REPUBLIQUE DU BENIN

FACULTE DES LETTRES, ARTS ET SCIENCES HUMAINES

ECOLE DOCTORALE PLURIDISCIPLINAIRE ESPACE CULTURES ET DEVELOPPEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

LABORATOIRE DE BIOMENBRANE ET SGNALISATION CELLULAIRE

Année : 2013-2014

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie
Spécialité : Biochimie /Physiologie/Pharmacologie

Présentée par :

AGOSSOU Adjoavi Essé

ACTION DE *KHAYA SENEGALENSIS* (MELIACEAE) SUR LE METABOLISME GENERAL. CAS DU DIABETE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT UNIQUE DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY CALAVI

Soutenue publiquement le : 02 Avril 2015
Devant le Jury composé de :

Président : Prof Lamine BABA-MOUSSA	Professeur titulaire	Université d'Abomey Calavi
Rapporteur : Dr Aly SAVADOGO	Maître de Conférences	Université de Ouagadougou
Rapporteur : Dr tchadjobo TCHACONDO	Maître de Conférences	Université de Lomé
Examinateur : Prof Joachim GBENOU	Professeur titulaire	Université d'Abomey Calavi
Directeur de thèse : Prof Alphonse SEZAN	Professeur titulaire	Université d'Abomey Calavi

Pendant cinq jours, on cherchera l'or dans les racines, sans rien trouver. Le jour suivant, enfin l'or apparaitra. On le divisera en deux, une moitié pour les hommes et l'autre pour le Seigneur notre Dieu….

DEDICACES

A mon Epoux et à ma fille chérie Haniya

A mes parents

A ma famille et à ma belle famille

Pour votre amour, votre patience et votre soutien.

REMERCIEMENTS

Au Prof. Alphonse SEZAN, Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'université d'Abomey Calavi (Benin), Directeur du Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Directeur de cette thèse de Doctorat:

Je tiens vivement à exprimer ici toute ma reconnaissance à mon Directeur de thèse qui n'a ménagé aucun effort pour l'aboutissement de ce travail de par la qualité de son encadrement et sa rigueur scientifique. La prouesse de faire sortir le meilleur de moi-même du point de vue scientifique et par le partage de vos connaissances nous ont mené à ce jour. Je vous remercie pour votre grande disponibilité et vos conseils tout le long de mon parcours.

Au Prof. Lamine Saïd BABA-MOUSSA, Professeur Titulaire en Biochimie et Biologie Moléculaire à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'université d'Abomey Calavi (Benin), Directeur du Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie : Pour votre disponibilité, pour vos conseils et encouragements précieux depuis mes années de formation en Master.

Merci Professeur d'avoir suivi ce travail et de siéger en tant que Président du Jury de soutenance. Nous en sommes honorés.

Au Dr Aly SAVADOGO, Maître de conférences en Biochimie-microbiologie, Université Ouagadougou, UFR-SVT, Département de Biochimie-microbiologie, CRSBAN: Malgré vos multiples occupations, vous avez su trouver le temps nécessaire pour évaluer cette thèse en tant que rapporteur et faire partie des membres du jury de soutenance. Soyez en remercier

Au Dr Tchadjobo TCHACONDO, Maître de Conférences en toxicologie/Chronobiologie à l'école Supérieur des Techniques Biologiques et Alimentaires de l'Université de Lomé (ESTBA/UL): troucez ici l'expression de nos sincères remerciements pour le temps et la peine consacrés au rapport de cette thèse. C'est un honneur pour nous de vous compter parmi les membres de notre jury.

Au Prof Joachim GBENOU, Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'université d'Abomey Calavi (Benin), Directeur du Laboratoire de pharmacognosie et huiles essentielles: vous et toute l'equipe de votre laboratoire avez toujours été d'une aide précieuse dans la réalisation de nos différents travaux de recherche. Merci d'avoir suivi ce travail et de sieger dans ce jury. Nous en sommes honorés

Au laboratoire de Laboratoire de Biomembranes et Signalisation cellulaire, où règne une bonne ambiance. Je remercie Dr YESSOUFOU Ganiou, Dr AHOKPE A. Mélanie, Dr ATTAKPA Eugène, Dr BEHANZIN Justin, Dr TAKIN Marcellin, ASSOU K.S. Eudoxie, AKOTEGNON Rodrigue, ZOUHOUN loica, AIVODJI Natacha, WOUETOLA A. Ermence

A tous mes amis et collègues du Laboratoire de Biologie et de typage moléculaire en microbiologie. Haziz SINA, Pacôme NOUMAVO, Wassiyath MOUSSE, Christine N'TCHA, Durand DAH NOUVLESSOUNON, Oscar DIDAGBE, Kamirou CHABI, Chimène NANOUKON, Nadège AGBODJANTO

A toutes et ceux qui ont été là pour faire souffler le vent du courage, de la persévérance, de l'abnégation, de la rigueur. Votre soutien a été indispensable pour affronter le très difficile monde de la recherche.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES i
REMERCIEMENTS ii
TABLE DES MATIERES iv
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS vii
LISTE DES FIGURES x
LISTES DE TABLEAUX xiii
INTRODUCTION 1
PREMIERE PARTIE:REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4
I. Histoire des plantes médicinales 5
II.KHAYA SENEGALENSIS 8
II.1.Historique des plantations de *Khaya senegalensis* au Bénin 8
II.2.LA PLANTE : Khaya senegalensis 9
II.2.1.Position systématique 9
II.2.2.Distribution géographique 9
II.2.3.Botanique 10
II.2.4.Principales espèces 12
II.2.5Phytochimie et activité pharmacologique de *Khaya senegalensis* 13
II.2.6.Utilisation (emplois en médecine traditionnelle) 15
III.*Cinnamomum zeylanicum* Blume, 1826, *Cinnamomum verum* J.Presl, 1825 19
III.1.Histoire de la Cinnamomum zeylanicum 19
III.2.La plante: *cinnamomun zeylanicum* 19
III.2.1.Position systématique 19
III.2.2.Distribution géographique 20
III.2.3.Botanique 20
III.2.4.Principales espèce: quelques autres espèces à travers le monde 21
III.2.5.Phytochimie et activité pharmacologie 22
III.2.6.Utilisation 23
IV.Quelques généralités sur la régulation glycémie et les organes impliqués 25
IV.1.Régulation physiologique de la glycémie 25
IV.2.Régulation moléculaire du transport de glucose 26
IV.3.Les principaux organes impliqués 28

IV.3.1.Le rein.....28
IV.3.1.1.Anatomie macroscopique 28
IV.3.1.2.Structure microscopique 29
IV.3.1.2.1.Le nephron.....29
IV.3.1.2.2.L'interstitium rénal 30
IV.3.1.3.Fonction du rein 31
IV.3.1.4.Manifestations toxiques 31
IV.3.2.Le foie 32
IV.3.2.1.Anatomie macroscopique 32
IV.3.2.2.Structure microscopique 33
IV.3.2.3.Fonction..... 35
IV.4.Régulation du métabolisme énergétique et rôle de l'hépatocyte 36
IV.5.Quelques marqueurs de l'évaluation..... 36
IV.5.1.Quelques marqueurs de l'évaluation de la fonction rénale..... 36
IV.5.2.Quelques marqueurs de l'évaluation de la fonction hépatique..... 36
IV.5.3.Quelques marqueurs du risque athéromateux..... 37
IV.5.4.Indicateurs de l'équilibre glycémique...... 37
DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES 38
I-MATERIEL 39
I-1 Matériel végétal 39
I-2 Matériel biologique..... 39
II-Préparation des extraits totaux 39
II-1 Screening phytochimiques 40
II-2 Recherche des alcaloïdes..... 40
II-3 Recherche des composés polyphénoliques..... 40
II-4 Recherche des dérivés quinoniques..... 42
II-5 Recherche des saponosides 42
II-6 Recherche de triterpénoïdes et de stéroïdes y compris les cardénolides 43
II-7 Recherche de dérivés cyanogéniques 44
II-8 Recherche des mucilages..... 44
II-9 Recherche de coumarines..... 44
II-10 Recherche des composés réducteurs 44
II-11 Recherche des dérivés anthracéniques 45
II-3-Dosage des paramètres biochimiques 47

II-3-1 Dosage du glucose 47
II-3-2 Dosage des triglycérides 49
II-3-3 Dosage du cholestérol -total, HDL, LDL 50
II-3-4 Les protéines totales 51
II-3-5 Dosage des transaminases 52
II-4- Histologie 54
TROISIEME PARTIE 61
RESULTATS ET DISCUSSIONS 61
I- RESULTATS 62
I-1 Résultats du screening phytochimique 62
I-2 Doses de 0 mg/kg --10 mg/kg-- 25 mg/kg --50 mg/kg de poids corporelle sous l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* 63
I-3 Histologie au doses de 0 mg/kg --10 mg/kg-- 25 mg/kg --50 mg/kg de poids corporelle sous l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* 72
I-4 Doses 0 mg/kg --0,5 mg/kg - 1 mg/kg - 2,5 mg/kg - 5 mg/kg de poids corporelle sous l'extrait éthylique de Khaya senegalensis 77
I-5 Histologies aux doses de 0 0,5 1 2,5 5 mg/kg de poids de khaya 81
I-6 Doses de 0 mg/kg 25 mg/kg 50 mg/kg 75 mg/kg 100 mg/kg de poids corporelle 90
DISCUSSION 99
L'étude chimique : Screening phytochimique 99
Étude pharmacologique 99
CONCLUSION 106
REFERENCES 166

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

Qsq : Quantité suffisante pour

Nm : Nanomètre

% : Pourcentage

°C : Celsius

L : Litre

G : Gramme

Mg : Milligramme

Na Cl : Chlorure de Sodium

MS : Matière Sèche

MG : Matière Grasse

Lys : Lysine

Met : Méthionine

Ca : Calcium

P : Phosphore

Na : Sodium

Kcal: Kilocalorie

Kg: Kilogramme

GOD: Glucose Oxydase

GPO: Glycérine-3-Phosphate-Oxydase

CO: Cholestérol Oxydase

C.z.: *Cinnamomum zeylanicum*

K: Potassium

Zn: Zinc

Mg Magnesium

Fe: Fer

Cu: Cuivre

g/l: Gramme par litre

ha: hectare

CE: Cholestérol Estérase

POD: Péroxydase

PAP : 4-amino-antipyrine

UAC : Université d'Abomey-Calavi

ASAT: Aspartame Amino Transférase

ALAT: Alanine Amino Transferase

GAMMA GT: Glutamyl Transferase

K.s.: Khaya senegalensis

P: pourcentage

PC: poids corporelle

NAD+:Nicotinamide adénine dinucléotide

Abs: Abssorbance

G6PD: Glucose 6 phosphate déshydrogenase

ATP: Adnosine triphosphate

GTP: Guanosine triphosphate

VT: valeur témoin

VE: valeur de la dose d'extrait

GK: Glycérol kinase

ADP: Adenosine Diphosphate

GPO: Glycerol 3 phosphate oxydase

PAP: 4-amino antipyrine

DAP:

POD: peroxydase

H_2O_2:

CCM: Chromatographie sur couche mince

UV: Ultra violet

CHCl3:

HCl:

FeCl3:

FAST: Faculté de sciences et techniques

H_2O: Eau

HDL: high density lipoproteine

LDL: Low density lipoproteine

GLUT 4: glucose transporteur 4

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Arbre *Khaya senegalensis* (AGOSSOU E.2014) 9
Figure 2: Distribution géographique de *khaya senegalensis* (Michel Arbonnier CIRAD 2005)9
Figure 3: Arbre (A), Tronc (B) et Feuilles (C) de *Khaya senegalensis (*Meliaceae) 11
Figure 4: Arbre de *Cinnamomum zeylanicum* 19
Figure 5: Feuilles de Cinnamomum zeylanicum 20
Figure 6: Régulation de la glycémie 26
Figure 7: Anatomie interne d'un rein humain. (a)photographie de coupe frontale du rein, (b) schéma d'un rein en coupe frontale (Marieb, 1999) 29
Figure 8: Anatomie détaillée des néphrons et leurs vaisseaux sanguins (Marieb 2007)..... 30
Figure 9: Anatomie macroscopique du foie (Marieb ,2007) 32
Figure 10 : Anatomie microscopique du foie (Marieb, 1999)..... 34
Figure: 11 : Etape de la fixation Immersion dans le formol..... 55
Figure 12 : les tissus dans des cassettes tissue-tek III 55
Figure 13 : différentes étapes de la circulation 56
Figure 14: Enrobage et coupe au microtome 57
Figure 15 : Le microtome..... 58
Figure 16: Confection de rubans grâce au Microtome..... 58
Figure 17: courbe montrant la variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en fonction du temps..... 63
Figure 18: courbe montrant la variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en 24h..... 64
Figure 19: courbe montrant la variation de la triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en fonction du temps..... 65
Figure 20: courbe montrant la variation de la triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en 24H..... 65
Figure 21: courbe montrant la variation de la cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de *K.s.* en fonction du temps 66
Figure 22: courbe montrant la variation de la Cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de *K.s.* en 24H 67
Figure 23: Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* sur la glycémie des lapins en hyperglycémie temporaire..... 69
Figure 24: Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* sur la triglycéridémie des lapins en hyperglycémie temporaire..... 70
Figure 25: Courbe montrant l'influence de l'administration de l'extrait alcoolique de *Khaya senegalensis* sur la cholestérolémie des lapins en hyperglycémie temporaire..... 71
Figure 26 : Coupe de foie d'un lapin sans traitement (témoin 0 mg de K.s/Kg de PC) La veine centrolobulaire (flèche non pleine) et les travées hépatiques (flèches) ont un aspect normal. Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)..... 72
Figure 27: Coupe de foie d'un lapin sans traitement. Les travées hépatiques (T) et les sinusoïdes veineux (S) sont normaux. Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200)..... 72
Figure 28: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu Figure 29 Coupe de foie d'un lapin..... 72
Figure 30: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de K.S/Kg de PC 73

Figure 31: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC 73
Figure 32 Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC 73
Figure 33: Coupe de rein d'un lapin sans traitement montrant un glomérule normal flèche pleine) et des tubules normaux (têtes de flèches). Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 400)..... 74
Figure 34 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de K.S/Kg de PC 74
Figure 35 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de K.S/Kg de PC 75
Figure 36: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC 75
Figure 37: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC Montrant un glomérule rénal en voie de destruction (flèche) Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)..... 75
Figure 38:Quelques paramètres biochimiques sur les lapins. 77
Figure 39: Concentration de l'ALAT chez les lapins..... 78
Figure 40: variation de l'activité de l'ALAT 78
Figure 41: Concentration de K.s. en fonction du temps..... 79
Figure 42: variation de la concentration d'asat en fonction du temps 80
Figure 43: concentration de gamma GT en fonction du temps 80
Figure 44: **Coupe de foie d'un lapin sans traitement**. La **veine centrolobulaire** (flèche non pleine) et les travées hépatiques (flèches) ont un aspect normal. *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)* Les travées hépatiques (T) et les sinusoïdes veineux (S) sont normaux. ***Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200)*** 81
Figure 45 : Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 5 mg de K.s. 81
Figure 46 : Coupe de rein d'un lapin sans traitement montrant un glomérule normal flèche pleine) et des tubules normaux (têtes de flèches). *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200)*..... 82
Figure 47 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de5 mg de K.s Les glomérules rénaux désignés en (a) sont normaux. *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)*..... 82
Figure 48: Variation du glucose en fonction de temps aux doses de 1 et 5 mg/kg de PC de *K.s.* 83
Figure 49: Variation des Triglycérides en fonction du temps aux doses 1 et 5 mg/kg de PC de K.s. 84
Figure 50: variation du Cholestérol en fonction du temps aux doses de 1 et 5 mg/kg de PC de K.S..... 85
Figure 51: Paramètres biochimiques après 15 jours..... 86
Figure 52: activités de la G6PDH hépatique et rénale 87
Figure 53: uremie 88
Figure 54: Courbe montrant la variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de K.s..... 91
Figure 55: Courbe de variation de la triglycérédemie sous l'influence des différentes doses de K.s 92
Figure 56: Courbe montrant la variation d'ASAT sous l'influence des différentes doses de K.s 93
Figure 57: Courbe montrant la variation d'ALAT sous l'influence des différentes doses de K.s 94

Figure 58: Courbe montrant la variation de la cholestérolémie totale sous l'influence des différentes doses de K.s 95
Figure 59: Courbe montrant la variation du poids corporel sous l'influence de *K. senegalensis* et *C. zeylanicum* 96
Figure 60: Courbe de la variation des valeurs d'ALAT sous l'influence de K. senegalensis et C. zeylanicum en fonction du temps 97
Figure 61: Courbe montrant la variation d'ASAT sous l'influence de K. senegalensis et de C. zeylanicum en fonction du temps 98

LISTES DE TABLEAUX

Tableau 1: Différentes appellations de *Khaya senegalensis* 12
Tableau 2: Principaux constituants de *khaya senegalensis* (Adesogan 1968) 14
Tableau 3: Transport facilité de glucose chez les mammifères (Ducluzeau et coll., 2002). 27
Tableau 4: Procédure de dosage du glucose..... 48
Tableau 5: Procédure de dosage des triglycérides 50
Tableau 6: Procédure de dosage du cholestérol 50
Tableau 7: Procédure de dosage Alanine amino transférase ALAT 52
Tableau 8: Procédure de dosage de Aspartame Amino Transférase (ASAT)..... 53
Tableau 9: Procédure de dosage de Gamma glutamyl transférase (GAMMAT GT)..... 54
Tableau 10: Résultats du screening phytochimique..... 62
Tableau 11: Les paramètres biochimiques des différents groupes. 89
Tableau 12: Activité de la G6PDH dans le foie et le rein 90

LISTES DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Agossou Essé**, Ahokpe Mélanie, Behanzin Justin,Takin Marcellin, ,Yessoufou Ganiou, Zohoun Loica, Baba-moussa Lamine, Sezan Alphonse. Effect of the ethanolic extract of Khaya senegalensis on some biochemical parameters in rabbit's glucose overload condition. **American Journal of Plant Sciences, 2015, 6, 240-248** Published Online January 2015 in SciRes. http://www.scirp.org/journal/ajps, http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.61027

- Takin M, Ahokpe M, Zohoun L, Assou E, Aïvodji N, **Agossou E**,Sezan A. Effect of total khaya senegalensis (meliaceae) barks extracts on hepatic liberation of glucose.National journal of physiology, pharmacy and pharmacology (2014);vol 4 issue2 ;112-117 . doi: 10.5455/njppp.2014.4.290920133

- **Agossou Essé**, Behanzin Justin, Assou E, Gbenou Joachim, Sezan Alphonse. Khaya senegalensis action on liver and kidney of rabbits. Role of glucose 6 phosphate deshydrogenase. Physiology and pharmacology (soumis pour publication)

- Assou K. Eudoxie, Behanzin Justin, Ahokpe Mélanie, Wouetola Ermence, **Agossou A. Essé**, Sezan Alphonse. Action of ethyl extracts of khaya senegalensis on Rat Hepatocytes. Evaluation of toxicity. American Journal of pharmtech Research. December 2014 Issue 6

PUBLICATION HORS THESE

Natacha AIVODJI, Eudoxie ASSOU, **Essé A. AGOSSOU**, Alphonse SEZAN. Global Journal for Research Analysis. Annona muricata recuced proliferation caused by cycas revoluta in Wistar rats. (soumis et accepté décembre 2014)

SEZAN A., GANGBO F., SENOU M., AHOKPE M., **AGOSSOU E**., AKPONA S.. Perturbations thyroïdiennes dans la région à risque de tanguiéta. Journal de la Société de Biologie Clinique, 2009 ; N°013 ; 5-11

SEZAN A., AHOKPE M., **AGOSSOU E**., AKPONA S. 2009. - β-adrenoceptor stimulation regulates intracellular pH(i) via inhibition of Na^+/H^+ exchanger in rat parotid cells. Revue CAMES (Sciences et Médecine) – série A, Vol. 09, 7-10.

SEZAN Alphonse, GANGBO Flore, AHOKPE Mélanie, **AGOSSOU A. Essé,** AKPONA Simon. 2009. - Implication des goitrigènes d'origine alimentaire dans le fonctionnement de la glande thyroïde: cas du manioc dans la production du H_2O_2 J. Sci. Uni. Lomé Série A 11(&): 11-15

YESSOUFOU G., **AGOSSOU A.E.,** BABAMOUSSA F., BABAMOUSSA L., SEZAN A. 2012. Etude de la prévalence des perturbations thyroïdiennes néonatales au Benin. Mali médical tome XXVII N°2 ; 16-20.

RESUME

L'utilsation sans cesse croissante des plantes et la recherche des principes actifs de ces dernières ouvre un très large champ à la recherche surtout en Afrique avec l'énorme potentialité de sa flore. La connaissance des mécanismes d' actions dans le contrôle de la glycémie et de insulino résistance ainsi que les principes actifs est d'enjeu majeur et mondial pour la santé publique.

L'objectif, de notre travail est de vérifier l'activité de l'extrait éthanolique de *Khaya senegalensis* sur le contrôle de la glycémie et une éventuelle toxicité. Pour cela, nous avons évalué l'activité hypoglycémiante de cet extrait, l'effet sur l'activité hépatique et rénale d'une enzyme la G6PDH. L' atteinte de l'integrité du foie et du rein ont fait l'objet de cette étude afin de suggerer une possible toxicité . Les résultats bruts sont traités par le logiciel Minitab1.4. L'effet de l'extrait sur les paramètres appréciés à travers l'analyse de variance (One-way ANOVA) suivi des t-test de comparaison de deux échantillons indépendants. Les résultats sont exprimés en Moyenne ± Ecart-type.

Les résultats montrent d'une part que l'extrait présente une activité hypoglycémiante d'autre part une possible toxicité.

La dose à administrer et la durée du traitement sont des notions à prendre sérieusement en compte. Ainsi, la dose 1mg a fait diminué la triglycéridémie ($p<0.05$) alors que la cholestérolémie s'élève significativement sous la dose 5mg ($p<0.05$). Les deux doses font élever significativement l'urémie ($p<0.05$). L'exploration de l'activité de la G6PDH montre une diminution de son activité dans le rein sous le traitement à 5mg ($p<0.05$). Dans le foie, son activité est également diminuée de façon significative sous l'effet des doses 1mg et 5mg. Aux fortes doses nous avons eu les pertubations sur le plan biochimique et hépatique sont énormes.

Ces résultats montrent une activité de l'extrait éthanolique de *Khaya senegalensis* qui dépend des doses administrées avec un risque d'atteinte rénale et hépatique qui se justifie par les résultats obtenus pour l'urémie et l'activité de la G6PDH et celui des transaminases.

Mots clés : *Khaya senegalensis, Diabète, Toxicité, Transaminases*

ABSTRACT

The ever-increasing use of plants and research of the active ingredients of the latter opens a wide field for research especially in Africa with enormous potential flora. Knowledge of the mechanisms of action in the control of blood sugar and insulin resistance as well as active ingredients and is a major global issue for public health.

The objective of our work is to verify the activity of the ethanol extract of Khaya senegalensis on glycemic control and possible toxicity. For this, we evaluated the hypoglycemic activity of this extract, the effect on the liver and kidney activity of an enzyme G6PDH. The achievement of the liver and kidney integrity were the subject of this study to suggest a possible toxicity. The raw results are processed by the Minitab1.4 software. The effect of the extract on the preferred settings through the analysis of variance (One-way ANOVA) followed comparison t-test of two independent samples. The results are expressed as mean ± standard deviation.

The results show both that the extract has hypoglycemic activity of other possible toxicity.

The dose and duration of treatment are concepts to take seriously. Thus, the 1mg dose was decreased triglycerides ($p < 0.05$), whereas cholesterol rises significantly in the 5mg dose ($p < 0.05$). Both doses are significantly raise blood urea ($p < 0.05$). The exploration of the activity of G6PDH shows a decrease in its activity in the kidney under treatment 5mg ($p < 0.05$). In the liver, its activity is also decreased significantly as a result of 1mg and 5mg doses. At high doses we had the disturbances on the biochemical and hepatic plan are enormous

These results show an activity of the ethanol extract of Khaya senegalensis dependent doses administered at risk of kidney and liver damage which is justified by the results obtained for uremia and activity of G6PDH and the transaminases.

Keywords: Khaya senegalensis, Diabetes, toxicity, transaminases

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Dans les années 1930 à commencer les premiers essais de plantations de *Khaya senegalensis* au Bénin (Toffo, Atchérigbé, Kandi, Kouandé, Tanguiéta). Cet arbre a été aussi beaucoup utilisé pour orner les bordures de route. Il s'avère qu'il possède de nombreuses propriétés médicinales ce qui lui vaut très souvent de subir des dommages de nos jours (les écorces sont enlevées)

Khaya senegalensis appartient à la famille des Meliaceae et est communément connu sous le nom de Caïlcédrat ou acajou de Sénégal. En Afrique de l'ouest il se reproduit naturellement dans les forêts galeries, mais on le trouve le plus souvent comme arbre d'ombrage dans les vieilles rues coloniales des villes africaines. Cette espèce a de nos jours un statut d'espèce vulnérable selon l'union internationale pour la conservation de la nature (l'UICN) dont La mission est d'influencer, d'encourager et d'assister les sociétés du monde entier, dans la conservation de l'intégrité et de la diversité de la nature, ainsi que, de s'assurer que l'utilisation des ressources naturelles est faite de façon équitable et durable.

Ces actions thérapeutiques n'ont pas été vérifiées. La **branchette** est utilisé comme cure-dent (car stimule la salivation), la **racine** est utilisée contre les diarrhées (sève également), les maux de tête, en prévention de la méningite **feuille** soigne les aménorrhées (Remarque :pas de preuve scientifique). En particulier, l'écorce est utilisée contre de nombreuses maladies : la blennorragie, la constipation, les démangeaisons, la fièvre, les plaies, les maux de dents, le paludisme, les ulcères phagédénique, les vers et à une action tonifiante. Parmi les plus importantes les proprites de l'**écorce** (en décoction ou en macération) on retrouve : action abortive, anti dysentérique, antisyphilique, fébrifuge, tonique et hypoglycémiante. C'est cette dernière propriétés qui sera l'objet de nos investigations.

Les troubles de régulation de la glycémie sont un problème de santé public très répandu à travers le monde. L'une de ces manifestations est le diabète. Cette maladie est l'une des premières causes de mortalité et de morbidité dans la plupart des pays occidentaux et son incidence devient aussi importante dans les pays en développement.

Le diabète, en particulier le diabète de type II, s'associe fréquemment à d'autres anomalies métaboliques et hémodynamiques. Plusieurs études expérimentales et cliniques montrent que l'obésité semble être la cause principale de la résistance à l'insuline qui à son tour joue un rôle

pathogénique majeur dans le développement du diabète de type II. (Luyckx, 1997) Le traitement moderne du diabète fait appel à plusieurs familles d'hypoglycémiants oraux comme les biguanides et les thiazolidinediones qui agissent sur l'insulino-résistance et les sulfamides et les glitinides qui agissent en stimulant l'insulino-sécrétion. Cependant aucun des médicaments utilisé pour le traitement du diabète n'agit simultanément sur les deux facteurs pathogéniques du diabète ou améliore aussi les anomalies du métabolisme lipidique associées le plus souvent au diabète de type II.

Dans la médecine traditionnelle sur l'utilisation et les vertus de nos plantes va jusqu'à la combinaison de plusieurs plantes dans le but d'obtenir des remèdes plus efficaces. Les études plus poussées et la recherche de preuves scientifique sur les plantes déja utilisées permettra aborder des approches thérapeutiques beaucoup plus sérieuses sur ce principe.

Ce travail s'inscrit dans un vaste projet ; celui de la détermination des mécanismes cellulaires qu'emprunte *Khaya senegalensis* afin de régulariser la glycémie. Notre étude met l'accent l'effet de la dose sur différents paramètres biochimiques et les effets possibles sur le foie et le rein. Ceci ne constitue qu'une partie du travail entamé sur cette plante.

Nous déterminerons l'action de petites doses de l'extrait de *Khaya senegalensis,* de doses plus fortes et voir dans quel mesure le foie et le rein sont touchés par le dosage des transaminases. L'Anathomo pathologie nous permettra explorer les effets possibles sur le foie et le rein.

Il s'avère aussi que des combinaisons de plantes sont réalisées dans la préparation de remède à base de *Khaya senegalensis*. L'usage associe *Khaya senegalensis* à *Cinnamomum zeylanicum* pour diminuer les effets toxiques. Nous testerons aussi l'effet de l'association de *Khaya senegalensis* et *Cinnamomum zeylanicum* qui selon les traditpraticiens pourrait diminuer toxicité.

PREMIERE PARTIE:REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Histoire des plantes médicinales

La phytothérapie est une approche thérapeutique ancestrale qui remonte aux fonds des âges les plus reculés de l'histoire de l'humanité. Les plantes médicinales ont toujours été tenues en haute estime pour leurs propriétés actives sur la santé de l'être humain. En effet, pour combattre la maladie et apaiser la souffrance, l'homme devait puiser dans son milieu naturel.

Aux origines des temps, l'homme devait déjà comprendre la notion de la plante biologiquement active, comprenant aussi bien la plante qui guérit que la plante qui tue. Mais il devait aussi contrôler les quantités et la durée du traitement. Celui qui maîtrisait ce savoir, représentait le sorcier, le mage et le guérisseur. Il détient à la fois la science des poisons et la science des drogues, d'où leur «pouvoir surnaturel».

Le cumul des acquisitions thérapeutiques à travers les âges, continue à se développer et s'enrichir de jour en jour jusqu'à aujourd'hui. De nos jours, la confiance qu'on accordait aux plantes médicinales n'a pas disparue. Au contraire, celles-ci suscitent un vif regain d'intérêt et profitent des progrès technologiques les plus avancés; ceux-là mêmes développés en partie par l'industrie pharmaceutique moderne. Et c'est ainsi que les secrets les plus intimes se dévoilent de manière de plus en plus détaillée.

Les tablettes de signes cunéiformes, datant de l'époque Sumérienne (4000 ans avant JC) et découvertes en 1948, sont considérées par les historiens comme les premiers recueils des formules de "plantes médicinales". On y dénombre 250 plantes utilisées en suspension ou en tisanes. Parmi les civilisations antiques qui ont marqué le plus l'histoire de la phytothérapie, l'Égypte Pharaonique occupe sans doute la première place.

Les égyptiens ont constitué les premiers principes de l'utilisation des plantes médicinales ou "Pharmacopée" dont le nom dérive du mot égyptien "Farmaké" (qui guérit). La découverte des dessins de certaines plantes médicinales sur les temples, les sanctuaires et les pyramides des anciens égyptiens prouve tout l'intérêt que ceux-ci accordaient à ces drogues.

En Asie, et plus particulièrement en Chine, l'empereur "Chen-Nong", connu sous le nom de "laboureur" et qui a vécu vers 3000 ou 2500 ans avant JC, accorda beaucoup d'importance à l'agriculture. Il fut le premier à étudier la phytothérapie et à dégager de l'expérimentation certains effets thérapeutiques ou, au contraire nocifs des plantes. La médecine chinoise lui doit la découverte de 365 plantes dont l'opium, le cannabis, la cannelle, la noix de muscade et ainsi de suite, qu'il classa dans un répertoire médical où il fixa les grandes indications de ces plantes.

En Inde, les drogues végétales entraient dans la composition des formules magiques, moins destinées directement à soigner qu'à soumettre les forces occultes de la nature. Ce sont les Sumériens et les Égyptiens qui, forts d'une solide culture pharmacologique, enseignèrent aux Grecs et aux Étrusques la méthode permettant de distinguer les plantes dangereuses des plantes curatives, ainsi que l'art de préparer des infusions et des décoctions médicales.

À l'époque Romaine, du moins dans les premiers siècles, les experts en matière de botanique étaient toujours Grecs et ce n'est que plus tard que les Romains s'attachèrent à l'étude de la flore, et à l'élaboration des médicaments qu'ils en pouvaient obtenir.

Les arabes furent, eux aussi de grands connaisseurs de plantes. Ils avaient hérité, de la grande culture des perses, de solides préceptes médicaux, tout en se référant à Galien (131-201 après JC) pour l'essentiel de sa doctrine. Les écoles arabes de Bagdad et de Cordoue furent célèbres et c'est encore aux arabes que les Italiens de l'école de Salerne se sont dirigés, au 12ème siècle, pour retrouver des secrets qui avaient été perdus dans les temps barbares.

Depuis cette époque jusqu'à nos jours, les herbes, les baies, les racines et autres produits végétaux n'ont pas cessé d'être l'objet d'étude approfondies, si bien que chaque jour leurs vertus sont reconnues davantage, mieux comprises et plus utilement appliqués. (Confalonière, 1967)

KHAYA SENEGALENSIS

II. KHAYA SENEGALENSIS

II.1. Historique des plantations de *Khaya senegalensis* au Bénin

L'idée de promouvoir des essences locales a retenu l'attention de l'administration forestière coloniale. C'est ainsi qu'en 1935 l'installation des plantations de *Khaya senegalensis* a commencé au Bénin. Il s'agit essentiellement d'essais de plantations (Toffo, Atchérigbé, Kandi, Kouandé, Tanguiéta), de plantations d'école (Birni, Kouaba) et de plantations de bord de route. Différents disposifs de semis (en carré, en quinconce), différents écartements (20 x 20 m ; 10 x 10 m) et différentes combinaisons (pure, mélange *Khaya senegalensis*-Tectona grandis, Khaya senegalensis-Senna siamea) ont été testés. Cependant, pour diverses raisons, parmi lesquelles on peut citer l'attaque du foreur Hypsipila robusta et la lenteur de croissance, les premiers résultats ont été décevants (Moumouni, 1980). Avec le deuxième plan d'équipement, de 1953 à 1959, tous les efforts vont converger vers le teck, au détriment de multiples essences autochtones dont *Khaya senegalensis* (Service des eaux, forêts et chasse, 1959). Par manque d'entretien et de suivi, et pour des raisons d'urbanisation, plusieurs plantations de caïlcédrats ont ensuite disparu. C'est le cas des plantations de Guéné (environ 7 ha), réalisée entre 1935 et 1943, des plantations de bord de route de Cotonou (actuel boulevard Saint-Michel et avenue Mgr Steimez), d'Allada (route de Tori), de la route Dassa-Savalou, de l'ancienne route Tchatchou-Parakou (SOKPON et OUINSAVI 2001).

De nos jours *Khaya senegalensis* est essentiellement utilisée en médecine traditionnelle et les arbres sont mutilés afin de prélever les écorces.

II.2. LA PLANTE : Khaya senegalensis

II.2.1. Position systématique

Classification classique

Règne: Plantae

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Sapindale

Famille: Meliaceae

Genre: Khaya A. Juss, 1830



Figure 1: Arbre *Khaya senegalensis* (AGOSSOU E.2014)

II.2.2. Distribution géographique

Espèce des régions soudano-zambéziennes et sahéliennes, le *Khaya senegalensis* se trouve le long d'une bande sensiblement parallèle à l'équateur et s'étendant de l'Océan Atlantique à l'Océan indien en traversant l'Afrique occidentale tropicale du Sénégal et de la Guinée Bissau au Tchad avec une pointe dans le Nord de l'Ouganda et le Sud du Soudan

Au Bénin, on le retrouve dans les galeries forestières, les forêts denses sèches, les forêts claires et dans les savanes soudaniennes. Il est aussi planté en bordure des routes et dans des îlots forestiers de reboisement

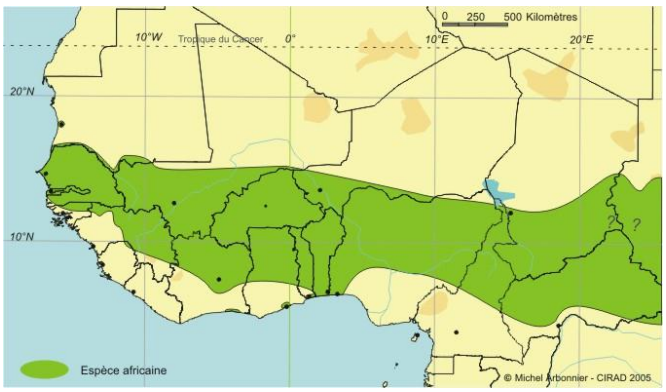


Figure 2: Distribution géographique de *khaya senegalensis* (Michel Arbonnier CIRAD 2005)

II.2.3. Botanique

La famille des Meliaceae qui comprend 50 genres et 1400 espèces, forme une importante famille botanique de distribution pantropicale (BANERJI, 1984 ; GUINKO et ColL 1995). Parmi les genres les plus importants on peut citer les genres Aglaia. Aphanamixis, Azadirachta, Carapa, Cedrela. Chukrasia, Dysoxylum. Entandrophragma, Guarea, Khaya, Mefia, Soymida, Swietenia, Trichilia, etc (BANERJI,1984).

La flore africaine en compte 18 genres et 47 espèces dont: *Khaya senegalensis*, *Pseudocedrela Kotschyi*, *Trichilia emetica*, *Azadirachta indica* (le neem) qui est une espèce introduite. Cette dernière espèce est originaire de l'Inde mais devenue subspontanée au Burkina Faso. Toutes ces quatre espèces sont utilisées dans la phannacopée traditionnelle. Khaya senegalensis et Azadirachta indica sont de grands arbres qui, par leurs feuilles sempervirentes, constituent des plantes d'ombrage et d'arbres d'avenues (GUINKO et Coll, 1995).

Les feuilles :

Elles sont glabres, paripennées, atteignant 20 à 25 cm de long avec 3 à 7 paires de folioles opposées ou alternes, elliptiques-oblongues ou oblongues, à sommet obtus ou obtusément acuminés. Les folioles ont 5 à 12 cm de longueur sur 4 à 6 cm de largeur et portent 8 à 10 paires de nervures latérales peu saillantes.

Inflorescences :

Les fleurs sont petites, environ 5 mm de long, blanches, peu apparentes, réunies en panicules de 15 à 20 cm de longueur, insérées au bout des rameaux avec les jeunes feuilles. Le calice vert, porte 4 à 5 sépales imbriqués et 4 à 5 pétales libres. La couronne est blanche, courtement lobée au sommet, avec 8 à 10 anthères sessiles, entièrement incluses, qui alternent avec les dents de la couronne. Son disque rouge ou orangé, porte un ovaire glabre à 4 loges multi-ovulées et un style terminé par un stigmate discoïde.

Les fruits :

La capsule ligneuse, est globalement de 4 à 6 cm de diamètre s'ouvrant en 4 valves. A maturité, elle est brunâtre. Elles sont insérées sur une columelle centrale de section quadrangulaire ou pentagonale et paraissent empilées. On peut compter 15 à 20 graines par pile sur chaque face de la columelle. La déhiscence se fait ordinairement sur l'arbre et les graines sont dispersées par le vent.

Stations (VON MAYDELL, 1983) Khaya senegalensis préfère les sols humides, profonds, les alluvions, le bord des cours d'eau et les bas-fonds non inondés. Il pousse aussi sur les stations très sèches ou superficielles ou latéritiques quand les précipitations suffisent (pluies réparties entre 650 à 1300 mm sur 4 à 7 mois).



Cliché de : AGOSSOU A. Essé. Devant l'amphi FAST/ uac

Figure 3: Arbre (A), Tronc (B) et Feuilles (C) de *Khaya senegalensis (*Meliaceae)

II.2.4. Principales espèces

Le genre Khaya comporte six espèces originaires d'Afrique (BANERJI, 1984).

Khaya anthotheca (Welw.) C. DC.
Khaya nyasica Stapf ex Baker, l'acajou Blanc
Khaya grandifoliola C. DC., l'acajou du Bénin
Khaya ivorensis A. Chev., l'acajou d'Afrique
Khaya madagascariensis Jum. & H. Perrier
Khaya senegalensis (Desr.) A. Juss., Syn. *Swietenia senegalensis* l'acajou du Sénégal ou Caïlcédrat.

Noms vulgaires

Le *Khaya senegalensis* est vulgairement appelé le Caïlcédrat en langue française.

Pays	Nom local	Langue	références
Sénégal	Hay	wolof	Ndiaye (2013)
Niger	madotchi	Haoussa	
	farrey	djerma	
Nigeria	aganwo	yoruba	
	Madaci	haoussa	Abubakar et al(2009)
	ono	igbo	
Cameroun	jala	bambara	
Togo	mahogen	éwé	
Burkina Faso	kuka	mossi	Daniel-Yves(2002)
Mali	Dala, deala	bambara	
Bénin	Zunzatin, agao	fon	
	Gano, tere	goun	
	Oganwo,ago	Nago, yoruba	Houehanou(2006)

Tableau 1: Différentes appellations de *Khaya senegalensis*

II.2.5. Phytochimie et activité pharmacologique de *Khaya senegalensis*

Les travaux effectués sur *Khaya senegalensis* révèlent la non existence d'alcaloïdes dans la plante (Kerharo et Adam, 1974), mais plusieurs auteurs signalent la présence des limonoïdes dans les fruits, les feuilles et les écorces (Olmo et al., 1996 et 1997 ; Khalid et al., 1998 ; Govindachari et Kumari, 1998).

Les limonoïdes sont des terpenoïdes très riches en oxygène et qui ont la même voie de synthèse que les quassinoides (Connolly, 1983). Ces limonoïdes de types phragmalines pour la plupart ont pour noms : les khayanolides A, B et D ; le khayalactol, le 1-O-acethylkhayanolide A, le 2-hydroxyseneganolide, le methylangolensate. Ces limonoïdes sont de puissants insecticides mais leur activité antiprotozoaire est modérée (Khalid et al., 1998 ; Nkatani et al., 2000 ; Abdelgaleil etal., 2003).

Plus récemment d'autres limonoïdes de la famille des mexicanolides, le seneganolide A, le 2-hydroxyseneganolide A et le 2-acetoxyseneganolide A ont été isolés des graines de K.senegalensis et leur propriété antifongique in vitro a été étudiée sur Botrytis cinerea (Abdelgaleil et al., 2004).

