Schéma botanique de la plante de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (D'après [Hélène Lamourdedieu](#) dans [Adjanohoun E.J. et al., 1985](#), modifié)

3.3. Habitat et répartition

Calotropis procera (Ait.) (*Asclepiadaceae*) est répandu dans les régions sèches de l'ancien monde (Afrique tropicale), y compris dans les îles de l'océan Indien, le nord de l'Afrique du sud et en Asie tropical et subtropical (Adjanooun *et al.*, 1985, Verma *et al.*, 2010). Il est parfois planté à l'extérieur de son aire de répartition naturelle : par exemple en Amérique subtropicale et en Australie où il a été introduit probablement comme plante ornementale mais où il se trouve échappé des cultures et naturalisé (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013).

Il se développe de façon générale dans des zones très riches en phosphore et en calcium ; d'où sa prédominance dans les cimetières, les charniers, les abattoirs, les jachères et les champs (Nacoulma, 1996).

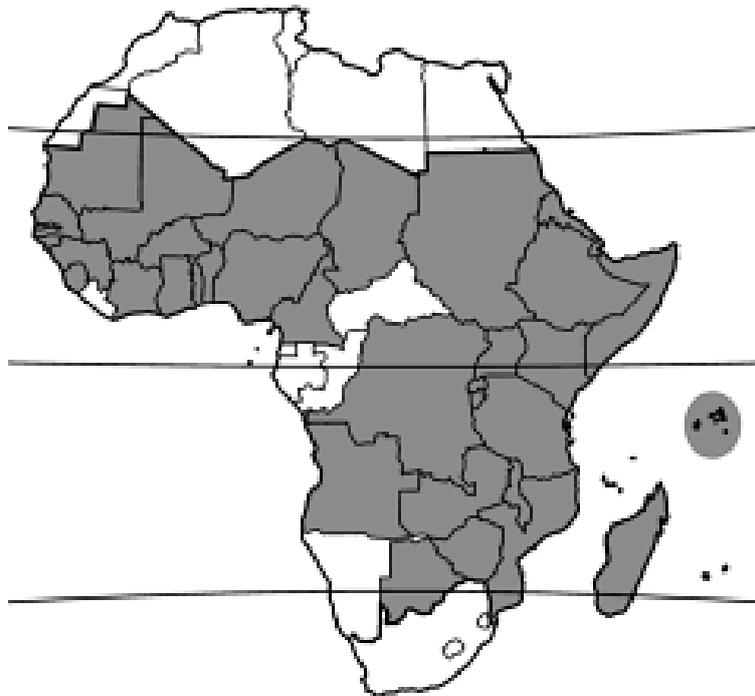


Figure 27: Carte de répartition de *Calotropis procera* (sauvage) en Afrique (D'après Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013, modifié)

**ANNEXE 3 : ATTESTATION DE DEPOT D'ECHANTILLONS DE PLANTE DE
CALOTROPIS PROCERA (AIT.) R.BR.**



MINISTERE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION

.....
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE

.....
INSTITUT DE L'ENVIRONNEMENT
ET DE RECHERCHES AGRICOLES

.....
DEPARTEMENT PRODUCTION FORESTIERE

.....
PROGRAMME PROTECTION DES
RESSOURCES FORESTIERES

.....
HERBIER NATIONAL DU BURKINA

BURKINA FASO
.....
Unité - Progrès - Justice

ATTESTATION DE DEPOT D'ECHANTILLONS

Je soussigné Dr GANABA Souleymane, Chef de Programme Protection des Ressources Forestières, déclare avoir enregistré les spécimens nommés *Calotropis procera* Ait. sous les numéros 8716 au niveau de l'Herbier National du Burkina (HNBUR). Ces spécimens sont déposés par OUEDRAOGO Gueswindé Geoffroy, Chercheur à L'IRSS.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Ouagadougou le 9 août 2011



Dr GANABA Souleymane

ANNEXE 4 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR LE REACTIF DE KEDDE

Réactif de révélation	Types d'extraits												Types de composés mis en évidence par le réactif
	T (Digoxine)			Cardiotoniques totaux			Extrait aqueux			Extrait éthanolique			
	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	
Kedde	-	-	-	0,0125	Violet	-	0,0125	Violet	-	0,0125	Violet	-	Glycosides stéroïdiques et aglycones (γ -lactone)
	-	-	-	0,075	''	-	0,075	''	-	0,075	''	-	
	-	-	-	0,1875	Violacé	-	0,1875	Violet	-	0,1875	Violet	-	
	-	-	-	0,3125	Violet	-	0,3125	Violet	-	0,3125	Violet	-	
	-	-	-	0,4375	Violacé	-	0,4375	Violacé	-	0,4375	Violacé	-	
	-	-	-	0,525	''	-	0,525	''	-	0,525	''	-	
	0,625	Violet	-	0,625	-	-	0,625	-	-	0,625	-	-	
	-	-	-	0,7125	Violet	-	0,7125	Violet	-	0,7125	Violet	-	
	-	-	-	0,775	''	-	0,775	''	-	0,775	Violet	-	

ANNEXE 5 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR LA CHLORAMINE-ACIDE TRICHLOROACETIQUE

Réactif de révélation	Types d'extraits												Types de composés mis en évidence par le réactif
	Digoxine			Cardiotoniques totaux			Extrait aqueux			Extrait éthanolique			
	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	
Chloramine-Trichloroacetic acid	-	-	-	0,075	-	Jaune	0,075	-	Jaune	0,075	-	Jaune	Glycosides digitaliques
	-	-	-	0,15	-	Marron	-	-	-	0,15	Grise	Marron	
	-	-	-	0,1875	-	Bleu	0,1875	-	Bleu	0,1875	-	Bleu	
	0,2875	-	Marron	0,2875	-	Marron	0,2875	-	Marron	0,2875	-	Marron	
	-	-	-	0,3375	Gris	-	-	-	-	0,3375	-	-	
	0,5	-	Bleu	0,5	-	Bleu	0,5	-	Bleu	-	-	-	
	0,625	Gris	Marron	0,625	Gris-clair	Marron	0,625	-	Marron	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	0,7125	Gris clair	-	0,7125	Gris clair	-	
	0,8125	-	Marron	0,8125	Gris	Marron	0,8125	Gris	Marron	0,8125	Grise	Marron	
	0,9375	-	Violet	0,9375	-	Violet	0,9375	-	Violet	0,9375	-	Violet	

ANNEXE 6 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR LE SbCl₃.

Réactif de révélation	Types d'extraits												Types de composés mis en évidence par le réactif
	Digoxine			Cardiotoniques totaux			Extrait aqueux			Extrait éthanolique			
	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	
SbCl₃	-	-	-	0,15	Bleue	Marron	-	-	-	0,15	Bleu	Marron	Caroténoïdes, terpènes/triterpènes, stérols, stéroïdes, saponosides/stéroïdes sapogenines, glycosides stéroïdiques, flavonoïdes
	-	-	-	0,1875	-	Bleu	0,1875	-	Bleu	0,1875	-	Bleu	
	-	-	-	0,275	-	Bleu	0,275	-	Bleu	0,275	-	Bleu	
	-	-	-	0,3375	Marron	Marron	0,3375	Rose	Marron	0,3375	Marron	Marron	
	-	-	-	0,4625	-	Violet	0,4526	-	Violet	-	-	-	
	-	-	-	0,5	-	Bleu	0,5	-	Bleu	0,5	-	Bleu	
	-	-	-	0,5375	R-O	Violet	0,5375	-	Violet	0,5375	Rose	Violet	
	0,575	Gris-clair	Bleu	0,575	-	Bleu	0,575	-	Bleu	0,575	-	Bleu	
	-	-	-	-	-	-	0,6875	Gris clair	-	0,6875	Gris clair	-	
	-	-	-	0,75	Gris clair	Marron	0,75	Gris	Marron	0,75	-	Marron	
	0,8125	Gris	-	-	-	-	-	-	-	0,8125	Gris	-	
	0,9375	-	Violet	0,9375	Rose	Violet	0,9375	Rose	Violet	0,9375	Rose	Violet	

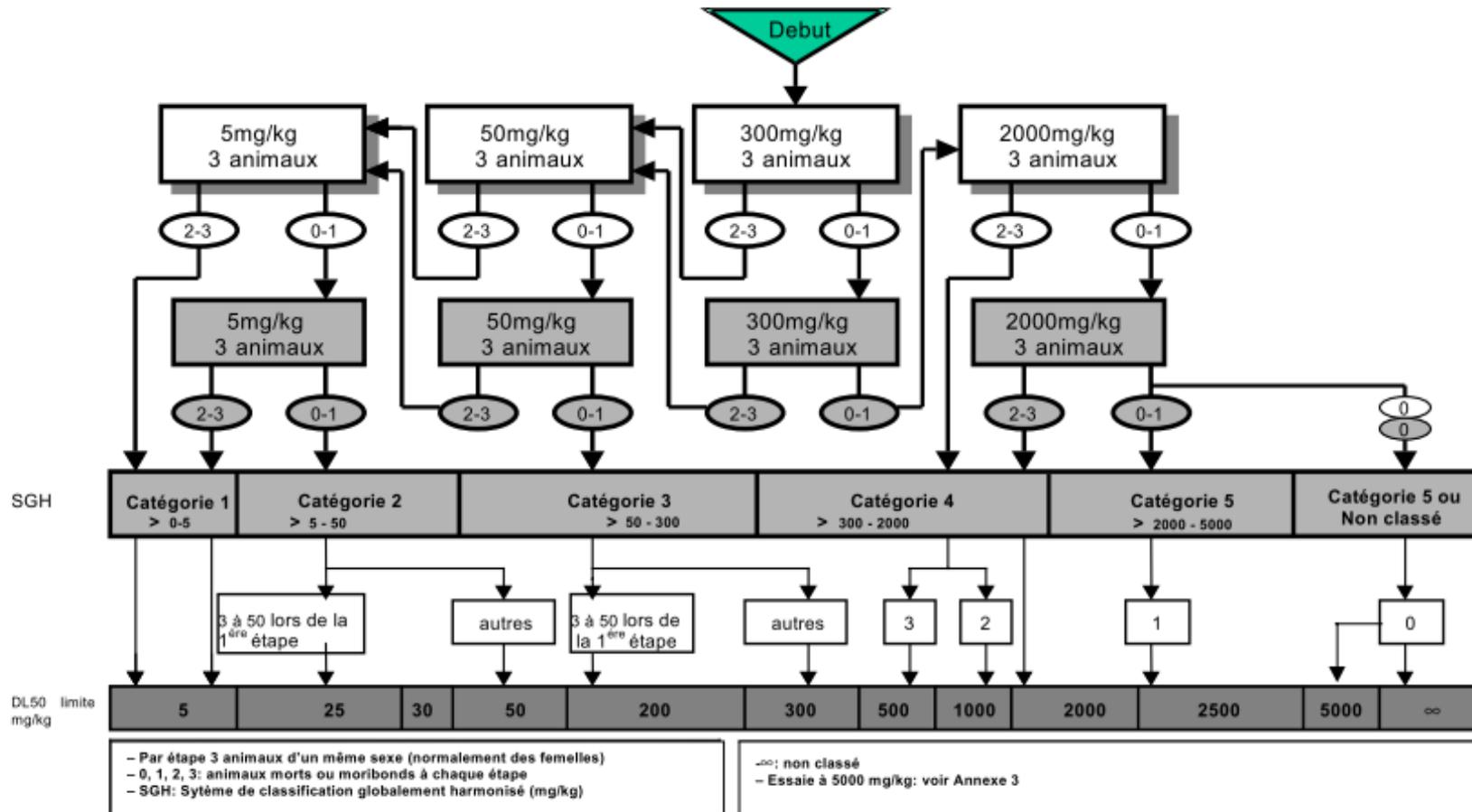
ANNEXE 7 : RESULTAT DE LA CARACTERISATION PAR CCM DEVELOPPE A L'AIDE DU SYSTEME ACETATE D'ETHYL-METHANOL-EAU (81 : 11 : 8) ET REVELE PAR H₂SO₄