Les graines de K. senegalensis produisent également une huile dont le profil en acides gras est le suivant : 21,90 % d'acide palmitique ; 64,62 % d'acide oléique ; 10,41 % d'acide stéarique et 3,58 % pour les autres acides gras (Okieimen et Eromosele, 1999). Ces corps sont répartis comme suit (ADESOGAN et Coll. 1967; 1968)

Organe de la plante	Compositions	Références
Ecorse de tronc	7-Diacetyl-7-oxogedunine	**Adesogan 1968**
	Methyl-angolensate	
	Methyl-6-hydroxyangolensate	
	3-destigloyl-dioxy-3B, 12B-diacetoxyswietenine	
Cœur du bois	Mexicanolide	
	khayasine	
	3-deisobutyryl-3B tigloyl-oxy-khayasine;	
	3-deisobutyryl-313 benzoylo-oxykhayasine;	
	Methyl-angolensate;	
	7-diacetyl-7-oxogedunine 3-destigloyl-6-dioxy-3B	
	213-diacetoxyswietenine	
	senegalensate of methyl	
Graine	Khivorine;	
	3-diacetyl Khivorine	
	7-diacetyl-7-oxokhivorine 3,7-diacetyl-7-Oxokhivorine;	
	3-destigloyl-6-dioxy-swietenine	
	3-B-acetoxy-swietenine	
Racine	khayasine	
Ecorse de racine	Methyl-6 hydroxyangolensate	

Tableau 2: **Principaux constituants de *khaya senegalensis* (Adesogan 1968)**

K. senegalensis a fait l'objet de plusieurs screening pour la recherche de ses propriétés pharmacologiques *in vitro*.

Les résultats de ces travaux confirment en outre la non-existence d'alcaloïdes, mais la présence de nimbostérol dans les écorces et d'une huile dans les feuilles

Les extraits de graines sont dotés d'une importante activité antiplasmodiale par contre l'activité des écorces est modérée (El Tahir A. et al., 1999). Khalid et al. (1998) ne trouvent pas une activité antiprotozoaire signifiante sur *Leishmania donovani* mais Abreu et al. (1999). Par contre trouvent une bonne activité sur *L. Major*. L'administration d'extrait éthanoïque est suivie de la modification de certains paramètres biochimiques dans la rate de rat.

En effet, l'activité de la phosphatase alcaline et le taux de Na+ sérique se trouvent réduits tandis que le taux de K+ reste constant pour une administration prolongée alors que l'administration sur une courte durée augmente uniquement le taux d'urée sérique (Adebayo et al., 2003).

D'autres travaux effectués sur *K. senegalensis* ont révèle que la plante a des propriétés antibactériennes (Kone et al., 2004),.hypothermisantes (Lompo et al., 1995) et anti-inflammatoires (Thioune et al., 1999).

II.2.6. Utilisation (emplois en médecine traditionnelle)

Les principales indications retenues sont les suivantes:

-Fébrifuge et tonique

Selon BERHAUT (1979) d'une manière générale, la plante est décrite comme fébrifuge et tonique (MASCRE, 1965 ; RAGEAU, 1973; KERHARO, 1974). Dans ce cas l'écorce sous diverses formes (macération, décoction) est utilisée seule ou en senegalensis jouit d'une réputation inégalée de fébrifuge et de tonique capable de donner un coup de fouet aux individus fatigués. Il est couramment utilisé comme antipaludique d'où le nom de quinquina du Sénégal qu'on lui a donné quelque fois. VON MAYDELL (1993) signale que les graines et les feuilles sont utilisées contre la fièvre. KERHARO (1974) mentionne que la graine, très amère, aurait plus de principe fébrifuge que l'écorce.

-Troubles gastro-intestinaux

Les fleurs sont utilisées dans les désordres de l'estomac; de même, le décocté d'écorce en boisson est utilisé contre les maux de ventre (BERHAUT, 1979). Dans les gastralgies, la poudre d'écorce est associée aux aliments du malade. On peut lui faire sucer un fragment de tige également. Khaya senegalensis est utilisé comme laxatif (VON MAYDELL, 1983). Les écorces seraient douées de propriétés purgatives (KERHARO, 1974)

-Inflammations

Les extraits de racines sont utilisés contre les inflammations des• gencives (VONMAYDELL, 1983). La même indication est signalée dans la région bissa au Burkina Faso par GUINKO (1977) en ce qui concerne la décoction d'écorce de tige en gargarisme ou la poudre d'écorce de tige en frottement sur les gencives.

-Parasitoses intestinales

Selon MASCRE (1965) et RAGEAU (1973) l'écorce est employée comme antidysentérique. BERHAUT, (1979) indique quant à lui, les propriétés vermifuges de l'écorce. Les extraits de racines sont utilisés contre les vers solitaires (VON MAYDELL, 1983). Les écorces sont utilisées en médecine humaine et vétérinaire comme anthelminthique contre le ténia (OLIVER-BEVER, 1986). Cette indication contre les vers intestinaux est préconisée en Guinée Conakry pour le décocté des racines (KEITA et Coll., 1995).

-Antiseptique – antibiotique

Les fleurs sont utilisées pour le traitement des maladies vénériennes (BERHAUT, 1979), syphilis, Blennorragie (KERHARO, 1974). L'écorce est employée sous diverses formes (décocté, macéré) en usage interne et externe à la fois dans le traitement de la lèpre, la syphilis, la varicelle et dans ce cas les feuilles sont ajoutées aux différentes préparations (KERHARO, 1974). Les extraits de racines sont utilisés contre la jaunisse, pour la désinfection des plaies sanguinolentes (VON MAYDELL, 1983), ulcérées et la variole (BOUQUET et DEBRAY, 1974).

Le macéré d'écorces et de feuilles est utilisé dans le traitement de la sénescence (KERHARO, 1974). Les feuilles réduites en poudre et prisées sont utilisées contre les céphalées (ADJANOHOUN et Coll., 1985). Les extraits de racines sont utilisés contre les dermatoses (Institut de Recherche en Biologie et Ecologie Tropicale, 1983), la gale (BERHAUT, 1979), les piqûres de scorpion, les allergies (VON MAYDELL, 1983) et les feuilles sont utilisées contre les névralgies. Les racines sont prescrites contre la stérilité, les maladies mentales. *Khaya senegalensis* est signalé comme aphrodisiaque et utilisé également en magie (VON MAYDELL, 1983).

Cinnamomum zeylanicum, Blume

III.*Cinnamomum zeylanicum* Blume, 1826, *Cinnamomum verum* J.Presl, 1825

III.1. Histoire de la Cinnamomum zeylanicum

Originaire du Sri Lanka et du sud de l'Inde, la Cannelle de Ceylan (Cinnamomum zeylanicum) pousse dans les forêts tropicales de Ceylan, de l'Inde orientale, de Java, de Madagascar. Jusqu'à 500 mètres d'altitude. Elle est cultivée de manière intensive dans toutes les régions tropicales, notamment aux Philippines et aux Antilles. On la multiplie par bouturage et, tous les deux ans, à la saison des pluies, on taille les arbrisseaux au ras du sol. L'écorce est récoltée sur les nombreux rejets et mise à fermenter pendant 24 heures. L'écorce interne peut alors être séparée de l'écorce externe.

III.2. La plante: *cinnamomun zeylanicum*

III.2.1.Position systématique

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Magnoliidae

Ordre : Laurales

Famille : Lauraceae

Genre : Cinnamomum



Figure 4: Arbre de *Cinnamomum zeylanicum*

III.2.2.Distribution géographique

III.2.3.Botanique

Le Cannelier de Ceylan est aussi appelé « Arbre à cannelle », ou nommé par les anglophones « Cinnamon ». Son nom latin est: Cinnamomum zeylanicum Nees, synonymes Cinnamomum verum Presl., Cinnamomum aromaticum J.Grah. « L'Arbre à cannelle » est un arbre au tronc droit, à l'écorce d'un brun rougeâtre. Son port est arrondi et dense. Il possède un feuillage persistant, aromatique, vert brillant au revers plus clair et glauque. Les feuilles sont longues (15 cm) lisses, simples, coriaces, opposées, ovales à lancéolées, marquées de trois nervures plus claires. Les jeunes pousses sont rouge vifs.

Les fleurs sont blanches à jaune pâle et ont une odeur désagréable. Elles sont groupées en panicules terminales à l'aisselle des feuilles. La fleur est petite, tubulaire unisexuée à corolle évasée et à six lobes arrondis et duveteux.

Le fruit est une baie charnue enserrée dans une cupule rigide, pyriforme (1,5 – 2 cm), vert foncé virant à maturité au pourpre – rouge marron. Il n'est pourvu que d'une seule graine. La croissance du Cannelier de Ceylan est moyenne et l'arbre peut atteindre six à dix mètres de hauteur. Le sol sablonneux est son terrain de prédilection et le Cannelier nécessite de la chaleur, de l'humidité pour bien se développer et préfère les emplacements au soleil ou légèrement à l'ombre.

Dans les plantations, les arbres sont taillés tous les deux ans, les forcer à drageonner. Ces drageons sont démasclés. La partie interne de l'écorce est récupérée puis séchée, au séchage elle reprend une forme tubulaire. La récolte s'effectue durant la saison pluies en mai/juin et octobre/ novembre.



Figure 5: Feuilles de Cinnamomum zeylanicum

III.2.4.Principales espèce: quelques autres espèces à travers le monde

-*Cinnamomum aromaticum* Nees, synonyme de Nees ou Cannelier de Chine.

Est originaire de Chine et d'Asie du sud – est. Son écorce est nettement plus épaisse que celle du Cannelier de Ceylan, elle est plus riche en huile essentielle. Les baies vertes sont aussi commercialisées comme épice.

-*Cinnamomum burmanni* Blume, synonyme *Cinnamomum cassia* Siebold ou Cannelier de Birmanie ou Padang : Originaire d'Indonésie (Philippines).

-*Cinnamomum camphora* (L) T.Nees & C.H. Eberm.

-*Cinnamomum cubense* (Nees) Kosterm., synonyme *Phoebe cubensis* Nees: Originaire d'Amérique centrale (Cuba et Puerto Rico).

-*Cinnamomum culitlawan* Blume : Originaire d'Asie (Malaisie, îles Moluques, Chine).

-Cinnamomum elongatum (Nees) Kosterm., synonyme *Phoebe elongata* Nees : Originaire d'Amérique centrale, présent à Cuba (Trinidad

-*Cinnamomum eucalyptoides* T.Nees, Cinnamomum paraneuron Miq., Cinnamomum

villosum Wight, Laurus nitida Roxb. : Originaire d'Asie (Inde du sud, Indonésie, Malaisie).Son feuillage est utilisé dans la pharmacopée indienne dans le traitement des dysenteries et des refroidissements.

-*Cinnamomum loureirii* Nees & Lecomte ou Cannelle de Saigon : Originaire d'Asie (nord du Vietnam et sud de la Chine – province du Yunnan).

-*Cinnamomum obtusifolium* Nees : Originaire de l'Assam et du Bengale.

-*Cinnamomum oliveri* F.M. Bailey : Originaire d'Australie (Queensland et Nouvelle Galles du sud), appelé localement « Oliver's Sassafras ».

-*Cinnamomum pauciflorum* Nees : Originaire d'Asie en zone subtropicale (Inde).

III.2.5. Phytochimie et activité pharmacologie

Les huiles obtenues à partir d'écorce, feuilles et écorce de racines ont une composition chimique très varié. Ce qui suggère de multiple effet pharmacologique. Les différentes parties de la plante possède les mêmes hydrocarbones mais en diverses proportions. Cz offre une large gamme de différentes huile avec divers caractéristique ce qui détermine sa valeur chez les industriels. (Gruenwald J, Freden J, Armbruester 2010)

Les études in vitro et in vivo sur les animaux et les humains à travers le monde ont démontré de nombreux effets bénéfiques de cz sur la santé (Javaprakasha GK, Rao LG : 2011)

Près de 30 études ont évalué les propriétés anti microbien in vitro et in vivo (Ranasinghe et al 2013). Samarasekera et al ont travaillé sur les propriétés de l'huile essentielle de feuilles et d'écorce de C.z. contre Culex quinquefasciatus, Anopheles tessellatus et Aedes aegypti, les effets in vitro et in vivo sur le taux de glucose sanguin, le contrôle de la glycémie et des lipides.

De récentes études de Ranasinghe et al et une revue de Bandara et al sur les effets de l'extrait de Cz sur le diabète ont montré de nombreux effets bénéfique in vitro et in vivo. In vitro Cz a démontré des potentialité a) sur la réduction de l'absorption post prandrial du glucose intestinal par l'inhibition de l'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme des carbohydrate(α-amylase pancréatique et α glucosidase b) la stimulation du glucose intracellulaire par la mobilisation des vésicules de translocation de GLUT4 c) stimulation le métabolisme du glucose et la synthèse du glycogène d) inhibition de la néoglucogenèse par des effets sur les enzymes clés de la régulation f) stimulation de la sécrétion de l'insuline et sur les potentialités des récepteur à insuline (51). Cinnantannin B1 a été identifié comme étant potentiellement le composé actif responsable de cet effet

Les effets in vivo se traduise par a) l'atténuation de la perte de poids associe au diabète b) la réduction du glucose sanguin c) la réduction de LDL et l'augmentation du HDL cholestérol d) réduction de HbA1c et l'augmentation du taux d'insuline dans le sang. Hasan et al ont aussi confirmé ces effets et démontrer que C.z. réduisait le taux de cholestérol total, de cholestérol LDL et de triglycérides tandis que le taux de HDL cholestérol augmente chez les rats diabétiques. Des résultats similaires ont été observés sur des lapins albinos

III.2.6.Utilisation

L'écorce est connut comme épice depuis plus de 4500 ans, mais aussi pour ses propriétés médicinales. Les égyptiens l'associait à l'aloès, la myrrhe et à d'autres substances pour l'embaumement des cadavres ou dans la confection d'essence de cannelle et de parfums, plus tard dans celle de l'huile sainte, mais aussi ses propriétés excitantes, aphrodisiaques (citée dans les contes des mille et une nuits).

La cannelle fut importée en Europe, dès le 17 ^{ième} siècle par les Portugais. Elle est utilisée comme aromate en bâtonnet ou en poudre, pour épicer les plats sucrés, salades de fruits, compotes, fruits cuits, pâtisseries et viennoiseries, soupes, marinades, légumes, viandes (tajines), confection de vins, boissons chaudes, élixirs, cocktails (punchs) et spiritueux. Elle entre dans la composition de mélanges d'épices tel que: curry, Quatre épices et cinq épices, Ras el Hanout (la cannelle est appelée en arabe ‘karfa’). Une des épices les plus anciennes connut en Chine sous empereur Chen Nung (2137 avant J.-C), appréciée par la reine Hatshepsout (1503 avant J.C) et déjà utilisée par Dioscoride pour traiter les affections respiratoires et comme aphrodisiaque. On en extrait une huile essentielle (par distillation des copeaux) qui est utilisée en parfumerie, cosmétologie, phytothérapie, aromathérapie, mais aussi dans l'industrie pharmaceutique pour ses propriétés: antibactérienne, antifongique, astringente, antispasmodique et stimulante (aldéhyde cinnamique) des fonctions circulatoires, cardiaques et respiratoires.

Dans certaines pharmacopées traditionnelles, elle est prescrite pour traiter les états grippaux, pour faciliter et accélérer les accouchements.

Quelques généralités sur la régulation glycémie et les organes impliqués

IV. Quelques généralités sur la régulation glycémie et les organes impliqués

IV.1. Régulation physiologique de la glycémie

Le glucose est le substrat énergétique des cellules, il est métabolisé en CO_2 et H_2O et permet la formation des molécules d'ATP. Le glucose sanguin a deux origines :

- Une origine exogène représentée par l'apport alimentaire
- Une origine endogène constituée essentiellement par le glycogène hépatique et musculaire qui est dégradé par la voie de la glycogénolyse.

Au niveau hépatique, le glucose peut se former également à partir des molécules telles que le glycérol, le lactate et les acides aminés glucoformateurs. On parle alors de la néoglucogenèse. En général, la glycémie est régulée par l'insuline, hormone hypoglycémiante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Le niveau de la glycémie constitue le facteur essentiel de la régulation de la sécrétion de l'insuline.

L'insuline assure son action hypoglycémiante par l'activation de la glycolyse et de la glycogénogenèse et par l'inhibition de la glyconéogenèse. La résultante de ces effets est une stimulation de l'emmagasinage du glucose sanguin par les cellules insulinosensibles (cellules du muscle squelettique, du foie et du tissu adipeux). Cette augmentation de la mobilisation du glucose sanguin vers les tissus périphériques permet d'atteindre l'euglycémie qui, à son tour, freine la sécrétion de l'insuline déclenchée par l'hyperglycémie initiale.

La glycémie est également régulée par d'autres hormones antagonistes de l'insuline telles que le glucagon, les catécholamines, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes. Le glucagon, sécrété par les cellules α pancréatiques, est la plus importante de ces hormones hyperglycémiantes.

Il exerce son action en stimulant la gluconéogenèse hépatique, en augmentant la glycogénolyse musculaire et hépatique, et en inhibant la glycolyse au niveau de plusieurs tissus.

Le foie joue un rôle principal dans la régulation de la glycémie; il est très sensible aux variations de la glycémie. Quand celle-ci est élevée, il capte et stocke le glucose sous forme de glycogène, et quand elle est baisse, il libère le glucose dans le courant sanguin (Pieri et kirkiacharin, 1992; Meyer, 1977; Williams, 1980).

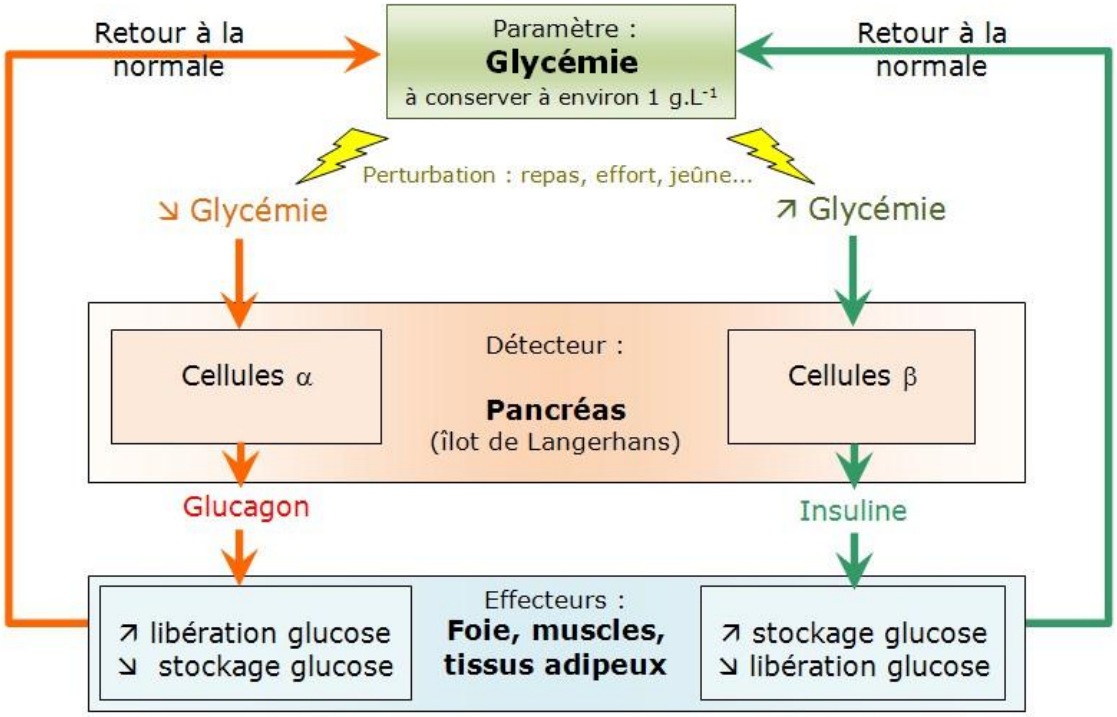


Figure 6: Régulation de la glycémie

IV.2. Régulation moléculaire du transport de glucose

Dans les tissus, la captation de glucose est assurée par divers transporteurs de glucose (voir tableau I). Le transport de glucose indépendant de l'insuline (captation basale) augmente de façon linéaire avec l'augmentation de la glycémie par un effet d'action de masse. Cependant, si le glucose-6-phosphate s'accumule, à cause d'une entrée du glucose dans la cellule supérieure à celle requise pour le métabolisme, l'augmentation du glucose-6-phosphate qui résulte va inhiber l'hexokinase et donc la phosphorylation du glucose (rétrocontrôle). Le glucose libre dans la cellule augmente ensuite et réduit le gradient de concentration, ce qui freine le transport de glucose (Andreelli et Girard, 2005).

Par contre, la régulation de l'hyperglycémie fait appel au transport de glucose contrôlé par l'insuline qui dépend des transporteurs de glucose Glut4 exprimés au niveau du muscle squelettique, des adipocytes et du muscle cardiaque. À l'équilibre, ces transporteurs sont localisés dans des vésicules intracellulaires, alors qu'en présence d'insuline, les Glut4 se retrouvent dans la membrane plasmique. Ce processus est appelé translocation (Suzuki et Kono,

1980).L'insuline augmente aussi l'activité des Glut4. L'insuline exerce ses actions cellulaires, incluant la translocation et l'activation des Glut4, par le biais de différentes voies de signalisation qui sont détaillées dans les sections suivantes.

Tableau 3: Transport facilité de glucose chez les mammifères (Ducluzeau et coll., 2002).

NOM	Distribution tissulaire	Fonction
Glut 1	Large distribution, abondant dans les érythrocytes, cellules endothéliales et les lignées cellulaires immortalises	Transport basal de glucose, augmente le transport de glucose au cours de la croissance et de la division cellulaire et assure le transport de glucose à travers la barrière hémato-encéphalique
Glut 2	Hépatocytes, cellules β pancréatiques, intestin, rein	Assure la fonction gluco-sensitive et le transport Transépithélial
Glut 3	Distribution très large chez l'humain ; présent dans le cerveau chez d'autres espèces	Transport basal chez plusieurs cellules humaines, transport de liquide encéphalique vers les cellules cérébrales
Glut 4	Muscle squelettique, cœur, adipocytes	Assure l'augmentation rapide de transport en réponse à' l'insuline
Glut 5	Intestin (jéjunum), présence faible dans les adipocytes, muscle, cerveau et rein	Transport intestinal de fructose et autres hexoses
Glut 7	Tissu néoglucogénique : foie	Libération de glucose néoformé au niveau de la lumière de RE
Glut 8	Blastocystes, possiblement dans d'autres tissus	Transport de glucose insulinodépendant chez les blastocystes
Glut X 1	Très abondant dans les testicules, moyennement dans le SNC et faiblement dans les tissus insulino-sensibles	-

IV.3. Les principaux organes impliqués

Les différents organes de l'organisme ne présentent pas la même sensibilité toxique du fait de leurs particularités métaboliques. La concentration du produit et /ou de ses métabolites intervient au niveau des spécificités d'action. La concentration dans les organes cibles résulte des étapes d'absorption, de distribution et de biotransformation. Lorsque ces cellules ont une grande affinité pour des molécules déterminées, cette particularité entraîne une absorption sélective de certains produits au niveau de certains organes. Du fait de leur forte mobilisation sanguine, le foie (site privilégié des biotransformations) et les reins sont les sites importants de distribution.

IV.3.1.Le rein

Les reins sont avec les poumons les principaux organes excréteurs de l'organisme. De plus, ils contrôlent le contenu en eau et en sels (électrolytes) du corps.

IV.3.1.1. Anatomie macroscopique

Les reins sont situés dans la région lombaire de part et d'autre de la colonne vertébrale et derrière la cavité péritonéale. Ils ont une forme d'haricot. Le rein droit se trouve sous le foie et le rein gauche sous la rate. Généralement le rein droit descend plus bas que le rein gauche. (Faller 1988) Un rein adulte pèse environ 150g chez l'homme et mesure à peu près 12cm de long, 6cm de large .Sur son côté médian concave se trouve le hile rénal par où pénètrent les artères et les nerfs autonomes et ressortent les veines et les bassinets. (Faller 1988)

Une coupe frontale du rein révèle l'existence de deux zones : la médulla dont l'extrémité interne ou papille se projette dans la cavité excrétrice et le cortex où se trouve le glomérule

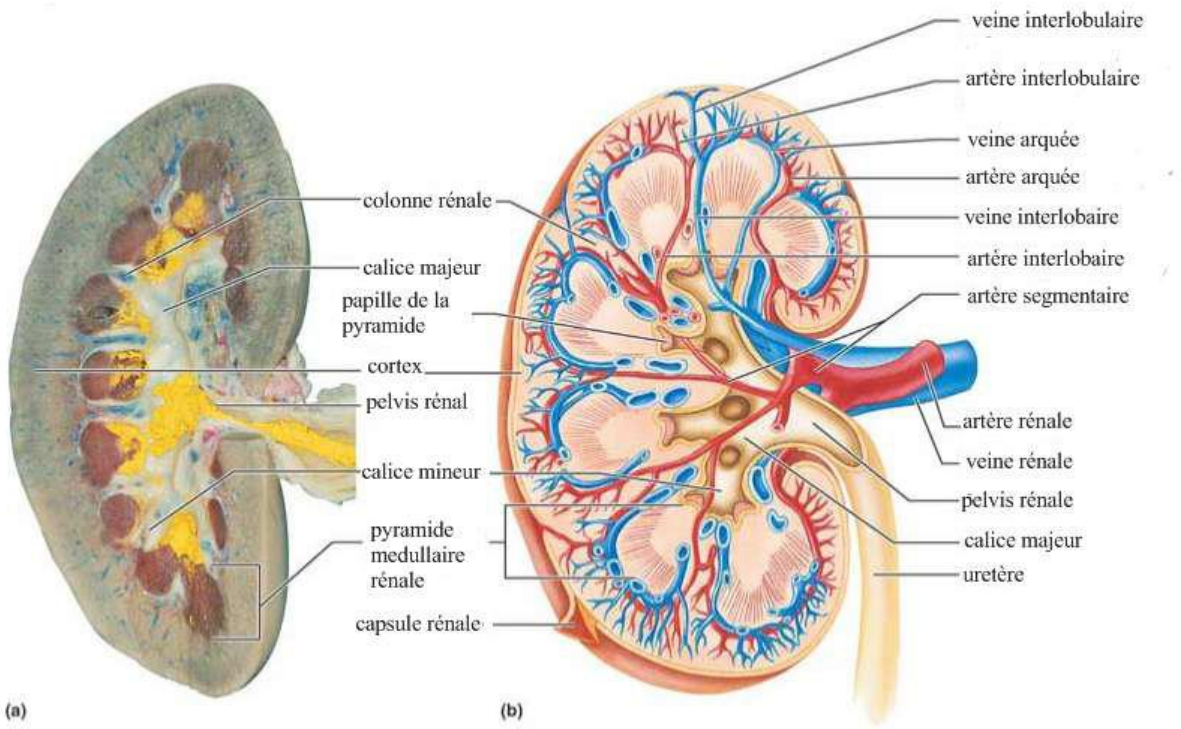


Figure 7: Anatomie interne d'un rein humain. (a)photographie de coupe frontale du rein, (b) schéma d'un rein en coupe frontale (Marieb, 1999)

IV.3.1.2. Structure microscopique

IV.3.1.2.1. Le nephron

Chaque néphron comprend :

-Un corpuscule rénal qui est constitué par une capsule glomérulaire ou capsule de Bowman et d'un bouquet de capillaires sanguins appelés glomérule rénal .A ce niveau, les cellules épithéliales modifiées appelées podocytes de la capsule de l'endothélium fenestré des capillaires glomérulaires assurent la filtration.

-Le tubule rénal formé de quatre parties présentant chacune une particularité structurale qui détermine leur rôle dans la filtration et l'épuration du sang traversant les reins

-Le tubule contourné distal aux cellules épithéliales comparables à celle du tubule contourné proximal mais qui sont beaucoup plus minces et sans microvillosités. Ces cellules vont contribuer d'avantage à la sécrétion des solutés dans le filtrat qu'à la réabsorption

-L'anse du néphron composé d'une part, d'une partie descendante aux caractéristiques structurales et fonctionnelles du tubule contourné proximal d'autre part, d'une partie ascendante, segment grêle composé d'un épithélium simple squameux perméable à l'eau, à la plupart des ions et à l'urée. L'épithélium devient cuboïde ou prismatique en s'éloignant de cette partie et les cellules Y sont adaptées au transport actif des ions.

-Le tubule rénal collecteur composé de cellules épithéliales assurant la réabsorption de l'eau, des ions sodium et du chlorure sous le contrôle d'une régulation hormonale. Chaque rein contient entre 1 et 1,5 million de néphron.

IV.3.1.2.2. L'interstitium rénal

C'est l'espace compris entre les tubules et le tube collecteur. Il constitue une zone importante de passage pour les ions et l'eau et contient des vaisseaux sanguins .L'interstitium devient généralement plus important lors des atteintes rénales

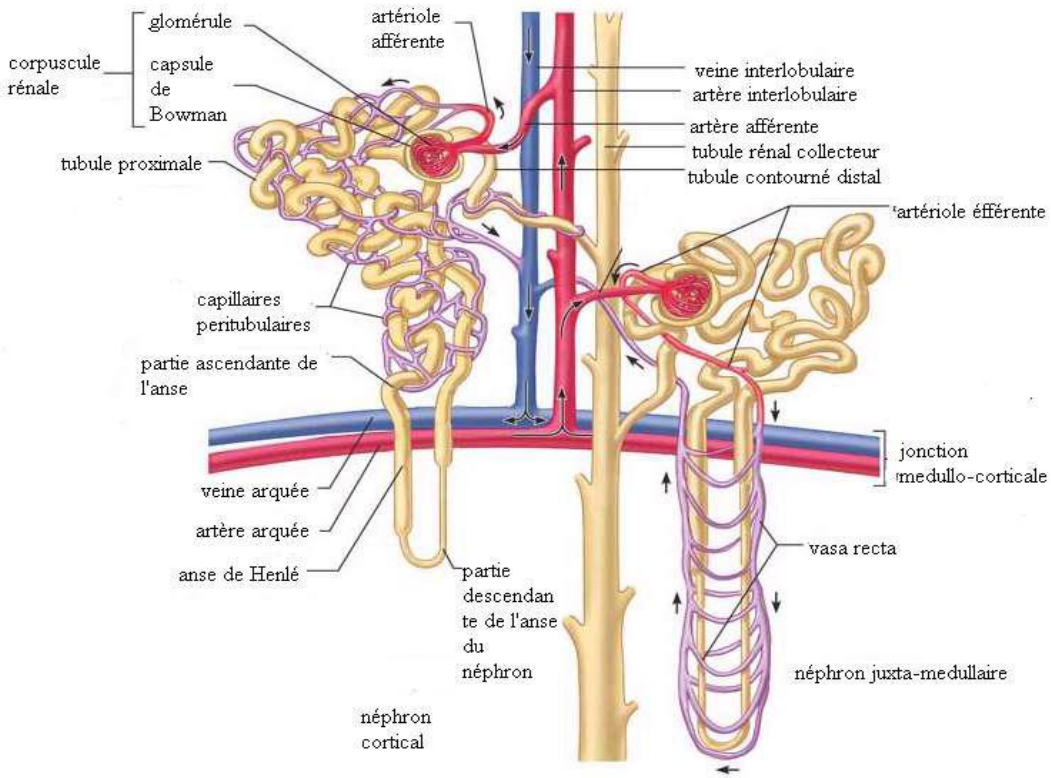


Figure 8: Anatomie détaillée des néphrons et leurs vaisseaux sanguins (Marieb 2007)

IV.3.1.3. Fonction du rein

Les reins assurent plusieurs fonctions à savoir :

-La fonction d'excrétion et de résorption

La fonction excrétrice des reins sert à débarrasser l'organisme de plusieurs produits du métabolisme et de tout excès de substances inorganiques ingérés.

-La fonction de régulation

Les reins régulent et maintiennent la composition chimique optimale et constante du sang et du liquide interstitiel. Ceci est rendu possible grâce au mécanisme de sécrétion et réabsorption différentiée au niveau des tubules du néphron.

-La fonction endocrine

La fonction endocrine des reins provient du fait que les reins sont une glande endocrine (produisent l'érythropoïétine et la rénine) et un site de dégradation des hormones produites par ailleurs telles que l'insuline et l'aldostérone.

IV.3.1.4. Manifestations toxiques

Toutes les zones du néphron peuvent être altérées par les toxiques ; les manifestations toxicologiques allant des dysfonctionnements mineurs de la fonction rénale par mort cellulaire. Les effets toxicologiques concernent principalement le glomérule (lieu de la filtration), mais également les tubules proximaux qui concernent les toxiques du fait de leur forte activité d'absorption et de sécrétion. D'autre part la forte teneur de ces derniers en cytochrome P450 leur permet de détoxifier ou d'activer les toxiques.

Les principaux néphrotoxiques sont les métaux lourds, les antibiotiques, les analgésiques et certains hydrocarbures halogénés (dérivés chlorés). Le rein a un fort pouvoir de compensation qui lui permet de retrouver un fonctionnement normal après d'importantes perturbations morphologiques ou métaboliques.

IV.3.2. Le foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain représentant environ 1/50eme du poids corporel soit 1,5 kg en moyenne chez l'adulte (Guyton)

IV.3.2.1. Anatomie macroscopique

Le foie est logé sous la coupole diaphragmatique droite derrière l'arc costal droit. Il est presque complètement enveloppé dans le péritoine viscéral qui recouvre sa capsule de tissu conjonctif. La face supérieure du foie correspond au diaphragme auquel elle adhère partiellement vers l'arrière. Sa face inférieure repose sur les viscères abdominaux. Le foie est divisé en 2 lobes anatomiques droit et gauche par un ligament falciforme. Le lobe droit contient la vésicule biliaire. Par le hile ou porte du foie, pénètrent la veine porte, l'artère hépatique et les nerfs autonomes tandis que des voies biliaires en sortent [figure 9] Faller (1988)

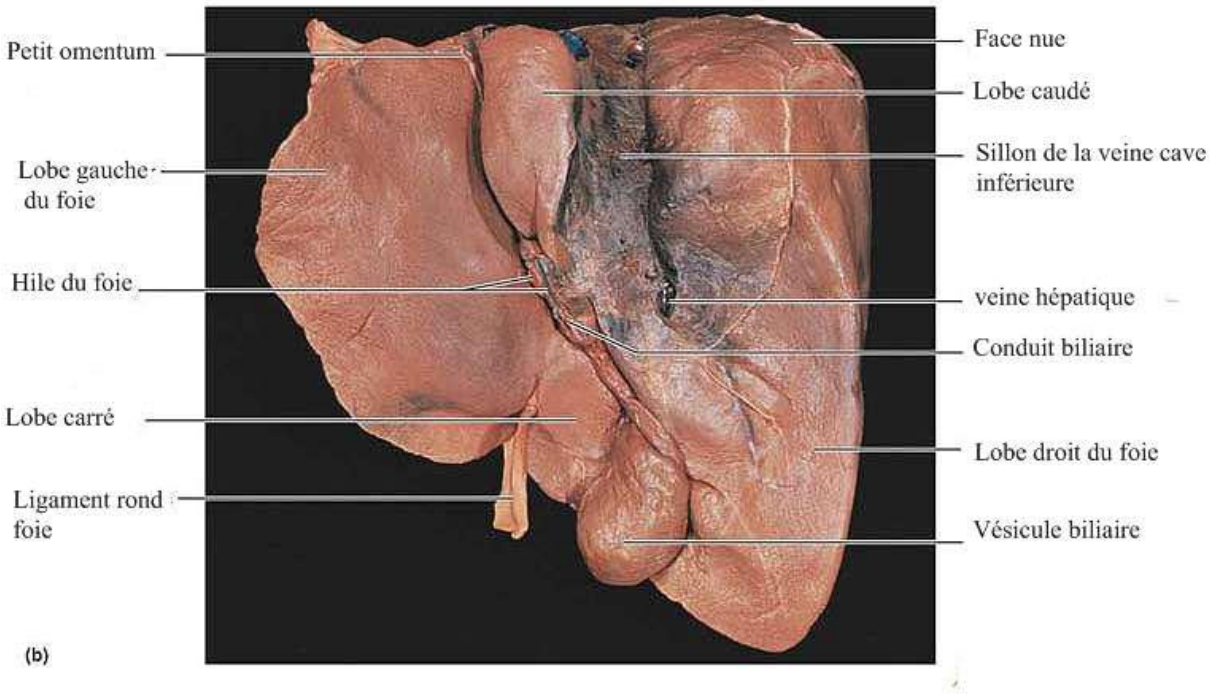


Figure 9: Anatomie macroscopique du foie (Marieb ,2007)

IV.3.2.2. Structure microscopique

Le foie est constitué de cellules hépatiques épithéliales nommées hépatocytes (60%) et des cellules du système réticuloendothélial : les cellules de Kupffer (40%).

Le tissu hépatique se compose d'une multitude de lobules hépatiques qui est une structure cylindrique de quelques millimètres de long et de 0,8-2 mm de diamètre **(**DIFIORE M.S.H. 1965).

Le lobule hépatique est l'unité fonctionnelle du foie. Il se présente comme un livre dont les «pages» seraient formées par des lames d'hépatocytes orientées de façon radiaire et dont le « dos » correspondrait à la veine hépatique centrolobulaire qui forme l'axe central du lobule. A la périphérie des lobules se trouvent des formations étoilées nommées espaces portes. Ils sont occupés par des vaisseaux issus de la veine porte et de l'artère hépatique ainsi que par les canaux biliaires. Le sang circule entre les lames épithéliales dans des capillaires sinusoïdes.

La circulation est centripète depuis l'espace porte jusqu'à la veine centrolobulaire. La bile progresse en sens inverse de façon centrifuge pour rejoindre les canaux biliaires situés dans les espaces portes.

Les capillaires sinusoïdes sont formées par des cellules fenestrées (0,2 µm). Cela permet aux grosses molécules (250 000 daltons) d'entrer au contact direct des hépatocytes dans l'espace de Disse qui est situé entre les capillaires et les lames d'hépatocytes. La composition des liquides remplissant l'espace de Disse est identique à celle du plasma sanguin. Les hépatocytes forment une monocouche autour de chaque capillaire et ils occupent 85% du volume hépatique. Ils sont responsables de la formation de la bile et des différentes transformations métaboliques.

Les cellules de Kupffer (5 à 10% du poids hépatique) sont des macrophages situés dans la lumière des capillaires sinusoïdes et fixés aux intersections de leurs ramifications. Elles ont pour rôle de phagocyter les particules étrangères qui arriveraient de l'intestin avant qu'elles ne gagnent la circulation générale **(**DIFIORE M.S.H., 1965)

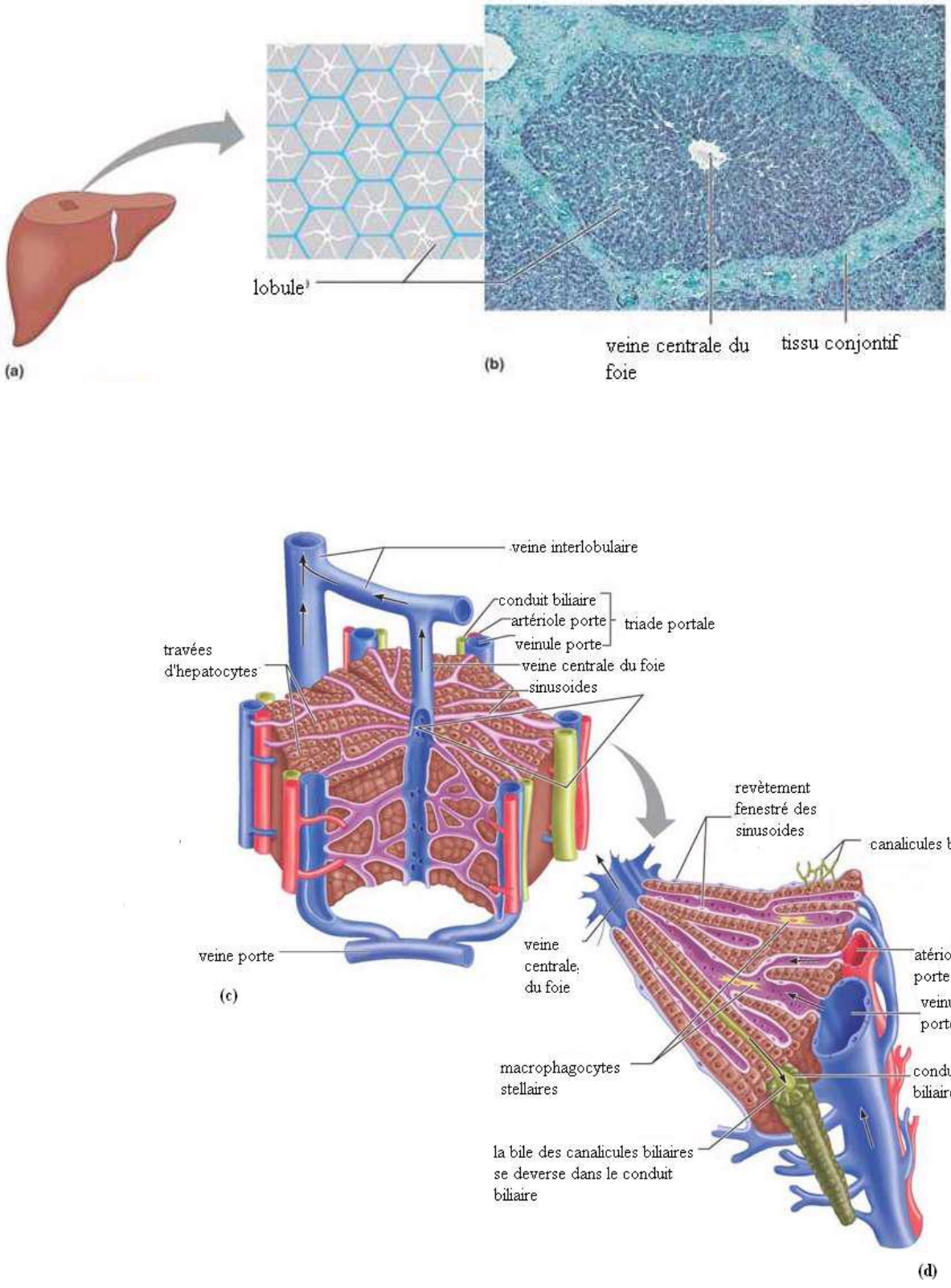


Figure 10 : Anatomie microscopique du foie (Marieb, 1999)

IV.3.2.3. Fonction

Du point de vue biochimique le foie est l'organe le plus complexe. Les fonctions hépatiques sont diversifiées et capitales pour l'organisme. Le foie effectue les fonctions suivantes :

- Il emballe les acides gras de façon à rendre possible leur transport et leur stockage ;
- Il synthétise les protéines plasmatiques ;
- Il synthétise les acides aminés non essentiels et convertis l'ammoniac produit par leur désamination en urée, un produit d'excrétion de toxicité réduite ;
- Il emmagasine le glucose sous forme de glycogène et assure la régulation de la glycémie.

En plus de toutes ses fonctions relevant du métabolisme des lipides, des protéines et du glucose, les hépatocytes du foie emmagasinent certaines vitamines, préservent le fer provenant des globules rouges usés, dégradent les hormones et détoxifient de certaines substances telles que l'alcool et médicaments (manifestations toxiques).