Réactif de révélation	Types d'extraits												Types de composés mis en évidence par le réactif
	Digoxine			Cardiotoniques totaux			Extrait aqueux			Extrait éthanolique			
	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	Rf	Visible	366 nm	
H ₂ SO ₄	-	-	-	0,0375	Violacé	Marron	-	-	-	0,0375	Violacé	Violet	Stéroïdes, sapogenines/saponosides, glycosides cardiotoniques, alcaloïdes
	-	-	-	-	-	-	0,075	-	Violet	-	-	-	
	-	-	-	0,1125	-	Marron	0,1125	-	Violet	0,1125	-	Violet	
	0,15	-	Vert	0,15	Noir	Vert	0,15	-	Bleu	0,15	Gris	Violet	
	-	-	-	0,1875	-	Bleu	0,1875	-	Bleu	0,1875	-	Bleu	
	-	-	-	0,2625	-	Bleu	0,2625	-	Bleu	0,2625	-	Bleu	
	0,35	-	Violet	0,3375	Gris	Violet	0,3375	-	Violet	0,3375	Gris clair	Violet	
	-	-	-	0,375	Violet	-	0,375	Violet	-	-	Violet	-	
	0,4	-	Bleu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	0,45	-	Vert	0,45	-	Violet	0,45	-	Violet	
	0,475	-	Bleu	0,475	-	Bleu	0,475	-	Bleu	0,475	-	Bleu	
	0,575	Gris	Mr/Bl*	0,575	-	Bleu	0,575	-	Bleu	0,575	-	Bleu	
	-	-	-	0,6875	-	Marron	0,6875	Gris	Marron	0,6875	-	Marron	
	0,75	G-C	-	0,75	Noir	Marron	0,75	Noir	Marron	0,75	Noire	Marron	
-	-	-	0,875	-	Violet	0,875	-	Violet	0,875	-	Violet		

* Avec l'extrait enrichi en hétérosides cardiotoniques, on note la présence de 2 spots superposés (Rf = 0,5625) dont un à fluorescence marron au centre auréolé d'un autre à fluorescence bleue.

ANNEXE 8 : SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG (OCDE, 2001)

ANNEXE 2c: SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG



ANNEXE 9 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES CELLULAIRE POUR LA CYTOTOXICITE

1. Milieu de culture des cellules Caco-2

-Milieux de culture DMEM complet: = RPMI+SVF (10%) + L-glutamine (4% de la solution stock à 200 mM) + pénicilline-streptomycine (1%).

-Réalisation du milieu (pour 100 ml)

85 ml de Milieu DMEM sans glutamine

10 ml de Sérum de veau Fœtal

4 ml de glutamine à 200 mM

1ml d'un mélange d'antibiotique soit (pénicilline-streptomycine) 100 UI de Pénicilline et 100 µg de Streptomycine au final.

2. Milieu de culture des cellules Neuro-2a

-Milieux de culture RPMI 1640 complet: = RPMI+SVF (10%) + L-glutamine (2% de la solution stock à 200 mM)+ Na pyruvate (1% de la solution stock à 100 mM)+ pénicilline-streptomycine (1%).

- Réalisation du milieu

86 ml de Milieu RPMI 1640 sans glutamine

10 ml de Sérum de veau Fœtal

2 ml de glutamine à 200 mM

1 ml de pyruvate de sodium à 100 mM

1ml d'un mélange d'antibiotique soit (pénicilline-streptomycine) 100 UI de Pénicilline et 100 µg de Streptomycine au final

ANNEXE 10 : ARTICLES PUBLIES

British Journal of Pharmacology and Toxicology 4(5): 194-200, 2013

ISSN: 2044-2459; e-ISSN: 2044-2467

© Maxwell Scientific Organization, 2013

Submitted: July 25, 2013

Accepted: August 06, 2013

Published: October 25, 2013

Acute and Subchronic Toxicity Studies of Roots Barks Extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br Used in the Treatment of Sickle Cell Disease in Burkina Faso

¹Geoffroy G. Ouedraogo, ¹Moustapha Ouedraogo, ²Assita Lamien-Sanou, ³Marius Lompo, ²Olga M. Gombri-Lompo and ^{1,3}Pierre I. Guissou

¹Laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé; Ecole Doctorale de la Santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021,

²Service d'Anatomie Pathologique; Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouédraogo (CHU-YO), 03 BP 7022, Ouagadougou 03, Burkina Faso

³Institut de Recherche en Science de la Santé/Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (IRSS/CNRST), Ouagadougou, 01 BP 7192, Ouagadougou 01, Burkina Faso

Abstract: *Calotropis procera* Ait. (Family Asclepiadaceae) is a species widely used for the treatment of various diseases including sickle cell disease in Burkina Faso. It enter in the composition of FACA[®], drug developed by Institute for Research in Health Sciences, Burkina Faso and used in the treatment of sickle cell disease. The objective of this study was to evaluate the toxic effects at short and long term of *Calotropis procera* root barks in some rodents. In the acute test, the limit test dose of 2000 mg/kg of aqueous and hydroalcoholic extracts were administered orally to NMRI mice and then observed individually 2 h post-dosing and at least once daily for 14 days. Sub-chronic toxicity was evaluated after a daily oral administration of 20 mg/kg body weight of aqueous extract for 3 and 6 weeks to Wistar rats. Biochemical and hematological assessments as well as body and relative organ weights of the rats were carried out. The limit dose of 2000 mg/kg did not cause any mortality or signs of acute toxicity in the mice tested during the observation period. In the sub-chronic tests, the results did not show any treatment-related abnormalities in terms of physiological, hematological parameters. However, on biochemical parameters, a slight but not significant ($p > 0.05$) elevation of ALT and AST were noticed in treated groups. Our results suggest that aqueous extract of *Calotropis procera* which contains many chemical compounds is relatively safe when administered orally and contribute to the safe use of this part of plant in pharmaceutical formulations.

Keywords: Biological parameters, *Calotropis procera* Ait., FACA[®], mice, wistar rat

INTRODUCTION

Sickle cell anemia, a genetic disease that affects hemoglobin of red blood cells is a major public health problem in Burkina Faso and Africa, the prevalence rate reaching between 10 and 40% of the population in some areas (OMS, 2006).

However, there is currently no curative treatment against sickle cell disease (OMS, 2006).

Also, in Burkina Faso, as in many African countries, the available drugs are imported and are not accessible to the majority of the population due to the high cost (Guissou *et al.*, 1995). Therefore; research and development of drugs against sickle cell disease based on traditional medicine; becoming a priority in Africa.

Calotropis procera (Ait.) R. Br. (*C. procera*) commonly called "Pomme de Sodome" in french is a species widely used in traditional medicine for the treatment of various diseases including sickle cell disease, asthma, cancer (Nacoulma, 1996).

Scientific works carried out by "Institut de Recherche en Science de la Santé" (IRSS) in Burkina Faso have permit the development of a phytomedicinal drug, named FACA[®] and used for the treatment of sickle cell disease. FACA[®] is a mixture of roots barks powder of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br (Asclepiadaceae) and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Lam (Rutaceae). FACA[®] is revealed to have clinically an efficacy for the treatment and prevention of sickle cell crisis in children (Guissou *et al.*, 1995; Nikiema *et al.*, 2010).

Calotropis procera belonging to the family of Asclepiadaceae is a small tree, distributed in tropical and subtropical Africa and Asia (Millar and Morris, 1987).

Several authors reported that *Calotropis procera* have various pharmacological activities such as anti-inflammatory and analgesic activities (Basu and Chaudhuri, 1991), antibacterial activities (Mainasara *et al.*, 2011), analgesic activities (Dewan *et al.*, 2000) and antioxidant activities (Faruki *et al.*, 2011).

Corresponding Author: Geoffroy G. Ouedraogo, Laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé; Ecole Doctorale de la Santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso, Tel.: (00226) 70 09 15 03

However, toxic effects of latex and leaves of *Calotropis procera* have been reported. (Mahmoud *et al.*, 1979b; Pahwa and Chatterjee, 1988; Singhal and Kumar, 2009; Mahmoud *et al.*, 1979a).

Also *Calotropis procera* is well known to possess cardiac glycosides such as cardenolides which are cardiac poison (Van Quaquebeke *et al.*, 2005).

Considering the chronic treatment of sickle cell disease and the presence of cardenolides in the plant, it was necessary to evaluate the toxicity of these extracts.

The aims of this present work was therefore to evaluate the toxic effects at short and long term of *Calotropis procera* root barks to contribute to the safe use of this part of plant in pharmaceuticals formulations.

MATERIALS AND METHODS

Materials:

Plant material: Fresh roots of *C. procera* were collected in Roumtemga located at 25 km north-East of Ouagadougou, capital of Burkina Faso, savannah countries, in July 2010 (temperature about 30°C with high relative humidity).

The plant sample was identified and authenticated at “Herbier National du Burkina (HNBU)” located at “Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (CNRST)” where the voucher specimen has been deposited under number HB 8716.

The barks were washed with tap water, dried under ventilation in the shade. The dried barks were pulverized using a mechanical grinder. The powder obtained was used for extracts preparation.

Animals care and treatment: Male and female NMRI mice (average weight 27±4 g) and Wistar rats (either sex, average weight 160±42 g), procured from the “Centre International de Recherche-Développement sur l’Élevage en zone Subhumide” (CIRDES¹), Burkina Faso were used for different experimental toxicology tests. They were housed in the animal cage with free access to water and standard laboratory pellet enriched with protein (29%). The animals were exposed under a controlled environment in animal house of “Unité de Formation et de Recherche en Science de la Santé” (University of Ouagadougou, Burkina Faso) at temperature of 23-25°C, 60% humidity and 12 h light-dark cycle two weeks before the use. The protocol of experimentation was approved by the local Ethical Committee for Animal Experimentation of University of Ouagadougou.

Methods:

Preparation of extracts: A portion of *C. procera* root barks powder sample was weighed (250 g) and macerated in 2,5 L of solvent (distilled water and a mixture methanol/water (70/30 v/v) respectively for aqueous and hydroalcoholic extract) during 24 h at room temperature.

The mixture was then filtered through cotton wool and the filtrate was centrifuged at 2000 rpm for five minutes. The collected supernatant of aqueous extract was then lyophilized, packaged in a bottle and stored in desiccator. For the hydroalcoholic extract, the collected supernatant was concentrated at 65°C under vacuum using a rotary evaporator before lyophilization and packaging in a bottle and stored in desiccator.

Acute toxicity test in mice: Acute toxicity tests of aqueous and hydroalcoholic extracts of root barks of *Calotropis procera* were performed separately in male and female mice according to OECD guideline for chemicals tests (OECD, 2001). The limit test at dose level of 2000 mg/kg body weight was administered orally (gavage) to six fasted males and females mice per extract. The females were nulliparous and nonpregnant.

The animals of different groups were individually observed for 120 min post-treatment and at least once daily for 14 days for mortality and signs of toxicity such as changes in skin and fur, eyes, mucus membranes, convulsion, salivation, diarrhea, lethargy, sleep and coma.

Subchronic toxicity test:

Experimental tests: Sub-chronic toxicity study of aqueous extract of root barks of *Calotropis procera* were performed according to OECD guideline for chemicals tests with slight modification (OECD, 1998).

Based on Lethal Dose 50 (LD₅₀) values obtained from acute toxicity studies, the selection of dose for sub-chronic toxicity was carried out. The dose selected in this study is 20 mg/kg body weight. This dose corresponded at 1/100 of LD₅₀ obtained in the acute toxicity tests.

A total number of 42 Wistar rats of both sex were randomly selected for the sub-chronic toxicity studies. The females were nulliparous and nonpregnant. The rats were divided into 3 groups and male and females were kept in separate polypropylene cages.

Group I : (5 males and 5 females) served as control and received a daily administration of vehicle (distilled water) for 6 weeks

Group II : (6 males and 6 females) received a daily administration of 20 mg/kg, body weight of aqueous extract for 3 weeks

Group III: (10 males and 10 females) received a daily administration of 20 mg/kg, body weight of aqueous extract for 6 weeks

During the period of experimentation, all animals were observed twice a day for signs of toxicity and mortality. Individual body weights of animals were recorded daily (OECD, 1998).

The animals were fasted over night prior to the terminal sacrifice, at which time the animals were anesthetized with ketamine and blood was collected via cardiac puncture into two vacutainers for each animals,

the first one containing Ethylene Diamine Tetraacetate (EDTA) for hematology analysis and the second in dry vacutainer.

The blood samples contained in dry vacutainers were centrifuged at 3000 rpm for 10 min using a table centrifuge and the sera obtained were kept in sterile tubes and stored at -4°C for later biochemical assays.

After the blood collection, internal organs including liver, heart, kidneys, lungs, stomach, testicles and ovaries were collected, weighed to determine relative organs weights and examined for gross pathology.

Blood analysis: Hematological parameters were performed using the blood samples contained in EDTA tube.

Red Blood Cell count (RBC), White Blood Cell count (WBC), platelet count (PLT), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), plateletcrit (PCT), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Mean Platelet Volume (MPV), Red cell Distribution Width (RDW) and Platelet Distribution Width (PDW) were determined on a semiautomatic cell counter (Hospitex Diagnostic, model: Hema screen 13, Italy).

Blood chemistry tests were performed on a semiautomatic biochemistry analyzer (Hospitex diagnostic, screen master LIHD113, Italy). Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (CREAT) and total protein were determined.

Histopathological evaluation: Tissue samples liver, kidneys, lungs and stomach were fixed in 10% buffered formalin solution. After routine processing, the paraffin sections of each tissue were cut at 5 µm thickness and stained with haematoxylin and eosin for histopathological examination. Microscopic slides were analyzed qualitatively under light microscope.

Statistical analysis: Results were expressed as Means±Standard deviations (SD). Means and standard deviations were calculated separately for males and females. The statistical data were processed with Graph Pad Prism.5. All groups were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by comparison of the treated groups to control by Dunnett's multiple comparison tests. Differences were considered to be statically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Acute toxicity study of the plant extracts: In acute toxicity study carried out in mice, the limit test at dose level of 2000 mg/kg body weight in single oral administration of aqueous and hydroalcoholic extract did not cause any death after 72 h post-treatment in males and females mice. Also any behavioral changes including changes in skin and fur, eyes, mucus

Table 1: Mean weekly body weight gain (g) of control and daily treated rats with aqueous extract of plant in sub-chronic oral toxicity test

Day	Sex	Control ^a	Dose (20 mg/kg/day b.w.)	
			3 Weeks ^b	6 Weeks ^c
00-07	M	5.8±1.30	3.5±0.84	10.1±3.87
	F	6.0±2.35	8.17±1.72	6.5±2.76
07-14	M	5.2±2.17	4.33±1.97	8.6±3.98
	F	5.4±2.61	5.67±2.25	7.4±2.99
14-21	M	4.6±2.88	3.83±1.17	7.6±3.89
	F	5.8±2.39	5.83±1.07	5.6±2.91
21-28	M	4.2±2.95		5.4±3.13
	F	3.8±1.92		4.4±1.35
28-35	M	5.0±2.88		5.0±2.16
	F	3.4±1.34		3.6±1.96
35-42	M	4.8±2.39		3.8±2.20
	F	3.6±1.52		3.8±1.32

Mean and Standard deviation are presented (a: n = 5; b: n = 6; c: n = 10); No statistical difference between the control and treated groups; ($p > 0.05$) One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests; M = Male; F = Female

Table 2: Mean relative organ weights of control and daily treated rats with aqueous extract of plant in sub-chronic oral toxicity test

Organ	Sex	Control ^a	Dose (20 mg/kg/day b.w.)	
			3 Weeks ^b	6 Weeks ^c
Liver	M	2.95±0.44	2.91±0.20	2.88±0.34
	F	2.85±0.22	3.22±0.15	3.19±0.26
Heart	M	0.36±0.05	0.33±0.03	0.38±0.05
	F	0.34±0.05	0.34±0.03	0.37±0.03
Kidneys	M	0.62±0.01	0.53±0.02	0.57±0.09
	F	0.56±0.06	0.53±0.03	0.57±0.05
Lung	M	0.52±0.12	0.49±0.06	0.54±0.07
	F	0.48±0.07	0.52±0.03	0.57±0.05
Stomach	M	2.81±0.94	2.38±0.54	2.37±0.64
	F	2.78±0.14	2.58±0.52	2.45±0.42
Testicles	M	1.73±0.24	1.58±0.19	1.95±0.43
	F	0.09±0.03	0.10±0.02	0.09±0.02

Mean and Standard deviation are presented (a: n = 5; b: n = 6; c: n = 10); No statistical difference between the control and treated groups; ($p > 0.05$) One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests; M = Male; F = Female

convulsion, salivation, diarrhea and lethargy did not observed in treated groups 14 days post-treatment.

Subchronic toxicity study of aqueous extract in rats: Daily administration of aqueous extract to males and females Wistar rats during 3 and 6 weeks at the dose of 20 mg/kg/day induced no mortality in either sex. No evidence of treatment-related gross toxicity was identified during clinical observation of rats exposed to the extract.

Effect of extract on physical parameters: The mean weekly body weight gain of control and daily treated rats with aqueous extract of root barks of the plant during 3 and 6 weeks is presented in the Table 1. Statistical analysis revealed that there were no significant differences in body weight between control and treatment groups ($p > 0.05$).

Table 2 presents the mean relative organ weights of liver, heart, kidneys, lungs, stomach, testicles and ovaries of control and treated rats. This result shows that there were no significant changes between different values of treatment and control groups ($p > 0.05$).