Les atteintes du foie sont complexes et diverses. Cet organe est une cible fréquente des toxiques qui, après pénétration dans l'organisme par le tube digestif, sont absorbés et transportés par la veine porte vers le foie.

De plus, le foie a une forte concentration en sites de liaison et en enzymes de métabolisation des xénobiotiques qui rendent la plupart des toxiques moins actifs et plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétables. La toxicité hépatique se manifeste différemment selon ses niveaux d'intervention sur les cellules hépatiques.

Certains toxiques peuvent entraîner plusieurs types d'atteintes hépatiques telles : la stéatose, la nécrose, la cirrhose et les néoplasmes qui peuvent résulter de l'exposition aux produits tels que les aflatoxines. Les dioxines peuvent entraîner la nécrose, la cirrhose et les néoplasmes ; Le bromobenzène est un inducteur de nécrose et de cirrhose, le phosphore de stéatose, de nécrose et de cirrhose.

IV.4. Régulation du métabolisme énergétique et rôle de l'hépatocyte

IV.5. Quelques marqueurs de l'évaluation

IV.5.1. Quelques marqueurs de l'évaluation de la fonction rénale

- Les paramètres les plus souvent utilisés sont ceux qui évaluent le degré de filtration glomérulaire et l'intégrité de la barrière de filtration glomérulaire. Ces paramètres mesurent l'excrétion urinaire d'une substance filtrée en totalité par les glomérules et non sécrétée, réabsorbée ou métabolisée au niveau tubulaire tel que la créatinine et l'urée.

- **La créatinine**

La créatine est l'acide methyl-guanidine-acétique. Elle existe dans les tissus musculaires sous forme de son amide phosphorique : la créatine phosphate. La créatinine quant à elle est un produit provenant de la déshydratation spontanée de la créatine de l'organisme. La concentration plasmatique de la créatinine est le marqueur biochimique de la fonction glomérulaire le plus simple et le plus fiable. Notons cependant que des variations de la concentration plasmatique de la créatinine peuvent survenir indépendamment du dysfonctionnement de la fonction rénale ; Ceci en relation avec une consommation de viande, l'exercice physique aigue et la masse musculaire.

- **L'urée**

L'urée est synthétisée dans le foie et résulte primitivement des réactions de désamination des acides aminés. Son élimination dans l'urine est la voie principale d'excrétion de l'azote.

Le taux de l'urée sanguine, normalement inférieure à 0,50 g/L ne donne qu'une idée médiocrement approchée de la fonction rénale car des facteurs, autres que la fonction rénale, peuvent en modifier le taux. Il s'agit des facteurs comme le régime alimentaire, le degré d'hydratation et le métabolisme protéique (Rock R.C. et al., 1987 et Bariety R. et al.,1978).

IV.5.2. Quelques marqueurs de l'évaluation de la fonction hépatique

Aminotransférases plasmatiques

Les transaminases (ou aminotransférases) sont des enzymes hépatocytaires dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha-aminé à un acide

alpha-cétonique. Il existe 2 transaminases dont le coenzyme est la vitamine B6 (phosphate de pyridoxal): Aspartate aminotransférase (ASAT) et Alanine aminotransférase (ALAT). Les mesures des activités des enzymes sériques aminotransférasiques permettent d'explorer la cytolyse au niveau des différents organes. L'activité de l'ALAT est plus spécifique au foie que celle de l'ASAT. Les activités plasmatiques peuvent êtres 20 fois plus élevées que la limite supérieure normale en cas d'hépatite (William J.Marshall, Stephan K.Bangert(2005)

IV.5.3. Quelques marqueurs du risque athéromateux

Cholestérol et triglycérides

Les principaux lipides du plasma sont les acides gras, les triglycérides, le cholestérol et les phospholipides. Le cholestérol joue un rôle essentiel dans la structure des membranes et il est le précurseur des hormones stéroïdiennes et des acides biliaires. Il est présent dans la ration alimentaire et peut être synthétisé par le foie selon un mécanisme soumis à une régulation très fine.

Les triglycérides sont constitués par une molécule de glycérol estérifié par trois acides gras à longues chaînes. Les triglycérides sont présents dans l'alimentation et peuvent êtres synthétisés par le foie et le tissu adipeux.

Des concentrations plasmatiques élevées en lipides, particulièrement en cholestérol et en triglycérides, sont associées par un lien de causalité à la pathogenèse de l'artériosclérose: processus responsable des maladies cardiovasculaires. (William J.Marshall, et al. 2005, Pierre Louisot et al 1970, Rock R.C. et al 1987, Bariety R. et al., 1978, Agbor G. et al. 2004)

IV.5.4. Indicateurs de l'équilibre glycémique.

La glycémie est le taux de glucose sanguin. Le glucose est un substrat énergétique essentiel de l'organisme. Les sources de glucose sont représentées par les glucides alimentaires et la production endogène (principalement hépatique) par glycogénolyse et néoglucogenèse. La glycémie n'a chez un même sujet une valeur fixe que dans des conditions métaboliques très précises. Il s'observe des hyperglycémies importantes dans le diabète mais aussi (à moindre degré) dans certaines intoxications (morphines, chloroforme, oxyde de carbone, adrénaline, caféine).

DEUXIEME PARTIE:
MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I- MATERIEL

I-1 Matériel végétal
Ecorse de *Khaya senegalensis*
Feuilles de *Cinnamomum zeylanicum*

I-2 Matériel biologique
Le lapin : *Oryctolagus cuniculus* de l'ordre des Lagomorphes et Famille des Léporidés

II-METHODES

Nos travaux se sont déroulés au sein du laboratoire de Biomembranes et Signalisation cellulaires de l'UAC situé dans l'enceinte du département de Physiologie Animale de la **FAST (Faculté** des sciences et techniques) et au laboratoire de pharmacognosie et huiles essentielles.

II- Préparation des extraits totaux

- extraits totaux de *Khaya senegalensis*

Les écorces de tronc de *Khaya senegalensis* ont été récoltées au matin en Avril 2011 (pendant la saison des pluies : la période de stagnation de la sève ; avant la reprise de l'activité végétative à l'UAC. Toute fermentation détruisant une partie des principes actifs, une fois que les écorces ont été cueillies, le séchage a été rapide. Les écorces sont séchées à l'air libre à la température du laboratoire, puis après dans la chaleur d'un four à 50˚C. Ensuite, ils ont été broyés finement et conservées dans des bocaux de verres. Pour l'obtention de l'extrait éthanoïque d'écorces de tige de *Khayasenegalensis*100 g d'écorces de tige finement broyées sont macérés dans 500mL d'alcool pendant 72 heures. Le filtrat est évaporé à 40°C pour l'extrait éthylique à l'aide de l'évaporateur ROTAVAPOR. Les extraits récupérés sont mis à l'étuve à 45°C pour séchage. Ensuite les extraits desséchés sont raclés et concassés dans un mortier de porcelaine. Les extraits desséchés obtenus sont pesés et le rendement calculé.
La solution d'extrait est préparée avec de l'eau distillée.

- Préparation des extraits de feuilles de cannelle

Les feuilles de *Cinnamomum zeylanicum* sont séchées à la température du laboratoire à l'abri du soleil puis réduites en poudre.
300g de poudre de feuilles sont ajoutés à 2 litres d'éthanol 95°.Le mélange ainsi obtenu est incubé pendant 72 heures à la température du laboratoire et fréquemment agité avant d'être filtré sur papier filtre whatman.
Tout le solvant est évaporé au rotavapor et les extraits totaux éthanoliques sont récupérés.

II-1 Screening phytochimiques

Le Screening phytochimiques est basé sur les réactions (coloration et précipitation) différentielles des principaux groupes de composés chimiques contenus dans les plantes selon la méthode de Houghton P. et Raman A. (1998) revue et adaptée aux conditions du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielle. Cette analyse comporte :

II-2 Recherche des alcaloïdes

Elle s'est faite grâce à deux tests :

Test général en milieu acide

On mélange 5 g de la poudre à 25mL d'acide chlorhydrique dilué à 5 %. Le mélange est macéré pendant 24 heures. On recueille 1mL du filtrat auquel on ajoute 5 gouttes de réactif de MAYER. En cas de présence d'alcaloïdes, on observe un précipité jaune ou louche dans le tube.

II-3 Recherche des composés polyphénoliques

- Recherche des tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques (anti-oxydants empêchant la dégénération cellulaire ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre dure et imputrescible en se fixant sur les protéines. On distingue deux grands groupes de tanins :

Les tanins hydrolysables ou tanins pyrogalliques qui sont des esters d'oses et d'acides phénols (acides galliques en particulier) ;

Les tanins condensés,non hydrolysables ou tanins catéchiques qui dérivent des cathécols et des proanthocyanidols par condensation ont la propriété de freiner le mauvais cholestérol.

A la première portion du filtrat, nous ajoutons quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 %. L'observation d'une coloration bleu-foncée, verte, brun-vert ou noire indique la présence des tanins.

- Recherche des tanins catéchiques

A 30mL de la seconde portion, nous ajoutons 15mL de réactif de STIASNY et chauffons le mélange au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité rose indique la présence des tanins catéchiques.

- Recherche des tanins galliques

Après récupération du filtrat, celui-ci a été saturé d'acétate sodique additionné de quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 % ($FeCl_3$ à 1%). On obtient une coloration bleu-noire : signe de la présence de tanins hydrolysables ou galliques.

- Recherche de flavonoïdes

Ce sont des pigments naturels de couleur jaune, généralement polyphénoliques. Ils sont le plus souvent sous forme d'hétérosides appelés flavonosides dont les génines sont des dérivés de la phénylchromone, la chromone étant la benzo-y-pyrone. Les flavonosides sont doués d'activictés diurétiques et vitaminiques P.Ce sont des protecteurs veineux qui diminuent le risque de maladies cardiovasculaires. Sa forte concentration en vitamine P permet de renforcer la résistance des parois des vaisseaux.

Les flavonosides sont extractibles par l'alcool ou par l'eau chaude ; ils sont peu solubles dans l'eau froide.

En solution alcoolique,en présence d'hydrogène naissant, produit in situ par action de l'acide chlorhydrique sur du magnésium, les flavonosides donnent des colorations variées allant du rouge-oranger au violet.

A 2mL de la deuxième portion, on ajoute 2ml d'alcool chlorhydrique(alcool à 96°=2volumes ;eau=2volumes ; HCl concentré=1volume) et, une pincée de poudre de

magnésium: c'est la réaction de la cyanidine. On observe une coloration orange,puis violette, donc la réaction est positive.

L'apparition d'une coloration: orangée indique les flavones ; rouge indique les flavonols ; violette indique la présence de flavonoïdes.

- Recherche des anthocyanes

Nous additionnons quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 5 % à 1mL de la deuxième portion. Ce mélange est ensuite alcalinisé par ajout de quelques gouttes d'ammoniaque dilué au demi. Une coloration rouge qui s'accentue et vire au bleu-violacé ou verdâtre indique la présence d'anthocyane.

- Recherche de leuco-anthocyane

A 5mL de la deuxième portion, nous ajoutons 5mL du réactif de SHINODA. Le mélange est ensuite chauffé pendant 15 minutes au bain marie à 90°C. L'observation d'une coloration rouge cerise ou violacée indique la présence de leuco-anthocyane.

II-4 Recherche des dérivés quinoniques

Dans un erlenmeyer, nous mélangeons 2mL de HCl à 5 % et 2 g de poudre. A ce mélange, nous ajoutons 20mL de chloroforme et nous laissons en agitation continue pendant 24 heures. Après macération, nous ajoutons 5 ml d'ammoniaque au mélange précédent : c'est la réaction de BORN-TRAGER. Une coloration rose ou rouge violacée indique une réaction positive.

II-5 Recherche des saponosides

Les saponosides ou saponines sont des hétérosidestrès répandus dans le règne végétal.Ils ont en commun leur structure et surtout un ensemble de propriétés physico-chimiques et physiologiques :

Abaisse le tension superficielle de solutions, d'où leur pouvoiraphrogène dans l'eau ;Saveur acre ; Pouvoir sternutatoire ;Pouvoir hémolytique et toxicité sur les animaux à sang froid.

Ils sont mis en évidence par l'indice de mousse qui est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue qui, dans des conditions déterminées, donne une mousse persistante.

Le décocté de 1g de poudre est préparé pendant 30 minutes dans 100mL d'eau distillée avec une ébullition modérée. Le filtrat refroidi puis ajusté à 100mL est réparti dans 10 tubes à essais (hauteur 16 cm x 16 cm de diamètre) en série arithmétique de raison 1/10ème de concentration du décocté (successivement 1, 2, 3…, 10mL de décocté; ajuster le volume de chaque tube à 10mL avec de l'eau distillée). Après 30 agitations dans le sens de la longueur pendant 15 secondes (deux agitations par seconde, après l'avoir bouché avec le pouce), le tube est laissé au repos pendant 15 minutes. La hauteur de la mousse est mesurée. Si elle est ≥ 1cm dans l'un des tubes, la dilution dans ce tube est l'indice de mousse cherché. Sinon, l'indice est inférieur à 100 (négligeable).

II-6 Recherche de triterpénoïdes et de stéroïdes y compris les cardénolides

Pour cette recherche, nous ajoutons à 1 g de poudre 10mL d'alcool éthylique à 70°C et nous agitons pendant 30 min. A ce mélange, nous ajoutons 10 ml d'eau distillée puis 2mL d'acétate de plomb à 10 % à volume égal V/V. Après 15 minutes de repos, nous ajoutons au filtrat 2mL de solution aqueuse de phosphate disodique à 10 %. Après 15 minutes de repos, le filtrat est recueilli dans une ampoule à décanter et extrait à trois reprises avec 5mL de chloroforme ($CHCl_3$). Les solutions chloroformiques sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre puis divisées en trois portions et évaporées à siccité (bain de sable).

- Recherche de triterpénoïdes

La première portion est solubilisée par quelques gouttes d'acide acétique. Au mélange obtenu, nous ajoutons 3mL d'un mélange d'anhydride acétique-acide sulfurique. Une coloration violette, bleue ou verte indique la présence de triterpénoïdes.

- Recherche de stéroïdes

A la deuxième portion, nous ajoutons 2 gouttes d'une solution alcoolique à 2% d'acide dinitrobenzoïque et 2 gouttes d'hydroxyde de sodium à 1N. L'apparition d'une coloration rouge pourpre ou rouge au vin indique la présence de stéroïdes. C'est la réaction de KEDDE.

- Recherche de cardénolides

Réaction de RAYMOND pour les cardénolides: elle consiste à ajouter à troisième portion successivement 2 gouttes d'une solution alcoolique à 1 % de métadinitronenzène et 2 gouttes de NaOH à 20 %. Une coloration bleue indique une réaction positive.

II-7 Recherche de dérivés cyanogéniques

A 15mL d'eau distillée on ajoute 2g de la poudre puis bouché immédiatement et laissé en macération pendant 1 heure. Le col de l'erlenmeyer est recouvert de papier imbibé d'acide picrique et on chauffe pendant quelques minutes. L'apparition d'une coloration marron indique le dégagement de HCN.

II-8 Recherche des mucilages

Nous avons introduit 1mL de décocté à 10 % dans un tube à essai et ajouté 5mL d'alcool absolu. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage après une dizaine de minutes.

II-9 Recherche de coumarines

A 20mL d'éther on ajoute 1 g de poudre puis bouché immédiatement dans un petit erlenmeyer et laissés en macération pendant 24 heures. Le filtrat a été ajusté à 20mL avec l'éther. 5mL de filtrat ont été évaporés dans une capsule à l'air libre. Au résidu obtenu, nous avons ajouté 2mL d'eau chaude et partagé la solution dans deux tubes à essai. Dans l'un des tubes, nous avons ajouté 0,5mL d'ammoniaque à 25 %. Le second tube représente le témoin. Nous observons la fluorescence des deux tubes à essai sous UV à 365 nm. Une fluorescence intense dans le tube test indique la présence de coumarines.

II-10 Recherche des composés réducteurs

Le décocté à 10 % est obtenu par ébullition modérée pendant 3 minutes d'un mélange de 50mL d'eau distillée et de 5g de poudre. Après refroidissement, le filtrat a été ajusté à 50mL avec de l'eau distillée. 5mL de filtrat sont introduits dans un tube à essai. Après le chauffage au bain-marie à 90 °C pendant quelques minutes, on ajoute 1mL de réactif de Fehling (liqueur de

Fehling A + liqueur de Fehling B à volume égal). On réchauffe le filtrat quelques minutes après. L'observation d'un précipité rouge vif indique la présence de composés réducteurs.

II-11 Recherche des dérivés anthracéniques

Les hétérosides anthracéniques sont des substances phénoliques dérivés del'anthracène à divers stades d'oxydation (anthranol, anthrone et anthraquinone) ; ils existent dans la plante sous des formes libres (génines) ou sous des formes combinées (hétérosides). Ils sont utilisés comme laxatifs ou purgatifs.

- Anthracéniques libres

A 1g de poudre, on ajoute 10mL de chloroforme et on chauffe prudemment pendant 3 minutes au bain-marie. Après filtration à chaud, le mélange est complété à 10mL avec le chloroforme. 1mL de l'extrait chloroformique est additionné de 1mL d'ammoniaque dilué à 1/2 puis agité.

L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence d'anthracéniques libres.

- Anthracéniques combinés
  - O-Hétérosides

A une partie du résidu épuisé par le chloroforme, on ajoute 10mL d'eau distillée et 1mL d'acide chlorhydrique concentré. Le tube à essai maintenu au bain marie bouillant pendant 15 min est ensuite refroidi sous un courant d'eau. L'hydrolysat est obtenu après filtration et ajustement à 10mL. On prélève 5mL de l'hydrolysat qu'on agite avec 5mL de chloroforme. La phase organique soutirée est introduite dans un tube à essai et additionnée de 1mL d'ammoniaque dilué au 1/2 puis agité (on garde la phase aqueuse). La présence d'anthracénique est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

Si la réaction est négative ou faiblement positive, on recherche les O-hétérosides à génines réduites. Pour ce faire on prélève 5mL d'hydrolysat qu'on additionne de 3 à 4 gouttes de $FeCl_3$ (chlorure ferrique) à 10 %. Le mélange chauffé au bain-marie pendant 5 min est ensuite refroidi sous courant d'eau puis agité avec 5mL de chloroforme. A la phase chloroformique soutirée et introduite dans un tube à essai, on ajoute 1mL d'ammoniaque au 1/2 puis on agite. Une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence des O-hétérosides à génines réduites.

- C-hétérosides

A la phase aqueuse conservée plus haut, on ajoute 1mL de $FeCl_3$ à 10 %. Le mélange est porté à ébullition au bain-marie bouillant pendant 30min puis refroidi. Après agitation avec 5 min de chloroforme, la phase chloroformiser est soutirée et recueilli dans un tube à essai. On y ajoute 1mL d'ammoniaque dilué à 1/2 et on agite. Une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence de génines de C-hétérosides.

II-3-Dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé de la manière suivante:

II-3-1 Dosage du glucose

Le sang est prélevé dans des tubes Vacuum Stérile avec fluorure de Sodium. Les tubes ont été centrifugés à la vitesse de 3000tours/min pendant 10 minutes. Le taux de glucose dans le plasma a été dosé par la méthode enzymatique GOD-PAP. Le kit BIOLABOGLUCOSE (Lot : 101120A ; ref : LP80209) a été utilisé.

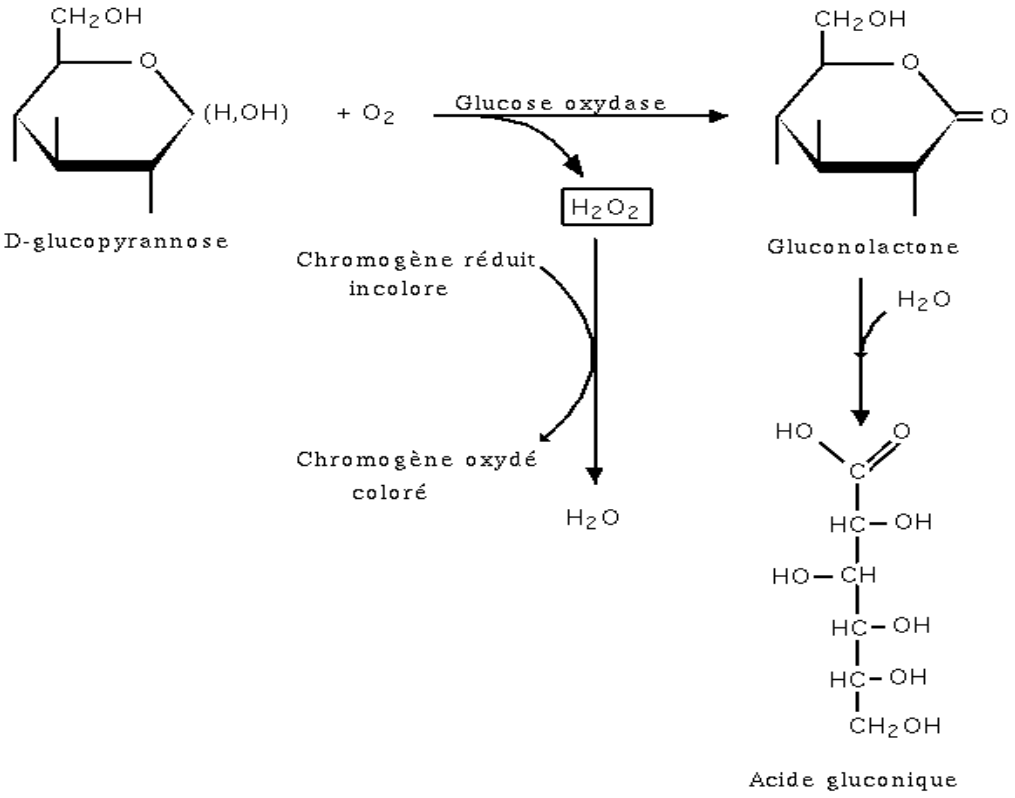
Principe

Le principe est celui de Trinder. En milieu aqueux et en présence d'oxygène, le glucose oxydase (G.O.D) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) lors de la réaction.

$$C_6H_{12}O_6 + \frac{1}{2} O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\textbf{G.O.D}} C_6H_{12}O_7 + H_2O_2$$

En présence d'une peroxydase (P.O.D), le peroxyde d'hydrogène réagit avec le chloro-4-phénol et le 4-aminoantipyrine (PAP) qui est incolore à l'état réduit pour former une quinonéimine. La quinonéimine formée présente une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en glucose. Cette intensité est mesurée au spectrophotomètre à 500nm. (Trinder P. 1969, Farrance I. 1987)

$$H_2O_2 + \text{chloro-4-phénol} + \text{4-aminoantipyrine} \xrightarrow{\textbf{PAP}} \text{quinonéimine} + 4H_2O$$



Mode opératoire

Amener le réactif à la température du laboratoire ; A l'aide d'une pipette, répartir dans les cuves comme récapitulé dans le tableau IV ci-dessous ; Bien mélanger et laisser incuber les cuves10min au bain-marie à 37°C ; Lire la concentration au spectrophotomètre.

Tableau 4: Procédure de dosage du glucose

Mesurer dans des cuves bien identifiées	**Blanc**	**Etalon**	**Echantillon**
Réactif (A)	1mL	1mL	1mL
Eau distillée	10µL		
Glucose standard(S)		10µL	
Plasma			10µL

II-3-2 Dosage des triglycérides

Pour ce faire, le sang est prélevé dans des tubes Vacuum Stérile sans anticoagulant. Le Kit BIOLABO TRIGLYCERIDES méthode GPO du lot 071106B de ref 80019 est utilisé.

Principe

Repose sur la méthode Fossati et Prencipe couplée à une réaction de Trinder.
Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement par la lipase afin de libérer les acides gras et le glycérol. Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) et le glycérol Kinase(GK) pour produire du Glycérol-3-phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP). LeGlycérol-3-phosphate est oxydé en Dihydroxyacétone phosphate (DAP) par le glycérolphosphate oxydase (GPO) en produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Lors d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase, le H_2O_2 réagit avec le 4-aminoantipyrine (PAP) et le 4-chlorophénol ((4-CP) pour produire la quinonéimine (rose) et de l'eau. Le schéma réactionnel est le suivant :

Triglycérides $\xrightarrow{\text{LIPASE}}$ Glycérol + acides gras libres

Glycérol + ATP $\xrightleftharpoons{\text{GK}}$ Glycérol-3-phosphate + ADP

Glycérol-3-phosphate + O_2 $\xrightleftharpoons{\text{GPO}}$ Dihydroxyacétone phosphate + H_2O_2

H_2O_2 + 4-chlorophénol + PAP $\xrightarrow{\text{POD}}$ Quinonéimine (rose) + H_2O

L'absorbance du complexe coloré (quinonéimine), proportionnelle à la concentration en triglycérides dans l'échantillon du sérum est mesuré à 500nm (Trinder P. 1969).

Mode opératoire

Ramener les réactifs et spécimen à température ambiante ; A l'aide d'une pipette, répartir dans les cuves comme récapitulé dans le tableau V ci-dessous ; Bien mélanger et laisser incuber les cuves 5min au bain-marie à 37°C ; Lire la concentration au spectrophotomètre.

Tableau 5: Procédure de dosage des triglycérides

Mesurer dans des cuves bien identifiées	**Blanc**	**Etalon**	**Echantillon**
Réactif	1mL	1mL	1mL
Eau distillée	10µL		
Etalon		10µL	
plasma			10µL

II-3-3 Dosage du cholestérol -total, HDL, LDL

La cholestérolémie a été déterminé suivant la méthode enzymatique CHOD-PAP décrite par Allain C. 1974 et al., selon le schéma suivant :

Cholestérol estérifié $\xrightarrow{CE}$ Cholestérol + Acides gras libres

Cholestérol + $O2^{CO}$ $\longrightarrow$ Cholestène-4-one-3 + H_2O_2

$2H_2O_2$ + Phénol + 4-amino-antipyrine $\xrightarrow{POD}$ Quinonéimine + $4H_2O$

La quinonéimine formée présente une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de cholestérol présent dans l'échantillon du sérum. Cette intensité est mesurée au spectrophotomètre à 500 nm.

Tableau 6: Procédure de dosage du cholestérol

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés	**Blanc**	**Etalon**	**Dosage**
Réactif	1ml	1ml	1ml
Eau déminéralisée	10 µL		
Etalon		10 µL	
Spécimem			10 µL

Mélanger. Laisser reposer 5 minutes a 37˚C ou 10 min à temprerature ambiante. Lire les absorbances à 500nm (480-520) contre le blanc réactif. La coloration est stable une heure.

II-3-4 Les protéines totales

Nous avons évalué les protéines totales du foie. Ceci nous permet de rapporter l'activité enzymatique de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase par unité de masse protéique. Les enzymes étant des protéines. Le dosage colorimétrique du biuret est utilisé. Cette méthode est basée sur la réduction du cuivre Cu^{2+} en Cu^{+} qui réagit avec le tryptophane (Trp, W), la tyrosine (Tyr, Y) et la cystéine (Cys, C). Les protéines donnent une couleur bleue-violette avec le sulfate de cuivre dans un milieu alcalin. L'intensité de la coloration formée, mesurée à 540 nm, est directement proportionnelle à la concentration des protéines totales présentes dans l'échantillon utilisé.

La quantité des protéines dans l'échantillon est exprimée en g/L de l'échantillon. Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du sérum albumine dans les mêmes conditions

Activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase

La mesure de l'activité enzymatique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase fait appel à un dosage enzymatique. Dans cette méthode, la formation de 6-Phospho-gluconate par la G6PDH est couplée à la réduction du $NADP^{+}$ en NADPH, H^{+}. L'apparition de $NADPH^{+}$ à 340 nm est directement proportionnelle au 6-Phosphogluconate formé, lui-même proportionnel à l'activité de la G6PDH. L'augmentation de la densité optique à 340 nm donne l'activité de l'enzyme (1 U correspond à 1 µmole de substrat (glucose) transformé par minute) **(Camus et al, 1969).** Le kit de réactif utilisé est celui du dosage de la G6PDH de BIOLABO de Référence : ref 97089

Le principe de la méthode est résumé comme suit :

Glucose-6-phosphate + NADP+ → 6-phospho-gluconate + NADPH + H^{+}

Le surnageant de la fraction cytosolique précédemment préparé constitue la solution enzymatique. Au tampon réactionnel est constitué de 100mmol/L de tampon tris pH 8,0 ; 10 mmol/L de $MgCl_2$; 0,5mmol/L de EDTA ; 310 mmol/L de $NADP^{+}$ et de conservateur, on ajoute un volume de 50µL de la solution enzymatique. Le volume final du mélange est de 3150 µL.

La réaction est déclenchée par l'adjonction de 100 µL du substrat (de concentration 0,6 mmol/L) c'est-à-dire la solution de Glucose-6-phosphate.

La procédure de dosage a consisté à prélever d'abord dans une cuvette 2.95mL de tampon coenzyme auxquels nous avons ajouté 50 µL de surnageant puis le tout est incubé à 37°C pendant 5minutes. Nous avons déclenché la réaction avec l'ajout à ce mélange de 100 µL de la solution de Glucose-6-phosphate. Nous avons lu l'absorbance initiale après 30secondes puis les autres chaque minute pendant 3mnutes. Ensuite nous avons calculé la moyenne des absorbance par minute (ΔAbs/min). L'appareil utilisé calcule automatiquement l'activité enzymatique exprimée en U/mL (Une **unité internationale** correspond à la quantité qui transforme dans des conditions optimales bien definies

(temperature, pH, quantité de substrat, une micromole de substrat par minute) puis nous la convertissons en mU/mg de protéines. Nous avons, juste après avoir obtenu la fraction cytosolique, procédé au dosage des paramètres sus-indiqués pour essayer d'assurer la linéarité du dosage.

II-3-5 Dosage des transaminases

Méthode dévelopée par Wrobleski et La Due, optimisée par Henry et Bergmeyer, le schéma réactionnel est le suivant :

L-Alanine+2-Oxoglutarate ALT Pyruvate + L-Glutamate

Pyruvate+NADH + H^+ LDH L-lactate + NAD^+

Tableau 7: Procédure de dosage Alanine amino transférase ALAT

Introduire dans une cuve de lecture de 1cm de trajet optique:	
Réactif	1ml
Laisser la température s'équilibrer à 37˚C (30˚C) puis ajouter:	
Spécimen	100µL
Mélanger. Après 1 minute, enregister l'abssorbance initiale à 340nm puis toutes les minutes pendants 3 minutes. Calculer la moyenne des variations d'absorbance (ΔAbs/min)	

- Dosage Aspartame Amino transferase

Méthode développée par Karmen et Al., et optimisée par henry et Al.

Le schéma réactionnel est le suivant:

L-Aspartate + 2Oxoglutarate $\xrightarrow{\text{AST}}$ Oxaloacétate + L-Glutamate

Oxaloacétate + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{MDH}}$ L-Malate + NAD^+

La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^+, et proportionnelle à l'activité AST dans le spécimen, est mesurée à 340nm. L'absence de P5P contribue à une forte amelioration de la stabilité du réactif reconstitué.

Tableau 8: Procédure de dosage de Aspartame Amino Transférase (ASAT)

Introduire dans une cuve de lecture de 1cm de trajet optique:	
Réactif	1ml
Laisser la température s'équilibrer à 37˚C (30˚C) puis ajouter:	
Spécimen	100µL
Mélanger. Après 1 minute, lire l'abssorbance initiale à 340nm puis toutes les minutes pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute (ΔAbs/min)	

Méthode basée sur les travaux de Szasz, Rosalki et Tarlow. Le schéma réactionnel est le suivant:

L-G-Glutamyl-p-nitroaniline GGT L-G-Glutamyl-glycylglycine

+Glycylglycine $\longrightarrow$ +p-nitroaniline

La vitesse de formation du p-nitroaniline, directement proportionnelle à l'activité GGT dans le spécimen, est mesurée à 405nm.

Tableau 9: Procédure de dosage de Gamma glutamyl transférase (GAMMAT GT)

Introduire dans une cuve de lecture de 1cm de trajet optique:	
Réactif	1ml
Laisser la température s'équilibrer à 37˚C (30˚C) puis ajouter:	
Spécimen ou calibrant	50 µL
Mélanger. Après 30 secondes, lire l'abssorbance à 405 nm toutes les minutes pendant 3 minutes. Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute (ΔAbs/min)	

II-4- Histologie

L'histologie permet d'étudier la morphologie des tissus vivants, c'est-à-dire la structure qui était la leur dans l'organisme. Mais pour que cette étude soit réalisable, il faut immobiliser le tissu dans un état aussi proche que possible de l'état vivant : c'est pourquoi on procède à leur fixation.

La Fixation

La fixation agit sur les molécules qui composent les tissus. Cette action a deux facettes qui, à certain égard, peuvent paraître contradictoires.

La première est l'inaction des molécules qui pourrait changer la morphologie tissulaire (par exemple les enzymes).

La seconde qui consiste en la préservation de l'intégrité chimique des tissus, ce qui permet de faire la relation entre leur morphologie et leur chimie ; comme on le sait, la morphologie d'un tissu est fonction de sa constitution chimique, et toute modification de celle-ci est susceptible d'affecter celle-là. Cette immobilisation de la structure des tissus les préserve (inhibition de l'autolyse tissulaire, inhibition de la putréfaction des tissus), mais les rends capable de supporter les manipulations préparatoires à la confection des spécimens histologiques. La fixation ici se fait par immersion dans le formol. On immerge le tissu dans un volume adéquat de liquide fixateur. Il est important de ne jamais verser le liquide sur le tissu

(ce qui peut causer des déplacements de substances), mais plutôt de plonger le tissu dans une quantité de liquide déjà préparé. Le formol est utilisé en solution aqueuse à 10% (4% de formaldéhyde).



Figure: 11 : Etape de la fixation Immersion dans le formol

La Circulation

Elle suit trois étapes pendant lesquelles, les tissus sont contenus dans des cassettes tissue-tek III. Les cassettes tissue-tek III : ces cassettes sont des contenants qu'on ferme grâce à une plaquette de plastique (tissue-tek III).



Figure 12 : les tissus dans des cassettes tissue-tek III

Ces trois etapes sont:

- Déshydration
- Eclaircissement
- Imprégnation

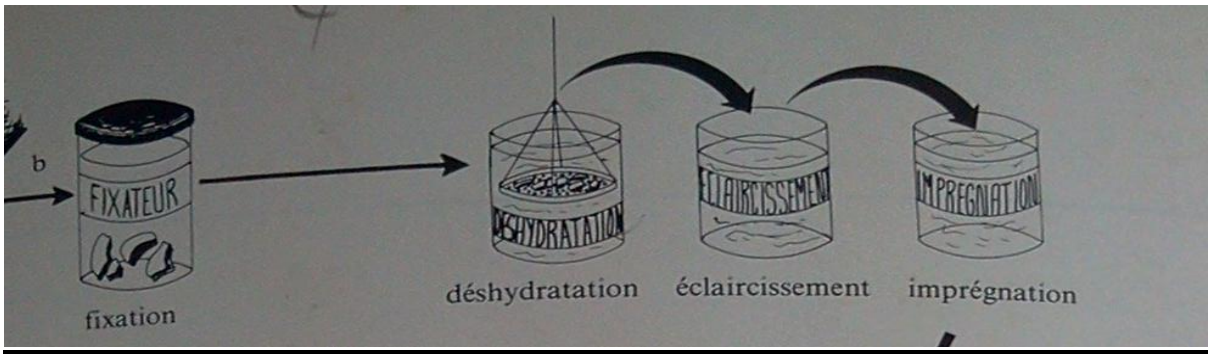


Figure 13 : différentes étapes de la circulation

- **La déshydratation**

C'est la première étape de la circulation proprement dite. Elle consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient (puisque la plupart des fixateurs sont des mélanges aqueux). L'agent déshydratant choisi ici : l'éthanol, n'est miscible qu'à l'eau ; et dans ce cas, on utilise un second liquide intermédiaire : le xylène.

L'éthanol présente une grande miscibilité à l'eau et provoque une forte réaction et un durcissement assez important du tissu. Cette étape consiste au passage des tissu dans huit bains d'éthanol de degré croissant : 70° ; 80° ; 90° ; et cinq bains de100° d'une durée de quarante-cinq minutes. Pour que la déshydratation soit la plus complète possible, il faut que les derniers bains contiennent l'éthanol à l'état pur. Il faut procéder graduellement et avec prudence car, si l'on transfère le tissu directement du formol à un bain d'éthanol absolu, la rétraction survient trop rapidement et entraîne une certaine distorsion des structures. L'éthanol n'étant pas miscible avec la paraffine il est utile d'utiliser un liquide intermédiaire miscible avec la paraffine: le xylène, c'est l'éclaircissement.

L'Eclaircissement

La technique de l'éclaircissement s'apparente étroitement à celle de la déshydratation sauf qu'ici le solvant est le xylène. Il consiste au passage dans trois bains de xylène de 45 min chacun.

L'imprégnation

Elle est l'étape terminale de la circulation ; en fait, les deux autres étapes n'existent que dans la mesure où elles préparent le tissu à subir l'imprégnation. L'agent le plus fréquemment

utilisé pour ce faire est la paraffine. Elle consiste au passage successif des tissus dans trois bains de paraffine de 45min.

L'enrobage

L'étape de l'enrobage suit celle de la circulation. Elle consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc fait de milieu d'inclusion. Les blocs ont été obtenus suivant le processus ci-après :
La pièce biopsique introduite dans la paraffine est positionnée selon l'architecture structurale que l'on veut observer ultérieurement.
La face sur laquelle nous allons réaliser les coupes est orientée vers le fond du moule métallique ;
La paraffine fondue est coulée sur le tissu ainsi orienté dans le moule servant de support au bloc avant sa solidification.
Le moule métallique est surmonté de la cassette d'inclusion en matière plastique qui est mise en contact avec la paraffine encore liquide par la face postérieure de sa base (la cassette s'adapte au porte bloc du microtome).
La paraffine est solidifiée sur une plaque réfrigérante de 3°C à 4°C pendant quelques minutes.
Après solidification, le moule a été débarrassé du bloc. Ainsi, nous obtenons un bloc prêt à la coupe.

Ce bloc est plus facile à manipuler que le tissu seul : on peut l'attacher à la pince porte-objet du microtome sans briser la pièce ; y inscrire visiblement le numéro d'identification de la pièce ; enfin, l'entreposer.

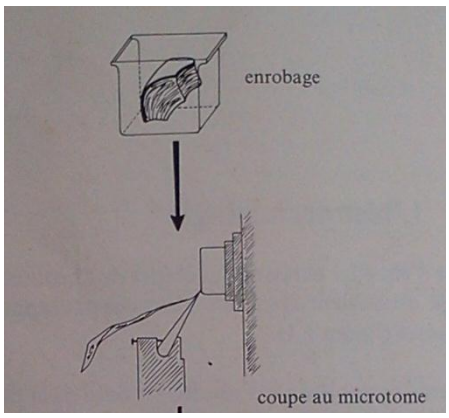




Figure 14: Enrobage et coupe au microtome

Confection de rubans grâce au Microtome

C'est une étape qui consiste à faire des coupes d'une épaisseur de l'ordre de 5 micromètres (µm) à l'aide d'un microtome qui possède un porte bloc où place le bloc de paraffine. Ici le microtome utilisé est le « 820 »Spencer microtome. Le bloc ou son support est introduit dans la pince à objet et immobilisé grâce à la vice de blocage, qui ne doit pas être serrée trop fortement.

Le tissu étant toujours recouvert d'une mince couche de paraffine il faut avant d'obtenir des couples utiles l'enlever grâce à l'opération appelée rabotage. Pour le faire le microtome a été réglé à 10µm.



Figure 15 : Le microtome

L'un des grands avantages de la paraffine tient au fait que, sous l'action de la chaleur produite par le frottement avec le rasoir, elle fond légèrement, ce qui permet aux coupes d'adhérer les unes aux autres et de former un ruban. Ce phénomène facilite grandement l'obtention et la manipulation d'un grand nombre de coupes à partir d'un même bloc**.**



Figure 16: Confection de rubans grâce au Microtome

Etalement des rubans de coupe

On utilise une plaque chauffante (chauffée à 55°C) sur laquelle on dépose les lames préalablement marquée que l'on recouvre d'eau gélatineuse qui est ici le liquide d'étalement. On y place les coupes, puis on les étale. A la fin de l'opération, on absorbe l'excès de liquide avec un papier buvard. Puis, les lames sont séchées à l'étuve dont la température est portée à 55°C pendant 30minutes (min).

Coloration des lames

Le procédé de coloration des coupes à la paraffine comporte trois temps. Il y a : d'abord les étapes préparatoires à la coloration subdivisée en deux volets : le déparaffinage et l'hydratation ; Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Il consiste à passer les coupes dans deux bains de xylène, pendant 5 minutes chaque fois.

L'hydratation a pour objet de préparer le tissu à recevoir l'eau. En effet, le xylène est retiré du tissu et remplacé par l'eau grâce, au passage dans 5 bains de 5min chacun de l'éthanol à concentrations décroissantes (deux bains d'éthanol absolu suivi de trois bains d'éthanol à 90, à 80, et à 70%). On termine l'hydratation par un séjour de 10 min dans l'eau courante.
Puis, celles de la coloration proprement dite grâce à la méthode à l'Acide Périodique-Schiff (APS).

Principe

Aussi appelée réaction de Hotchkiss-McManus, la méthode à l'acide periodique-Schiff est basée sur deux découvertes différentes : la réaction de Malaprade (1928), où on utilise l'oxydation par l'acide périodique pour transformer des groupes glycol en aldéhyde ;
la leucofuchsine de Schiff (1966), solution de fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux, qui réagit avec les aldéhydes libres pour produire une coloration rouge.