Table 3: Mean hematological value of control and daily treated rats with aqueous extract of plant in sub-chronic oral toxicity test

Parameters	Sex	Control ^a	Dose (20 mg/kg/day b.w.)	
			3 Weeks ^b	6 Weeks ^c
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	M	8.21 \pm 0.90	8.52 \pm 0.91	7.96 \pm 0.54
	F	7.41 \pm 0.64	7.37 \pm 0.45	7.83 \pm 0.95
MCV (fL)	M	46.2 \pm 1.92	49.33 \pm 2.50	46.30 \pm 0.67
	F	48.00 \pm 1.00	50.67 \pm 1.03	48.60 \pm 2.07
HCT (%)	M	38.12 \pm 5.41	42.02 \pm 3.47	36.93 \pm 2.76
	F	35.66 \pm 3.38	37.17 \pm 2.57	38.05 \pm 3.90
MCH (pg)	M	19.04 \pm 2.14	20.02 \pm 1.58	20.04 \pm 0.99
	F	19.32 \pm 1.65	20.22 \pm 0.75	19.75 \pm 2.12
MCHC (g/dL)	M	41.32 \pm 5.85	40.47 \pm 2.43	43.20 \pm 1.95
	F	40.22 \pm 3.63	40.07 \pm 1.46	40.49 \pm 3.43
RDW (%)	M	27.20 \pm 1.42	25.60 \pm 1.48	27.03 \pm 0.78
	F	26.58 \pm 1.07	24.80 \pm 0.66	29.13 \pm 3.61
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	M	6.34 \pm 0.80	6.38 \pm 3.48	7.08 \pm 1.88
	F	5.92 \pm 1.55	6.63 \pm 3.97	5.62 \pm 1.15
HGB (g/dL)	M	15.50 \pm 0.58	16.95 \pm 0.90	15.94 \pm 1.40
	F	14.26 \pm 0.75	14.88 \pm 0.87	15.33 \pm 1.09
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	M	520.80 \pm 38.09	513.33 \pm 97.01	479.90 \pm 96.37
	F	492.60 \pm 75.57	487.00 \pm 40.32	529.30 \pm 87.89
MPV (fL)	M	8.16 \pm 0.39	8.42 \pm 0.33	8.16 \pm 0.37
	F	7.94 \pm 0.27	8.02 \pm 0.15	8.08 \pm 0.52
PCT (%)	M	0.42 \pm 0.03	0.43 \pm 0.08	0.39 \pm 0.07
	F	0.39 \pm 0.07	0.39 \pm 0.04	0.43 \pm 0.08
PDW (fL)	M	43.96 \pm 12.32	43.00 \pm 15.18	39.52 \pm 13.30
	F	40.92 \pm 2.31	55.05 \pm 1.40	42.32 \pm 12.11

Mean and Standard deviation are presented (a: n = 5; b: n = 6; c: n = 10); No statistical difference between the control and treated groups; (p>0.05) One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests; M = Male; F = Female

Table 4: Mean blood clinical chemistry value of control and daily treated rats with aqueous extract of plant in sub-chronic oral toxicity test

Parameters	Sex	Control ^a	Dose (20 mg/kg/day b.w.)	
			3 Weeks ^b	6 Weeks ^c
ALT (U/L)	M	31.72 \pm 18.45	29.10 \pm 13.67	58.19 \pm 29.5
	F	35.75 \pm 10.42	32.29 \pm 12.08	53.32 \pm 26.76
AST (U/L)	M	77.52 \pm 23.59	124.18 \pm 53.04	121.64 \pm 64.76
	F	92.93 \pm 21.90	130.88 \pm 62.28	147.44 \pm 62.05
CREAT (mg/dL)	M	0.88 \pm 0.13	0.81 \pm 0.08	0.8 \pm 0.10
	F	0.87 \pm 0.05	0.81 \pm 0.06	0.79 \pm 0.07
Total protein (g/dL)	M	5.66 \pm 0.35	5.98 \pm 0.52	6.02 \pm 1.86
	F	6.31 \pm 0.30	7.26 \pm 0.66	6.24 \pm 1.13

Mean and Standard deviation are presented (a: n = 5; b: n = 6; c: n = 10); No statistical difference between the control and treated groups; (p>0.05) One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests; M = Male; F = Female

Effect of extract on hematological parameters: The results of hematological parameters of control and daily treated rats with aqueous extract of root barks of the plant during 3 and 6 weeks are shown in Table 3. These results show that there were no statistically significant difference between treated and control groups (p>0.05).

Effect of extract on serum biochemical parameters: The results of blood clinical chemistry parameters are shown in Table 4. This result indicates a slight elevation of alanine aminotransferase (ALT) after 6 weeks of treatment and aspartate aminotransferase (AST) after 3 and 6 weeks of treatment in the treated rats. However there were no statistically significant differences between different values of treatment and control groups (p>0.05).

For creatinine and total protein values, there were no significant change between treated and control groups (p>0.05).

Histopathological examination: Histological examination of liver, kidney, stomach and lungs on

optical microscope showed that there were not most histological changes in treated rats compared to controls.

However, slight congestions of stomach, lungs and liver, a dilatation of central veins of liver and lungs alveoli were observed in some rats after 3 and 6 weeks of treatment (Fig. 1).

DISCUSSION

Many investigations on *C. procera* have reported that the plant has numerous pharmacological properties. The toxicity of different parts including the aerial parts and the latex of the plant has already been evaluated. However, there is little information about the toxicity of root bark which was the subject of our study.

In this present study of acute toxicity in NMRI mice, the limit test at dose level of 2000 mg/kg body weight in single oral administration of aqueous and alcoholic extract did not cause any mortality and signs of toxicity during the period of observation in both sex. These results indicate that both extracts of the plants have a LD₅₀ higher than 2000 mg/kg and suggests that

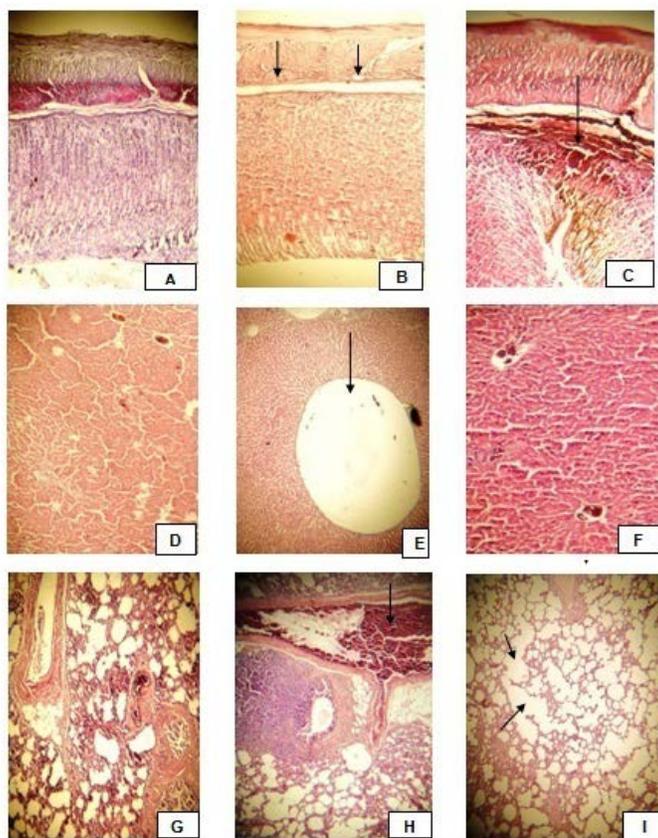


Fig. 1: Histopathological finding. (Haematoxylin and Eosin stain x 5). A: normal stomach; B: mucosal atrophy; C: congestion of stomach; D: Normal liver; E: Dilated central veins of liver; F: slight congestion of liver; G: Normal lung; H: congestion of lungs; I: dilatation of the pulmonary alveoli

these extracts are products which have low oral toxicity according to classification of Hodge and Sterner (1943) and United Nation (2011).

Compared to digoxin which is a reference cardenolide, the LD₅₀ of the aqueous extract of the root bark of the plant is 250 times greater than digoxin that is 7.8 mg/kg by oral route on mice.

Our results are similar to Mossa *et al.* (1991) which showed that ethanol extract of the aerial parts of *C. procera* does not cause oral toxicity in mice at doses up to 3000 mg/kg.

Other authors have found that the aqueous decoction and ethanolic extract of the roots of *C. procera* of Mali at doses of 1500 and 2000 mg/kg caused a mortality of 20-40% of Wistar rats (Circosta *et al.*, 2001). The difference with our results may be explained by the extraction procedure, the type of animal used, but also the soil factors that can influence the chemical composition of extracts.

The subchronic toxicity study showed that the daily oral administration of aqueous extract at 20 mg/kg/day body weight during 3 and 6 weeks did not cause any death and clinical signs of toxicity. The mean weekly body weight gain and relative organ weights of treated groups were similar to control group. Body weight is known to be one of the most sensitive indicators of

adverse effects. In this study all animals' body weight were increased during the administration period suggesting that aqueous extract did not influence the animal's weight gain. These results go in agreement with the results of other researchers who also observed this weight gain with the aqueous extract of the leaves of *C. procera* on rabbits (Pouokam *et al.*, 2011; Shahat and Shihata, 2012).

Hematological profile is important to know in the treatment of sickle cell disease.

In this present subchronic toxicity study we found that there were no significant changes in the hematological parameters between the control and the experimental groups. According to some authors, there is a correlation of toxicity in hematological, gastrointestinal and cardiovascular adverse effects between animals and humans (Olson *et al.*, 2000).

The hematopoietic system is one of the most sensitive targets for toxic chemicals and an important index of physiological and pathological status in human and animal (Li *et al.*, 2010).

Hematological indices in animals are important to determine the toxicity risk since the changes in the blood system have a higher predictive value for human toxicity. The hematological indices obtained in this study suggest that the aqueous extract of plant is not

toxic on hematological parameters as they do not affect the circulating blood cells or their production. Thus, the ingestion of aqueous extract shall not have adverse effects on cellular components of blood in sickle cell patients.

Our results were similar to Dada *et al.* (2002) who have found that the daily oral administration of latex of *C. procera* on rat during 7 and 14 days has no significant effects on blood parameters.

For the biochemical parameters, a slight elevation of transaminases ALT and AST were noticed but there were not statistically significant differences. Our result is in the line of data from other authors who reported the slight elevation of serum enzymes in rat treated with latex of *C. procera* (Dada *et al.*, 2002).

The serum levels of Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate aminotransferases (AST) are usually elevated in conditions associated with injuries or diseases affecting the liver which leads to the release of these hepatocellular enzymes into the bloodstream (Pagana and Pagana, 2002)

Our result indicates that the liver was not greatly damaged to release significant quantities of the enzyme into the blood due to the quantity of extract administered (Odutola, 2000). The amount of enzyme released into blood is directly proportional to the number of damaged cells and the interval of time between injury and the test (Adedeji *et al.*, 2002).

The slight congestion and dilatation of central veins of liver seen in histological examination could explained the slight elevation of transaminases ALT and AST observed in this study.

Concerning the values of creatinine and total protein, there were no significant change between treated and control groups meaning that kidney and liver were not greatly damaged respectively.

Creatinine is a serum metabolite that is indicative of the renal function (Whitby *et al.*, 1987). The normal values of creatinine obtained suggest that kidney were not damaged. The normal cytoarchitecture of kidney found in histological examination confirmed these results.

The dose used in this subchronic toxicity study is at least 10 times higher than the dose used in the FACA[®]. The overall results obtained in subchronic toxicity study indicates that the aqueous extract of root bark is tolerated in oral repeat administration and there would be less risk of toxicity in sickle cell patients under treatment FACA[®].

CONCLUSION

Our results have suggested that aqueous and hydroalcohol extracts of *C. procera* root bark are relatively safe when administered orally and could justify the use of this part of the plant in the treatment of various diseases including sickle cell disease.

These results contribute to reassure people in the safe use of FACA[®] in the treatment of sickle cell

disease. But it is necessary to complete the toxicological evaluation of products derived from this plant including FACA[®] by pharmacovigilance monitoring of patients under treatment.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the “West African Health Organisation (WAHO)” for providing financial research support.

REFERENCES

- Adedeji, O.S., M.B. Abubakar and P.C. Ozegbe, 2002. Growth-suppressing effect of *Calotropis procera* (Giant Milkweed)-chronic cyanide toxicity and urinary enzyme excretion in rabbits. Trop. Vet., pp: 1357.
- Basu, A. and A.K. Chaudhuri, 1991. Preliminary studies on the antiinflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. J. Ethnopharmacol., 31(3): 319-324.
- Circosta, C., R. Sanogo and F. Occhiuto, 2001. Effects of *Calotropis procera* on oestrous cycle and on oestrogenic functionality in rats. Farmaco, 56(5-7): 373-378.
- Dada, Y.O., M.T. Lamidi, K.I. Eghianruwa and F. Adepoju, 2002. Effects of oral administration of the latex of *Calotropis procera* on weight, hematology and biochemistry in rats. Trop. Vet., 20(4): 218-225.
- Dewan, S., H. Sangraula and V.L. Kumar, 2000: Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. J. Ethnopharmacol., 73 (1-2): 307-311.
- Faruki, Md. Z., M.K. Jha, Md. M. Rahman, M.B. Alam, M.E.H. Mazumder and Md. S. Rana, 2011. in- vitro antioxidant and cytotoxic potential of *Calotropis procera* (R. Br.) root. Int. J. Pharm. Sci. Res., 2(8): 2132-2135.
- Guisso, I.P., M. Sawadogo, A. Sawadogo and A. Ouattara, 1995. Etude de l'efficacité antidrepanocitaire de gelules FACA[®] chez les enfants en milieu hospitalier de Ouagadougou (chn-yo). Pharm. Méd. Trad. Afro, pp: 29-36.
- Hodge, H.C. and J.H. Sterner, 1943. Determination of substance acute toxicity by LD₅₀. Am. Ind. Hyg. Assoc., 10: 93.
- Mahmoud, O.M., S.E.I. Adam and G. Tartour, 1979a. The effects of *Calotropis procera* on small ruminants. I. Effects of feeding sheep with the plant. J. Comp. Pathol., 89(2): 241-250.
- Mahmoud, O.M., S.E.I. Adam and G. Tartour, 1979b. The effects of *Calotropis procera* on small ruminants. II. Effects of administration of the latex to sheep and goats. J. Comp. Pathol., 89: 251-263.

- Mainasara, M.M., B.L. Aliero, A.A. Aliero and S.S. Dahiru, 2011. Phytochemical and antibacterial properties of *Calotropis Procera* (Ait) R. Br. (Sodom Apple) fruit and bark extracts. Int. J. Modern Botany, 1(1): 8-11.
- Millar, A.G. and M. Morris, 1987. Plants of Dhofar, the Southern Region of Oman, Traditional, Economic and Medicinal Uses. The office of the Advisor for Conservation of the Environment, Diwan of Royal Court Sultanate of Oman, pp: 42.
- Mossa, J.S., M. Tariq, A. Mohsin, A.M. Ageel, M.A. Al-Yahya, M.S. Al-Said and S. Rafatullah, 1991. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. Am. J. Chinese Med., 19: 223-231.
- Nacoulma, O.G., 1996. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. Ph. D. Thesis, Biochemistry-Microbiology Department, University of Ouagadougou.
- Nations Unies, 2011. Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Quatrième édition révisée. New York and Genève. ST/SG/AC.10/30/Rev4.
- Nikiema, J.B., B. Ouattara, R. Semde, K. Djierro, M. Compaore, I.P. Guissou and O.M.J. Kasilo, 2010. Promotion de la médecine traditionnelle du burkina faso: Essai de développement d'un médicament anti drépanocytaire, le FACA. Afr. Health Monitor, Special Issue 13: 52-57.
- Odutola, A., 2000. Rapid Interpretation of Routine Clinical Laboratory Tests S. Asekome and Co., Zaria, pp: 24-28.
- OECD, 1998. Test Guideline 408: Subchronic Oral Toxicity-Rodent: 90-day. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD, 2001. Test Guideline 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Olson, H., G. Betton, D. Robinson, K. Thomas, A. Monro and G. Kolaja, 2000. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. Regul. Toxicol. Pharm., 32: 56-67.
- OMS, 2006. La drépanocytose dans la région Africaine: Situation actuelle et perspectives. Cinquante-sixième session. Point 8.11 de l'ordre du jour provisoire. AFR/RC56/17.
- Pahwa, R. and V.C. Chatterjee, 1988. The toxicity of Indian *Calotropis procera* R.Br. latex in the black rat, *Rattus rattus*. Vet. Hum. Toxicol., 30: 305-308.
- Pouokam, G.B., H. Ahmed, C. Dawurung, A. Atiku, S. David and O. Philipe, 2011. Influence of age on sub-chronic toxicity of the aqueous extract of the leaves of *Calotropis procera* on rabbits. J. Toxicol. Environ. Health Sci., 3(5): 119-126.
- Shahat, M.A. and A.M.A. Shihata 2012. Evaluation of the toxicological effects manifested after long term administration of aqueous *Calotropis procera* plant extract in male and female rabbits. Egypt. J. Hospital Med., 47: 291-300.
- Singhal, A. and V.L. Kumar, 2009. Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat. J. Ethnopharmacol., 122: 172-174.
- Van Quaquebeke, E., G. Simon, A. André, J. Dewelle, M. El Yazidi, F. Bruyneel, J. Tuti, O. Nacoulma, P. Guissou, C. Decaestecker, J.C. Braekman, R. Kiss and F. Darro, 2005. Identification of a novel cardenolide (2"-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: Structure-activity relationship analyses. J. Med. Chem. 48(3): 849-56.
- Whitby, L.G., I.W. Percy-Robb and A.F. Smith, 1987. Lecture Notes on Clinical Chemistry. 3rd Edn., Black well Scientific Publications, Oxford, pp: 111-137.

Endnote:

- 1: Center specializing in livestock breeding of laboratory animals for research.

Cytotoxicity assessment of aqueous extract from root barks of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. in human intestinal Caco-2 and mouse neuroblastoma Neuro-2a cell lines

Geoffroy G. Ouedraogo^{1,2*}, Serge Moukha², Théophile A. Mobio², Moustapha Ouedraogo¹, Pierre I. Guissou^{1,3} and Edmond E. Creppy²

¹Laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé ; Ecole Doctorale de la Santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso, ²Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée, UFR des sciences pharmaceutiques, Université Bordeaux-2, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux, France, ³Institut de Recherche en Science de la Santé / Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (IRSS/CNRST), 03 BP 7192 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: 20/02/2014

Revised on: 08/03/2014

Accepted on: 20/04/2014

Available online: 28/04/2014

Key words:

Calotropis procera Ait., cytotoxicity, FACA[®], Caco-2 cell, Neuro-2a cell.

ABSTRACT

Calotropis procera (Ait.) R. Br (Asclepiadaceae) is a species widely used in traditional medicine for the treatment of various diseases such as sickle cell disease, asthma and cancer. In Burkina Faso, it enter in the composition of FACA[®] in combination with *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam (Rutaceae), drug used in sickle cell disease treatment. The objective of this study was to evaluate the in vitro cytotoxicity of aqueous extract of root barks of the plant on cell lines to increase the safe use of FACA[®]. MTT and Neutral Red assays performed on Caco-2 and Neuro-2a cell lines revealed that aqueous extract from root barks of *Calotropis procera* are cytotoxic on these cell lines. DNA fragmentation assay on Caco-2 cell showed DNA smearing reflecting a degradation of nuclear material that indicates a possible genotoxicity. Altogether, it comes out that the most sensitive cell line is the human colorectal carcinoma Caco-2 cells. Comparatively the active compounds of *Calotropis procera* do not affect the mice nervous system cells in the same dramatic extent. Our results strongly suggest that patients under treatment of FACA[®] must respect doses prescribed in order to avoid adverse side effects on the gastrointestinal tract.

INTRODUCTION

In Burkina Faso, as in many developing countries access to medical care in general and drug in particular, is often difficult. Current drugs are imported, and are not available to most patients because of their high cost (Guissou *et al.*, 1995). In this country more than half of the population lives in rural areas and uses a lot of herbs for their health care. More broadly, according to World Health Organization, it appears that approximately 80% of African people use traditional medicine for primary health care (OMS, 2002). Among the plants used in traditional medicine in Burkina Faso the *Calotropis procera* (Ait.) R. Br, also called “Pomme de

Sodome” in French, is a species widely used among treatment of various diseases such as sickle cell disease, asthma and cancer (Nacoulma 1996).