Mode Opératoire

Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet (10minutes) ;

Rincer à l'eau distillée ;

Oxyder avec l'acide périodique à 1% (15minutes) ;

Laver à l'eau courante (10minutes) ;

Rincer à l'eau distillée ;

Colorer avec le réactif de Schiff préalablement filtré avec deux filtres Whatman n°1 (15minutes) ;

Passer dans l'eau sulfureuse pour enlever le réactif en excès (3bains de 2 minutes chacun) ;

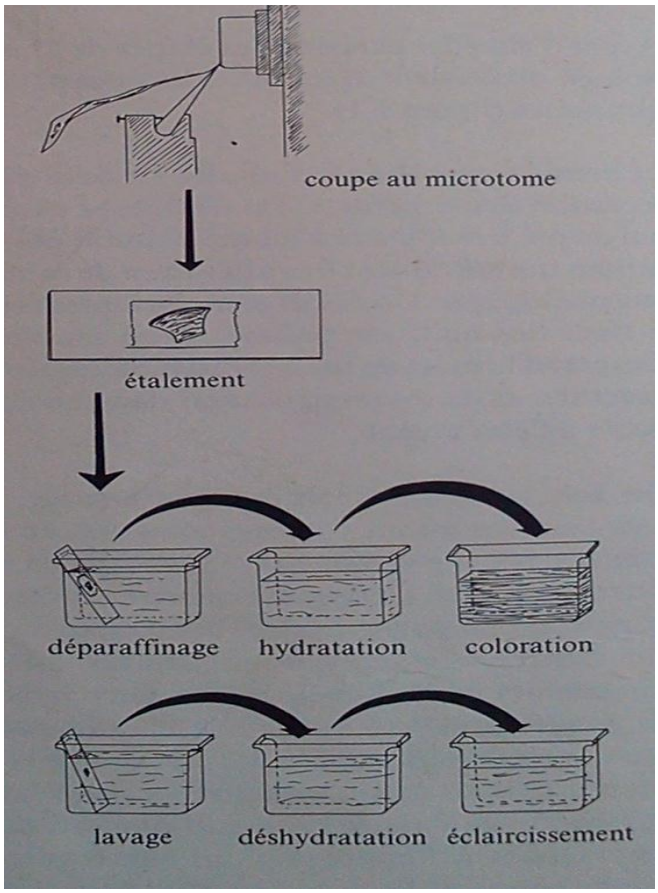
Laver à l'eau du robinet (10minutes) ;

Colorer les noyaux avec l'hématéine de Harris (30 minutes) ;

Laver à l'eau de robinet (10minutes) ;

Déshydrater, éclaircir et monter à l'Eukitt**]**.

Substances positives à l'APS : rose à rouge-pourpre
Noyau : bleu
Fond : teinte vert pâle
Et, enfin, les étapes préparatoires au montage: déshydratation, éclaircissement.



<u>Le montage</u>

Il se fait grâce à l'Eukitt.

<u>Lecture des lames</u>

Elle s'est faite au microscope doté de caméra relié à un ordinateur servant à capturer les photos.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I- RESULTATS

I-1 Résultats du screening phytochimique

Les différents test réalisées nous ont permis de résumer les résutats dans le tableau suivant:

Nous avons des tanins, des tanins catéchiques, des leuco-anthocyane qui ont pour groupe chimique des composés polyphénoliques qui sont très abondant dans l'extrait de *Khaya senegalensis.*

Les saponosides sont aussi très abondant et l'indice de mousse est 4, les stéroïdes sont très peu. O-Hétérosides à génines réduites qui ont pour groupe chimiques les dérivés anthracéniques sont peu abondants.

Tableau 10: Résultats du screening phytochimique

Groupes chimiques	**Sous-groupes**	**Observation**
Composés polyphénoliques	Tanins	+++
	Tanins catéchiques	+++
	Anthocyanes	++
	Leuco-anthocyane	+++
Saponosides	Saponosides Indice du mousse est 4	+++
Stéroïdes	Stéroïdes	+
Dérivés anthracéniques	O-Hétérosides à génines réduites	++

+++ Abondant ++ Peu abondant + Faible

I-2 Doses de 0 mg/kg --10 mg/kg-- 25 mg/kg --50 mg/kg de poids corporelle sous l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*

Nous avons travaillé avec un groupe témoins ayant reçu de l'eau distillé (0mg d'extrait de K.s.) et quatre doses diffèrentes de l'extrait de *khaya senegalensis* (**10** mg/kg-- **25** mg/kg **--50** mg/kg).

Dans un premier temps les prélèvement ont été effectuer avec un intervalle de 15 jours et sur une période de 30 jours et par la suite sur 24 heures avec un intervalle de 6 heures.

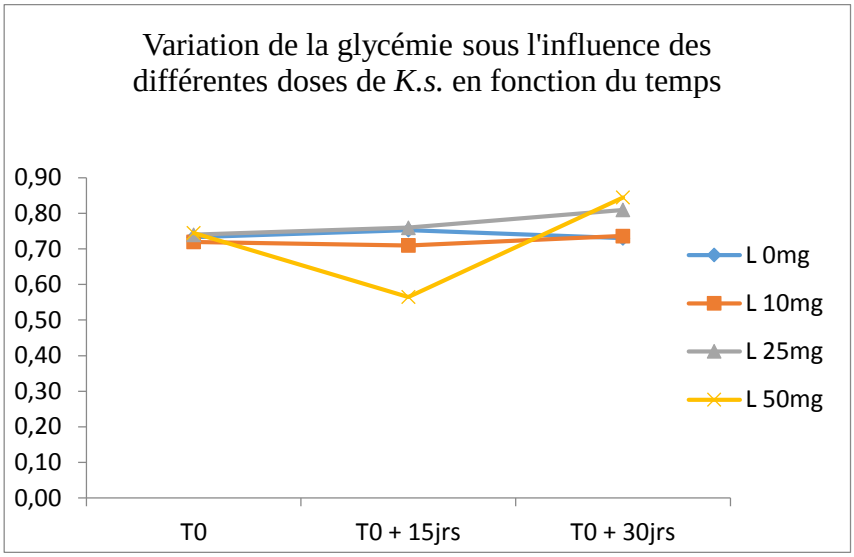


Figure 17: courbe montrant la variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en fonction du temps

Chez les lots de lapins normo glycémiques traité par l'extrait, on a constaté que :

L'administration quotidienne de **10mg/kg** de poids corporelle (PC) d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin a diminué de 5,75% la glycémie après quinze jours. Au au trentième jour la glycémie revient à la hausse.

L'administration quotidienne de **25mg/kg** de PC d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin a augmenté la glycemie de 0,88% après quinze jours et de 10,96% au trentième jour.

L'administration quotidienne de **50mg/kg** de PC d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin a diminué de 25% la glycémie après quinze jours mais, augmenté de 15,75% au trentième jour (figure 17).

%de réduction = [VT - VE/VT].100

VT= valeur du témoin

VE= valeur sous la dose d'extrait

Cependant, l'analyse statistique de ces résultats n'a révélé aucune différence significative au seuil de 5%.

En vue de comprendre le moment d'où la baisse a commencé, des dosages ont été effectué chaque six heures pendant 24h.

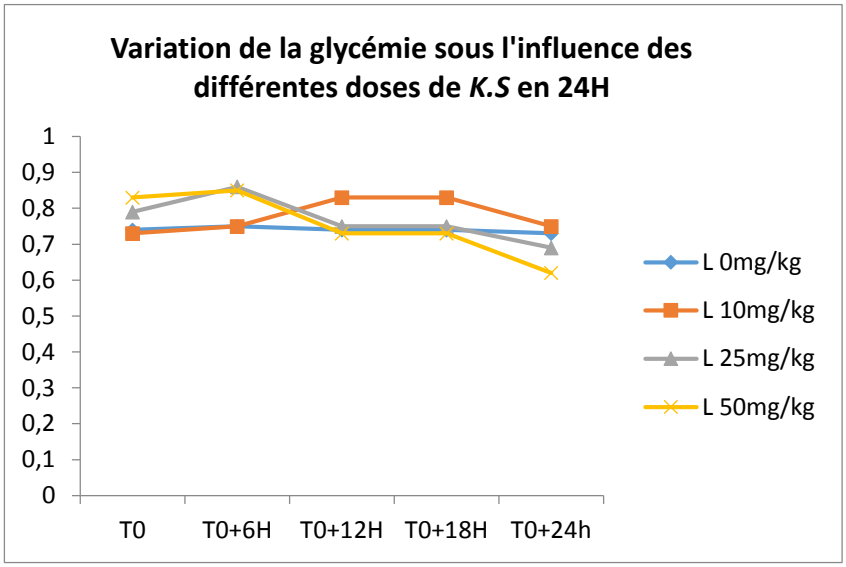


Figure 18: courbe montrant la variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en 24h

L'administration de 10mg d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* n'entraîne pas de modification significative de la glycémie. Par contre, l'administration de 25mg et 50mg d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* entraîne respectivement une diminution de 12,66%, 25,30% de la glycémie après 24h (figure 18).Aussi, l'analyse statistique de ces résultats n'a révélé aucune différence significative au seuil de 5% sauf pour la dose 50mg pour laquelle, il existe une différence significative au seuil de 5%

Les triglycérides ont été dosés dans les même condition que le glucose. Les résultats obtenus ont permis de tracer les courbes suivantes.

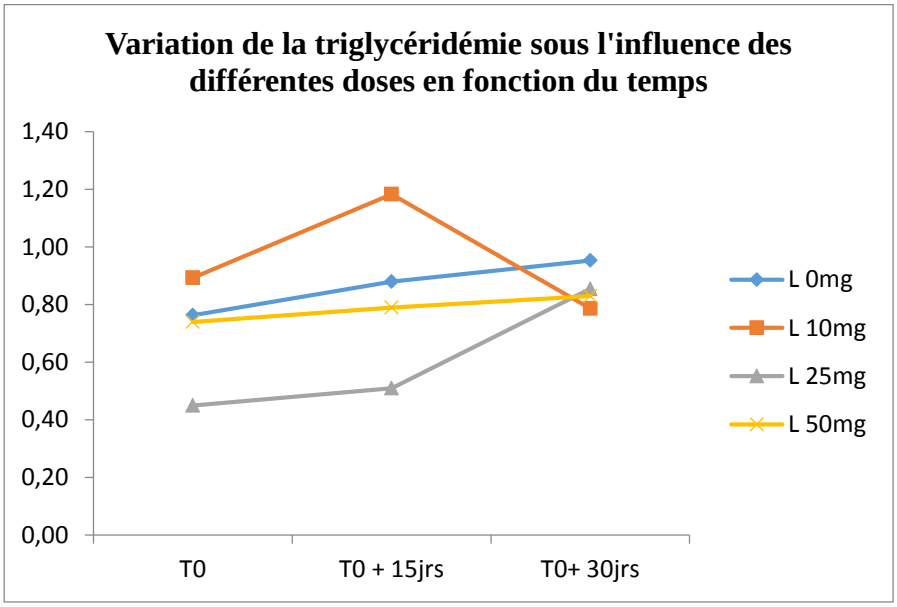


Figure 19: courbe montrant la variation de la triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en fonction du temps

L'administration de 10mg d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* entraîne une diminution de 11,94% de la triglycéridémie. Par contre, l'administration de 25mg et 50mg d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* entraîne une augmentation respectivement de 90% et de 12,16% de la triglycéridémie (figure19). L'analyse statistique des résultats n'a révélé aucune différence significative.

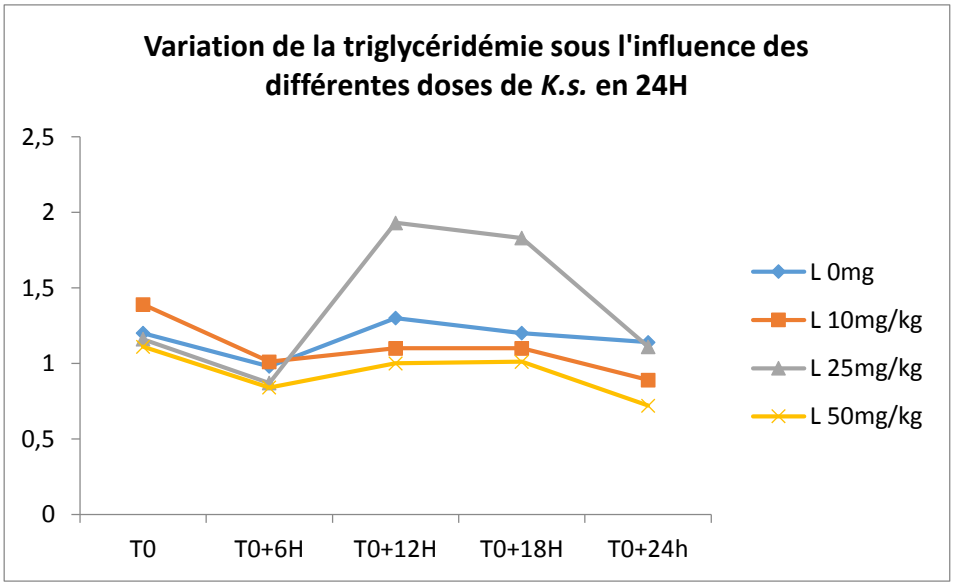


Figure 20: courbe montrant la variation de la triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de *K.S* en 24H

L'administration de différentes doses d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin n'entraîne pas de modification significative de la triglycéridémie toutes les six heures en pendant 24H. Elle a diminué respectivement de 21,93% de 2,63% et de 36,84% pour les doses 10mg, 25mg, 50mg /kg de PC (figure 20) par rapport au lot témoin.

Cependant, l'analyse statistique de ces résultats n'a révélé aucune différence significative au seuil de 5%.

Nous avons aussi dosé les cholestérols dans nos différents echantillons. Ce qui nous a permi d'obtenir les graphes suivants:

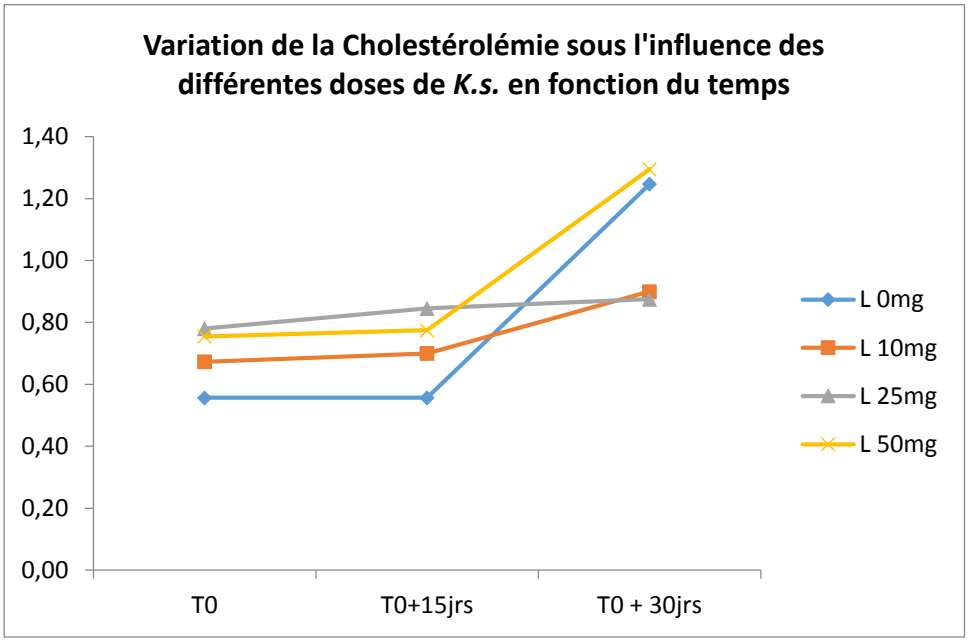


Figure 21: courbe montrant la variation de la cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de *K.s.* en fonction du temps

L'administration de différentes doses d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin n'entraîne pas de modification significative de la cholestérolémie pendant les trente jours d'essai. Après 30 jrs, le pourcentage de réduction de la cholestérolémie par rapport au lot témoin est respectivement de 27,81% de 29,81% et de -3,88% pour les doses 10mg, 25mg, 50mg (figure21).

Cependant, l'analyse statistique de ces résultats n'a révélé aucune différence significative au seuil de 5%.

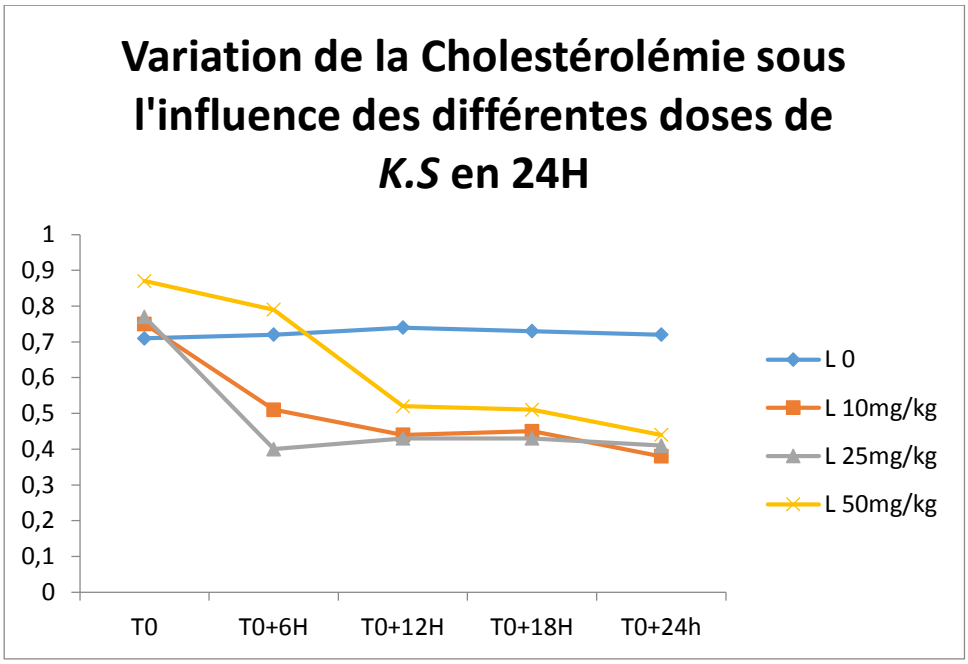


Figure 22: courbe montrant la variation de la Cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de *K.s.* en 24H

N.B : Après une semaine après le début de l'essai, un des lapins de la dose 50 est décédé ; et deux semaines avant la fin de l'essai un des lapins recevant la dose 10mg/kg est aussi décédé.

La cholestérolémie chez les lapins normoglycémiques après gavage d'eau distillée ou de différentes doses d'extraits éthanoïques de *Khaya senegalensis* en 24H montre qu'à partir de T0+6H la cholestérolémie amorce une baisse, qui s'accentue à T0+12H, puis continue à baisser lentement. A T0+24H, le pourcentage de réduction de la cholestérolémie par rapport au lot témoin est respectivement de 47,22% de 43,06% et de 38,89% pour les doses 10mg, 25mg, 50mg (figure 13)

Nous avons travailler sur des lapins normaux et avons évaluer les paramètes biochimiques comme la glycémie les triglycérides le cholestérol sur une période de 30 jours puis sur une durée de 24heures.

Les résultats précédent ont fait naître des interrogations. Celles de savoir quelle serait l'influence de *Khaya senegalensis* sur les lapins en condition d'hyperglycémie temporaire.

Résultats sur les différents dosages des paramètres biochimiques des lapins en hyperglycémie temporaire aux doses 10mg 25 et 50mg/kg de poids corporelle

Résultats Glycémie aux doses 10mg, 25mg et 50mg/kg de poids corporelle

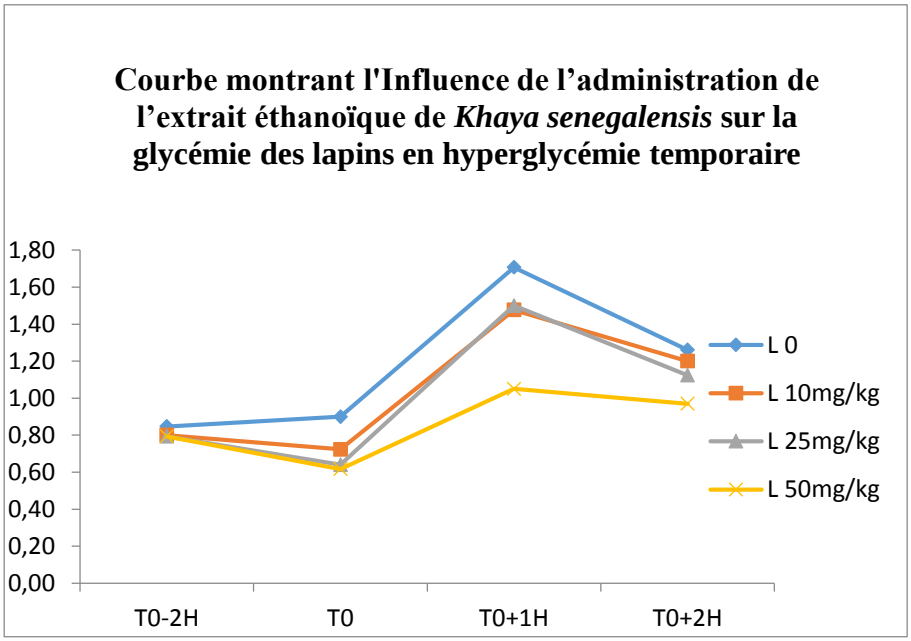


Figure 23: Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* sur la glycémie des lapins en hyperglycémie temporaire

L'épreuve de HyperGlycemie Provoquee par voie Orale HGPO, entraîne une augmentation significative de la glycémie à partir de 60 min, un prétraitement par l'extrait éthanoïque aux doses 10- 25et 50mg/kg de PC prévient de façon significative le pic hyperglycémique observé lors de l'HGPO (, figure 23).

Pour le Lot témoin : Lot 0mg/kg

- L'administration de 2g de glucose entraîne en 60 minutes une augmentation significative de la glycémie allant jusqu'à 1,71g/l ;
- à la 120è minute, la glycémie baisse et atteint 1,26g/l soit une baisse de 26,17 % par rapport à la 60è minute.

Pour le lot 10mg/kg :

- 10 mg d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* abaisse la glycémie de 13,48% par rapport aux lapins soumis uniquement à la surcharge de glucose à la 60è minute.
- à la 120è minute, la baisse de la glycémie continue et est de 4,76% par rapport au témoin.

Pour le lot 25mg/kg :

- 25 mg d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* abaisse la glycémie de 12,11% par rapport au témoin à la 60è minute.

- à la 120è minute, la glycémie est de 1,12g/l, ce qui équivaut à une diminution de 10,85% par rapport au lot témoin.

Pour le lot 50mg/kg :

- 50 mg d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* abaisse considérablement la glycémie de 38,48% par rapport au témoin à la 60è minute.

- à la 120è minute, la glycémie est de 1,12g/l, ce qui équivaut à une diminution de 23,02% par rapport au lot témoin.

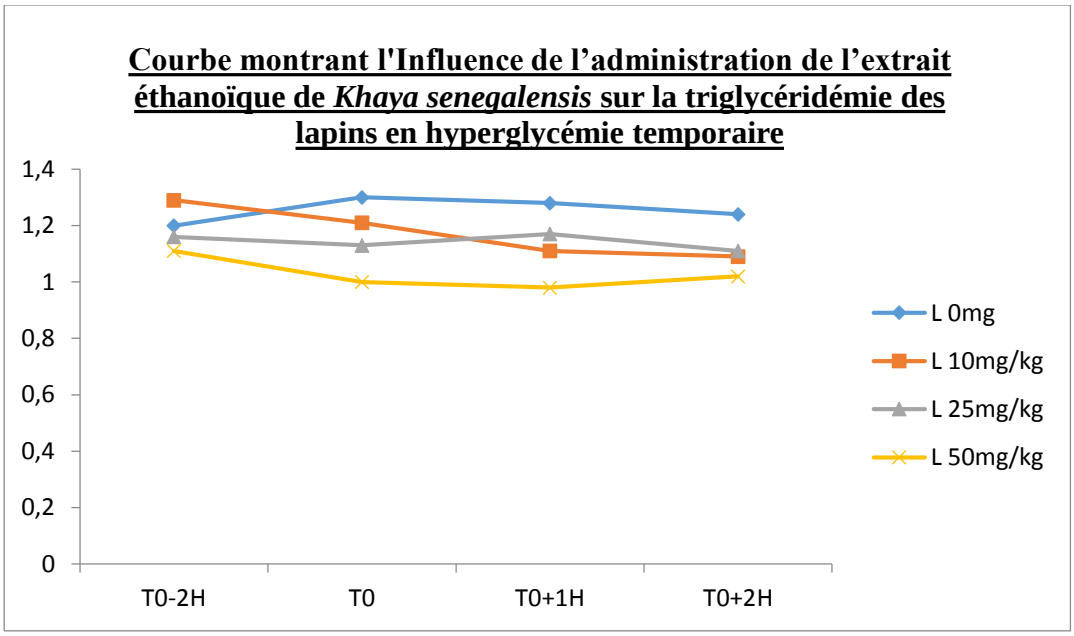


Figure 24: Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* sur la triglycéridémie des lapins en hyperglycémie temporaire

Influence de l'administration de l'extrait éthanoïque de Khaya senegalensis sur la triglycéridémie (en g/l) des lapins en hyperglycémie temporaire

Les résultats montrent que les concentrations sériques des triglycérides ont été très voisines chez les quatre lots expérimentaux tout au long de la durée d'expérimentation (figure 15).L'étude statistique de ces résultats n'a révélée aucune différence significative.

Résultats glycémie aux doses 10mg, 25mg et 50mg/kg de poids corporelle

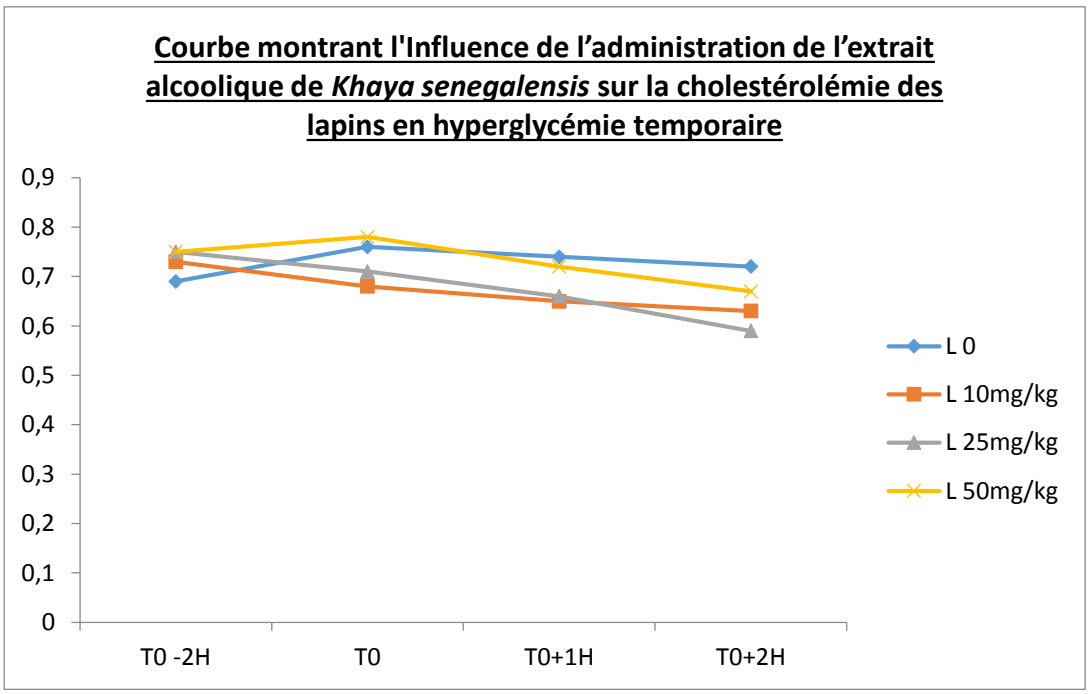


Figure 25: Courbe montrant l'influence de l'administration de l'extrait alcoolique de *Khaya senegalensis* sur la cholestérolémie des lapins en hyperglycémie temporaire

Influence de l'administration de l'extrait éthanoïque de Khaya senegalensis sur la cholestérolémie (en g/l) des lapins en hyperglycémie temporaire

L'administration de différentes doses d'extrait éthanoïque de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin n'entraîne pas de modification significative de la cholestérolémie avant la surcharge en glucose. Une heure après cette l'administration de la surcharge de glucose, la cholestérolémie amorce une baisse. Le pourcentage de réduction de la cholestérolémie par rapport au lot témoin est respectivement de 27,81% de 29,81% et de -3,88% pour les doses 10mg, 25mg, 50mg (figure16).

Cependant, l'analyse statistique de ces résultats n'a révélé aucune différence significative au seuil de 5%.

I-3 Histologie au doses de 0 mg/kg --10 mg/kg-- 25 mg/kg --50 mg/kg de poids corporelle sous l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*

Nous avons réaliser des coupes histologiques sur des coupes de rein et de foie de

Sur une coupe de foie de lapin n'ayant reçu aucun traitement, on n'observe aucune modification. Le veine centrolobulaire , les travées hépatiques, les sinusoïdes veineux sont normaux.

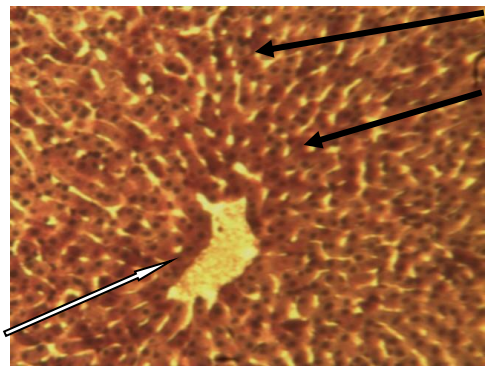


Figure 26 : Coupe de foie d'un lapin sans traitement (témoin 0 mg de K.s/Kg de PC) La veine centrolobulaire (flèche non pleine) et les travées hépatiques (flèches) ont un aspect normal. Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

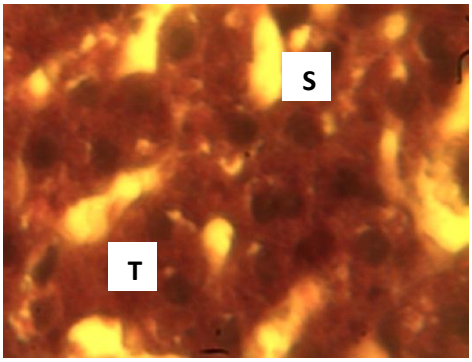


Figure 27: Coupe de foie d'un lapin sans traitement. Les travées hépatiques (T) et les sinusoîdes veineux (S) sont normaux. Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200)

Pour les lapins ayant reçu la dose de 10 mg/kg de PC et 25 mg/kg de PC de *K.s.* nous n'observons pas non plus des modification au niveau tissulaire. Les coupes histologiques sont normaux.

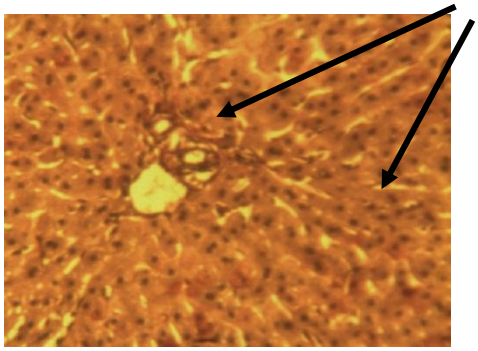


Figure 28: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de10 mg de K.s./Kg de PC
Les hépatocytes (flèches) sont quasi normaux. L'espace de Disse est normal.Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

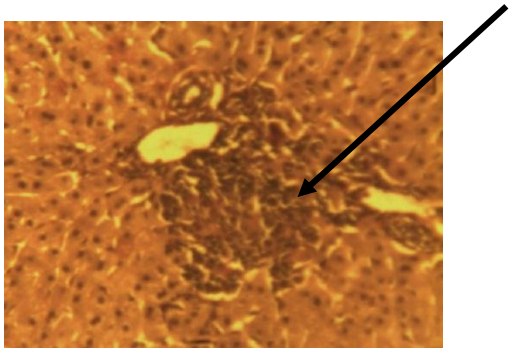


Figure 29 Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de K.s./Kg de PCLes hépatocytes (flèches) sont quasi normaux. L'espace de Disse est normal.On note parfois la présence de nombreux cellules dans le tissu conjonctif de la veine centrolobulaire (flèche) Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

Les coupes histologiques aux doses de 25 mg de *Ks*/kg et 50 mg de *K.s.* présentent quelques anomalies que l'ont peu observées sur les figures suivantes:

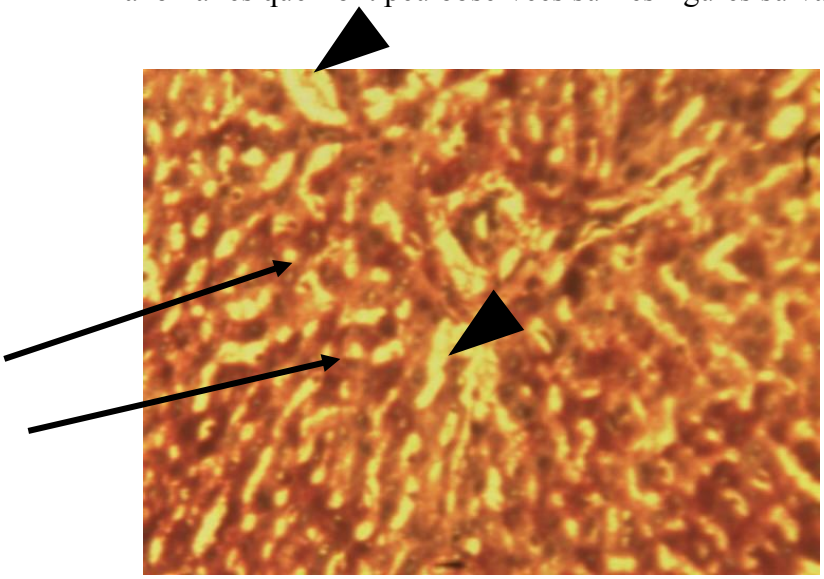


Figure 30: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de K.S/Kg de PC

Les hépatocytes (flèches) sont quasi normaux.
L'espace de Disse parait plus dilaté (têtes de flèches).
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

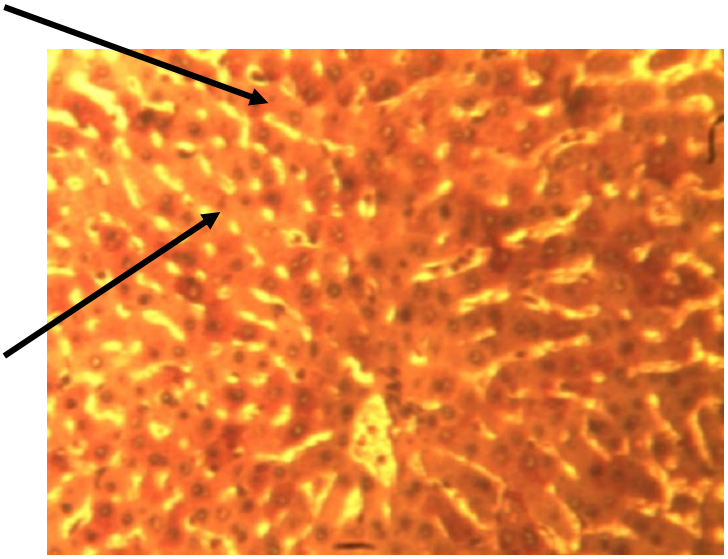


Figure 31: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC

Des hépatocytes ont un noyau pycnotique (flèches).
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

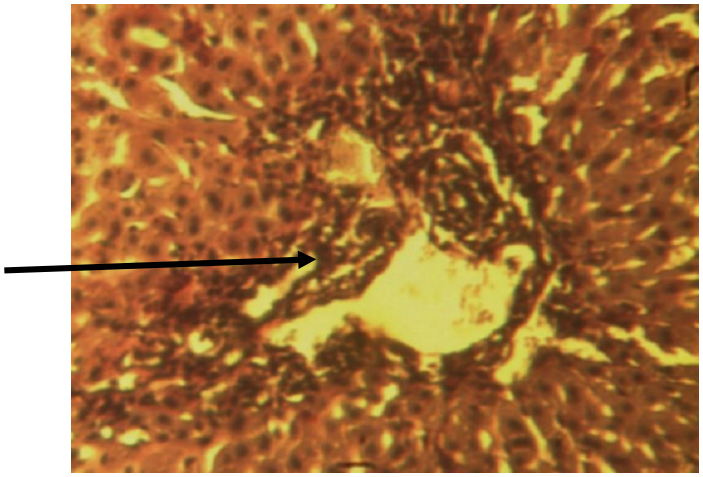


Figure 32 Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC

Les hépatocytes sont quasi normaux. On note parfois la présence de nombreux cellules dans le tissu conjonctif de la veine centrolobulaire (flèches) Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X

Les coupes histologiques ont été réalisées aussi sur des reins des lapins ayant reçu différentes doses de *K.s.*

Sur les coupes de reins de lapins temeoins ayant recu de l'eau distillée et pas l;extrait de Ks. Nous ne remarquons aucune anomalies. Mais a partir de 10mg de K.s /kg de PC sur les reins on observe des anomalies.

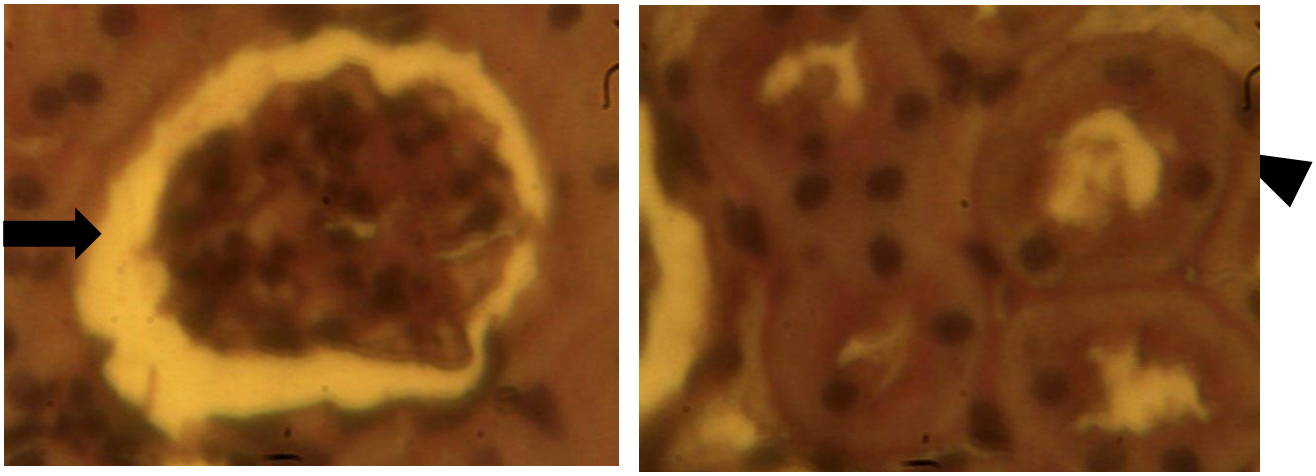


Figure 33: Coupe de rein d'un lapin sans traitement montrant un glomérule normal flèche pleine) et des tubules normaux (têtes de flèches). Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 400)

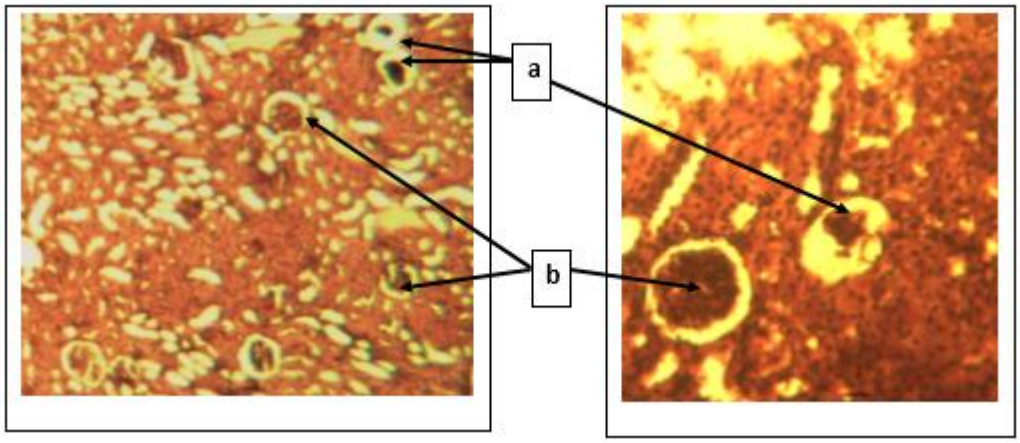


Figure 34 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de K.S/Kg de PC

Les glomérules rénaux normaux sont désignés en (a) et les anormaux en (b). Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 40)

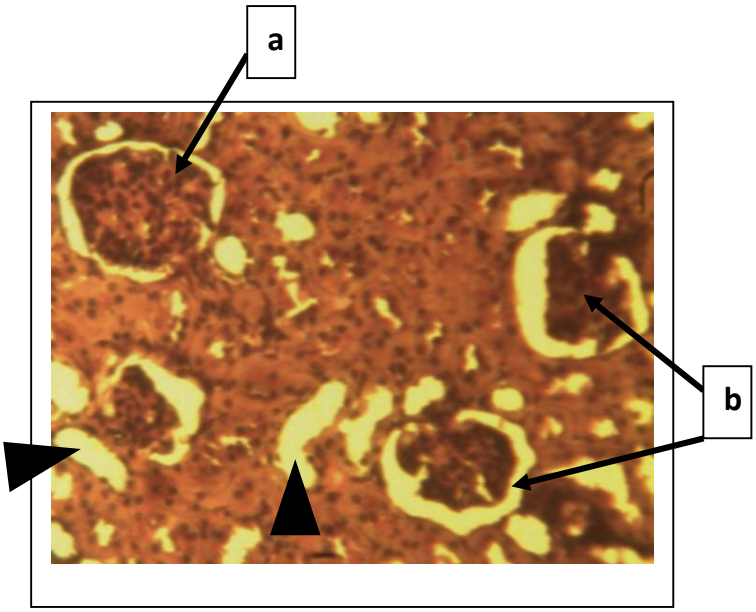


Figure 35 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de K.S/Kg de PC

Le glomérule rénal normal est désigné en (a) et les quasi normaux en (b).
Les tubes rénaux paraissent dilatés par endroit (têtes de flèches).
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

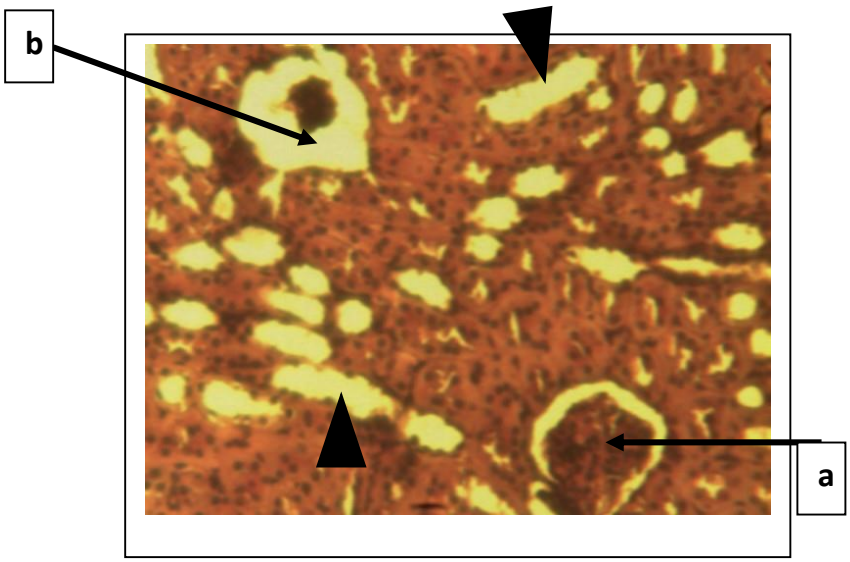


Figure 36: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC

Le glomérule rénal normal est désigné en (a) et l'anormal en (b)
Les tubes rénaux paraissent dilatés par endroit (têtes de flèches).
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

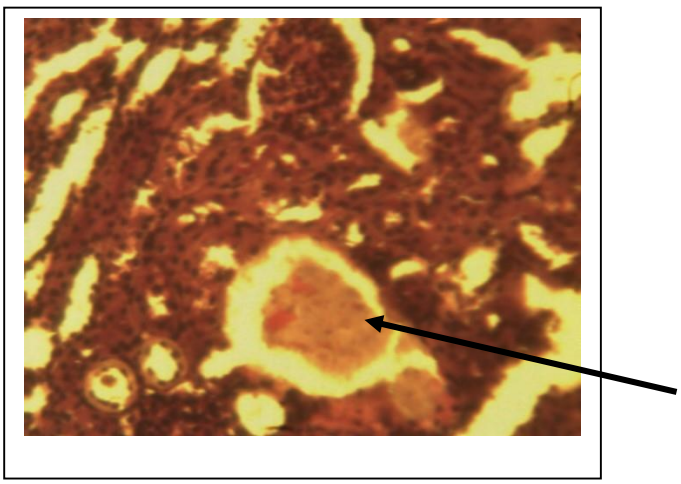


Figure 37: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC Montrant un glomérule rénal en voie de destruction (flèche) Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

Les coupes histologiques ne montrent aucune atteinte sur le foie des animaux témoins ayant reçu seulement de l'eau distilée. Les travées hépatique et les sinusoïde veineux sont normaux. A la dose de 10mg/kg de PC l'espace de Disse paraissent normaux. A l'administration d'une dose plus elevées c'est a dire 25mg/kg de PC on observe l'espace de DISSE qui parait plus dilaté.La coupe du foie à la dose de 50mg/kg de PC de nombreuses cellules dans le tissus conjonctif de la veine centrolobulaire.