The genus *Calotropis* R.Br. (Asclepiadaceae) is commonly distributed in tropical and subtropical arid regions of Asia, Middle-East and Africa and is represented mainly by two species viz. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantean* (Verma *et al.*, 2010). *Calotropis procera* (Ait.) R. Br (*C. procera*) is a shrub belonging to the family of Asclepiadaceae. This wild plant grows typically in arid environments rich in phosphorus and calcium such as cemeteries, in the "wadi" or savannah and appears always verdant. Different parts of this plant are used for different purposes such as treatment of diverse diseases but also widespread in magico-religious practices. The leaves and root barks of *C. procera* are used in traditional medicine and renowned for the treatment of sickle cell disease.

* Corresponding Author

Geoffroy G. Ouedraogo; Laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé ; Ecole Doctorale de la Santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

E-mail: guioffray@yahoo.fr; Tel. (00226) 70 09 15 03

Numerous investigations conducted by the laboratories of pharmacology and toxicology of the “Unité de Formation et de Recherche en Science de la Santé” (University of Ouagadougou) and the Institute for Research in Health Sciences, Burkina Faso resulted the development of a phytomedicinal drug named FACA[®] (Nikiema *et al.*, 2010).

FACA[®] is a mixture of roots barks powder of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br (Asclepiadaceae) and *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam (Rutaceae) used in the treatment of sickle cell disease. This phytomedicinal drug revealed some effectiveness in clinical trials to relieve sickle cell crisis in children (Guissou *et al.*, 1995, Nikiema *et al.*, 2010).

The major component of FACA[®] is *C. procera* well known for its toxicity due to abundant latex. Regardless of the benefit that can be drawn, substances contained in this herbal medicine can be potentially toxic to human health especially during sustained use which can lead to toxicity.

Recent *in vitro* and *in vivo* investigations have revealed that many plants in traditional medicine have mutagenic, cytotoxic and genotoxic effects (Plewa and Wagner, 1993; Higashimoto *et al.*, 1993; Schimmer *et al.*, 1994; Zin and Chaffin, 1998)

Several studies reported that the root barks extract of *C. procera* possesses cytotoxic properties on cancer cells line (Smith *et al.*, 1995; Van Quaquebeke *et al.*, 2005). Actually, components of the plant including latex appeared to have *in vivo* anticancer and cytotoxic properties (Choedon *et al.*, 2006).

Considering long-term treatment for sickle cell disease, a better knowledge of potential cytotoxic effects of the part of the plant used in the FACA[®] proves to be necessary. The aim of this study was therefore to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of aqueous extract of root barks of the plant on cell lines to contribute to the safe use of FACA[®] in the treatment of sickle cell disease.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and extract preparation

Fresh roots of *C. procera* were collected in Roumtenga located at 25 km north-East of Ouagadougou, capital of Burkina Faso, savannah countries, in January 2012.

A sample of harvested plant was authenticated at the “Herbier National du Burkina (HNBU)” located at “Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (CNRST)” where the voucher specimen has been deposited under number 8,716.

The barks were washed with tap water, dried under ventilation in the shade. The dried barks were pulverized using a mechanical grinder (Gladiator Est. 1931 Type BN 1 Mach. 40461 1083).

Aqueous extract was then prepared by maceration of a portion of root bark powder (250g) in 2.5 L distilled water during 48h at room temperature.

The mixture was then filtered through cotton wool, and the filtrate was centrifuged at 2,000 rpm for 5 min. The collected supernatant was then lyophilized using Freeze dryer (CHRIST

Alpha 1-2, BIOBLOCK SCIENTIFIC), packaged in a bottle and stored in a desiccator. The lyophilisate obtained was then used for cytotoxicity tests.

Chemicals and culture medium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640), Foetal Calf Serum (FCS), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and neutral red solution were provided from Sigma-Aldrich (France). All other chemicals used were of analytical grade.

Cells and culture condition

Cytotoxic effect of aqueous extract of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br was carried out on Caco-2 cells (Human Caucasian colon adenocarcinoma) and Neuro-2a cells (mouse Albino neuroblastoma).

Caco-2 cells were provided from European Collection of Cell Cultures (ECACC) and Neuro-2a cells from American Type Culture Collection (ATCC). These cells were frozen in cryotubes and stored in liquid nitrogen at -196 °C before being thawed and cultured.

Caco-2 cells were grown as monolayer cultures in a high glucose (4 g/L) DMEM medium and Neuro-2a cells in RPMI medium. These cells culture medium were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 8mM L-glutamine, 1% of penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 g/mL) mixture. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator (Jouan, IG 150, France). For cell counting and subculture, the cells were suspended using 0.05% trypsin and 0.02% EDTA for Caco-2 cells and mechanically for Neuro-2a cells.

Cells viability assay by MTT

Cell viability was assessed using MTT colorimetric assay widely used to determine cell growth and cell cytotoxicity, particularly in the development of new drugs (Akhir *et al.*, 2011). It is based on the ability of viable cells to metabolize a tetrazolium salt to formazan blue in the mitochondria (Loveland *et al.*, 1992). The formazan accumulation is proportional to the number of viable cells and inversely proportional to the degree of cytotoxicity (Berridge *et al.*, 2005).

Briefly, the cells are inoculated in 96 well plates at (2 to 3) x10⁵ cells/mL of complete cell culture medium. Cells were incubated (Jouan IG 150 incubator, France) for 24 hours at 37°C in a humidified-5% CO₂ enriched atmosphere prior to extract exposition. Culture medium was removed and after 48 hours of exposure in the same culture conditions with a concentration range of aqueous extract of plant (ranging from 0.15 to 15x10³µg/mL prepared in serum-free medium) or vehicle (cell culture medium) or control (cells with serum-free medium), again culture medium was removed before adding 100 µL of 1 mg/mL solution of thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT). Plates were incubated during 1 hour at 37°C, excess MTT was removed and 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to each wells to dissolve formazan crystals, precipitates resulting from the conversion of

MTT by the mitochondrial succinate dehydrogenase. The plates were vortexed 5 min and read at 540 nm with a Microplate Reader LT-4000 (Labtech, France).

The viability was expressed as the optical density value from treated samples versus optical density values from control wells (untreated cells) both corrected by blank measurements of wells without cells.

Each experiment was repeated independently three times in six replicates (n=6) for each concentration point.

Cells viability assay by neutral red

Neutral red (NR) test was also performed to assess cytotoxicity. NR assay is a cell viability test based on the ability of living cells to incorporate and bind neutral red. Cytotoxicity is expressed as a concentration dependent reduction of the uptake of NR, thus providing a sensitive, integrated signal of both cell integrity and growth inhibition (Borenfreund and Puerner, 1985). Routinely, the cells were inoculated at a density of $(2 \text{ to } 3) \times 10^5$ cells/mL in transparent 96-well plates (100 μL per well) and incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 . After 24 hours, the medium was removed from wells and the cells were exposed to concentration of plant extract ranging from 0.15 to $15 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ (in serum-free medium) or vehicle (cell culture medium) or control (cells with serum-free medium) for 72 hours. Then, plant extract media are removed and the cell layer washed with 150 μL of phosphate buffered saline solution (PBS). Next 150 μL of a pre-warmed (37°C) solution of neutral red prepared in fresh cell culture medium ($3.3 \times 10^{-2} \text{ g/L}$) was added to each well. After 3 hours of incubation at 37°C (5% CO_2) the cells were washed twice with PBS and then lysed with 150 μL of mixture of acetic acid solution / ethanol 50% (1: 99 v/v). The plates were shaken for 15 min with a plate vortex before reading absorbance at 540 nm with Microplate Reader LT-4000 Labtech, France (Kouadio *et al.*, 2005). Cell viability was calculated from relative dye intensity compared with untreated samples.

Each experiment was repeated independently three times in six replicates (n=6) for each concentration point.

Morphological analysis

The morphology of cell was monitored using an inverted microscope. Caco-2 and Neuro-2a cells were checked for morphologic changes after 48 hours exposure to range concentrations of plant extract or vehicle as compared to control (100 μL per well) and photographs were taken (40x).

DNA fragmentation assay

DNA fragmentation assay were performed on Caco-2 cells. Cells were seeded at a density of $(2 \text{ to } 3) \times 10^5$ cells/mL in 6-well plates (3 mL per well) and incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 . After 24 hours of culture, the culture medium was removed and the plate was treated with adapted concentrations of plant extract (10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). After 24 hours of exposition at 37°C (5% CO_2), the medium was removed,

followed by washing the cell layer with 5 mL PBS. The adherent cells were then lysed with lysis buffer (Tris-EDTA (20:5) pH 8 and 1% SDS). The proteins were digested with proteinase K (100 $\mu\text{g/mL}$ for 1 hour at 37°C) and RNA by RNase A (10 $\mu\text{g/mL}$ at 37°C for 15 min).

DNA extraction was carried out with chloroform isoamyl alcohol (24v: 1v) followed by precipitation with sodium acetate (3M, pH 4.8) and cold absolute ethanol (1v: 2v) and centrifuged at 6,000 g for 45 min at 4°C. The DNA pellet was air dried and re-suspended in ultrapure sterile water. The quantity and purity of DNA was determined by measuring the absorbance at 260 and 280 nm with NanoDrop 2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific, USA). DNA fragmentation was analyzed in a 2% agarose gel in the presence of 1 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide.

Data analysis

The results are express as means \pm SEM of three independent experiments in six replicate. Statistical difference between the control and the plant extract with different concentrations to the cell line were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunett's multiple comparison tests. Differences were considered to be statically significant at $p < 0.05$. Significance levels were reported as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The IC_{50} values were obtained by nonlinear regression using the Graph pad Prism 5.0 program.

RESULTS

Effects on cells viability

Cell Growth Profile with MTT Assay

The effect of increasing concentrations of aqueous extract from root barks of *C. procera* on Caco-2 cells viability using MTT method is shown in Figure 1a. Aqueous plant extract induced cell death in concentration-dependent manner. The effective concentration causing 50% loss of cell viability (IC_{50}) in Caco-2 cell line is about 33 $\mu\text{g/mL}$ after 48 hours exposure to plant extract (Table 1).

Table. 1: IC_{50} Values in MTT and Neutral Red assay.

Cells line	IC_{50} Values \pm SEM ($\mu\text{g/mL}$)	
	MTT	Neutral Red
Caco-2	32.80 \pm 12.31	11.39 \pm 5.57
Neuro-2a	1802.33 \pm 192.31	230.10 \pm 9.5

IC_{50} values were obtained by nonlinear regression using the Graph pad Prism 5.0 program

The effect of increasing concentrations of aqueous extract on Neuro-2a cells using MTT assay is presented in figure 1b. Aqueous extract also causes cell death in concentration-dependent manner but with an IC_{50} of about 1802 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1) after 48 hours of exposure of the cells to the plant extract. It can be noticed that mice Neuro- 2a cell are less sensitive (55 time less sensitive) to the *C. procera* aqueous extract than Human Caco-2 cells (Neuro 2a $\text{IC}_{50} >$ Caco-2 IC_{50} ; Figure 1 and Table 1).

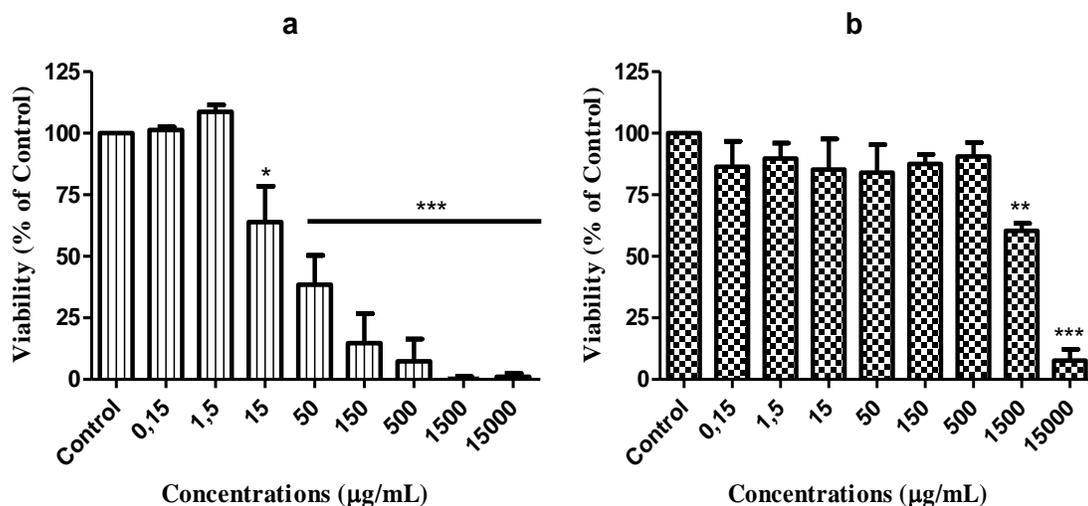


Fig. 1: Cytotoxic effect of aqueous extract of root barks of *Calotropis procera* on Caco-2 (a) and Neuro-2a (b) cells in MTT assay. The Caco-2 and Neuro-2a cells were treated with increasing concentrations of aqueous extract (0.15 to 15×10^3 $\mu\text{g/mL}$) for 48 hours. The cell viability was measured in six-replicate using MTT assay. Means \pm SEM of three independent experiments are presented. * *p* values: * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** $p < 0.001$ as compared to control.

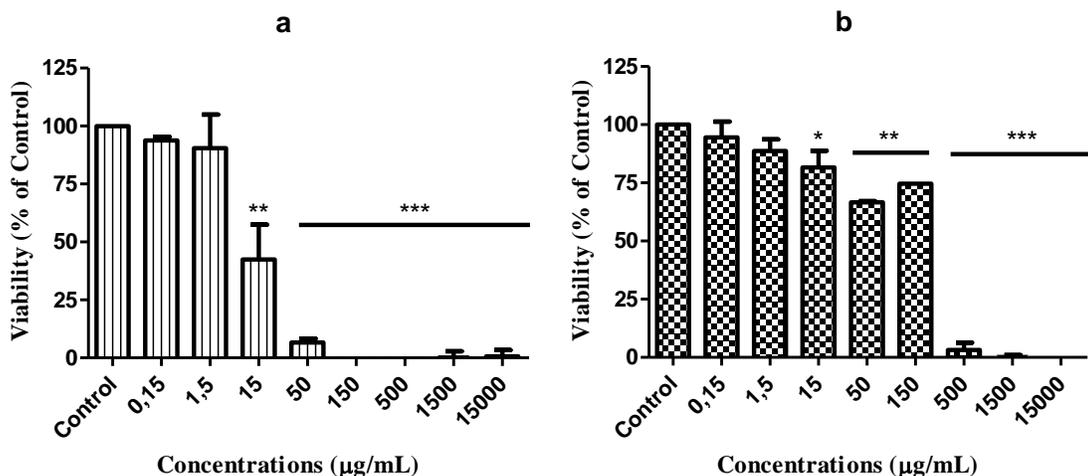
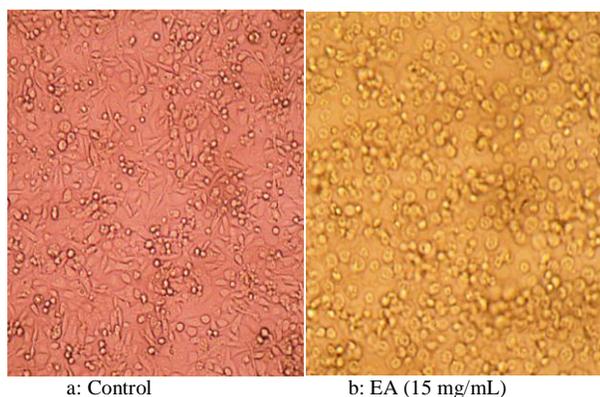


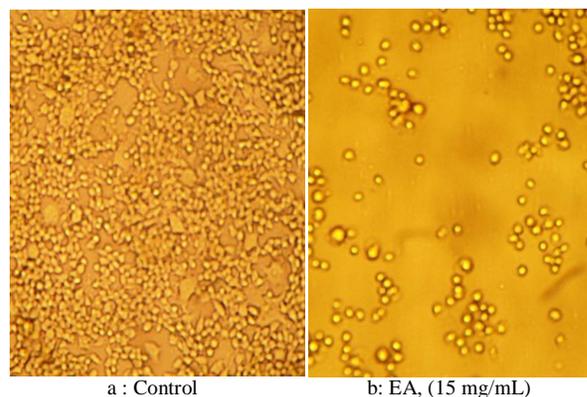
Fig. 2: Cytotoxic effect of aqueous extract of root barks of *Calotropis procera* on Caco-2 (a) and Neuro-2a (b) cells in Neutral Red assay. The Caco-2 and Neuro-2a cells were treated with increasing concentrations of aqueous extract (0.15 to 15×10^3 $\mu\text{g/mL}$) for 48 hours. The cell viability was measured in six-replicate using Neutral Red assay. Means \pm SEM of three independent experiments are presented. * *p* values: * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** $p < 0.001$ as compared to control.



a: Control

b: EA (15 mg/mL)

Fig. 3: Comparison of Caco-2 cells morphology under inverted microscope for the control cells (a) and cells treated with 15 mg/mL of aqueous extract (EA) (b) after 48 hours of exposure (x40)



a: Control

b: EA, (15 mg/mL)

Fig. 4: Comparison of Neuro-2a cells morphology under inverted microscope for the control cells (a) and cells treated with 15 mg/mL of aqueous extract (b) after 48 hours of exposure (x40)

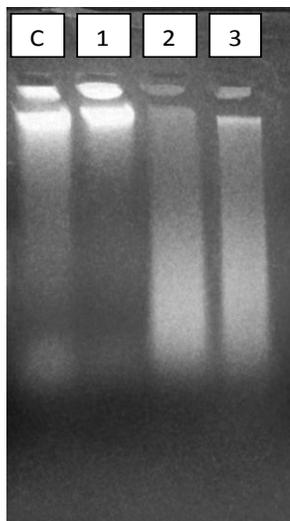


Fig. 5: Effect of aqueous extract of root barks of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br on DNA fragmentation in Caco-2 cells. Lane (C): Control; lane (1): EA 10 µg/mL; lane (2): EA 50 µg/mL; lane (3): EA 100 µg/mL

Cell Growth Profile with Neutral red Assay

The effect of *C. procera* root barks aqueous extract on cell viability of Caco-2 and Neuro-2a using neutral red test is shown in figure 2. The plant aqueous extract causes an inhibition of cell growth in a concentration-dependent manner after 48 hours exposure (figure 2). The inhibition was significantly different from control (untreated cells, $p < 0.05$) with 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of about 11 µg/mL for Caco-2 cells and 230 µg/mL for Neuro-2a cells (Table 1). Again with the Neutral Red assay Neuro-2a cells are less sensitive (20 time less) than Caco-2 cells (Neuro 2a IC_{50} > Caco-2 IC_{50} ; Figure 2 and Table 1).

Morphological aspect of cells

The cytotoxic effect of *C. procera* root barks aqueous extract show morphological changes of Caco-2 cells after 48 hours of exposure (Figure 3). As compared to controls, it can be clearly seen that after 48 hours cells appearance of cell layer is changing (destruction) strongly suggesting that cell death is occurring in the wells treated with the plant extract (compare Figure 3a and Fig. 3b). The cytotoxic effect of *C. procera* root barks aqueous extract on the morphology of Neuro-2a cells after 48 hours of intoxication is illustrated in Figure 4. The aqueous extract of root bark of plant causes a mortality of Neuro-2a cells in wells at high concentration of extract (15 mg/mL) (Fig. 4b) as compared to the controls (Fig. 4a). It can be seen from Figure 4b that the cell layer is sparser when compared to the control cell layer in Figure 4a.