Sur les coupes histologique de rein, nous n'observons aucune anomalie. C'est aux doses 10mg/kg de PC et 50mg/kg de PC qu'apparaisse des glomérules anormaux et des tubes rénaux dilatés. Sur l'une des coupes à 50mg/kg de PC on remarque un glomerule en voie de destruction. Tout ceci étant des signes d'une atteinte hépatique et rénale.

Après avoir travailler avec les doses de 0, 10, 25, 50 mg de K.s. /kg de PC, nous avons reduit ses doses au dizième pour savoir si a ses petites doses nous pouvions observées deja des atteintes d'ordre hépatique ou rénales. Nous avons donc travailler avec les doses de **0- - 0,5 -- 1-- 2,5 -- 5** mg de K.s. /kg de PC

	Doses en mg de K.s. /kg de PC							
Première partie	0					10	25	50
Deuxième partie	0	0,5	1	2,5	5			

I-4 Doses 0 mg/kg --0,5 mg/kg - 1 mg/kg - 2,5 mg/kg - 5 mg/kg de poids corporelle sous l'extrait éthylique de Khaya senegalensis

Sur les doses de **0- - 0,5 -- 1-- 2,5 -- 5** mg de K.s. /kg de PC nous avons réaliser les paramètres biochimiques fait précédemment mais en plus nous avons doses les transaminases (ALAT, ASAT, GAMMAT GT)

La figure suivante résume les résultats par rapport aux paramètres biochimiques

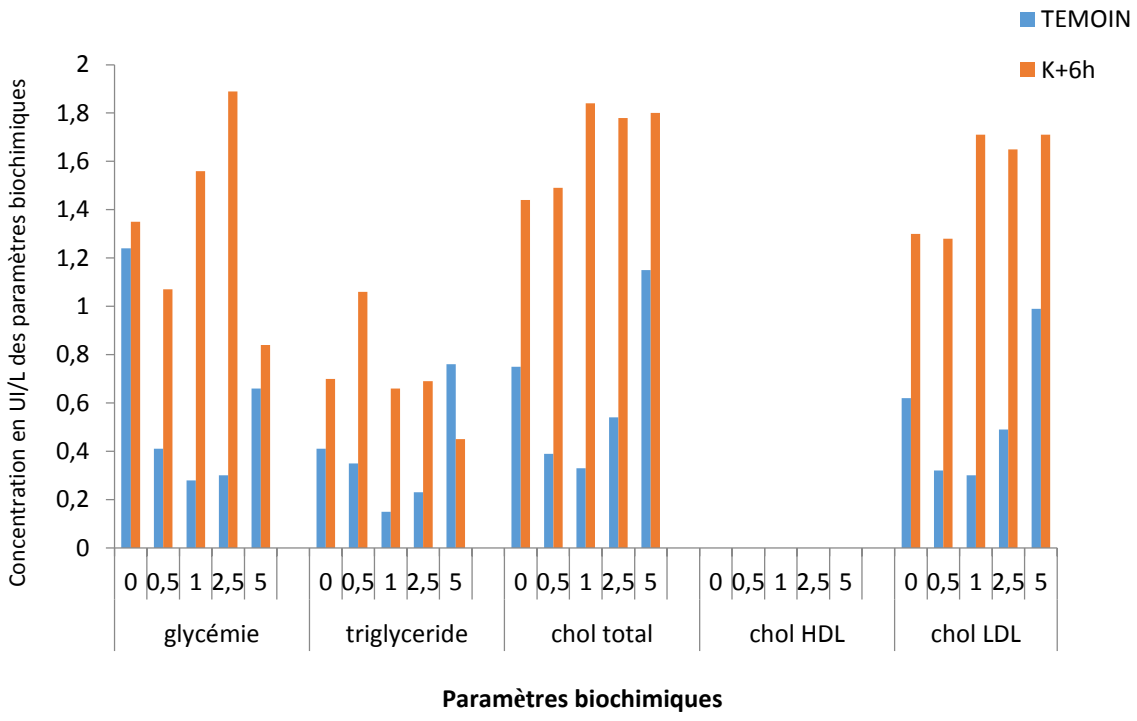


Figure 38:Quelques paramètres biochimiques sur les lapins.

On note une augmentation après 6h en présence de Khaya senegalensis de tous les parametres biochimiques sauf celui de HDL.

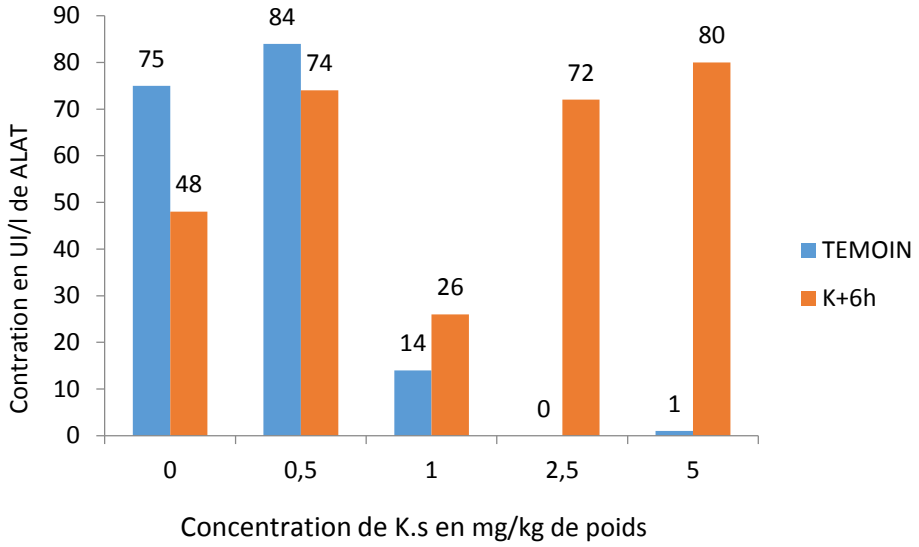


Figure 39: Concentration de l'ALAT chez les lapins

Six heures apres l'administration de l'extrait de K.s. sur les doses de 0,5 et1 mg/kg de PC de K.s. nous n'observons pas de changement sur la concentration l'alanine amino transférase alors qu'aux doses de 2,5 et 5 les concentrations sont plus elevées.

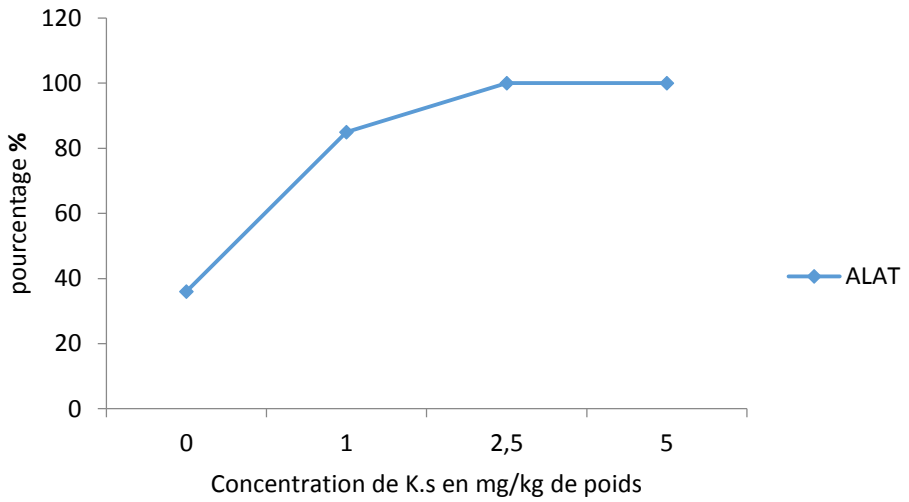


Figure 40: variation de l'activité de l'ALAT

La courbe de la variation du taux d'ALAT sous l'effet de K.s. montre une courbe hyperbolique. Cette concentration augmentre par rapport au temps avant d'atteintre un plateau.

Nous avons par la suite procédé aux dosages de l'aspartame amino transférase. Ce qui nous a permi d'obtenir la figure suivante:

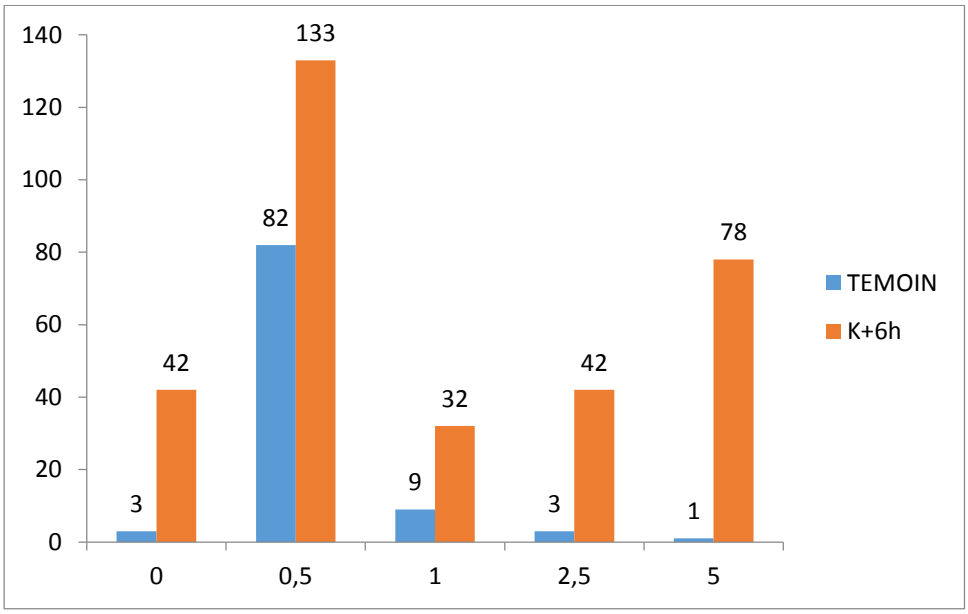


Figure 41: Concentration de K.s. en fonction du temps

Les valeurs de concentration de ASAT sous l'effet de khaya s. ont augmenter par rapport aux valeurs témoins.

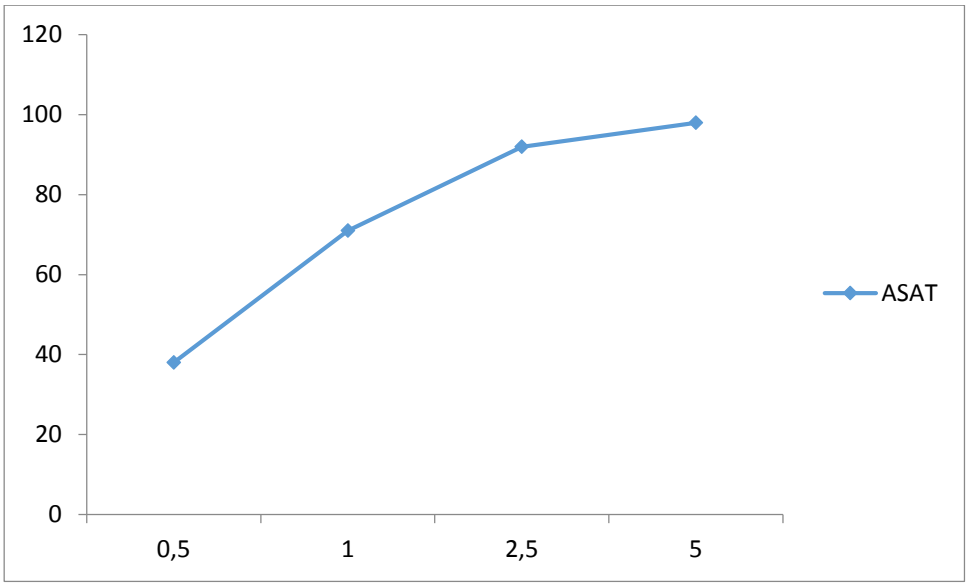


Figure 42: variation de la concentration d'asat en fonction du temps

Nous avons aussi tracé la variation de la concenration en ASAT

Gama gt

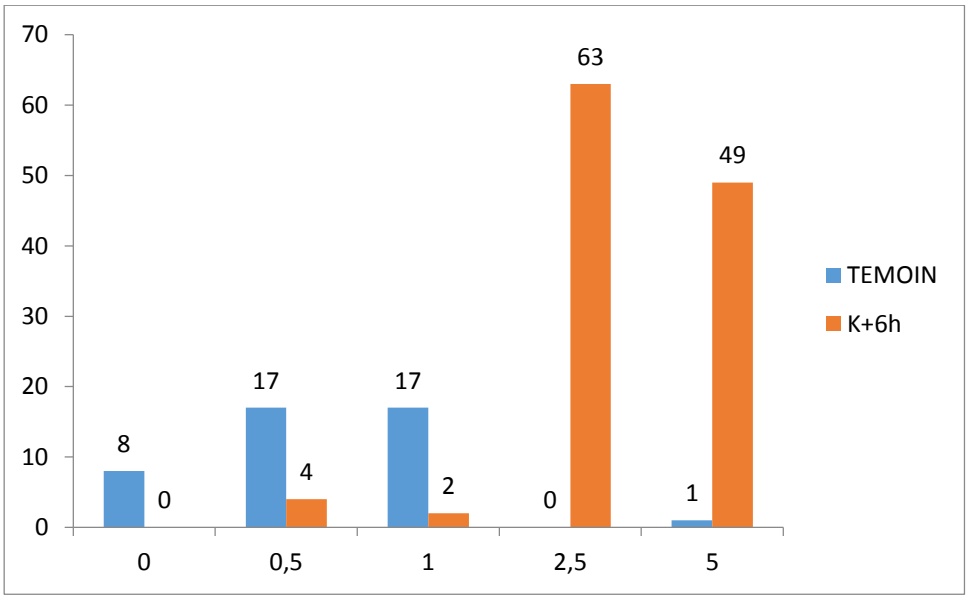


Figure 43: concentration de gamma GT en fonction du temps

Les valeurs témoins a T0 ont ete prises. Six heures après l'administration de khaya senegalensis la concentration en gammat GT a significativement augmenter surtout aux doses 2,5 et 5 mg/kg de PC.

I-5 Histologies aux doses de 0 0,5 1 2,5 5 mg/kg de poids de khaya

Des coupes histologie de foie et de rein ont été faites pour évaluer les conséquences sur ces deux organes. Vue les resultats obtenues par rapport aux transaminases qui sont des marqueurs de la fonction hépatique.

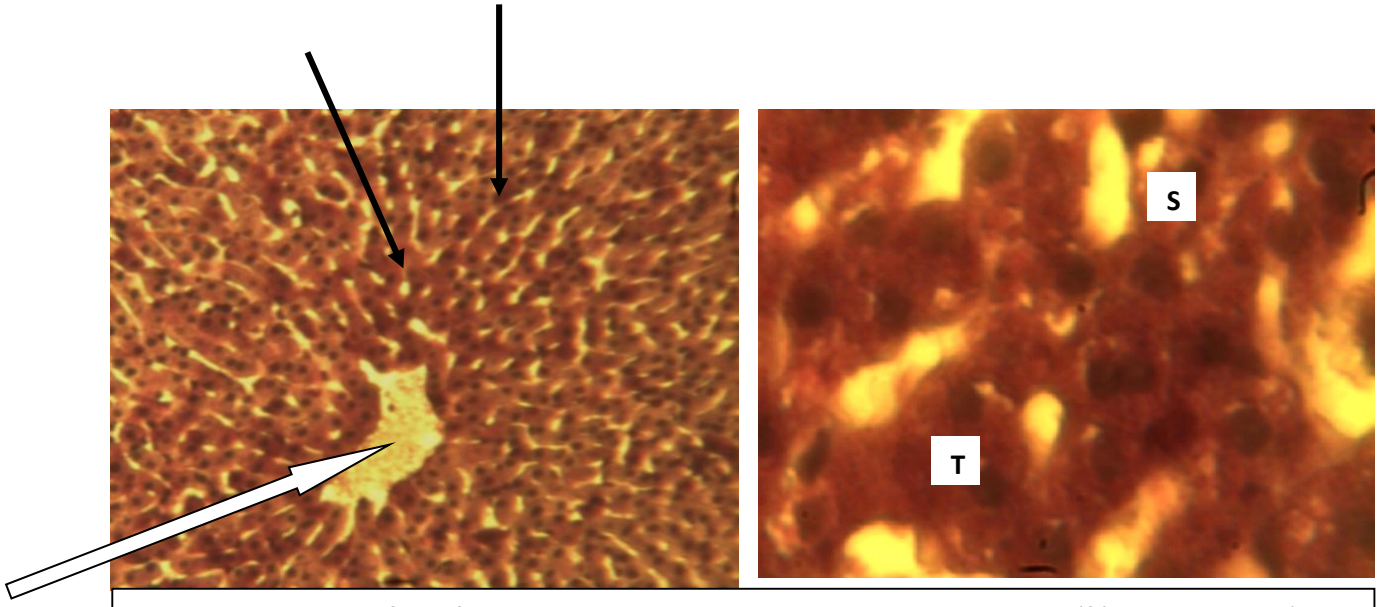


Figure 44: **Coupe de foie d'un lapin sans traitement**. La **veine centrolobulaire** (flèche non pleine) et les travées hépatiques (flèches) ont un aspect normal. *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)*
Les travées hépatiques (T) et les sinusoïdes veineux (S) sont normaux. ***Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200)***

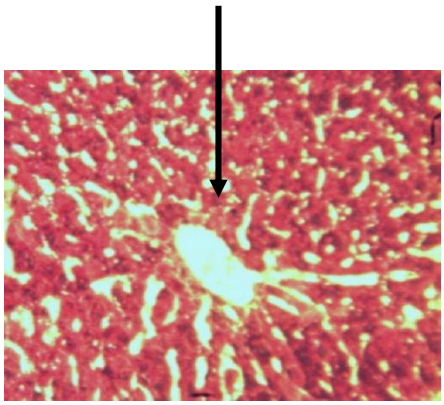


Figure 45 : Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 5 mg de K.s.

Les hépatocytes (flèches) sont quasi normaux.
L'espace de Disse est normal.
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

Les glomérures et les tubules sont nomaux sur les coupes de rein des lapins témoins n'ayant pas reçu le traitement.

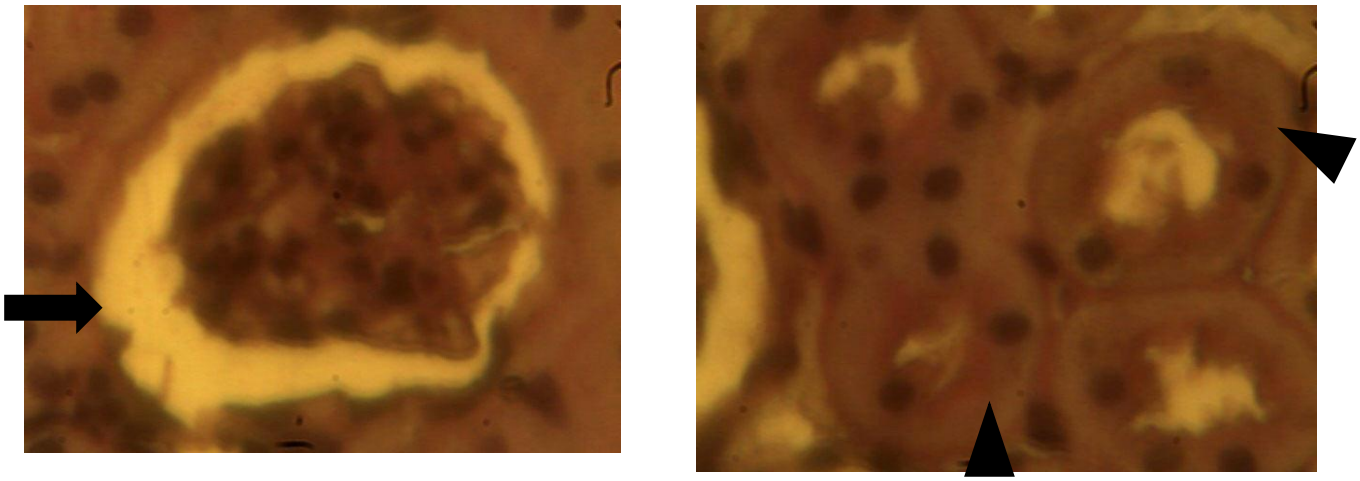


Figure 46 : Coupe de rein d'un lapin sans traitement **montrant un glomérule normal flèche pleine) et des tubules normaux (têtes de flèches).** ***Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200)***

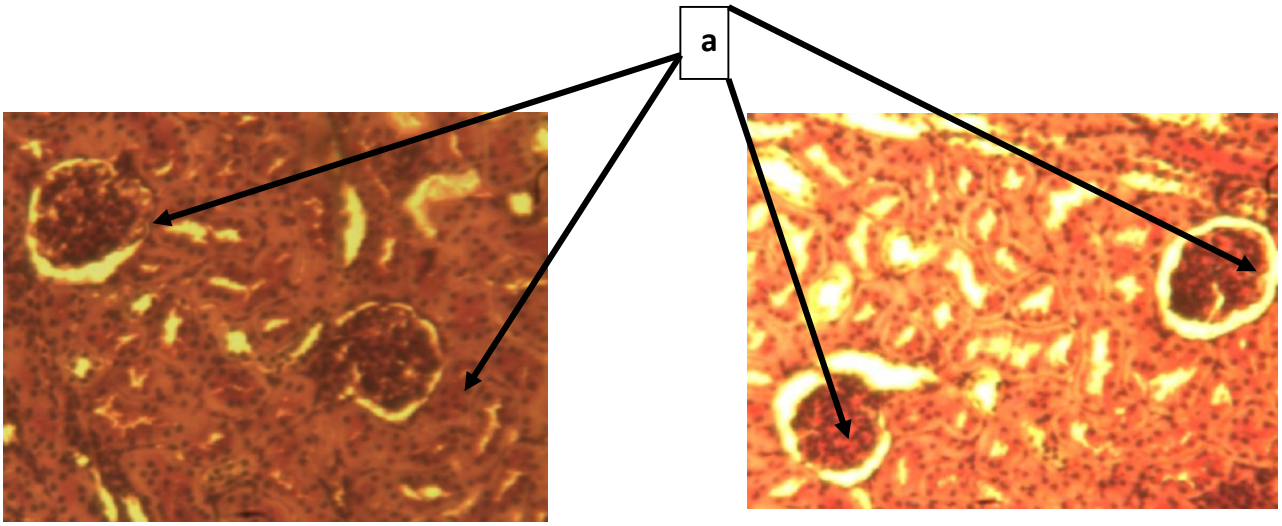


Figure 47 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de5 mg de K.s **Les glomérules rénaux désignés en (a) sont normaux.** ***Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)***

Les résultats de l'histologie ne montre pas des atteintes des tissus . Les coupes de foie et de reins semble normaux.

Nos travaux se sont poursuivis avec deux doses: la dose de 1 et 5 mg/kg de K.s. de PC.

	Doses en mg de K.s. /kg de PC							
Première partie	0					10	25	50
Deuxième partie	0	0,5	1	2,5	5			
Troisieme partie	0		1		5			

Nous avonc donc repris les paramètres biochimiques pour ces deux doses de 1 et 5mg/kg de PC de *K.s.*

Nous avons doses le glucose, les triglycérides le cholestérol et les figures suivantes montrent les résultats obtenues.

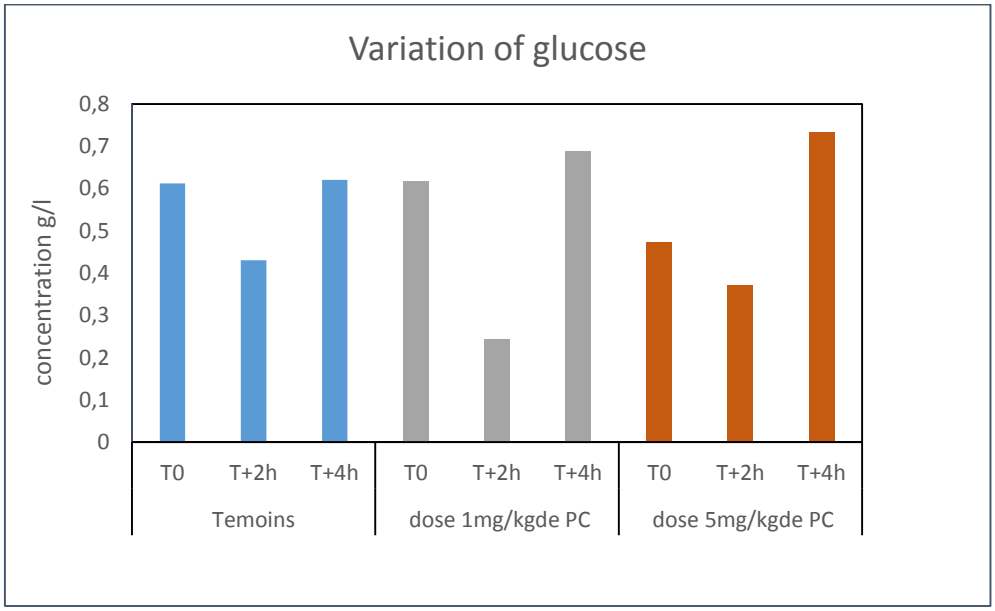


Figure 48: Variation du glucose en fonction de temps aux doses de 1 et 5 mg/kg de PC de *K.s.*

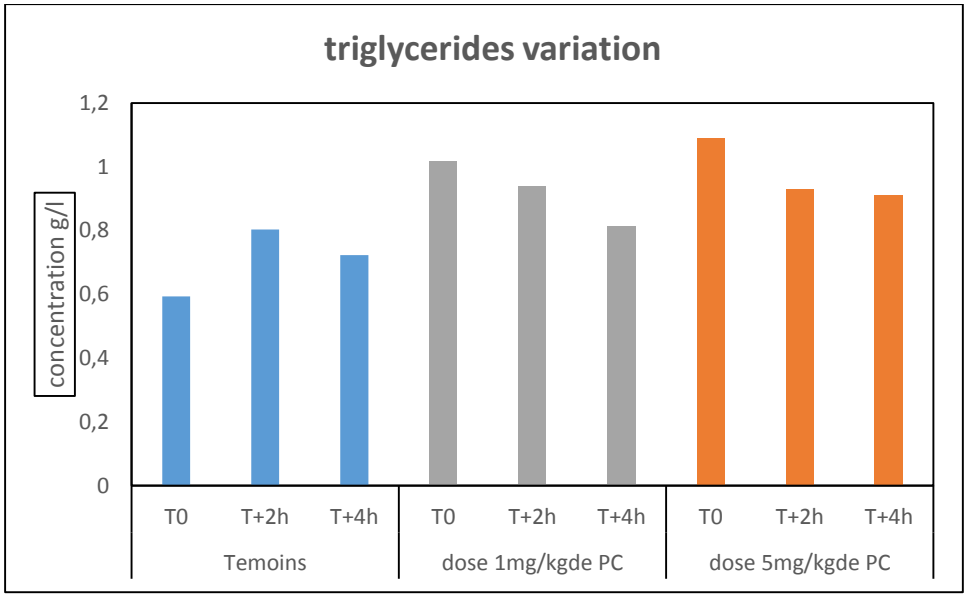


Figure 49: Variation des Triglycérides en fonction du temps aux doses 1 et 5 mg/kg de PC de K.s.

Le graphique II présente la variation de la triglycéridémie par groupe et en fonction du temps.

Chez le groupe témoin, la triglycéridémie qui est de 5,93 au début s'élève à 8,03 puis revient à 7,23. Au sein du groupe L1, au début la triglycéridémie est de 10,18. Elle diminue à 9,40 après 2 Heures puis chute à 8,13 après 4Heures. Le t-test ne laisse apparaitre une différence significative entre ces valeurs. Au sein du groupe L5, la triglycéridémie varie de 10,90 à 6,93 entre T0 et T+2H ; puis remonte à 9,13 à T+4H. Cette variation n'est pas significative. La comparaison des moyennes des triglycéridémie entre groupes et en fonction du temps ne présente aucune différence.

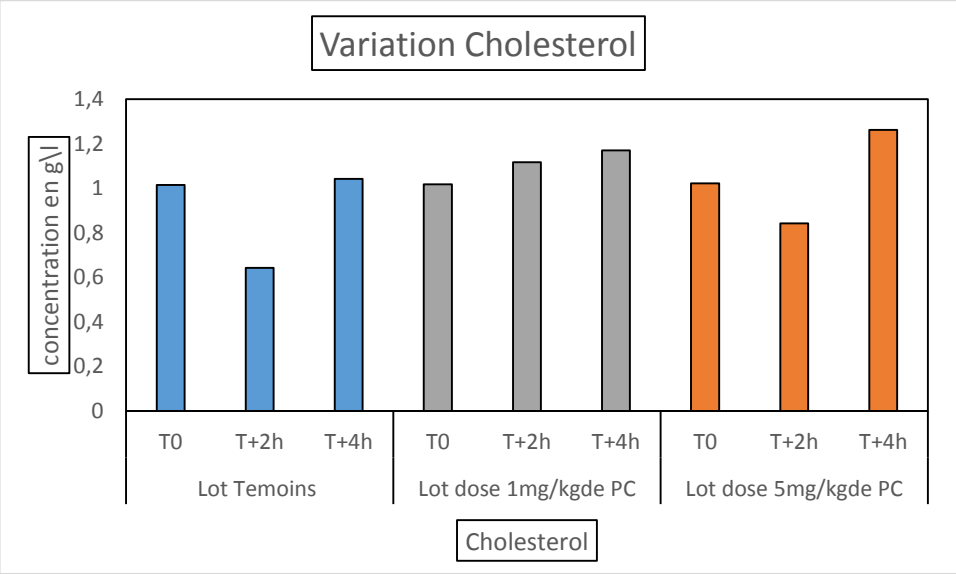


Figure 50: variation du Cholestérol en fonction du temps aux doses de 1 et 5 mg/kg de PC de K.S

Le figure présente la variation de la cholestérolémie moyenne des lapins des trois groupes formés. Chez les lapins du groupe T, la cholestérolémie diminue d'abord en passant 10,15 à 6,43 entre T0 et T+2H puis elle augmente entre t+2H et T+4H où elle devient 10,43. Dans le groupe L1, la cholestérolémie augmente avec le temps qui suit le gavage. Elle passe de 10,18 à 11,17 puis à 11,70 respectivement lorsqu'on passe de T0 à T+2H puis à T+4H. Cette diminution observée n'est pas significative. En moyenne, la cholestérolémie du groupe L5 diminue entre T0 et T+2H et remonte si on passe à T+4H. Ainsi, elle est au début 10,23 puis de 8,43 puis enfin de 12,63. On constate que la diminution n'est pas significative alors que l'augmentation l'est.

La **glycémie** n'a globalement pas changé sous l'effet de l'extrait de *Khaya Senegalensis* aux doses de 1mg et 5mg. Les moyennes 0,67 ; 0,81 et 0,57 de la glycémie respectivement des groupes témoin ; 1mg et 5mgne sont pas différents. Le constat est dû au hasard (Tableau IV).

La **triglycéridémie** s'est abaissée chez le groupe 1mg comparativement au groupe témoin. La différence entre les moyennes du paramètre chez les groupes témoin et 1mg est significative ($p < 0.05$). Sous la dose de 5mg, la triglycéridémie est diminuée mais pas statistiquement significatif (Tableau IV).

Contrairement à la triglycéridémie, la **cholestérolémie** s'est élevée pendant le temps du traitement. Ainsi, alors qu'elle est de 0,76 chez le groupe témoin, elle augment à 1,07 et 1,17 respectivement chez le groupe 1mg et le groupe 5mg. L'augmentation est significative avec la dose 5mg

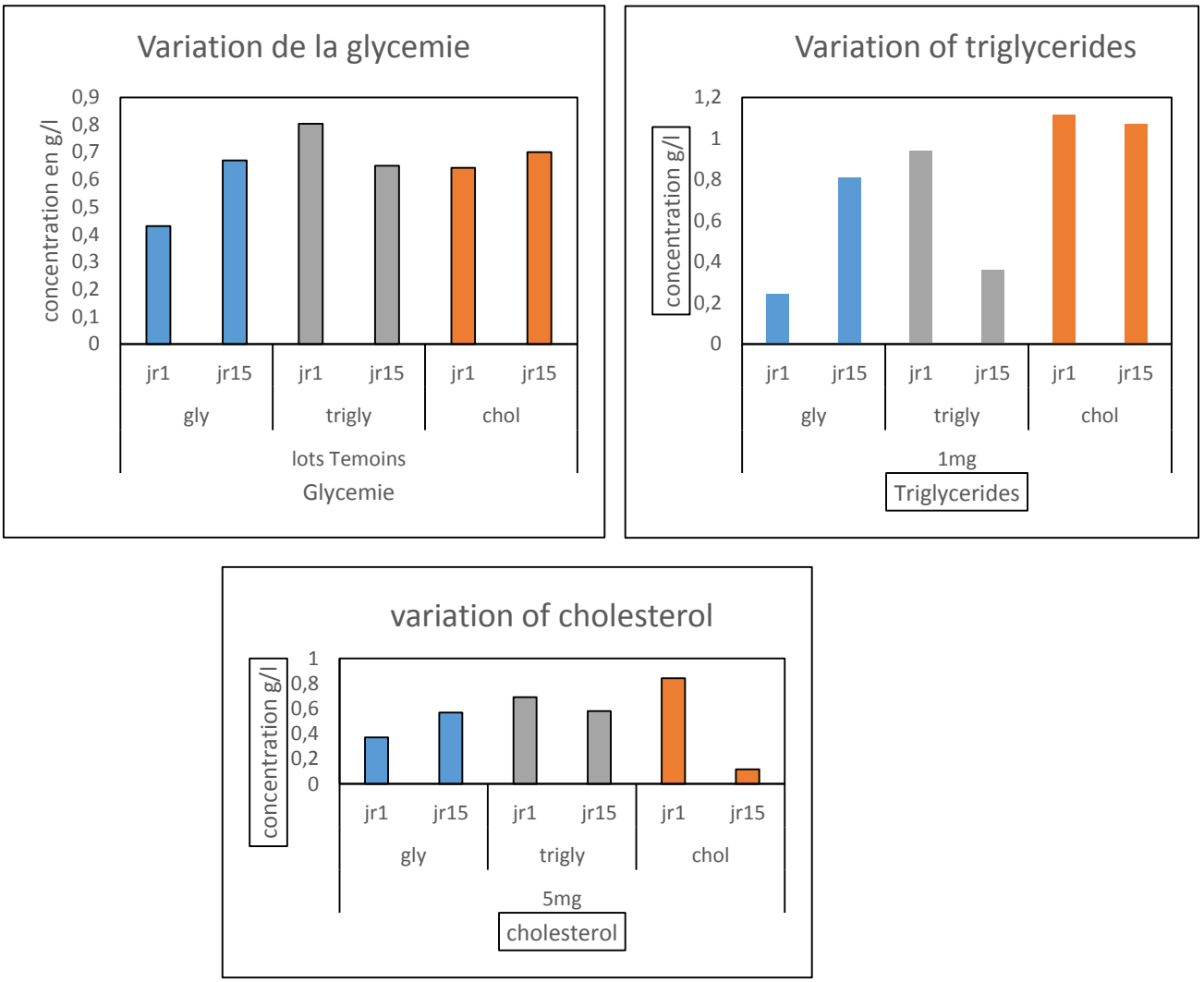


Figure 51: Paramètres biochimiques après 15 jours

La figure suivante présente les résultats des activités enzymatiques de la glucose-6-phosphodéshydrogénase par unité de masse protéique dans le foie et le rein.

On note une diminution de l'activité de l'enzyme ans le foie des animaux ayant reçu 1mg d'extrait de *Khaya Senegalensis* en comparaison avec le témoin (127.3 contre 122.8). Cette diminution n'est pas significative. Par contre la diminution de l'activité de la G6PDH hépatique est significative ($p< 0.05$) chez les animaux du groupe 5mg (127.3 contre 62.6).

Dans le rein, on dénote également une diminution d'activité de la G6PDH au sein des deux groupes ayant reçu les extraits de *Khaya*. A cet effet, on a chez le groupe 1mg 121,7mU/mg de protéines contre 168,6 pour le témoin. Aussi a-t-on 116.4 contre 168,6 pour le témoin.

La corrélation entre Glycémie et activité G6PDH hépatique ou rénale ($r = -0,567$ et $p = 0,055$ pour le foie et $r = -0,123$ et $p = 0,703$ pour le rein) est négative donc l'activité de la G6PDH diminue quand la glycémie augmente ce, aussi bien chez le groupe 1mg que le groupe 5mg. Toutes fois, cette corrélation n'est pas significative.

A partir de ces résultats le graphique V est réalisé

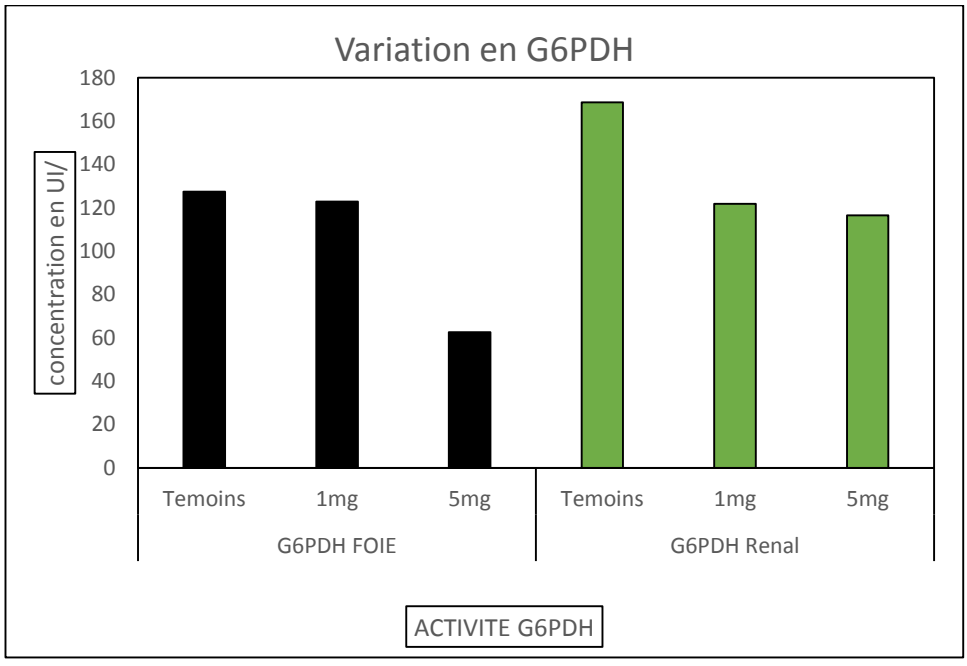


Figure 52: activités de la G6PDH hépatique et rénale

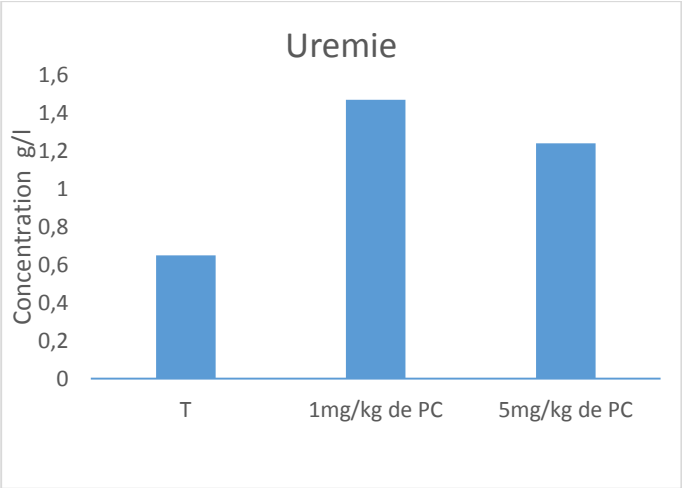


Figure 53: urémie

Chez le groupe témoin, la triglycéridémie qui est de 5,93 au début s'élève à 8,03 puis revient à 7,23. Au sein du groupe L1, au début la triglycéridémie est de 10,18. Elle diminue à 9,40 après 2 Heures puis chute à 8,13 après 4Heures. Le t-test ne laisse apparaitre une différence significative entre ces valeurs. Au sein du groupe L5, la triglycéridémie varie de 10,90 à 6,93 entre T0 et T+2H ; puis remonte à 9,13 à T+4H. Cette variation n'est pas significative. La comparaison des moyennes des triglycéridémie entre groupes et en fonction du temps ne présente aucune différence.

Chez les lapins du groupe T, la cholestérolémie diminue d'abord en passant 10,15 à 6,43 entre T0 et T+2H puis elle augmente entre t+2H et T+4H où elle devient 10,43. Dans le groupe L1, la cholestérolémie augmente avec le temps qui suit le gavage. Elle passe de 10,18 à 11,17 puis à 11,70 respectivement lorsqu'on passe de T0 à T+2H puis à T+4H. Cette diminution observée n'est pas significative. En moyenne, la cholestérolémie du groupe L5 diminue entre T0 et T+2H et remonte si on passe à T+4H. Ainsi, elle est au début 10,23 puis de 8,43 puis enfin de 12,63. On constate que la diminution n'est pas significative alors que l'augmentation l'est.

Paramètres biochimiques chez le model normoglycémique après 15 jours de traitement

La **glycémie** n'a globalement pas changé sous l'effet de l'extrait de *Khaya Senegalensis* aux doses de 1mg et 5mg. Les moyennes 0,67 ; 0,81 et 0,57 de la glycémie respectivement des groupes témoin ; 1mg et 5mg ne sont pas différents. La différence n'est pas significative ($p = 0,086$)

La **triglycéridémie** s'est abaissée chez le groupe 1mg comparativement au groupe témoin. La différence entre les moyennes du paramètre chez les groupes témoin et 1mg est significative

(p< 0.05). Sous la dose de 5mg, la triglycéridémie est diminuée mais pas statistiquement significatif.

Contrairement à la triglycéridémie, la **cholestérolémie** s'est élevée pendant le temps du traitement. Ainsi, alors qu'elle est de 0,76 chez le groupe témoin, elle augmente à 1,07 et 1,17 respectivement chez le groupe 1mg et le groupe 5mg. L'augmentation est significative avec la dose 5mg.

Tout comme le paramètre précédent, l'**urémie** est élevée chez les groupes ayant reçu l'extrait alcoolique au dose 1mg et 5mg. On a 0,65g/L pour le témoin ; 1,41g/L pour le groupe 1mg et 1,24g/L pour le groupe 5mg. Cette élévation moyenne du paramètre chez ces groupes est significative comparativement au témoin (p< 0.05) .

	Groupe Témoin	***Groupe L1mg***	***Groupe L5mg***
Paramètres Biochimiques	***Glycémie***	***0,67 ± 0,06***	***0,81 ± 0,1***	***0,57 ± 0,07***
Triglycérides	***0,65 ± 0,03***	***0,36 ± 0,09****	***0,58 ± 0,03***
Cholestérol	***0,76 ± 0,05***	***1,07 ± 0,23***	***1,17 ± 0,16****
Urée	***0,65 ± 0,16***	***1,41 ± 0,15****	***1,24 ± 0,12****

*= Différence significative avec p-value < 0.05 et comparé au témoin. Résultats exprimés en moyenne ± Ecart-type

Tableau 11: **Les paramètres biochimiques des différents groupes.**

3.1.4- Activité enzymatique de la Glucose-6-phosphodéshydrogenase

Le tableau présente les résultats des activités enzymatiques de la glucose-6-phosphodéshydrogenase par unité de masse protéique dans le foie et le rein.

On note une diminution de l'activité de l'enzyme ans le foie des animaux ayant reçu 1mg d'extrait de *Khaya Senegalensis* en comparaison avec le témoin (127,3 contre 122,8). Cette diminution n'est pas significative. Par contre la diminution de l'activité de la G6PDH hépatique est significative (p< 0.05) chez les animaux du groupe 5mg (127,3 contre 62,6).

Dans le rein, on dénote également une diminution d'activité de la G6PDH au sein des deux groupes ayant reçu les extraits de *Khaya*. A cet effet, on a chez le groupe 1mg 121,7mU/mg de protéines contre 168,6 pour le témoin. Aussi a-t-on 116,4 contre 168,6 pour le témoin.

La corrélation entre Glycémie et activité G6PDH hépatique ou rénale (r = -0,567 et p = 0,055 pour le foie et r = -0,123 et p = 0,703 pour le rein) est négative donc l'activité de la G6PDH

diminue quand la glycémie augmente ce, aussi bien chez le groupe 1mg que le groupe 5mg. Toutes fois, cette corrélation n'est pas significative.

Paramètres		***Groupe Témoin***	***Groupe 1mg***	***Groupe 5mg***
Activité G6PDH	***G6PDH-foie (mU/mg Pro)***	***127,3 ± 12***	***122,8 ± 22***	***62,6 ± 13****
G6PDH-rein (mU/mg Pro)		***168,6 ± 10***	***121,7 ± 7,9****	***116,4 ± 12****

*= Différence significative avec p-value < 0.05 et comparé au témoin.

Tableau 12: **Activité de la G6PDH dans le foie et le rein**

	Doses en mg de K.s. /kg de PC									
Première partie	0					10	25	50		
Deuxième partie	0	0,5	1	2,5	5					
Troisieme partie	0		1		5					
Quatrieme partie	0						25	50	75	100

I-6 Doses de 0 mg/kg 25 mg/kg 50 mg/kg 75 mg/kg 100 mg/kg de poids corporelle

Effet conjugué de *Khaya senegalensis* et de cannelle sur les atteintes hépatiques suite à l'administration de fortes doses de *Khaya senegalensis*

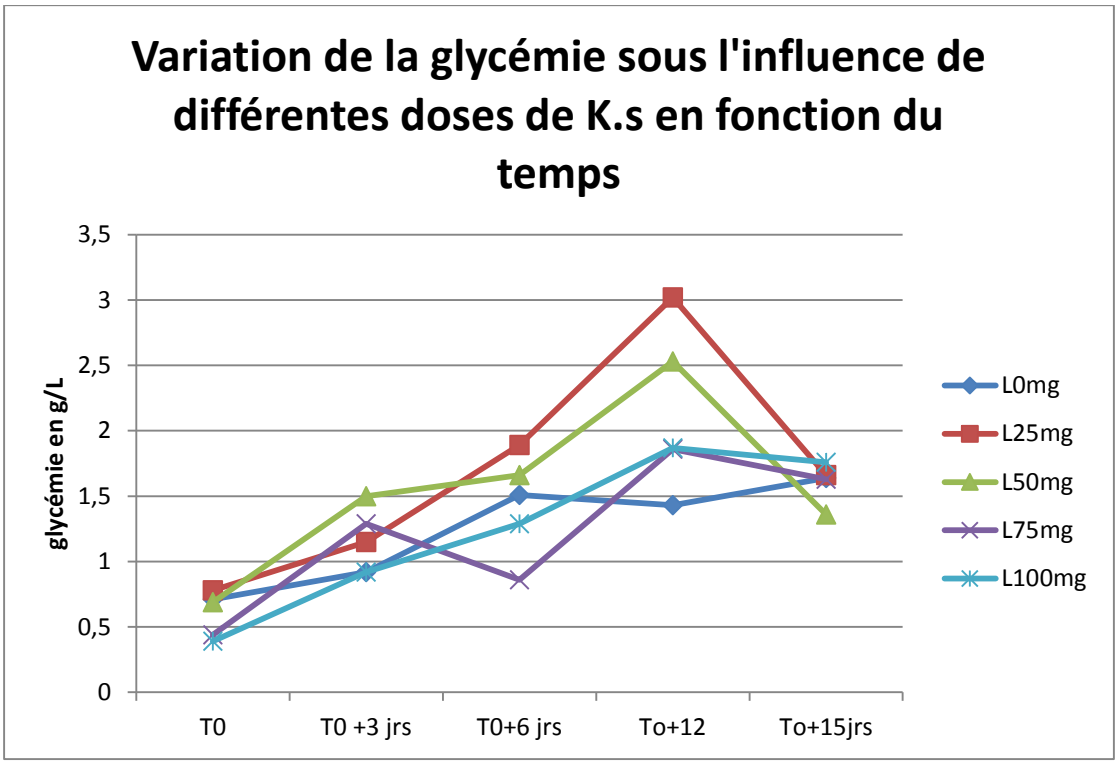


Figure 54: Courbe montrant la variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de K.s

Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la triglycérédemie chez les lapins normoglycémiques

Chez des lapins normoglycémiques traités par l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* on a constaté :

L'administration quotidienne de 25mg/kg de poids corporel d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au témoin a entraîné une très légère augmentation de la triglycérédemie au neuvième et douzième jour ;

Par contre les doses 50,75 et 100mg/kg de poids corporel de *Khaya senegalensis* n'ont pas entraîné une variation de la triglycérédemie par rapport au témoin.

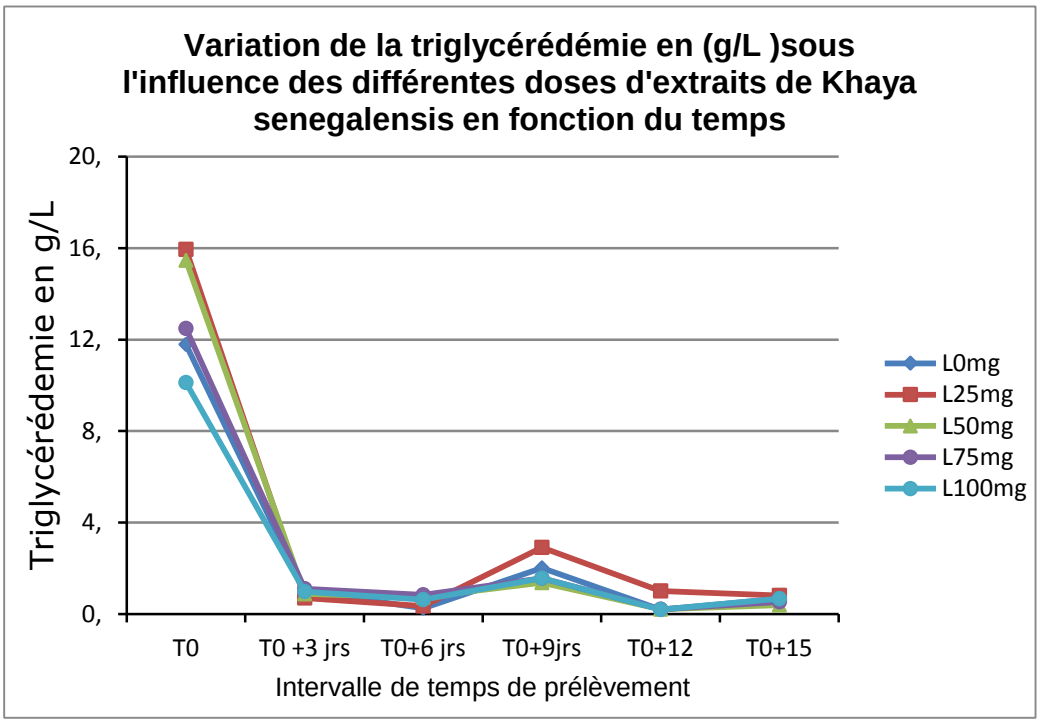


Figure 55: Courbe de variation de la triglycérédemie sous l'influence des différentes doses de K.s

I-2-3-Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur ASAT des lapins normoglycémiques

L'administration quotidienne de 25, 50, 100mg/kg de poids corporel de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* n'ont pratiquement pas entraîné de variation de la concentration d'ASAT par rapport au témoin sauf la dose 75mg/kg de poids corporel qui a entraîné son augmentation au quinzième jour (figure 55).

Chez les lapins normoglycémiques traités par l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, on a constaté :

L'administration quotidienne de 25mg/kg de poids corporel d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au témoin entraîne une augmentation progressive de la glycémie entre le troisième et le douzième jour avant de revenir à la même valeur que le témoin au quinzième jour ;

L'administration quotidienne de 50mg/kg de poids corporel d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au témoin entraîne une augmentation de la glycémie entre le troisième

et le douzième jour avant de connaître une légère diminution par rapport au témoin le quinzième jour ;

L'administration quotidienne de 75mg/kg de poids corporel d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au témoin a entraîné une légère augmentation de la glycémie au troisième et douzième jour et une diminution au sixième jour ;

L'administration quotidienne de 100mg/kg de poids corporel d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au témoin a entraîné une légère augmentation de la glycémie au douzième et quinzième jour et a diminué légèrement au sixième jour (figure 56).

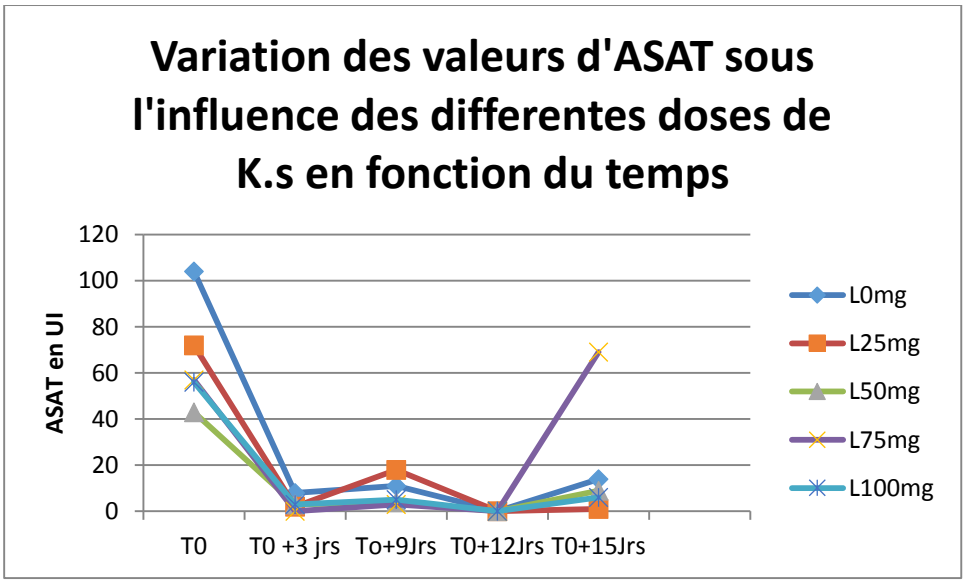


Figure 56: Courbe montrant la variation d'ASAT sous l'influence des différentes doses de K.s

I-2-4- Influence de l'administration de l'extrait éthylique de Khaya senegalensis sur ALAT des lapins normoglycémiques

L'administration quotidienne de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* à des lapins normoglycémiques montre :

Pour la dose 25mg/kg du poids corporel de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, on note une diminution de la concentration d'ALAT par rapport au témoin au troisième, neuvième et quinzième jour ;

Pour dose de 50mg/kg de poids corporel de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, on note une diminution par rapport au témoin de la concentration d'ALAT au troisième, neuvième et quinzième jour ;

Pour la dose de 75mg/kg de poids corporel de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, on note par rapport au témoin une diminution de la concentration d'ALAT au neuvième et quinzième jour ;

Pour la dose de 100mg/kg de poids corporel d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*,on note par rapport au témoin une diminution de la concentration d'ALAT au neuvième et quinzième jour.

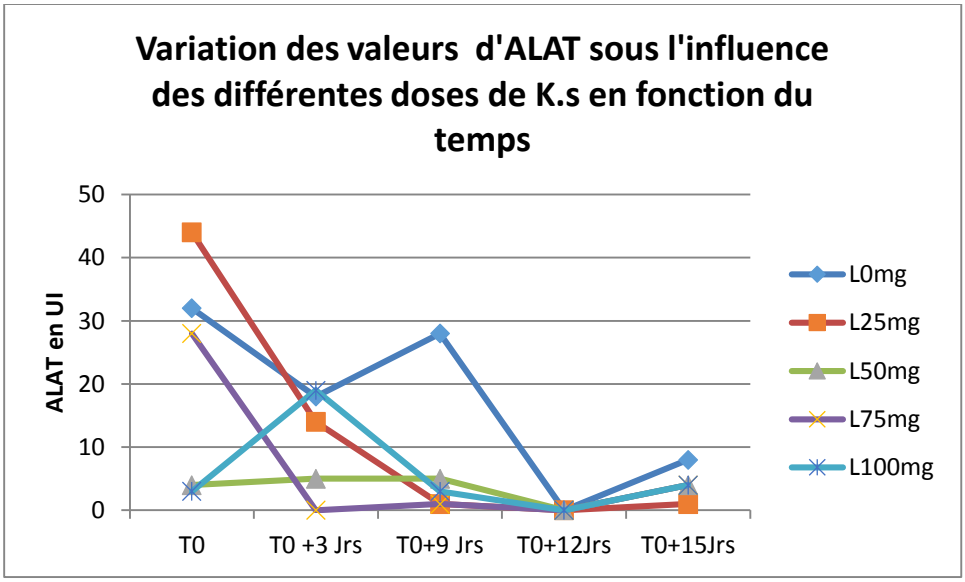


Figure 57: Courbe montrant la variation d'ALAT sous l'influence des différentes doses de K.s

I-2-5- Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la cholestérolémie totale

L'administration quotidienne de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* montre :

Les de 25,50, 100mg/kg de poids corporel de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* n'ont entraîné aucune variation de la cholestérolémie totale par rapport au témoin sauf la dose 75mg /kg de poids corporel qui a entraîné une très légère augmentation au sixième jour (figure 58).

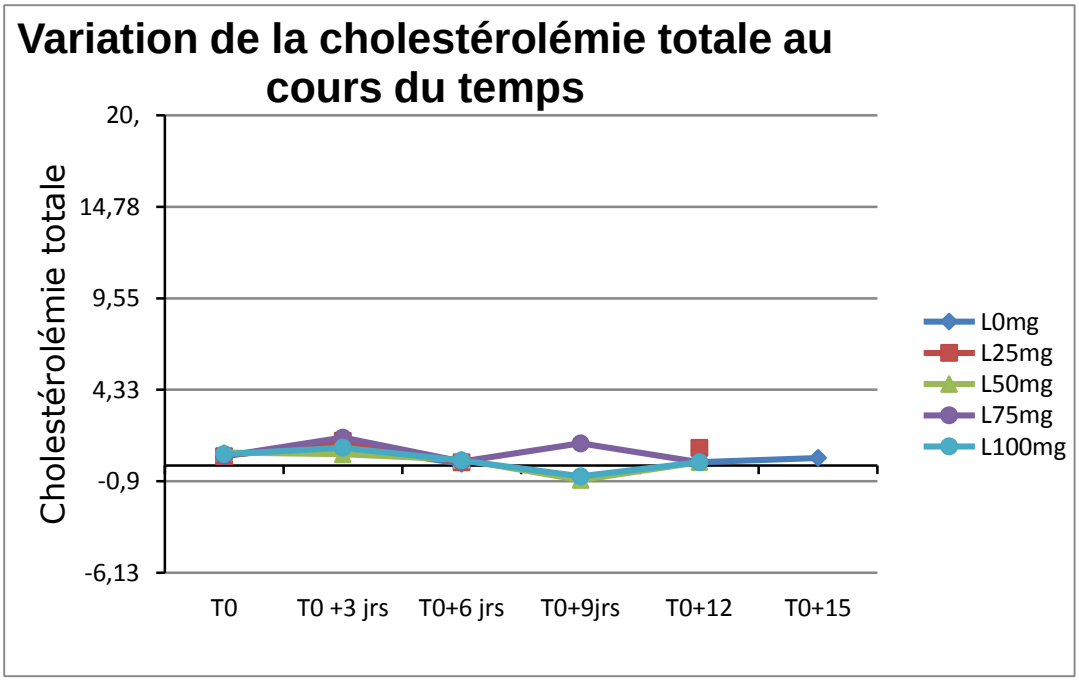


Figure 58: Courbe montrant la variation de la cholestérolémie totale sous l'influence des différentes doses de K.s

I-3- Influence des extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* et des feuilles de *Cinamomum zeylanicum* sur le poids corporel

L'administration quotidienne des extraits éthylique de *Khaya senegalensis* et des feuilles de *Cinamomum zeylanicum* montre :

Pour la dose de 75mg/kg de poids corporel de *Khaya senegalensis* et 50mg/kg de poids corporel de *Cinamomum zeylanicum* une légère diminution du poids corporel par rapport au témoin ;

Pour la dose de 100mg/kg de poids corporel de *Khaya senegalensis* et 50mg/kg de poids corporel de Cinamomum zeylanicum une légère diminution du poids corporel par rapport au témoin (figure 59).

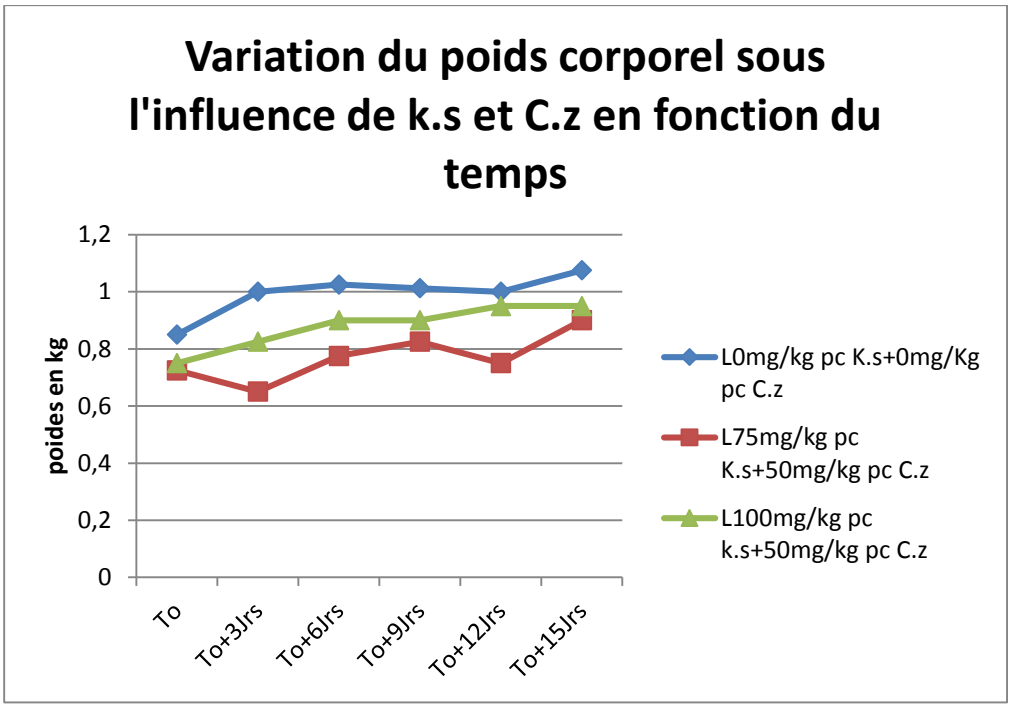


Figure 59: Courbe montrant la variation du poids corporel sous l'influence de *K. senegalensis* et *C. zeylanicum*

I-3-1- Influence des extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* et de *Cinamomum zeylanicum* sur ALAT

L'administration quotidienne des extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* et de feuilles de *Cinamomum zeylanicum* montre :

Pour dose 75mg/kg de poids corporel de *Khaya senegalensis* et 50mg/kg de poids corporel de Cinamomum zeylanicum une augmentation de la concentration d'ALAT au troisième jour et une diminution au neuvième, douzième et quinzième jour par rapport au témoin ;

Pour la dose 100mg/kg de poids corporel de *Khaya senegalensis* et 50mg/kg de poids corporel de *Cinamomum zeylanicum* une augmentation de la concentration d'ALAT au sixième et neuvième jour et une légère diminution seulement au quinzième jour par rapport au témoin (figure 60).

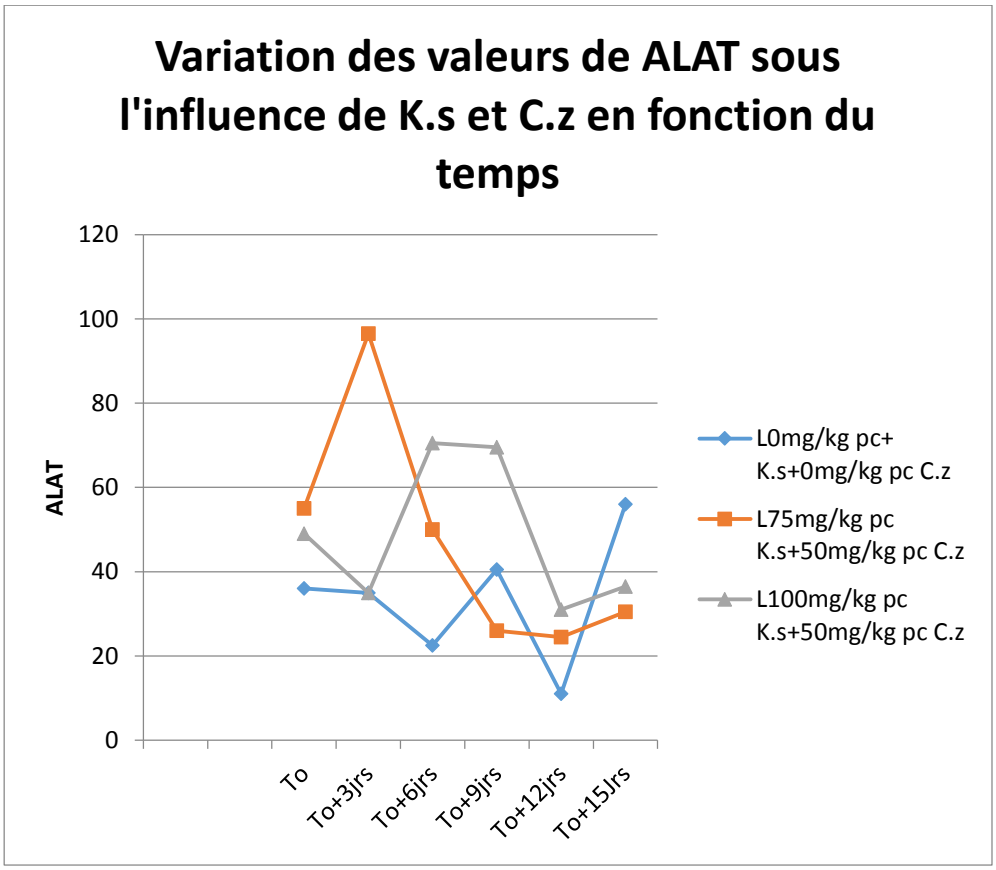


Figure 60: Courbe de la variation des valeurs d'ALAT sous l'influence de K. senegalensis et C. zeylanicum en fonction du temps

II-3-2-Influence des extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* et des feuilles de *Cinamomum zeylanicum* sur ASAT

L'administration quotidienne des extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* et de *Cinamomum zeylanicum* montre :

Pour la dose 75mg/kg du poids corporel de *Khaya senegalensis* et 50mg/kg du poids corporel une augmentation de la concentration d'ASAT au troisième et neuvième jour et une légère diminution au sixième et quinzième jour par rapport au témoin

Pour la dose 100mg/kg du poids corporel de *Khaya senegalensis* et 50mg/kg du poids corporel de *Cinamomum zeylanicum* une légère diminution de la concentration d'ASAT au troisième et douzième jour et une augmentation au neuvième jour par rapport au témoin.

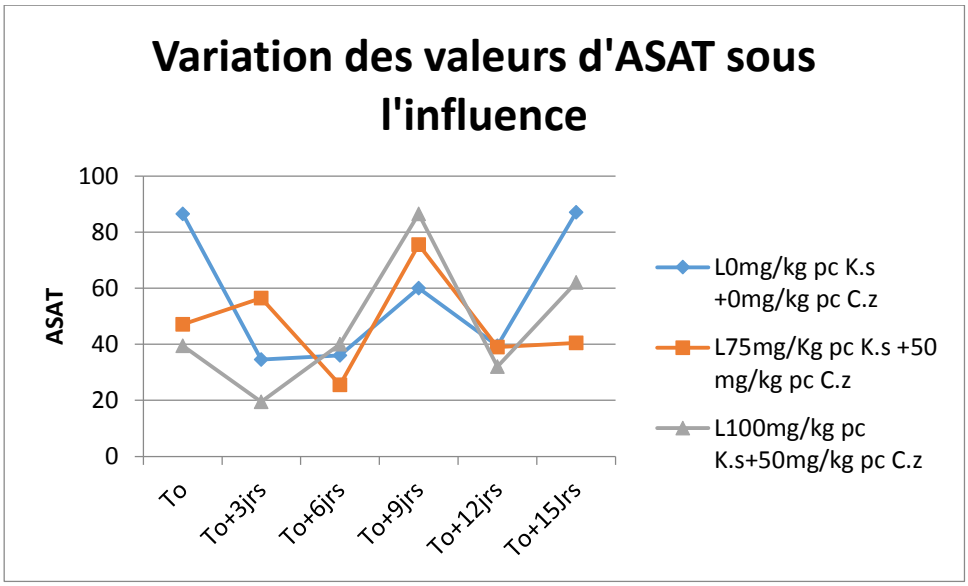


Figure 61: Courbe montrant la variation d'ASAT sous l'influence de K. senegalensis et de C. zeylanicum en fonction du temps

DISCUSSION

L'étude chimique : Screening phytochimique

Les principes chimiques mis en évidence au cours du screening phytochimique sont des composés:

-polyphénoliques (tanins, tanins cathéchique, anthocyane et leuco-anthocyane)

- Saponisides avec un indice de masse de 4

- de stéroïdes et des dérives anthracéniques

Les polyphénols sont les composés majeurs dans la plante au regard des réactions de précipitation importantes obtenues avec des réactifs appropriés. Ce sont principalement des tanins

La non existence d'alcaloïdes est à signaler dans la plante.

Ces résultats corroborent ceux de l'étude de (Kerharo et Adam, 1974)

Étude pharmacologique

- Action de l'extrait aqueux de *Khaya senegalensis* sur les paramètres biologiques:

Les résultats obtenus nous permettent de faire les constats suivants:

Les valeurs que nous avons enregistrées des paramètres étudiés rejoignent celles notées par **Othmani-Mecifet al, (2005)** sur le lapin *Oryctolagus cuniculus* du Maghreb (Algérie) ; Pour notre part l'intervalle de la glycémie va de 0,68 à 0,73 g/l, pour l'auteur il varie de 0,80 à 1,15 mg. La relative faible valeur est due à la petite taille de l'échantillon (03 lapins chez nous contre 36 lapins chez l'auteur). Les valeurs obtenues pour les Triglycérides (TG) et le cholestérol sont comprises entre 0,68 à 0,80 mg/dl et 0,70 et 0,81 g/l contre respectivement 0,74-1,57g/l et 0,30 - 0,64 g/l. Notre cholestérolémie est sensiblement élevée par rapport à celle de l'auteur. L'urémie notée pour la race locale est variable de 0,35 à 0,90 g/l, elle se retrouve dans le même intervalle que celle de la race utilisée par **Othmani-Mecif (2005)** qui est de 0,38 à 0,52 g/l.

Ces intervalles reçoivent l'aval de ceux retrouvés en Europe sur la même espèce (**Vaissaire**, **1977)** hormis les valeurs de la cholestérolémie. Ces petites fluctuations peuvent être en relation probable avec le régime alimentaire donné.

Khaya Senegalensis est une plante qui est utilisé pour ses différents effets sur des paramètres du sang **(Adebayo et al ; 2003 ; Kolawolé and *al*, 2011)** ; dans le traitement de plusieurs maladies **(Gill, 1992)**. Peu de travaux se sont consacrés aux activités antidiabétiques de *Khaya senegalensis.* **Zohoun en 2011** a montré in vitro que les extraits éthanoliques de *Khaya senegalensis* inhibe la libération hépatique du glucose à de faibles concentrations (5 ; 10 ou 20µg/L). Ce travail révèle que *Khaya sénégalensis* contient les principaux groupes de principes actifs que sont les composés polyphenoliques (majoritaires), les saponosides, les stéroïdes et les O-Hétérosides.

L'hypoglycémie observée chez les lapins normoglycémiques laisse penser que les extraits éthanoliques de *Khaya senegalensis* ont pu agir de la même façon que certains antidiabétiques oraux tel que la glibenclamide par la fermeture des canaux K+/ ATP, la dépolarisation membranaire et la stimulation de l'afflux Ca^{2}+, première étape clé pour la sécrétion d'insuline **(Henquin, 2005).** Il est démontré que les polysaccharides de *Genderma lucidum* (un champignon) ne stimulent pas la synthèse de l'insuline, mais peut être stimulent directement sa libération à partir des cellules β pancréatiques restantes en facilitant l'afflux du Ca2+ dans les cellules β pancréatiques chez les rats rendus par la streptozotocine **(Zhang et al, 2004)**.

L'effet hypoglycémiant de l'extrait éthanolique *de Khaya senegalensis* peut être aussi assimilé à la fois aux effets des constituants organiques qu'à ceux des constituants inorganiques. Entre autre, il est important de noter que les constituants inorganiques que les plantes médicinales contiennent jouent parfois un rôle primordial dans l'amélioration de leurs propriétés médicinales y compris l'activité hypoglycémiante. A cet effet, **Bhaskar et al., (2008),** qui ont étudié l'effet hypoglycémique de extrait aqueux de *Mucuna prurien* « 200 mg/kg » chez des rats rendus diabétiques par Streptozotocine, indiquent qu'un certains nombres de minéraux essentiels tels que Na, K, Ca, Zn, Mg, Fe, Cu et Mn peuvent être associés à un mécanisme de libération de l'insuline et de son activité. Aussi, il a été rapporté que plusieurs molécules bioactives isolés de plantes tels que les terpènes et les flavonoïdes influencent les cellules β pancréatique et stimulent la sécrétion de l'insuline par leurs activités antioxydantes **(Sarkhail et al., 2007)**. Etant donné qu'au cours du diabète le stress oxydant et les radicaux libres affectent et détruisent les cellules β, donc l'extrait éthanolique de *Khaya senegalensis* peut aussi augmenter la sécrétion de l'insuline via son activité antioxydante **(El-Alfy et al., 2005).**

Le profil lipidique des lapins après quelques heures de traitement n'a pas tellement changé. Ceci montre que les extraits éthanoliques de *Khaya senegalensis* n'auraient pas d'activité hypolipidémiante instantanée. Dans notre travail, un traitement de 15 jours des animaux provoque un changement dans le profil lipidique. Dans leur travail, **Masuma et al (2010)**

rapportent que plusieurs études ont indiqué qu'une élévation de la cholestérolémie totale est fortement associée à l'athérosclérose coronaire et augmente le risque cardiovasculaire. Ils enrichissent leurs propos en poursuivant que des études cliniques ont montré qu'une diminution de la cholestérolémie en utilisant une diète alimentaire ou des médicaments diminue l'incidence des maladies coronaires cardiaques. Chez les lapins soumis au traitement de *Khaya Senegalensis* la cholestérolémie s'est élevée. Aux doses utilisées, les extraits de Khaya pourraient affecter certaines enzymes sanguines **(Kolawole et al, 2011)** ou hépatiques notamment celles impliquées dans le métabolisme du cholestérol. La triglycéridémie par contre s'est abaissée sous *Khaya* ce qui pourrait être dû à la réduction de la synthèse des triglycérides hépatiques et ou à une réduction de la lipolyse qui serait due à l'augmentation de l'insulinémie **(Sivaraj et al., 2009)** sous *Khaya senegalensis*.

L'augmentation de l'urémie pourrait être associée à un défaut d'excrétion rénale (une insuffisance rénale). Lors d'une atteinte rénale chronique on assiste à non seulement un déficit d'élimination de l'urée mais aussi des sulfates, des phosphates et des ions (**Valdiguié, 2008)**. Le traitement des animaux par *Khaya Senegalensis* provoque une augmentation significative de l'urémie, preuve d'une atteinte rénale chez ces animaux. Ce résultat confirme ceux de **Kolawolé et al (2011)** qui ont constaté que l'urémie des rats traités par des extraits de *Khaya Senegalensis* augmente proportionnellement avec la dose. La créatinine, tout comme l'urée augmente en fonction de la dose. L'augmentation de la créatinine étant un indicateur des lésions rénales **(Valdiguié, 2008**), appuis l'idée d'une attaque rénale aussi bien par les extraits éthanoliques de *Khaya Senegalensis* (**Adebayo et al, 2003)** que par ses extraits aqueux **(Kolawolé et al 2011).** Ces effets semblent se reflétés sur la masse des reins. En effet, dans notre travail, nous avons noté une légère diminution du ratio masse rénal/masse corporelle. Cette diminution a été constatée par le groupe d'Adebayo et al, (2003) en utilisant une dose similaire aux nôtres (2 mg/Kg de poids).

Les effets néfastes des extraits de *Khaya Senegalensis* ne semblent pas toucher que le rein. Le groupe de **Kolawolé et al (2011)** a constaté que les extraits aqueux de *Khaya Senegalensis* élèvent le niveau de la phosphatase alcaline. Des augmentations des phosphatases alcalines sont observées dans les affections hépatiques **(Valdiguié, 2008**) ce qui soutient une attaque hépatique lors d'un traitement prolongé. D'autres indicateurs des fonctions rénales ont été explorés sous *Khaya Senegalensis*. Il s'agit de l'alanine amino-transférase (ALAT) et de l'aspartate amino-transférase (ASAT). L'augmentation de ces enzymes (transaminases) est modérée, dans les hépatites chroniques**,** et traduit l'atteinte parenchymateuse par nécrose cellulaire. Aussi, elle est due aux obstructions des voies biliaires **(Valdiguié, 2008**).

On est en passe de conclure qu'un traitement prolongé de plus de deux (02) semaines des extraits de *Khaya Senegalensis* peut affecter des organes vitaux que sont le foie et le rein et passerait dès lors à côté de son usage bénéfique.

Plusieurs travaux ont montré que la G6PDH est la principale source du NADPH. A cet effet, la diminution de l'activité de la G6PDH conduit à la baisse de la quantité du NADPH et rend la cellule sensible aux effets néfastes des oxydants (**Yizhen et al, 2005).** Le NADPH est utilisé dans différents processus de synthèse telle la réduction des radicaux, la biosynthèse des lipides. Au cours du diabète, l'hyperglycémie, engendre une agression accrue du stress oxydatif chez la cellule (**Yizhen et al, 2005).** Des exemples précis rapportés par le groupe de **Yizhen et al, (2005)** le montrent. D'abord les cellules en culture exposées à un taux élevé du glucose (dans le milieu de culture) présentent un stress oxydatif élevé caractérisé par l'augmentation du taux de peroxydation des lipides et des espèces réactives. Ensuite, les cellules en culture, traitées par un taux élevé intracellulaire d'antioxydants tels du glutathion réduit ou de la catalase, sont protégées contre les effets délétères de la forte concentration du glucose. Enfin, il est montré que les espèces réactives de l'oxygène sont la cause ou peuvent être la conséquence des autres mécanismes impliqués les complications du diabète. C'est le cas de l'augmentation de l'activité de l'aldose réductase qui conduit à une déplétion du NADPH ayant pour conséquence l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène.

Au vue de ces constats, nous nous sommes fixés l'objectif de *voir l'effet des extraits éthanoliques de Khaya Senegalensis sur l'enzyme clé de la production du NADPH cellulaire chez des animaux normaux*. Dès lors nous avons choisi deux organes vitaux que sont le rein et foie. Le foie et le rein sont le siège des détoxifications de l'organisme. Les espèces réactives de l'oxygène sont des substances plus ou moins toxiques dont l'élimination implique beaucoup plus souvent ces organes. Une diminution du taux de NADPH pourrait être néfaste pour le système antioxydant de la cellule. C'est pourquoi **Yizhen et al, (2005)** ont supposé que le maintien de tout le système antioxydant se repose sur une production suffisante du NADPH, du fait qu'ilsoit le principal réducteur. En exemple, le NADPH est le cofacteur limitant dans le maintien actif de la catalase. Aussi, le NADPH sert de cofacteur à la glutathion réductase pour laquelle il catalyse la réduction du glutathion oxydé. Le glutathion réduit étant le récupérateur des radicaux libres.

En tant que principale sources du NADPH, le rôle de la G6PDH comme enzyme antioxydante est élaboré. Des travaux variés le montent. En effet, **Pandolfi et al. (1995)** ont montré que les cellules dépourvues de la G6PDH n'arrivaient pas assurer la voie des pentoses phosphates et étaient très vulnérables au stress oxydant. **Yizhen et al., (2005)** dans leur travail ont constaté

une normalisation de l'activité de la G6PDH chez les animaux diabétiques traités à l'insuline. Cette normalisation de l'activité était également concomitante à l'expression de la G6PDH, du NADPH et d'autres enzymes antioxydantes dont le superoxyde dismutase, la catalase comparativement aux animaux diabétiques. Dans ce même travail, ils rapportent qu'une sur-expression de la G6PDH aide à prévenir le stress oxydant conduisant à l'apoptose.

Dans notre travail, le traitement des animaux par des extraits provoque la diminution de l'activité de la G6PDH rénale aux deux doses (1mg et 5mg) après quinze (15) jours. Cette diminution pourrait être due à l'inhibition de l'expression de G6PDH ou à son activation. Dans les deux cas, la conséquence immédiate est la faible production du NADPH **(Pandolfi et al, 1995).** Ce fait pourrait être à la base de la vulnérabilité du rein et du foie des animaux traités au *Khaya senegalensis*. En effet, **Kolawolé et al. (2011).** On constaté l'élévation du taux des enzymes indicatrices des atteintes hépatiques et rénales lorsqu'ils ont administré des extraits de *Khaya senegalensis* aux rats. La vulnérabilité rénale et hépatique sous *Khaya senegalensis* pourrait également être due à l'atteinte de l'intégrité des membranes plasmique et endothéliale. En effet, la phosphatase alkaline plasmatique qui est utilisée pour vérifier l'intégrité de la membrane plasmique **(Akanji, 1993)** est élevée. Cette élévation pourrait rendre compte de la « toxicité » probable que pourrait engendrer de l'utilisation prolongée des extraits de l'écorce de *Khaya senegalensis* qui se sont pourtant révélés posséder une activité antioxydante *in vitro* (**Lompo, et al., 2007**). En effet, dans leur travail préliminaire sur l'activité antioxydante des extraits de *Khaya senegalensis*, **Lompo et al. (2007)** ont montré que les extraits éthanoliques et aqueux, ainsi que leur fraction lyophilisée respective présentaient des activités antioxydantes in vitro. Cette activité est en relation avec la capacité des extraits à capter les radicaux émis par le 1,1-diphényl-2-pricryl-hydrazyl (DPPH) et à réduire les radicaux libres. On pourrait sous réserve dire que les extraits des écorces de *Khaya senegalensis* sont de manipulation délicate (**Lompo, 1998**)

Après une dislocation cervicale, les lapins sont ensuite ouverts et le foie et le rein sont immédiatement prélevés, lavé dans une solution de NaCl à 0,9% puis pesés. Le travail de **Camus et *al* (1969)** montre que les mêmes conditions de centrifugation des broyats du tissu hépatique permettaient d'observer les activités des enzymes hépatiques que sont la Glucokinase, les Hexokinases 1+2+3, la Glucose-6-phosphodéhydrogénase et la Phosphogluconate déshydrogénase. Du travail de **Ferrs et al, (1996)** repris par **Maghdessian (2010)** il ressort que pour la doser l'activité de la Glucokinase il faut centrifuger le broyat à

1400g pendant dix (10) minutes puis recueillir le surnageant qui est à nouveau centrifugé à 12000g pendant dix (10) puis le culot de cette deuxième centrifugation est repris dans le tampon d'homogénéisation et centrifugé à nouveau. Les deux surnageants ont été recueillis pour le dosage. Un gramme de chaque foie et rein est utilisé pour la préparation de l'homogénat du tissu hépatique (20%) (poids/volume). L'homogénat est préparé par l'addition du 4ml de tampon phosphate 0.1M (0.1 M, PH 8 et KCl 154 mM) à un gramme du tissu, puis broyer dans une porcelaine et centrifugé conformément à la description précédente **(Camus et al, 1969 ; Ferrs et al, 1996 ; Maghdessian, R. 2010).** Le surnageant constitue la fraction dans laquelle nous avons dosé les protéines totales et l'activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase.