DNA fragmentation assay

To elucidate the mechanism of cells death, DNA fragmentation assay was performed on Caco-2 cells. As shown in Figure 5, treatment with higher concentrations of aqueous extract of roots barks of *Calotropis procera* (50 and 100 µg/mL) during 24 hours resulted in DNA smearing and not DNA laddering as it can be seen from apoptotic cells. Only DNA from cells treated with 10 µg/mL of the compound remained intact as in the controls (Figure 5 lane C and lane 1). Although mitochondria are affected by the toxic extract as shown with MTT assays, DNA continuous

smearing suggests that Caco-2 cell dies due to necrosis-like associated mechanism.

DISCUSSION

Cytotoxicity is seen primarily as the potential of a compound to induce cell death. The in vitro cytotoxicity assays are widely used for chemicals screening for predicting toxicity in animals or Human (Eisenbrand *et al.*, 2002). They allow a rapid assessment of the toxicity of a product and also the reduction of the use of animals for toxicity testing. Some differences in viability measurement can be found depending on the test agent used in cytotoxicity test (Weyermann *et al.*, 2005). Consequently, MTT and non-enzymatic Neutral Red assays were performed to evaluate cytotoxic effect of aqueous extract of root barks of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br on Caco-2 and Neuro-2a cell lines. The choice of Caco-2 cells was based on the fact that they has been extensively used for studies of intestinal absorption and toxicity of xenobiotics (Meunier *et al.*, 1995; Prueksaritanont *et al.*, 1996; Schmiedlin-Ren *et al.*, 1997). More closely, this cell line model allows the study of presystemic xenobiotic metabolism.

The choice of Neuro-2a was based on fact that they are mouse neural cell line that has been extensively used to study neuronal differentiation, signaling pathways and also neural toxic (Olmsted *et al.*, 1970).

The result obtained show that the aqueous extract of root barks of the plant are cytotoxic on Caco-2 and Neuro-2a cells both in MTT and Neutral Red cytotoxic test. The strongest cytotoxic effect of extract was observed on Caco-2 cells and results are rather similar in both methods. MTT and neutral red assay showing 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of 33 and 11 µg/mL respectively. For Neuro-2a cells, the aqueous extract of root barks of the plant exhibited lower cytotoxic effect with both methods. A significant growth inhibitory effect was obtained at extract concentrations higher than 1.5 mg/mL. MTT assay clearly show that aqueous extract causes cytotoxicity by altering the mitochondrial metabolism through succinate dehydrogenase activities whereas neutral red assay show alteration of cells membranes and transport of neutral red causing an apparent decrease in cell viability. These results are consistent and paralleled with the morphological change and cells erosion observed under inverted microscope and interpreted as cell death. Several authors have previously reported the cytotoxic effect of parts of *C. procera* on cells lines. The root extract of *C. procera* has been found to produce a strong cytotoxic effect on COLO 320 tumour cells (Smit *et al.*, 1995). More recently, Van Quaquebeke *et al.* (2005) have showed that hemi synthetic cardenolides derivates originally isolated from root barks of the plant had a strong in vitro cytotoxic effect on several human cancer cell lines (Van Quaquebeke *et al.*, 2005).

According to the standards of the National Cancer Institute (NCI), an extract is considered to have significant anticancer properties if IC_{50} value is less than 20 µg/mL (Cordell *et al.*, 1993). The IC_{50} obtained in our study on caco-2 cell using

MTT and Neutral red methods is 33 µg/mL and 11 µg/mL respectively meaning that the extract has potential anticancer properties. DNA fragmentation assay carried out with Caco-2 cell show DNA smearing reflecting a degradation of nuclear material indicating potential genotoxicity. Other authors have found that the root extracts of *C. procera* inhibit the proliferation of Hep G-2 cells via apoptotic and cell cycle disruption based mechanisms (Mathur *et al.*, 2009). It has been established that cardiotonic steroid glycosides (bufalin and digoxin, for instance) are capable to kill cancer cells through the activation of apoptotic pathways (McConkey *et al.*, 2000; Kurosawa *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2008). Caco-2 cells are deficient for both P53 gene copies, this mean that apoptosis in Hep-G2 is most likely due to P53 signaling after alteration of DNA molecules. But the results presented here suggest now that *C. procera* aqueous extract may also triggering cell death via a less safe route causing necrotic damage. Actually, the cytotoxic effect observed in our study is probably due to the presence of cardiotonic glycoside such as cardenolides whose presence in the plant has been reported by Van Quaquebeke *et al.* (2005). Thus, the mechanism of cells death could be apoptosis but it is necessary to clarify them by further study.

The overall results suggests that the active compounds of *C. procera* do not have much negative effect on the nervous system cells but the doses administered should be well adjusted in order to avoid adverse effects in the gastrointestinal tract. Thus patients under treatment FACA® (phytomedicinal drug taken by oral route) must respect doses prescribed to prevent the occurrence of adverse side effects.

CONCLUSION

The cytotoxicity study of the aqueous extract of root barks of *C. procera* on Caco-2 and Neuro-2a cell lines showed that the extract has a potential cytotoxic effect on human colorectal carcinoma Caco-2 cells and much less on Neuro-2a cells, originating from mouse neuroblastoma. However, further studies are required to elucidate the mechanism of cytotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the “Service de Coopération et d'Action Culturelle” (SCAC) of the France Embassy, Burkina Faso for the financial support through the FSP Network Project.

REFERENCES

Akhir NM, Chua LS, Majid FAA, Sarmidi MR. Cytotoxicity of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Ficus deltoidea* on Human Ovarian Carcinoma Cell Line. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 2011; 1(4): 397-409.

Berridge MV, Paties MH, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 2005; 11:127-152.

Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined invitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 1985; 24:119-124.

Choedon T, Mathan G, Arya S, Kumar VL, Kumar V. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a

transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2006; 12 (16): 2517-2522.

Cordell GA, Kinghorn AD, Pezzuto JM 1993. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In: Colegate SM and Molyneux RJ (Eds.): *Bioactive Natural Products*. Boca Raton, CRC Press, USA. 195-216.

Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. *Methods of in vitro toxicology*. Food and Chemical Toxicology, 2002; 40:193-236.

Guissou IP, Sawadogo M, Sawadogo A, Ouattara A. Etude de l'efficacité antidrepanocytaire de gelules FACA® chez les enfants en milieu hospitalier de Ouagadougou (chn-yo). *Pharm. Méd. trad. afro*, 1995; 29-36.

Higashimoto M, Purintrapiban J, Kataoka K, Kinouch T, Vinitketkumnuen U, Akimoto S, Matsumoto H, Ohnishi Y. Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand. *Mutation Research*, 1993; 303 (3):135-142.

Kouadio JH, Mobio TA, Baudrimont I, Moukha S, Danoc SD, Creppy EE. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 2005; 213: 56-65.

Kurosawa M, Tani Y, Nishimura S, Numazawa S, Yoshida T. Distinct PKC isozymes regulate bufalin-induced differentiation and apoptosis in human monocytic cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001; 280: 459-464.

Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wana ZX, Hertzog PJ. Validation of the MTT test dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assay. *Biochem. Int.*, 1992; 27(3): 501-510.

Mathur R, Gupta KS, Mathur SR, Velpandian T. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2009; 47: 343-348.

McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, New- Man RA. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 2000; 60: 3807-3812.

Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol*, 1995;11: 187-194.

Nacoulma OG. 1996. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. PhD Thesis, Biochemistry- Microbiology Department, University of Ouagadougou.

Nikiema JB, Ouattara B, Semde R, Djierro K, Compaore M., Guissou IP, Kasilo OMJ. Promotion de la Médecine Traditionnelle du Burkina Faso: Essai de développement d'un médicament antidrepanocytaire, le FACA. *African Health Monitor*, 2010; 13 (Special Issue): 52-57.

Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J. Isolation of Microtubule Protein from Cultured Mouse Neuroblastoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1970; 65(1): 129-136.

Organisation Mondiale de la Santé, 2002. Médecine traditionnelle : Rapport du secrétariat. Conseil exécutif. Cent onzième session. *Point 5.7 de l'ordre du jour provisoire. EB111/9 du 12 décembre 2002*.

Plewa MJ, Wagner ED. Activation of promutagens by green plants. *Annual Review of Genetics*, 1993; 27: 93-113.

Prueksaritanont T, Gorham L, Hochman J, Tran L, Vyas K. Comparative studies of drug-metabolizing enzyme in dog, monkey, and human small intestine, and in Caco-2 cells. *DrugMetab. Dispos*, 1996; 24: 634-642.

Schimmer O, Kruger A, Paulini H, Haefele F. An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. *Pharmazie*, 1994; 49 (6): 448-451.

Schmiedlin-Ren P, Thummel K, Fisher J, Paine M, Lown K, Watkins P. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells

grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol. Pharmacol*, 1997; 51: 741-754.

Smit HF, Woerdenbag HJ, Singh RH, Meulenbeld GJ, Labadie, RP, Zwaving JH. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. *J Ethnopharmacol*, 1995; 47:75-84.

Van Quaquebeke E, Simon G, Andre A, Dewelle J, Yazidi ME, Bruyneel F, Tuti J, Nacoulma O, Guissou P, Decaestecker C, Braekman JC, Kiss R, Darro F. Identification of a novel cardénolides (2''-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure activity relationship analyses. *J Med Chem*, 2005; 48:849-856.

Verma R, Satsangi GP, Shrivastava JN. Ethno-medicinal profile of different plant parts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Ethnobotanical Leaflets*, 2010; 14: 721-42.

Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharmaceut*, 2005; 288: 369-376.

Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, Rey S, Hammers H, Chang D, Pili R, Dang CV, Liu JO, Semenza GL. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105:19579–19586.

Zink T, Chaffin J. Herbal health products: what family physicians need to know. *American Family Physician*, 1998; 58 (5): 1133–1140.

How to cite this article:

Geoffroy G. Ouedraogo, Serge Moukha; Théophile A. Mobio, Moustapha Ouedraogo, Pierre I. Guissou and Edmond E. Creppy., Cytotoxicity assessment of aqueous extract from root barks of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. in human intestinal Caco-2 and mouse neuroblastoma Neuro-2a cell lines. *J App Pharm Sci*, 2014; 4 (04): 001-007.