L'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* a montré une augmentation de la glycémie pour les doses de 25, 50,75 et 100mg/kg du poids corporel chez des lapins normoglycémiques. Cette augmentation observée pourrait être due soit à : -
Une diminution de l'activité de glycogène synthétase, enzyme qui permet le stockage du glucose sous forme de glycogène ;
-Un dysfonctionnement des canaux GLUT2 des hépatocytes qui ne permet pas l'entrée du glucose pour assurer la diminution de la glycémie ;
-Une atteinte des hépatocytes sous l'action de ces différentes doses d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis.*
L'administration de 25,50, 75et 100mg/kg du poids corporel d'extrait éthylique de *Khaya sengalensis* a montré une diminution de la concentration d'ALAT ce s'expliquerait par une diminution d'activité d'ALAT par ces différentes doses d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis.*
Les atteintes hépatiques sont caractérisées par une très forte des transaminases qui des enzymes qui caractérisent le fonctionnement du foie. La toxicité des antidiabétiques au niveau du foie est caractérisée par une forte activité des transaminases. Cette toxicité des antidiabétiques est liée à la présence de certaines molécules comme les alcaloïdes ; or le *Khaya senegalensis* contient des alcaloïdes. Des nouvelles recherches sont en cours dans le d'avoir des antidiabétiques moins toxiques. L'administration combinée de *Khaya senegalensis et de Cinamomum zeylanicum* a montré une diminution de l'activité d'ALAT au cours du temps pour la dose 75mg/kg du poids corporel de *Khaya senegalensis* et 50mg/kg du poids corporel de *Cinamomum zeylanicum*. Or l'activité d'ALAT caractérise mieux l'activité du foie que celle d'ASAT.Cette diminution constatée pourrait être due à :

-Les extraits de *Cinamomum zeylanicum* agiraient sur le foie pour assurer les réparations tissulaires par stimulation de la prolifération des cellules hépatiques en remplacement des hépatocytes lésés

- Les extraits de *Cinamomum zeylanicum* faciliteraient l'élimination des substances toxiques de *Khaya senegalensis* responsables des atteintes hépatiques

-Les extraits de *Cinamomum zeylanicum* contiendraient des substances qui empêchent la fixation des substances toxiques de *Khaya senegalensis* sur les hépatocytes

-Les extraits de *Cinamomum zeylanicum* diminueraient l'action des substances toxiques de *Khaya senegalensis.*

CONCLUSION

Khaya senegalensis ou quinquina du Sénégal fait partie des 1400 espèces de la famille des Meliaceae et l'un des six éléments du genre khaya qui poussent en Afrique. C'est un grand arbre de 25 à 30 m de haut typique des savanes arborées. Il est souvent utilisé pour son ombrage et comme arbre d'avenues dans les grandes villes où il jouit d'une grande réputation en médecine et pharmacopée traditionnelles.

D'usages très diversifiés en médecine ct pharmacopée traditionnelles, toutes les parties de la plante sont utilisées. Rares sont les plants adultes de *khaya senegalensis* dont le tronc n'ait pas été mutilé pour les nombreux usages des écorces. Parmi ces usages, on peut citer non seulement son emploi comme tonique et fébrifuge dans le paludisme d'où il tire son nom de quinquina du Sénégal, mais également dans diverses pathologies en Gastro-entérologie, en Rhumatologie, en Parasitologie, en Gynécologie, en Dermatologie, en Pneumologie, en O.R.L., en Cardiologie, en Maladies infectieuses, en Odontostomatologie, en Ophtalmologie, en Traumatologie... et dans diverses autres pathologies.

Du point de vue chimique, nos études sur l'écorce de tronc mettent en évidence les principaux groupes chimiques suivants: Composés polyphénoliques Saponosides Stéroïdes Dérivés anthracéniques.

Du point de vue pharmacologique, l'étude a permis d'explorer l'aspect hypoglycemiant de la plante, son effet dose-dépendant et sa possible toxicité par l'histologie, le dosage des paramètres biochimiques et surtout le dosage des transaminases.

Cette investigation a permis de noter que cette plante a beaucoup de potentialités et que l'on n'a pas fini de connaitre les avantages qu'on nous puissions en tirer.

Cependant il convient de relever les limites de notre étude qui ont été:

- au niveau de l'étude pharmacologique: les lapins utilisés dans l'étude ne sont pas de souche pure donc une source de variations interindividuelles importantes. Leur nombre par lot devra être augmenté pour une meilleure analyse statistique.

Ces résultats obtenus sont une contribution à la valorisation de la pharmacopée traditionnelle. Ils constituent des prérequis devant orienter vers des études sur des animaux en hyperglycémie permanente. L'état de diabète expérimental créé chez des animaux permettra de suivre sur une

longue période l'action de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur les différents paramètres biochimiques étudiés dans notre présente étude.

Comme perspectives, l'isolement de substances pures responsables de l'activité hypoglycémiant et toxique est à envisager afin de pouvoir en faire une meilleure utilisation.

Par ailleurs la détermination chimique des substances actives nous permettra de comprendre mieux suivant la relation structure activité et les propriétés physico-chimiques de ces composés leurs mécanismes d'action.

Au niveau de la pharmacologie, les mécanismes d'action devront être étudiés et cela, conformément à la nature des composés isolés.

PUBLICATIONS

LISTES DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Agossou Essé**, Ahokpe Mélanie, Behanzin Justin,Takin Marcellin, ,Yessoufou Ganiou, Zohoun Loica, Baba-moussa Lamine, Sezan Alphonse. Effect of the ethanolic extract of Khaya senegalensis on some biochemical parameters in rabbit's glucose overload condition. **American Journal of Plant Sciences, 2015, 6, 240-248** Published Online January 2015 in SciRes. http://www.scirp.org/journal/ajps, http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.61027

- Takin M, Ahokpe M, Zohoun L, Assou E, Aïvodji N, **Agossou E**,Sezan A. Effect of total khaya senegalensis (meliaceae) barks extracts on hepatic liberation of glucose.National journal of physiology, pharmacy and pharmacology (2014);vol 4 issue2 ;112-117 . doi: 10.5455/njppp.2014.4.290920133

- **Agossou Essé**, Behanzin Justin, Assou E, Gbenou Joachim, Sezan Alphonse. Khaya senegalensis action on liver and kidney of rabbits. Role of glucose 6 phosphate deshydrogenase. Physiology and pharmacology (soumis pour publication)

- Assou K. Eudoxie, Behanzin Justin, Ahokpe Mélanie, Wouetola Ermence, **Agossou A. Essé**, Sezan Alphonse. Action of ethyl extracts of khaya senegalensis on Rat Hepatocytes. Evaluation of toxicity. American Journal of pharmtech Research. December 2014 Issue 6

PUBLICATION HORS THESE

Natacha AIVODJI, Eudoxie ASSOU, **Essé A. AGOSSOU**, Alphonse SEZAN. Global Journal for Research Analysis. Annona muricata recuced proliferation caused by cycas revoluta in Wistar rats. (soumis et accepté décembre 2014)

SEZAN A., GANGBO F., SENOU M., AHOKPE M., **AGOSSOU E**., AKPONA S.. Perturbations thyroïdiennes dans la région à risque de tanguiéta. Journal de la Société de Biologie Clinique, 2009 ; N°013 ; 5-11

SEZAN A., AHOKPE M., **AGOSSOU E**., AKPONA S. 2009. - β-adrenoceptor stimulation regulates intracellular pH(i) via inhibition of Na^+/H^+ exchanger in rat parotid cells. Revue CAMES (Sciences et Médecine) – série A, Vol. 09, 7-10.

SEZAN Alphonse, GANGBO Flore, AHOKPE Mélanie, **AGOSSOU A. Essé,** AKPONA Simon. 2009. - Implication des goitrigènes d'origine alimentaire dans le fonctionnement de la glande thyroïde: cas du manioc dans la production du H_2O_2 J. Sci. Uni. Lomé Série A 11(&): 11-15

YESSOUFOU G., **AGOSSOU A.E.,** BABAMOUSSA F., BABAMOUSSA L., SEZAN A. 2012. Etude de la prévalence des perturbations thyroïdiennes néonatales au Benin. Mali médical tome XXVII N°2 ; 16-20.


American Journal of
Plant Sciences

American Journal of Plant Sciences, 2015, 6, 240-248
Published Online January 2015 in SciRes. http://www.scirp.org/journal/ajps
http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.61027

Effect of the Ethanolic Extract of *Khaya senegalensis* on Some Biochemical Parameters on Rabbit's in Glucose Overload Condition

Essé Agossou[1], Mélanie Ahokpe[1], Justin Behanzin[1], Marcellin Takin[1], Ganiou Yessoufou[1], Loica Zohoun[1], Lamine Baba-Moussa[2], Alphonse Sezan[1*]

[1]Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire Département de Physiologie Animale, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin
[2]Laboratoire de Biologie et de Typage moléculaire en Microbiologie Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin
Email: *sezco@live, *alphonse.sezan@fast.uac.bj

Received 5 January 2015; accepted 22 January 2015; published 26 January 2015

Copyright © 2015 by authors and Scientific Research Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

Abstract

The effect of the ethanolic extract *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters was tested in rabbits with normal glucose and glucose overload. Phytochemical screening after three batches of 6 rabbits race (TBD) were treated with the extract in oral doses of respectively 10, 25 and 50 mg/kg body weight for 30 days; three other groups receiving respectively these doses of the extract were placed under a priori temporary overload of glucose; a control group received instead distilled water treatment. Blood glucose, triglycerides and total cholesterol were measured by spectrophotometry and weight gain of the animals was performed at the beginning of the experiment and every 2 weeks during the study period. The phytochemical screening revealed the presence of polyphenolic compounds (majority) of saponins of anthracene derivatives and steroids in the extract. The test results indicate that under the dose of 50 mg/kg body weight (BW) there was a significant decrease ($p < 0.05$) in blood glucose after 24 hours. The extract had no effect on the lipid profile or body weight of rabbits.

Keywords

Rabbit, *Khaya senegalensis*, Glucose, Lipid Profile

*Corresponding author.

How to cite this paper: Agossou, E., Ahokpe, M., Behanzin, J., Takin, M., Yessoufou, G., Zohoun, L., Baba-Moussa, L. and Sezan, A. (2015) Effect of the Ethanolic Extract of *Khaya senegalensis* on Some Biochemical Parameters on Rabbit's in Glucose Overload Condition. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 240-248. http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.61027

1. Introduction

The use of bioactive plant became popular more particularly in poor regions such as Africa and Asia [1] in the treatment of chronic diseases [2]-[5]. The use of these plants does not guarantee full effectiveness and safety [6]. The risk of toxicity associated with chemical compounds of medicinal plants becomes the concern of Scientific Research [7]. *Khaya senegalensis* (Meliaceae), a tropical plant, is widely used for its therapeutic properties. It is used in the treatment of malaria, jaundice etc. [8]. The seeds and leaves of *Khaya s.* are used in the treatment of fever and headache [9], amenorrhea, smallpox, jaundice, lumbago and rheumatism whereas extracts of roots treat mental illness, leprosy and syphilis [9]. Many scientific studies have demonstrated the biological activity of extracts of *Khaya senegalensis*, aqueous extracts and ethyl showed biological activity in rats through effects on biochemical and hematological parameters [10] [11], as it has been shown that extracts of *Khaya s.* possess antiradical activity [12]. Based on these results, it remains that the safety of this plant is to prove. On suspicion of an impact of *Khaya s.* on metabolism, we studied the effect of the ethyl extract of *Khaya senegalensis* on blood glucose and blood lipid profile in rabbits.

2. Materials and Methods

The study was conducted at the Laboratory of Biomembranes and Cell Signaling, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey Calavi, south of Benin, between July 2011 and March 2012. The extraction were performed at the Laboratory of Pharmacognosy and Essential Oils at the Institute of Applied Biomedical Sciences (ISBA), Cotonou, Benin.

Plant material. The barks of *Khaya senegalensis* were collected in July 2011 in the town of Abomey Calavi, agro-ecological zone VI, in southern Benin. This area has a climate Guinean type with two rainy seasons (April-July, September-November) rainfall varies from 1000 to 1400 mm and the soil is lateritic, ferruginous or hydro morph. The plant material was air-dried and milled into powder [3].

2.1. Preparation of Extract

Dry bark of *Khaya senegalensis* were cut into small pieces and then ground in mill knives. 100 g of the resulting powder, weighed using an analytical balance Sartorius® and placed in a jar prepared for this purpose, were soaked in 500 ml of 96% ethanol for 72 hours. Then the macerate was filtered through cotton wool fiber. The obtained filtrate was evaporated at 40°C using the evaporator ROTAVAPOR®. The paste deposited at the bottom of the evaporator ball was recovered in jars and put to dry in an oven at 45°C. After complete drying, the solids fused to the bottom of the jars were scraped, crushed and kept in jars.

2.2. Biological Material

Twenty-four rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of body weight between 1.155 and 1.370 kg, provided by the animal production department of the University of Abomey Calavi were used for the test.

The 24 rabbits were fed exclusively on fodder and water to drink, and they received no other medication at the time outside of the extract. They were randomly divided into three groups of 06 rabbits treated as follows:

-Lot 1 (L1) was the control group receiving oral administration of distilled water in place of ethyl extract of *Khaya senegalensis*,

-Lot 2 (L2) was the group treated by oral administration at a dose of 10 mg/kg body weight/day of ethyl extract of *Khaya senegalensis*, for 15 days.

-Lot 3 (L3) was the group treated by oral administration at a dose of 25 mg/kg body weight/day of ethyl extract of *Khaya senegalensis*, for 15 days.

-Lot 4 (L4) was batch treated by oral administration at a dose of 50 mg/kg body weight/day of ethyl extract of *Khaya senegalensis*, for 15 days.

2.3. Phytochemical Screening

It is based on the reactions (color and precipitation) Differential major groups of chemical compounds in plants according to the method of Houghton PJ and A. RAMAN (1998) [13] reviewed and adapted to the conditions of the Laboratory of Pharmacognosy and Essential Oils of ISBA.

2.4. Determination of Biochemical Parameters

To assay blood glucose, triglycerides and cholesterol in rabbits, we collected vacuum blood of these animals from the marginal ear vein, and the blood is collected in dry test tubes (for triglycerides and cholesterol) and anticoagulant (EDTA for glucose), and is then centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and the supernatant serum or plasma were decanted and stored for the determination of these parameters.

2.4.1. Glucose

We measured blood glucose by the enzymatic method with GOD-PAP reagent® (Bio Lab Lot: 021101A/2013/02 SCI) with T0, T0 + 6 hours, 12 hours and T0 + 18 hours, 24 hours T0, T0 + 15 days and 30 days, T0 corresponds to the sampling time at the end of 12 hours of fasting before administration of distilled water and ethyl extract of *Khaya senegalensis*.

Trinder method: In aqueous medium and in the presence of oxygen, glucose oxidase (GOD) catalyses the oxidation of glucose to gluconic acid and hydrogen peroxide (H_2O_2) in the reaction.

Glucose + ½ O_2 + $2H_2O$ + H_2O_2 gluconic acid

In the presence of peroxidase (POD), hydrogen peroxide reacts with 4-chloro-phenol and 4-aminoantipyrine (PAP) which is colorless in the reduced state to form a quinoneimine. Quinoneimine formed has a pink color whose intensity is proportional to the glucose concentration. This intensity is measured with a spectrophotometer at 500 nm [4] [5].

2.4.2. Triglycerides

Kit BIOLABO TRIGLYCERIDES GPO lot 071106B method of ref 80019 is used to determine blood levels trigycérides.

The assay principle is based on the method and Fossati Prencipe coupled to a Trinder reaction: the triglycerides are hydrolyzed enzymatically by lipase to free fatty acids and glycerol. The glycerol is phosphorylated by adenosine triphosphate (ATP) and glycerol kinase (GK) to produce glycerol-3-phosphate and adenosine diphosphate (ADP). Glycerol-3-phosphate is oxidized to dihydroxyacetone phosphate (DAP) with glycerol phosphate oxidase (GPO) to produce hydrogen peroxide (H_2O_2). In a color reaction catalyzed by peroxidase, H2O2 reacts with 4-aminoantipyrine (PAP) and 4-chlorophenol ((4-CP) to produce quinoneimine (pink) and water. Reaction scheme is as follows:

LIPASE Triglycerides Glycerol + free fatty acids

GK Glycerol + ATP glycerol-3-phosphate + ADP

Glycerol-3-phosphate Dihydroxyacetone phosphate + O_2 + H_2O_2 GPO

H_2O_2 + 4-chlorophenol + PAP quinoneimine POD (pink) + H_2O

The absorbance of the colored complex (quinoneimine), proportional to the concentration of triglycerides in the serum sample is measured at 500 nm [5] [7].

H_2O_2 + 4-chloro-phenol + 4-aminoantipyrine + $4H_2O$ quinoneimine

2.4.3. Total Cholesterol

Kit BIOLABO CHOLESTEROL CHOD-PAP lot 081104A REF 80106 was used.

The principle of the assay is as follows: cholesterol was determined using the CHOD-PAP enzymatic method described by Allain *et al.* [14]. According to the following scheme:

EC + esterified cholesterol Cholesterol Free fatty acids

Cholesterol + O_2 CO cholestene-4-one-3 + H_2O_2

$2H_2O_2$ + Phenol + 4-aminoantipyrine + $4H_2O$ POD quinoneimine

Quinoneimine formed has a pink color whose intensity is proportional to the amount of cholesterol present in the serum sample [6]. This intensity is measured with a spectrophotometer at 500 nm.

2.4.4. Data Processing

The data are processed in the Microsoft Office 2007 software Minitab14 2003 version was used for the different tests comparing average, the T-test was used for comparison of means of biochemical parameters between different batches of rabbits and for changes in biochemical parameters in time to appreciate the statistical significance of the difference of parameters between different batches of rabbits, we used analysis of variance (one-way

± ANOVA). The parameter results are expressed as mean standart deviation.

3. Results and Discussions

The screening phytochimic, of the ethanolic extracts of *Khaya senegalensis*, shows the presence of several molecules. These molecules and their presence rates in the extracts are listed in Table 1.

Weighed the on different ones periods (T0: beginning of the experiment; "T + 15": 15 days after the beginning of the experiment; and "T + 30": 30 days after the beginning of the experiment) of rabbits separated in 4 batches (L50 mg, L25 mg, L10 mg, L0 mg) according to the amount from extracts which was managed to them, showed a variation of weight in the rabbits which is listed in Table 2.

The impact on the glycemia of the administration to rabbits of the various amounts of extracts of *Khaya senegalensis*, measured according to time, shows on Figure 1 a weak variation of the glycemia with regard to the pilot batch and the batches of the amounts: L25 mg, L10 mg. While for rabbits of the batches of amount: L50 mg, a fall of the glycemia is observed during the first 15 days of the experiment, then it goes up Until the 30th day of experiment.

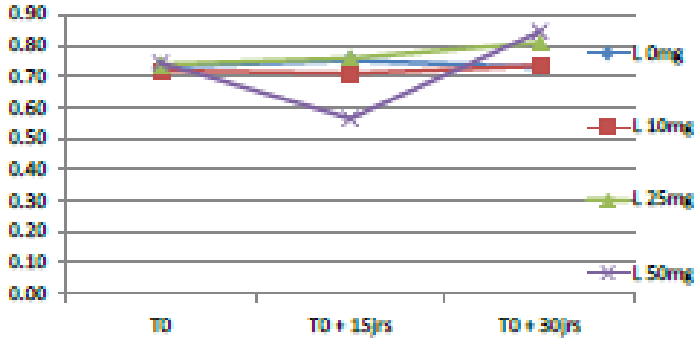


Figure 1. Variation of glucose under the influence of different doses of K.S. function of time.

Table 1. Phytochemical screening of ethanolic extracts of *Khaya senegalensis*.

Chemical groups	Subgroups	Observation
Polyphénolics	Tannins	+++
	Catechin tannins	+++
	Anthocyanin	++
	Leuco-anthocyanin	+++
Saponins	Saponosides Foam index 4	+++
Steroids	Steroids	+
Anthracene derivatives	O-Hétérosides à génines réduites	++

+++: Abondant; ++: not abundant; +: low.

Table 2. Weight of rabbit's normoglycemic versus time.

	Times (days)		
Doses	T0	T + 15 days	T + days
L0 mg	0.93 ± 0.23	1.47 ± 0.27	1.53 ± 0.14
L10 mg	1.15 ± 0.41	1.49 ± 0.09	1.63 ± 0.06
L25 mg	1.08 ± 0.18	1.6 ± 0.25	1.79 ± 0.23
L50 mg	0.97 ± 0.03	1.54 ± 0.20	1.65 ± 0.21

The impact on the glycemia of the administration to rabbits of the various amounts of extracts of *Khaya senegalensis*, measured at different hours on 24 hours, does not show any variation of the glycemia on Figure 2 with regard to the pilot batch over all the duration of the experiment for the batches of the amounts: L25 mg, L 50 mg, a growth of the glycemia is observed over the first 6 hours of the experiment. This glycemia fall the 6 hours following, is stabilized 12th hour per 18th hour then falls until the end of the experiment. While for rabbits of the batches of amount: L10 mg, a weak growth of the glycemia is observed during the first 6 hours of the experiment, the slope of growth increases and the glycemia is stabilized to leave per 12th hour the experiment and starts to fall per 18th hour of the experiment.

The impact on the glycemia of the administration to rabbits in temporary hyperglycemia of the various amounts of extracts of *Khaya senegalensis*, measured at different hours, shows on Figure 3 a fall of the glycemia for the 2 h before the beginning of the experiment. It is necessary noted that the fall of the glycemia lose the batch of L50 mg amount is weak, while it is significant for the other batches.

The impact on the triglyceridemy of the administration to rabbits of the various amounts of extracts of *Khaya senegalensis*, measured according to time, shows on Figure 4 a growth of this triglyceridemy hanging the 15 following days the beginning of this experiment. From the 15th day it falls until the 30 e day with regard to the batch of amount L10 mg. For the batches of L0 mg amounts and 50 mg, a weak growth is observed all along the experiment. Finally for the batch L25 mg weak a growth of the triglyceridemy is observed the first 15 days of the experiment, this growth increases until the 30 e days.

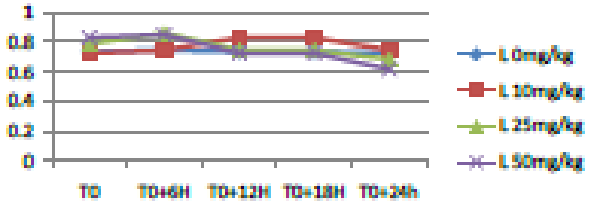


Figure 2. Variation in blood glucose under influence of different doses of K.S. in 24 hours.

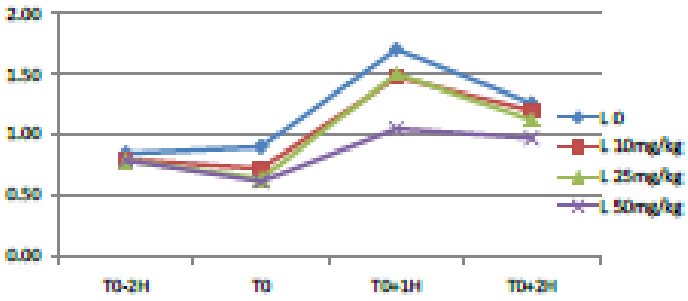


Figure 3. Variation in blood glucose under influence of different doses of K.S. in temporary hyperglycemia.

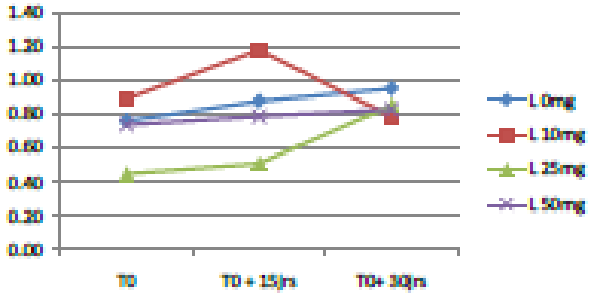


Figure 4. Triglycerides variation under influence of different doses of K.S. versus time.

The variation all the 6 hours of the triglyceridemy of hanging rabbits under influences 24 h of the different amounts of extracts of *Khaya senegalensis* is illustrated on Figure 5. For all the amounts one observes a weak fall of this triglyceridemy during the first 6 hours of the experiment, then a significant growth of this triglyceridemy with regard to the batch of L25 mg amount, until the 12th hour for the other batches this growth is weak. After the tryglyceridemy is stabilized for the batches L25 mg and L50 mg and a weak fall slightly for the other batches until the 18th h. And finally a progressive fall for all the batches until the end of the experiment.

The triglyceridemy of rabbits in temporary hyperglycemia and under influences of the various amounts of extract of *Khaya senengalansis* is measured and is illustrated on Figure 6. The general pace of the tryglyceridemy of rabbits for all the amounts is with the fall during all the experiment. However light growth is observed during the 2 h preceding the beginning of the experiment for the pilot batch and a light growth also for the batch of L25 mg amount, during the hour following the beginning of the experiment.

The variations of the cholesterolemy of rabbits subjected to the various amounts of extracts of *Khaya senegalensis* according to time, is illustrated on Figure 7. Indeed cholesterolemy of rabbits with tendency to grow the first 15 days of the experiment for every amounts safe for the L0 mg amount of the pilot batch which remains constant. From the 15th days until the end of the experiment the cholesterolemy strongly increases for the amounts L50 mg and L0 mg, and slightly for the L10 mg. Amount while one observes a light fall for the L25 mg amount.

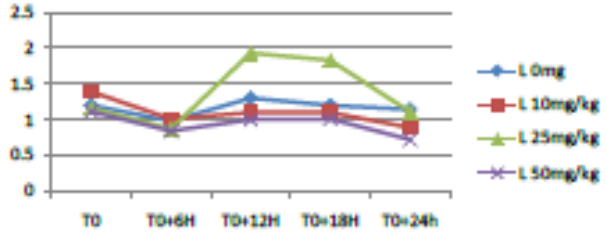


Figure 5. Triglycerides variation under influence of different doses of K.S. in 24 hours.

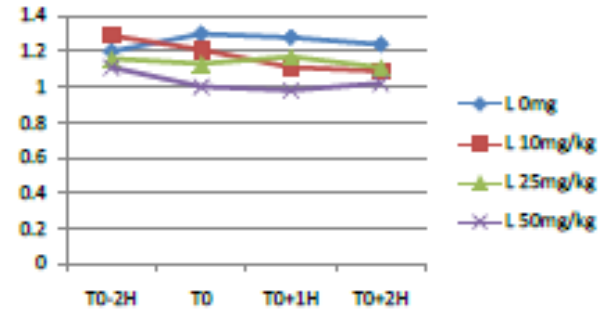


Figure 6. Triglycerides variation under influence of different doses of K.S. in temporary hyperglycemia.

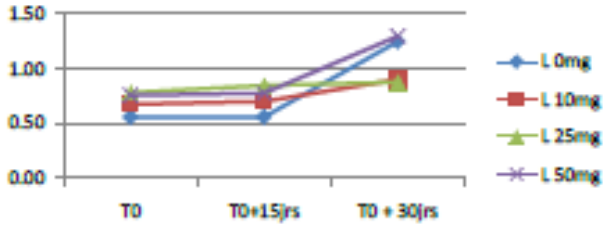


Figure 7. Cholesterol variation under influence of different doses of K.S. versus time.

The variation of the cholesterolemy of rabbits subjected to the various amounts of extracts of *Khaya senegalensis* during 24 h, is illustrated on Figure 8. During the first 12 hours of the experiment, the cholesterolemy has a downward trend for all the amounts except the L0 mg amount which grows slightly. Between the 12th and the 18th hour of the experiment the cholesterolemy tends to become relatively constant for all the doses. Finally the measured cholesterolemy falls slightly for all the amounts.

The variation of the cholesterolemy of rabbits in temporary hyperglycemia subjected to the various amounts of extracts of *Khaya senegalensis*, is illustrated on Figure 9. During the 2 hours previous the experiment, the cholesterolemy has a downward trend for the amounts L10 mg and while L25 mg for the amounts L0 mg and L50 mg which grows slightly. Beginning of the experiment until 2 h after the beginning of the experiment the measured cholesterolemy falls slightly for all the amounts.

4. Discussion

The phytochemical analysis revealed the presence of polyphenolic compounds (tannins, anthocyanins, lenco anthocyanin) of saponins, steroids and anthracene compounds (o-glycosides).

The alcoholic extract of *Khaya senegalensis* administration for four weeks did not significantly altered the change of body weight of treated rabbits ($p < 0.05$). Although we have noticed an increase respectively fortnightly from 1.82% and 6.55%, 8.75% ET17, 25%, 5% and 7.75% for doses of 10 mg/kg, 25 mg/kg and 50 mg/kg body weight.

Blood glucose did not change in the rabbits treated de 10 mg/kg dose of BW extract, 24 hours after administration. For cons, the administration of 25 mg and 50 mg/kg BW extract resulted in a decrease of 12.66%, 25.30% in blood sugar after 24 hours, only the resulting decline in the dose of 50 mg/kg BW extract is significant, one could think of a dose-dependency for this effect. This could be justified by the presence in the extract of glycosides which increases hepatic glucose utilization [15], so the o-glycosides, even scarce in the extract could inhibit the gluconeogenesis and suppress insulin in rabbits treated by increasing the rate of membrane glucose transporters such as Al-Achi demonstrated in 2005. The extract may also increase the secretion of insulin via its anti-oxidant activity [16] as terpenes and flavonoids influence pancreatic β cells and stimulate insulin secretion by their anti activity oxidizing [6]. Indeed, it would set in motion a closing signal of K^+/ATP, membrane depolarization and stimulation of Ca^{2+} influx, the first step in insulin secretion [12] [17] showed that ethyl extract of *Khaya senegalensis* has an anti-radical activity. In fact, our study showed the presence in the extract of an abundant amount of polyphenolic compounds which have an anti-radical activity [18]. Some flavonoids,

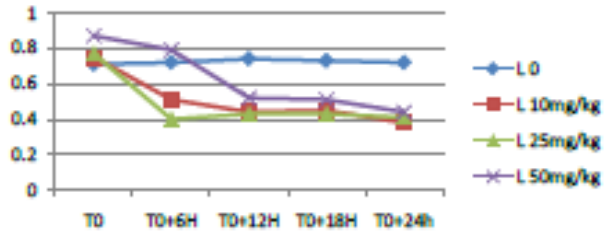


Figure 8. Cholesterol variation under influence of different doses of K.S. in 24 hours.

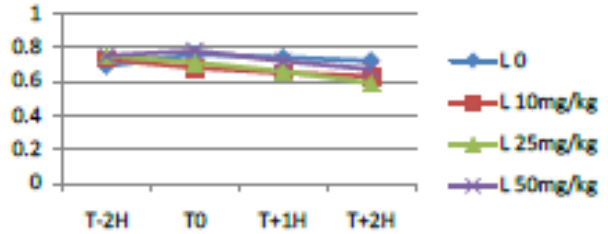


Figure 9. Cholesterol variation under influence of different doses of K.S. in temporary hyperglycemia.

which have been isolated from plants, inhibit glucose transporters in the intestines, decrease the expression of genes that control gluconeogenesis, increase the storage of glucose in the liver and reduce the breakdown of glycogen , for example, which is a catechin tannin inhibits the intestinal absorption of glucose as well as epicatechin gallate increases hepatic glycogen synthesis and quercetin increases insulin synthesis, it has been reported in the literature that *Khaya senegalensis* bark are rich in these compounds. It is possible that the hypoglycemic action of the plant is related to the presence of these compounds.

Glucose does not appear to vary significantly ($p > 0.05$) after one month of daily administration of 10 - 25 - 50 mg/kg of extract ethyl BW *Khaya senegalensis*. There is still that daily administration of 50 mg/kg of BW extract decreased by 23% glucose test after fifteen days, this decrease is not significant.

The hypoglycemic action of the extract is not very remarkable for rabbits even in overload of glucose, because rabbits are not diabetic and that any variation in blood glucose have been standardized by the regulatory systems this parameter.

For cons, the administration of 25 mg of ethyl extract of *Khaya senegalensis* causes a decrease of 42.05% triglyceride 15 days after the start of the test and increased 48.46% and 52.50% respectively after 12 h, 18 h and action of the extract. In addition, no significant changes were noted on triglycerides with rabbits temporary hyperglycemia. Also, the statistical analysis of these results has revealed no significant difference.

Similarly, in normoglycemic rabbits treatment with the extract *Khaya senegalensis*, it was found that after a month trial, the daily administration of the extract ethyl 10 - 25 - 50 mg/kg BW *Khaya senegalensis* not significant changes in serum cholesterol compared to control group. However, cholesterol levels in normoglycemic rabbits after feeding different doses of ethyl extracts of *Khaya senegalensis* 24 H, 6 H shows that after beginning cholesterol decreased 29.17%, 44.44%, −9.72%, respectively 10 - 25 - 50 mg/kg doses for BW. This decline was accentuated after 12 h and password −9.72% to 29.73% for 50 mg/kg dose, then continues to decline slowly. Statistical analysis of the results showed no significant difference both in rabbits.

Different doses of ethyl extracts of *Khaya senegalensis* not affect the lipid profile of rabbits (triglycerides and cholesterol) because they are not diabetic. Indeed, insulin deficiency or insulin resistance may be responsible for hyperlipidemia, because insulin has an inhibitory action on the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), a key enzyme for the biosynthesis of cholesterol. On the other hand, glucagon, catecholamines and other hormones increase lipolysis.

Are in the normal physiology of rabbits does not allow a remarkable action of ethyl extract on blood glucose, triglycerides and cholesterol. Thus, rabbits through their regulatory system that works have evacuated the extract and the hypoglycemic effect is more remarkable.

Ethyl bark extract of *Khaya senegalensis* has an effect on the liver and kidneys of normoglycemic stuffed rabbits for a month. In the liver, hepatocytes are almost normal. However, we note the presence of many cells in the connective tissue of the central vein and dilation space of Disse. This would mean that the ethyl extract of bark of *Khaya senegalensis* have induced liver cell proliferation that led to an expansion of the space of Disse. Compared to the kidneys, it notes that there are abnormal glomeruli. The renal tubules appeared dilated in places and there are glomeruli being destroyed.

5. Conclusion

The results from this study have show that oral daily administration of the ethanolic extract of *Khaya senegalensis* for lond period has side effect. Therefore, chronic usage of khaya should be avoided.

References

[1] Musa, H.R., Ambroggi, M., Souto, A. and Angeby, K.A. (2005) Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis by Nitrate Reductase Essay Applied Directly on Microscopy-Positive Sputum Sample. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 3159-3161. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.7.3159-3161.2005

[2] Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R. and Roy, P. (2008) Effects of Flavonoid-Rich Extract from Seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Diabetic Mice. *Food Chemistry*, **110**, 697-705. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.068

[3] Guermaz, R., Zekri, S., Hatri, A., Kessal, F. and Brouri, M. (2008) Le diabète de type 2 en Algérie: Poids actuel et à venir. *La Revue de Médecine Interne*, **29**, S49-S50. http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2008.03.087

[4] Singh, J. and Kakkar, P. (2009) Antihyperglycemic and Antioxidant Effect of *Berberis aristata* Root Extract and Its

Role in Regulating Carbohydrate Metabolism in Diabetic Lapins. *Journal of Ethnopharmacology*.

[5] Zhou, L., Zhou, S., Tang, J., Zhang, K., Guang, L., Huang, Y., Xu, Y., Ying, Y., Zhang, L. and Li, D. (2009) Protective Effect of Berberine on Beta Cells in Streptozotocin- and High-Carbohydrate/High-Fat Diet-Induced Diabetic Lapins. *European Journal of Pharmacology*, **606**, 262-268. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.056

[6] Sarkhail, P., *et al.* (2007) Antidiabetic Effect of *Phlomis antsookana*: Effects on Hepatic Cells Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Experimental Diabetes. *Pharmacological Research*, **56**, 261-266. http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2007.07.003

[7] Bahorun, T. (1997) Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research, 83-94.

[8] Gill, L.S. (1992) Ethnomedical Uses of Plants in Nigeria. Uniben Press, Benin City, 15-65.

[9] Maydell, H.J. (1986) Trees and Shrubs of Sahel-Thier Characteristics and Uses. Gesdtschaft, Fur, Germany, 105-110.

[10] Kolawole, S.O., *et al.* (2011) Effects of Aqueous Extract of *Khaya senegalensis* Stem Bark on Biochemical and Hematological Parameters in Rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **6**, 602-607.

[11] Adebayo, J.O., Yacubu, M.T., Egwin, E.C., Owoyele, V.B. and Enaibe, B.U. (2003) Effect of Ethanolic Extract of *Khaya senegalensis* on Some Biochemical Parameters of Rat Kidney. *Journal of Ethnopharmacology*, **88**, 69-72. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00193-4

[12] Lompo, M., Dubois, J. and Guissou, I.P. (2007) *In Vivo* Preliminary Study of Free Radical Scavenging Activity of Extracts from *Khaya senegalensis* A. Juss. *Journal of Biological Sciences*, **7**, 677-680. http://dx.doi.org/10.3923/jbs.2007.677.680

[13] Houghton, P.J. and Raman, A. (1998) Laboratory Handbook for Fractionation of Natural Extracts. Chapman and Hall, London, 199 p.

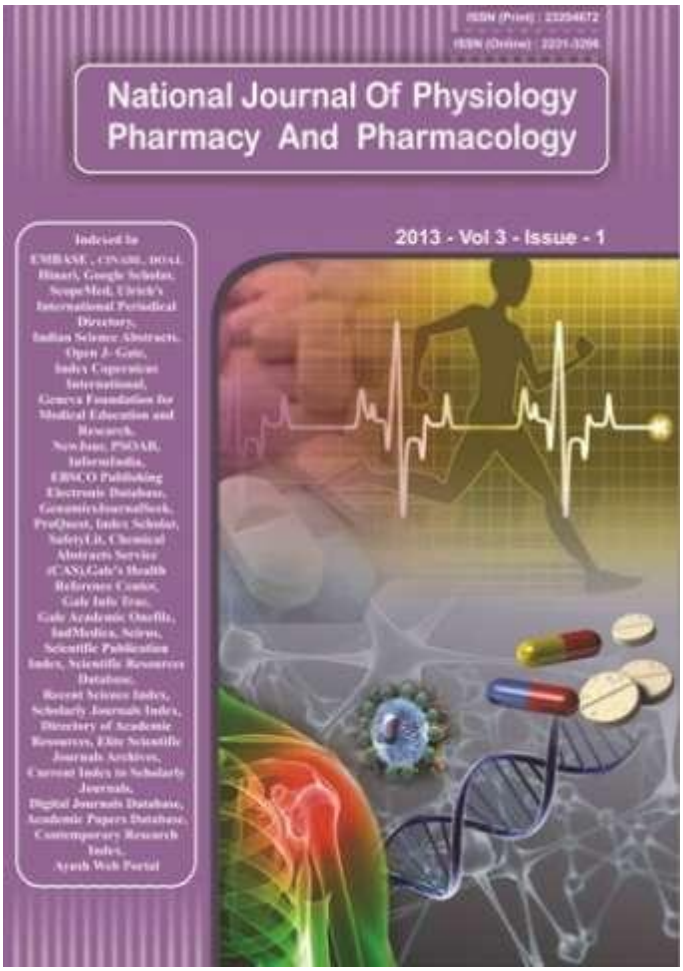
[14] Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W. and Fu, P.C. (1974) Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical Chemistry*, **20**, 470-475.

[15] Al-Achi, A. (2005) Herbs that Affect Blood Glucose Level. *Women's Health in Primary Care*, **8**, 325-330.

[16] Pari, L. and Venkateswaran, S. (2002) Hypoglycaemic Activity of *Scoparia dulcis* L. Extract in Alloxan Induced Hyperglycaemic Rats. *Phytotherapy Research*, **16**, 662-664.

[17] Waltner-Law, M.E., Wang, X.L., Law, B.K., Hall, R.K., Nawano, M. and Granner, D.K. (2002) Epigallocatechin Gallate, a Constituent of Green Tea, Represses Hepatic Glucose Production. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 34933-34940. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M204672200

[18] Vergès, B. (2007) Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **21**, 9-16. http://dx.doi.org/10.1016/j.nupar.2007.01.011


National Journal Of Physiology Pharmacy And Pharmacology
2013 - Vol 3 - Issue - 1

RESEARCH ARTICLE

EFFECT OF TOTAL KHAYA SENEGALENSIS (MELIACEAE) BARKS EXTRACTS ON HEPATIC LIBERATION OF GLUCOSE

Background: Increasing the use of traditional therapy is an obvious reality in some country. The bark of *Khaya senegalensis* is suspected to treat diabetes. That is what this type of work is started.
Aims & Objective: The aim of this work is to test the effect of total *Khaya senegalensis* barks extracts on the hepatic liberation of glucose in vitro.
Materials and Methods: The dried extracts obtained from barks powder had been prepared at concentrations of 0, 2, 5, 10 and 20 µg/L and applied on fragments of mice Wistar isolated liver, kept in Mack -Ewen solution. After incubation at 37°C in oven, glucose level in the solution had been measured by spectrophometer, using GOD-PAP® regent, for each extracts concentration at the times T=0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes.
Results: Glucose level in the solution had varied in time function from one extracts concentration to another. *Khaya senegalensis* barks total extracts had reduced hepatic liberation of glucose. This effect had been comparable to the effect of insulin 2,5IU solution used like reference substance in this experimentation. The total extracts of *Khaya senegalensis* barks could actuate on enzymes implicated in the metabolism of intra hepatocytary glucose.
Conclusion: This investigation had been coupled to phytochimic analyses that showed the presence of saponolides, anthracitic derivers and steroids in Khaya senegalensis barks.
Key Words: Insulin; Glucose; Liver Fragments; *Khaya Senegalensis*; Hepatic Liberation Of Glucose; Mice Wistar

Takin M, Ahokpe M, Zohoun L, Assou E, Aivodji N, Agossou E, Sezan A

Laboratory of Biomembranes and Cell Signaling, Department of Animal Physiology, Faculty of Sciences and Technology (FAST), University of Abomey Calavi, Cotonou, Republic of Benin

Correspondence to: Sezan A (alphonse.sezan@fast.uac.bj)

Received Date: 25.09.2013
Accepted Date: 29.09.2013

DOI: 10.5455/njppp.2014.4.290920133

INTRODUCTION

Metabolic diseases such as diabetes pose enormous challenges today in global populations. Diabetes is a malfunction of the control system of blood glucose resulting from genetic and / or environmental. This condition is caused by either a deficiency in the secretion of insulin, or misuse of the said hormone in the body where the classification of diabetes into two specific groups: lean "insulin dependent diabetes" or diabetes or Type I met young patients and characterized by insulin deficiency, "the non-insulin dependent diabetes" or type II diabetes or fatty, met in subjects 40 years especially, but also increasingly in the young and obese subjects, characterized by misuse of insulin by the body tissues.[1]

Forecasts announced for 2030 a figure of 366 million diabetics in the world.[1] This increase is expected to increase, aging, obesity, too unhealthy diets and lifestyles sedentary. Diabetes is a chronic disease with a mortality rate of 2%. Modern drugs used in hospitals are too expensive for an African population with more than half live below the poverty line and poverty is considered a risk of developing chronic diseases, the continent black not less spared.[2] Indeed, diabetes is a real health problem affecting all countries, whether developed or developing, for example France has more than 3 million patients in the United States had 12 million in 1998.[3] Benin has more than 200 000 patients with diabetes according to a WHO estimate, giving a prevalence that exceeds 2% of the population. Of these patients, 90% are being treated for diabetes mellitus type II and 10% for diabetes mellitus type I. (According to WHO).[17] Without proper treatment, diabetes can cause heart disease, blindness, impotence and even amputation above the foot. In Benin, diabetes is the second leading cause of hospitalization after HIV and AIDS accounts for over 95% of consultations in internal medicine, all specialties. (According to the WHO estimate) Also, according to the World Health Organization (WHO), about 80% of the population living in the African region make use of traditional medicine for their health care needs.[4,16] Much of the Beninese population is consulted by healers, as they offer herbal extracts and cost effective.

Given the expansion of these diseases whose support is high, the WHO, in its resolution AFR/RC50/R3 31 August 2000, encouraged African countries to develop regional strategies on traditional medicine to undertake research on medicinal plants and promote their optimum use in the delivery systems of health care.[1]

Our investigations are currently focused on the action of a harvested plant in Benin (*Khaya senegalensis*: Meliaceae) used by traditional healers to try to treat diabetes.[4,5] To check the effectiveness of this plant in the treatment of diabetes can we study its effect on the liver fragments to determine its involvement in the regulation of intracellular glucose.

MATERIALS AND METHODS

Harvesting and Processing of Plant Material: The bark of *Khaya senegalensis* were collected from different regions (north, center and south) of Benin and were dried in the sun for 15 days, then reduced to powder mill knife.

Preparation of Dry Extracts of *Khaya Senegalensis*: 100g of powdered bark of *Khaya senegalensis* weighed using a Sartorius ® analytical balance, were macerated in 500 ml of distilled water for 48 hours under continuous magnetic stirring water. After this time the macerate was recovered and concentrated by evaporation of the solvent at 80 ° C at the evaporator Rotavapor®. In following the extracts were dried in an oven at 45 ° C for the solids.

Preparation of Extracts at Different Concentrations: X g of solids were dissolved in Y ml of the reaction solution to achieve concentrations of extract it to 2, 5, 10 & 20 µg/L

Determining the Efficiency of Extraction: The yield R extraction was determined according to the conventional method, the extracts obtained were weighed and then following calculation rule was applied:
R= Mass of solids /Mass of powder of bark

Phytochemical Analysis: To determine the different chemical constituents of bark of *Khaya senegalensis*, the phytochemical screening was applied using the method of Houghton PJ AND RAMA A. (1998) reviewed and adapted to the conditions of the Laboratory of Pharmacognosy and Essential Oils of ISBA This technique is based on the reactions (color and precipitation) differential of the main groups of chemical compounds found in plants.

Preparation of Biological Material: A Wistar rat was dissected and the liver has been taken apart and stored in a jar containing the reaction solution (Mack-Ewen).

Preparation of the Mack-Ewen Solution: The reagents forming the Mack-Ewen solution are:

- Sodium chloride (NaCl) concentration of 100 mM,
- Potatium chloride (KCl) concentration of 7 mM,
- Calcium dichloride (CaCl2) concentration of 1.2 mM,
- Sodium dihydrogen phosphate (NaH2PO4) concentration of 25 mM,
- Sodium hydrogen phosphate (Na2HPO4) in 10 mM concentration,
- BSA (protein) concentration of 1%.



Figure-1: Candied *K. senegalensis*



Figure-2: Powdered bark of *K. senegalensis*



Figure-3: Solids *K. senegalensis*

Table-1: Assay procedure of glucose by the GOD-PAP method

tube	white	Etalon	Dosage
reagent	1mL	1Ml	1mL
distilled water	10µl	-	-
etalon	-	10µl	-
sample	-	-	10µl

Determination of Glucose: Glucose was measured for each of the concentrations of the extracts *K. senegalensis* and for each time t = 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes

by spectrophotometry using the GOD-PAP reagent ®. This is an enzymatic method based on the oxidation of glucose.

Glucose was also assayed for insulin solution to 2.5UI and the effect was compared with extracts of *K. senegalensis* 2 and 5 µg/ L.

Procedure: In each of the three (03) tanks labeled respectively White Stallion and Dosage, we 1mL of reagent GOD-PAP ® using a micropipette Ependhorff® P1000. Then we add respectively, using pipettes Ependhorff® P10, 10µL distilled water, 10µL of standard glucose and 10µL of the sample to be assayed. (Table 1) Mix well and keep in the dark for 10 minutes at 37 ° C or 20 minutes at room temperature. Soon realize reading optical densities (OD) spectrophotometer BIOLAB the wavelength of 540 nm.

RESULTS

Extraction Efficience: The mass of solids is obtained 22.62 g, corresponding to a yield,
R= (22.62 g /100 g) X 100 = 22.62%

Results of Phytochemical Analysis: Extracts from the bark of *Khaya senegalensis* contain abundant polyphenolic compounds such as tannins, catechin tannins and leuco-anthocyanins, and abundant saponins such as sanosides with a foam index of 4. Other polyphenolic compounds such as anthocyanins as anthracene derivatives such as 0-glycosides reduced aglucones are scarce in these extracts unlike steroids which are there in small quantities. (See Table 2)

Glucose Determination (measuring the variation in optical density versus the concentration of the total extracts of *Khaya senegalensis*): The figure 4 shows the change in optical density as a function of different concentrations of total extracts of *Khaya senegalensis*. Changes in optical density obtained for the determination of glucose are shown in Figure 4 for concentrations 2 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L of total extracts of *Khaya senegalensis* to time T = 0, 10, 20, 30, 40 and 60 min. Changes in optical density in the control linear and evolve from the bottom up in time. Changes in optical density for total extracts of *Khaya senegalensis* to different concentrations are in general lower than the control in the same time. Changes in optical density obtained for the determination of glucose with total extracts of *Khaya senegalensis* to a concentration of 10 µg/L were maintained above those obtained with the control at times T = 0, 10, 20, 30 and 40 (mn). At time t = 60 min extracts at different concentrations were maintained lower than that of the control for the same time optical density. The extracts at concentrations below 10 µg / L seem to record the lowest optical densities. The following figure shows the comparison between the curves of variation of the optical density of the control and the optical density of the extract at 10 µg/L.

Table-2: Results of phytochemical analysis

Chemical Group	Subgroup	Observation
Polyphenolic Compounds	Tannins	+++
	Cate classy tannins	+++
	Anthocyannes 2	++
	Leuco anthocyanin	+++
Saponins	Sanosides (Index foam is 4)	+++
Steroids	Steroids	+
Anthracene Derivatives	O-glycosides with reduced aglucones	++

+++: abundant; ++: little; +: low

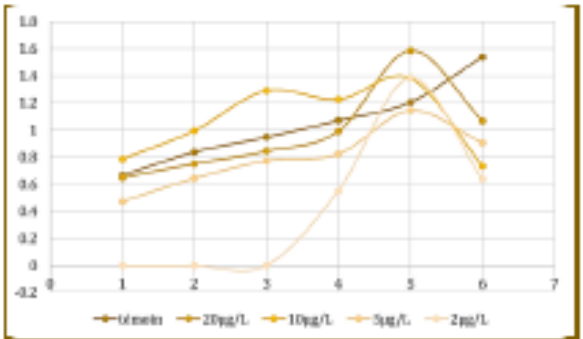


Figure-4: Variation of the optical density as a function of different concentrations of total extracts of *Khaya senegalensis*

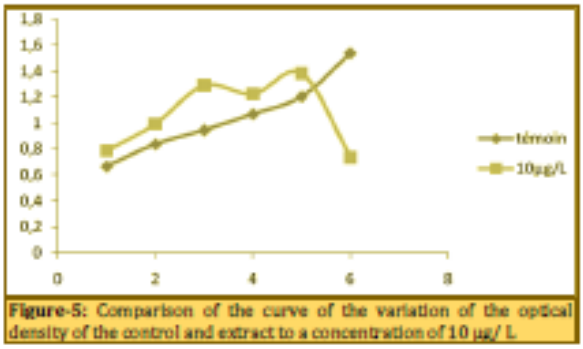


Figure-5: Comparison of the curve of the variation of the optical density of the control and extract to a concentration of 10 µg/ L

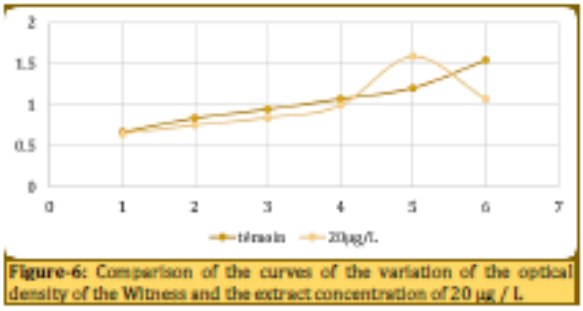


Figure-6: Comparison of the curves of the variation of the optical density of the Witness and the extract concentration of 20 µg / L

= 40, T = 50, T = 60 min are below the OD of the control. The shape of the curves of total extracts of *Khaya senegalensis* concentrations 2 µg /L and 5 µg/L is similar to the curve of insulin. Changes in optical density for insulin are above the optical density variations in extracts at concentrations 2 µg/L and 5 µg/L (figure 10).

DISCUSSION

Movement of glucose through the membrane of hepatocytes: The graph for the determination of glucose in the control tube is a straight line upward over time. This would explain hepatic glucose release in the reaction solution. This release is probably due to a mobilization of glucose in liver cells. Several ways of mobilization may be causing this. You could think of a priori simple diffusion of glucose (movement of glucose following a concentration gradient), but this is much more complex. It could involve a group such as glycogen synthase, glycogen phosphorylase and phosphatase enzymes, and molecules such as ATP and protein type PEPCK. When glucose levels drop significantly in the environment of hepatocytes, glycogen synthase phosphatase as glycogen are inactivated, resulting in the activation of glycogen phosphorylase by phosphorylation (contribution by ATP phosphatase group or other form of cellular energy reserves) which phosphorylate glycogen and will hydrolyze to glucose. The pyruvtate phosphoenol (PEPCK), the enzyme which catalyzes the gluconeogenesis (the conversion reaction of intermediate non-carbohydrate such as oxaloacetate glucose) could also be activated, thereby increasing the flux of glucose to the outside environment of the hepatocytes.[6] Then we could justify the release of glucose by the proper functioning of enzymes isolated from rat liver, which would be kept in conditions or very close physiological offered the reaction solution. This would also make a good preparation of said solution.

Effect of total extracts of *Khaya senegalensis* glucose: The change in optical density obtained in this experiment by spectrophotometry is a quantity that provides information on the amount of glucose present in the medium. Is directly proportional to the glucose concentration in the medium. The phenomenon we observe in the absence of total extracts of *Khaya senegalensis* is a gradual release of glucose from hepatocytes into the external environment. When we apply the total extracts of *Khaya senegalensis* to different concentrations 2 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L in time T = 0, 10, 20, 30, 40 and 60 minutes, we see so overall decrease in the rate of glucose in the medium. Two possible events could justify these results:

- *A glucose degradation in the environment under the effect of the extracts:* All times should be noted that pyruvate would not in this case part of the degradation products of glucose degradation product that would give a reading of optical density variation in the experimental wave length of 500 nm, which is to add the variations of the optical density recorded under the effect of the extracts, which may then erroneously increase the level of glucose in the medium, the assay itself is based on oxidation of glucose to pyruvate. , We would have had values of optical density change significantly above the values of optical density change of control, as a result of total extracts of *Khaya senegalensis* to different concentrations, which is not the case that we already record the determination of glucose values of the change in optical density which are below those of the variations in optical density of the control. This would lead us to reject the hypothesis of a possible oxidation of glucose to pyruvate in the medium under the effect of extracts of *Khaya senegalensis*.

- *Oxidative degradation of glucose into hepatocytes:* There would be an oxidation of glucose to pyruvate by the activation or induction of pyruvate kinase. The pyruvate could deteriorate to acetyl coenzyme A, which enters the tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle) which is a preparatory step in the respiratory chain. The final product is ATP, which is a form of energy storage needed for cellular metabolism.[10-15] This hypothesis would have two consequences on the one hand, degradation of glycogen phosphorylase activation or induction of glycogen as it is explained above, this reaction remained upstream of the cascade of biochemical reactions that lead to a complete glycolysis with the results in the formation of ATP, the other possible entry of glucose into hepatocytes through activation of glycogen synthase. If we extrapolate our experimental in vitro phenomenon of glycemic control, the breakdown of glucose within hepatocytes to form ATP would result in a decrease of PEPCK therefore glucose by glucose enters the liver, and hepatocytes seeking their physiological balance, and glycogen are in dynamic equilibrium with the blood glucose.

- For concentrations 10 µg/L and 20 µg/L it would have produced a saturation of the enzymes involved in the

degradation of intracellular glucose to ATP. Indeed extracts of *Khaya senegalensis* to concentrations below 10 µg/L seem to reported changes in the optical density lower than concentrations of the extracts to 10 µg/L and 20 µg/L. Would occur for concentrations 10 µg/L and 20 µg/L excess of substrate (glucose) for the enzyme pyruvate kinase (which degrades glucose to pyruvate to borrow the Krebs cycle and the process of breathing with the formation energy ATP), may be this is due to saturation of receptors and therefore, part of the glucose escape hepatocytes experimentation by the mechanism of facilitated transport of glucose across the biological membrane to its action on PEPCK level explained above kernel this would explain the values of the variation of the high optical density of the extracts at concentrations 10 µg/L and 20 µg/L in contrast to those obtained for concentrations 2 µg/L and 5 µg/L.

- The effect of the extracts concentration 5µg / L of glucose kinetics show an interest in this because the glucose concentration was kept almost constant 30 min after application.

Comparing the effect of total extracts of *Khaya senegalensis* the effect of insulin: We note that the curve of the effect of extracts of *Khaya senegalensis* to the concentration of 5 µg / L and the effect of insulin seem to have the same kinetic (see figure 10), one could think of a similarity between the mode of action of insulin and extracts, the role of insulin in regulating blood glucose is accelerated by the breakdown of glucose to form ATP or stimulating the entry and storage of glucose as glycogen in the liver.[7-9] Curve insulin concentration 2.5 IU/ml is above the curve extracts of *Khaya senegalensis* the concentration 5 µg/L, this would not mean that extracts of *Khaya senegalensis* have greater activity than insulin, it cannot be said for the present study did not address this aspect.

At this stage, our experiments do not allow us to clarify the mechanism of action of *Khaya senegalensis*. We will continue this work to explore mechanisms of action.

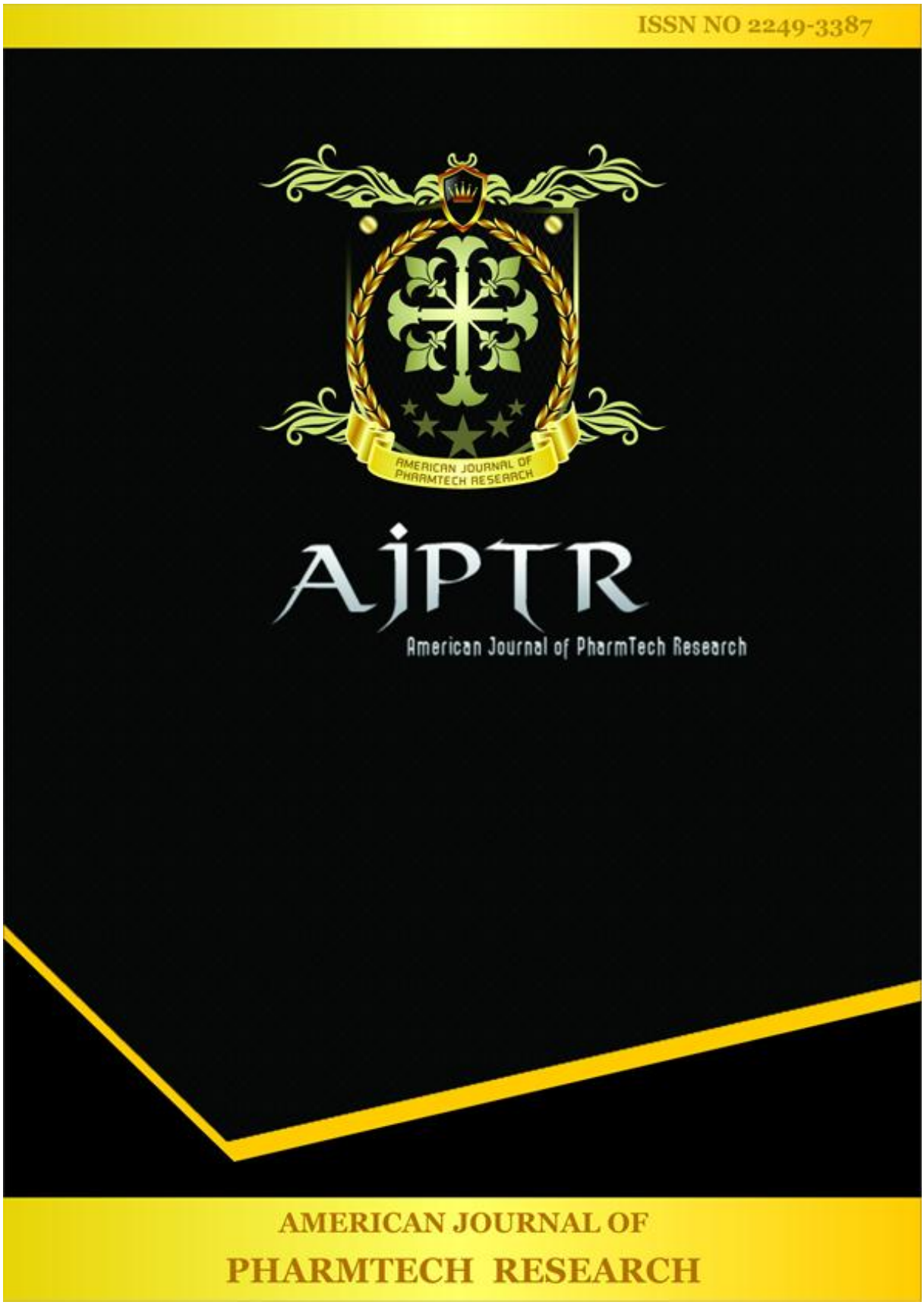
CONCLUSION

The total extracts of *Khaya senegalensis* caused the decline in the rate of hepatic glucose release, this could be explained by a blockade of cellular glucose metabolic pathways that would lead to a decrease in hepatic glucose output. The anti-hyperglycemic effect reported by some traditional healers would thus be justified. The mode of action of total extracts of *Khaya senegalensis* is comparable to that of human insulin.

REFERENCES

1. Adjotin P. Médecines traditionnelles et médecine moderne au Bénin. Collaborations ou conflits ? (Mémoire de DES) Genève : Institut universitaire d'études du développement (IUED), 1996. p. 57.
2. Lehninger AL, Nelson DL. Principios de Bioquímica. 2da Edicion. Spain : Omega 1999. p. 453-6.
3. Grimaldi A, Jacqueminet S, Heurtier A, Bosquet F, Collectif. Guide pratique du diabète. 3e édition. Médiguides (Paris): Elsevier Masson. 2005. p. 271.
4. Juss A. CTFT Khaya senegalensis (Desr.). Bois et Forêts des Tropiques, no 218, 4è trimestre; 1988 : 43-55.
5. Christine O. Contribution à la conservation du Khaya senegalensis (Desr). A. JUSS: importance socio-économique, structure et dynamiques des peuplements naturels et productivités des plantations d'essai au Bénin. 2000.
6. Koukoui ASI. Omédine. étude des signaux calciques hépatocytaires induits par différents agonistes modulateurs de la sécrétion biliaire et de la production hépatique du glucose : acides biliaires, prostaglandines et glucagon. Thèse de doctorat en signalisation cellulaire, endocrinologie, reproduction/science de la vie.2005. p. 169.
7. Boullard B. Dictionnaire plantes médicinales du monde. Réalité et croyance. Ed ESTEM 7, paris: De Boeck Secundair, 2001. p. 636.
8. Yaro B. Contribution à l'étude du traitement traditionnel du diabète au mali. thèse de pharmacie. 1992. p. 133.
9. Coulibaly B. Contribution à l'étude des remèdes traditionnels utilisés dans le traitement du diabète au mali. Thèse de pharmacie. 1988. p.113.
10. Gbenou JD, Oyeniran C. Contribution à l'étude des propriétés hypoglycémiantes de l'huile essentielle d'Eucalyptus canaldulensis. Mémoire de Maîtrise en physiologie. Cotonou ; Bénin 2004;33-45.
11. Keita A, Mariko E. Etude de l'activité hypoglycémiante des feuilles de Sclerarya birrea, revue Médecine Traditionnelle Africaine 1998; 10 :16-25
12. Lawson-evi P, Eklu-Gadegbeku. Activité hypoglycémiante de quelques plantes médicinales. Revue Médecine traditionnelle Africaine 1997;1(9):60-69.
13. Oga ASS, Tebi A, Aka J, Adouéni KV, Malan KA, Kouadio LP, Loktrou. Le diabète sucré diagnostiqué en Côte d'Ivoire: des particularités épidémiologiques. Med 2006;66:241-6.
14. Rao BK, Rao CH. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of , syzygium alternifolium (wt) Walp. Seed extracts in normal and diabetic rat. Phytomedecine 2001;8:88-93.
15. Goodman, G. Gilman, G. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7th Edición. México: McGraw- Hill. 1994. p. 1459-70.
16. World Health Organization. Rapport de l'OMS. Press Release WHO/38. 16 May 2002.

Cite this article as: Takin M, Ahokpe M, Zohoun L, Assou E, Alvodji N, Agossou E, et al. Effect of total *Khaya senegalensis* (Meliaceae) barks extracts on hepatic liberation of glucose. Natl J Physiol Pharm Pharmacol 2014; 4:105-110.
Source of Support: **Nil**
Conflict of Interest: **None declared**


ISSN NO 2249-3387
AMERICAN JOURNAL OF PHARMTECH RESEARCH
AJPTR
American Journal of PharmTech Research
AMERICAN JOURNAL OF
PHARMTECH RESEARCH

RESEARCH ARTICLE Am. J. PharmTech Res. 2014; 4(6) ISSN: 2249-3387



AMERICAN JOURNAL OF PHARMTECH RESEARCH
Journal home page: http://www.ajptr.com/

Action of Ethyl Extracts of KhayaSenegalensis on Rat Hepatocytes. Evaluation of Toxicity

Assou K. Eudoxie[1], Behanzin Justin[1], Ahokpe Melanie[1], Wouetola Ermence[1], Agossou A. Essè[1], Sezan Alphonse[1]*

1 Laboratory of Biomembranes and Cell Signaling University of AbomeyCalavi, 06 BP 3041 Cotonou, Benin.

ABSTRACT

The present work aims to study the effect of ethyl extract stem bark of Khayasenegalensis on the lipid profile of rat hepatocytes. For this, a sub-chronic gavage was performed on batches of 8 Wistar rats received 3 respectively, by oral administration of the extract at doses 2.5 mg / kg; 5mg / Kg; 10mg / Kg; 25mg / Kg; 50mg / Kg; 100mg / kg and 200mg / kg body weight for 14 days (control group received instead of the extract of Khayasenegalensis of distilled water) and isolation of hepatocytes was made after killing rats. Then, all the lipids (phospholipids and neutral) were extracted and separated by thin layer chromatography on two different plates. TLC of lipids (phospholipids and neutral) revealed an appearance of membrane lipids in the dose of 5 mg / kg; 10mg / Kg; 25mg / Kg; 50mg / Kg; 100mg / kg and 200mg / kg compared to control, while in the dose of 2.5 mg / kg there was no significant change compared to the control. The appearance of neutral lipids is only degradation of the phospholipids and the phospholipids provides that Khayasenegalensis lysed membrane of hepatocytes, which leads to the dispersion of the phospholipids. So it was only after dispersion, these lipids have started to deteriorate in neutral lipids. Where the administration of ethyl extract of trunk bark khayasenegalensis high dose may cause necrosis of liver cells, thus at high doses is toxic Khayasenegalensis. And the most efficient to mitigate the risk of toxicity are those doses less than or equal to 2.5 mg / Kg.

Keywords: Khayasenegalensis, phospholipids, neutral lipids, CCM, necrosis.

*Corresponding Author Email: sezco@live.fr
Received 04 November 2014, Accepted 02 December 2014

Please cite this article as: Sezan A *et al.*, Action of Ethyl Extracts of KhayaSenegalensis on Rat Hepatocytes. Evaluation of Toxicity. American Journal of PharmTech Research 2014.

INTRODUCTION

Africa and Benin in particular, there are many plants that are known for their therapeutic qualities, among them are: Khayasenegalensis and Azadirachtaindica (Meliaceae), Allium sativum L. and Aloe vera L. (Liliaceae) Anogeisusleiocarpus (Guill and perr.) and Combretummicranthum (G. Don) (Combretaceae) Ageratum conyzoides L. (Asteraceae), Eucalyptus globulus (Myrtaceae); etc. Khayasenegalensis is one of six species of the genus Khaya, native to tropical Africa and belonging to the family Meliaceae. It grows in many countries Togo, Cameroon, Mali, Cote d'Ivoire, Senegal [1, 2]. It is used in the treatment of conditions such as gastrointestinal disorders, enteralgia, inflammation, intestinal parasites, he also intervene in cardiac disorders (tachycardia, sore heart), vascular disease (varicose veins, hemorrhoids), skin problems (scabies, eczema), gynecological disorders (dysmenorrhea, infertility), the neuropathology (headache, hemiplegia), liver disease, diabetes, etc. [3, 4, 5]. Indeed, the use of K. senegalensis in the treatment of all those pathologies highlights several different functional mechanisms of the body's organs. In the case of diabetes, for example, organs are arraigned pancreas, liver, kidneys. But the liver is the heaviest and most voluminous organ in the body. It is located in the abdominal cavity in humans and housed in the right upper quadrant. It comprises 65% of liver cells (hepatocytes) that through their multiple functions, the liver put in interaction with other organs. Accordingly, any malfunction of the liver can have serious repercussions on many body functions. For several decades, diabetes is a disease that has plagued the world by its frequency and its complications. According to WHO, the prevalence is for a growth of about 35% [4] and after the screening of Boyle and his collaborators, the worldwide diabetic population would reach 300 million or more by 2050[6]. Given the complications and difficulties of the therapeutic management of diabetes and given the rumors K. senegalensis in the treatment of diabetes by traditional healers, many scientists have studied this plant to know his or her principle (s) active (s) and its mode of action to confirm or deny rumors of a hand and relieve the sick in the health and financial secondly plans. Thus, the laboratory Biomembranes and Cell Signaling did not remain indifferent to this state of affairs, it is a mission to find the mode of action of this plant to relieve the pains of diabetics worldwide and Benin in particular. Thus TAKIN et al (2013) showed on normoglycemic and hyperglycemic rabbits K. senegalensis can keep blood sugar normal in the first and can be back to normal in the second following the dose and time of administration[4]. These results give the K. senegalensis "hypoglycemic effects" and "anti hyperglycemic." In addition, TAKIN et al (2013) have shown that in the presence of K. senegalensis, isolated rat liver (in vitro assay) was observed movement

of glucose through. These results suggest that K. senegalensis could stimulate the storage of glucose in the liver. Thus these data gave rise to several questions such as: Khaya fact that the membrane of hepatocytes? Would he membrane receptors? How does it trigger the storage of glucose? It borrows the same signaling pathway as insulin? Khaya would it not toxic? All these questions then follows the subject of our work to assess the potential toxicity of Khayasenegalensis on rat hepatocytes to promote, encourage the use of this plant and eventually replace inconvenient conventional treatments such as insulin injection, or where appropriate discourage its use.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Plant material

The bark of *Khayasenegalensis*, were collected in April 2011 in rain season. The plant material wasair-dried and milled into powder. The percolated mixture was filtered and evaporated with rotavapor

Animal

Wistarrat liver is use and subjected to a sub-chronic feeding (14 days) and were obtained from the Animal Breeding ofcytogenetics laboratory of the ISBA / FSS / Cotonou. Breeding is done in a lighted room 12 hours a day, and the temperature is ambient. The animals had free access to food and water.

Methods

Preparation of extract from the bark of Khayasenegalensis

To obtain the extract ethyl bark of Khayasenegalensis, 200 g powder obtained, weighed using an analytical balance Sartorius® were macerated in 2000 ml of ethanol at 90 ° C under agitation continuously for 72 hours. Then, the macerate was filtered through hydrophilic cotton fiber. The obtained filtrate was evaporated at 40 ° C using the evaporator and the Rotavapor® rotatitif mesh is reused for a second maceration to increase yield. The paste deposited at the bottom of the evaporator flask was recovered in jars and put in oven-drying at 45 ° C. After complete drying, the solids at the bottom multiples jars were scraped using a spatula stainless steel, crushed in a mortar porcelain and kept in glass bottles previously labeled. Finally, the yield is calculated.

Feeding rats

In this operation, it is administered the ethyl bark extracts KhayasenegalensisWistar rats (males and females) and approximately 200g of the same diet, and orally at various doses for about two weeks. These animals received no other medication in the time outside of the extract. The rats

were randomly divided into 08 lots, 03 rats (No. 1, No. 2 and No. 3) and attributed respectively to lots doses per kg body weight per day: 0 mg / Kg; 2.5 mg / kg; 5 mg / kg; 10 mg / kg; 25 mg / kg; 50 mg / kg; 100 mg / kg and 200 mg / kg; and sets the volume to be administered at V = 01 ml. Then, each rat weighs each lot in order to find the average weight and the effective dose of extract which will be administered is calculated. Gave then daily and at the same time the rats for 14 days. Lot 1 is the control group and received oral administration of distilled water instead of the extract ethyl (0 mg / kg) of Khayasenegalensis for 14 days; other lots (2-8) are treated by oral administration, the respective doses of 2.5 mg / kg; 5 mg / kg; 10 mg / kg; 25 mg / kg; 50 mg / kg; 100 mg / kg and 200 mg / kg body weight per day of the extract of Khayasenegalensis ethyl, for 14 days; Finally, the rats were sacrificed 24 hours after the last gavage, to take our livers to various manipulations.

Isolation of rat hepatocytes using the cold trypsinization[7, 8, 9, 10, 11].

The trypsinization is the method for breaking the tissue to isolate cells using the exposure to hot or cold method. Due to tryptic activity of trypsin in the method of trypsinization hot at 37°C; the tissue is damaged and harvesting the cells after 30 minutes of incubation may lead to cell damage or reaggregation. These inconveniences can be overcome by using a minimum concentration of trypsin and a long incubation time in order to increase the separation efficiency of trypsin. At longer incubation times, the tryptic activity affects the cells and therefore the temperature should be minimized to reduce the triptych effect. A simple method to reduce damage to cells during exposure is to soak the fabric with trypsin at 4 ° C for 6-18 h to allow penetration of the enzyme with low tryptic activity followed by exposure of 20 to 30 minutes at 37°C for disintegration. Rats (250 g) were anesthetized by inhalation of chloroform, and the liver was isolated by a horizontal cut on the ventral surface near the diaphragm of the animal. The isolation of the liver time does not last more than 2 to 3 min. The liver was maintained in phosphate buffer saline solution (PBS) at 4 ° C until use. The experimental environment was sterilized. 0.375 g of liver was removed and then cut with the surgical blade into small pieces; these pieces were washed with PBS, and then transferred to Petri dishes and other unwanted tissues such as adipose tissue and necrotic tissue were removed. Liver pieces were washed once more with PBS; transferred to a Falcon tube in which they are soaked in 0.25% crude trypsin in RPMI for 18 hours at 4°C. Trypsin is added after the operation of 10 ml per 1 g of tissue. After incubation, the liver pieces were exposed at 37°C for 30 minutes in 1 ml per 100 mg of warm RPMI tissue. In order to completely disperse the tissue is made gentle pipetting, then the solution is sterile filtered through a muslin cloth to remove the larger pieces. Cells were preserved for experiments and stored in common crop in 5% dimethyl

sulfoxide (DMSO) as cryoprotectant used, added to the cell to reduce the formation of ice and thereby prevent cell death in during the freezing process, and the cells may be frozen at -80°C and stored in liquid nitrogen in complete safety).

Extraction and thin layer chromatography of cellular lipids

Lipid extraction

The lipid extraction method is based on the method known as solvent gradient used by Stephan et al. (2004) for extracting mycobacterial lipids. It has been adapted to the hepatocytes. Four successive extractions are carried out on the same sample cell. The extraction solvent is methanol / chloroform increasingly enriched in chloroform [12, 13]. The cellular lipids were extracted by four successive extractions a day, with stirring at 250 rpm. The lipid extract is recovered after separation of the cells; adding an aqueous solution of 0.9% NaCl (CHCl3 proportional to volume) afforded the two phases [14, 15]. The cells are then ready to undergo the next extraction. The proportion of solvents chloroform (CHCl3) and methanol (CH3OH) are different according to the extraction step:

First extraction: CHCl3 / CH3OH (1V: 2V)

Second extraction: CHCl3 / CH3OH (1V: 1V)

Third extraction: CHCl3 / CH3OH (2V: 1V)

Fourth extraction: CHCl3 / CH3OH (2V: 1V)

A volume V = 15 mg per 500 ml of cells

All the organic phases are combined and the solvent was evaporated under a hood or Rotavapor. The lipid extract is resuspended in a volume of chloroform (1 ml of solvent to 10 mg of lipids). Then the lipid extract is stored at -80 ° C or used for the analysis.

Note: If the sample was stored at - 80 ° C, it must be evaporated under a stream of nitrogen and then resuspend in chloroform to know the precise volume before lipid analysis [15].

Thin layer chromatography (TLC) of cellular lipids

This is the separation of different classes of lipids on silica gel thin layer chromatography. CCM is based on electrostatic interaction / hydrogen bond. The principle of "like attracts like that," often encountered in chemistry allows still here to explain the nature of the phenomena involved. It is based on the differential adsorption phenomena: a mobile phase consisting of solvent progressing along a stationary phase (silica) on a fixed plate. TLC takes place in three stages: preparation of the tank, preparation of the plate, and elution. The various cellular lipids are divided into two major groups: phospholipids and neutral lipids. They are separated on two different plates. [13]

Separation of neutral lipids by TLC

As their name suggests, the neutral lipids are not charged compounds. They include: the free or esterified fatty acids, mono-, di- and triglycerides, free sterols and esterified. They are separated using low-polar solvents: hexane, ethyl ether.The separation of neutral lipids is first by migration in a hexane solvent: diethyl ether: glacial acetic acid (80: 20: 2 v / v / v) up to half of the plate. The plate is then dried a second migration is performed until 1 cm from the upper edge of the plate with hexane alone [13, 15].

Preparation of the vessel (mobile phase)

Eluent E1: it corresponds to the M1 mixture of the following solvents: hexane: ethyl ether: glacial acetic acid (80: 20: 2 v / v / v) [15, 13].

Eluent E2: it is the only hexane [13].

The two eluents are placed in two different vessels C1 and C2 at a height of about 0.5 cm from the bottom of the tank; then the tanks are closed so that they are saturated eluent steam for 10 to 15 min.

Preparation of stationary phase

On a silica plate (Silica gel 60, Merck, France) with dimensions of 10 × 10 cm, draw a pencil, a line about 1 cm from the bottom edge and parallel to it; is then deposited on the line, using capillary tubes and 0.5 to 1 cm apart, 10 mL of each sample to be analyzed lipids (control, sample 1, sample 2 ...) [15, 13].

Elution or development of the chromatogram

The plate is placed in a slightly oblique position in the cell C1 is then closed. The solvent which covers the bottom rises along the plate by capillary action. Migration is terminated when the solvent front reaches about half of the plate. The plate is then placed in the second tank C2 and migration after drying is stopped when the solvent front reaches the top of about 1cm from the plate. The level reached by the solvent (front line) is indicated by a thin line and the plate is dried in the open air or using a drier [15, 13].

Separation of phospholipids by TLC

Phospholipids are polar molecules separated using combinations of highly polar solvent: water, methanol, chloroform ... Migration was once with a mixture: chloroform / acetone / methanol / acetic acid / H2O (50/15/10 / 10/4 (v / v) or chloroform / methanol / glacial acetic acid / water (25: 15: 4: 2) or chloroform / methanol / ammonia (65: 25: 4). these proportions are on the verge of . two-phase mixture must remain monophasic [15, 13].

Preparation of the vessel (mobile phase)

The eluent corresponds to the mixture of the following solvents: chloroform / acetone / methanol / glacial acetic acid / H2O (50/15/10/10/4) or chloroform / methanol / glacial acetic acid / water (25: 15: 4: 2) or chloroform / methanol / ammonia (65: 25: 4). The eluent was placed in a tank at a height C3 of about 0.5 cm from the bottom of the tank; then the vessel is closed so that it is saturated with steam for eluting 10-15 min [15,13].

Preparation of stationary phase

On a silica plate (Silica gel 60, Merck, France) with dimensions of 10 × 10 cm, draw a pencil, a line about 1 cm from the bottom edge and parallel to it; is then deposited on the line, using a capillary tube and 0.5 to 1 cm apart, 10 mL of each sample to be analyzed lipids (control, sample 1, sample 2)

Elution or development of the chromatogram

The plate is placed in a slightly oblique position C3 in the vessel is then closed. The solvent which covers the bottom rises along the plate by capillary action. Migration is terminated when the solvent front reaches approximately 1 cm from the upper end of the plate. The level reached by the solvent (front line) is indicated by a thin line and the plate is dried in the open air or using a drier [15, 13].

Revelation of lipids on TLC plates

Revelation is made by spraying a solution of copper II sulfate 10% (10 g in 100 mL of CuSO4, $5H_2O$ H3PO4 8% (v / v)). Once the dry plate, it is placed for about 15 min in an oven at 150 ° C min. The presence of spots indicates the presence of lipids in question [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction yield

The yield is calculated using the formula published by Takin et al

Table 1: Table showing the yield obtained after extraction

Extract	Performance in%	Color	Aspect
Macerated / ethanol	16,6	Red wine powder	Powder

Action of ethyl bark extract of K. senegalensis on the profile of neutral lipids in rat hepatocytes

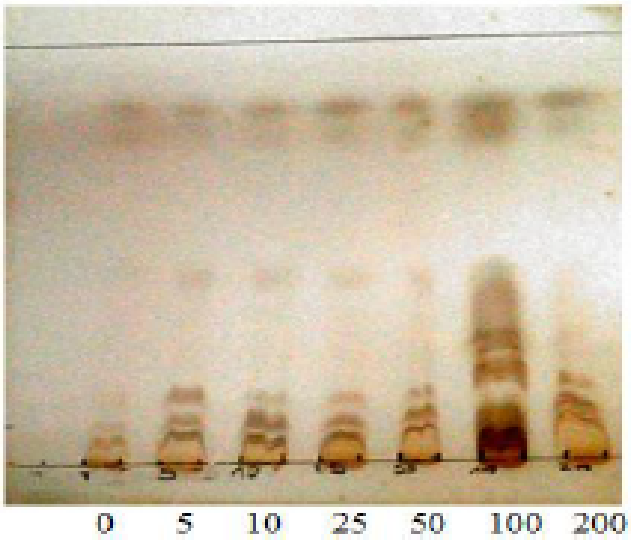


Figure 1:Photo of the plate obtained after migration of different neutral lipids

In groups of rats treated with the extract, it was found that the daily administration of different doses of the extract ethyl Khayasenegalensis bark compared to the control group for 14 days influenced qualitatively and quantitatively different types of lipids cells in neutral. Figure 1 shows the picture of the plate obtained after a first migration with hexane / ethyl ether / glacial acetic acid (40: 10: 1 v / v / v) up to half of the plate, then a second migration with hexane alone to 1 cm from the edge of the plate. This allows to separate the different neutral lipids. The first deposit corresponds to the negative control and the other are respectively the doses of 5 mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg 100mg / kg and 200mg / kg of bark extract ethyl K. senegalensis. Whereas in the neutral lipids in their entirety is found that:

For the control there are four spots about four neutral lipids

For the doses of 5mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg was more than six to six spots, therefore neutral lipids.

For doses of 100mg / kg and 200mg / kg was more than seven spots longer than seven neutral lipids.

Considering each lipid, we note that:

The spots at the witness are very low, so each lipid in question is a small amount compared to other The spots at doses of 5mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / Kg least low compared to the control, so the amount of each of the lipids in these doses is greater relative to witness. Spots at doses of 100mg / kg and 200mg / kg are sharper, darker compared to the control, so the amount of lipids in each of these doses is greater compared to the control and all other doses. In addition, it is noted that at each there is more deposit heavy lipids (spots bottom) that slight lipids (spots from

above). Including the dose of 2.5 mg / kg of extract, we see that there is no significant change in the dose for this compared to negative control lipid profile. Indeed, at the witness as to the level of 2.5 mg / kg dose was two weak spots, so there are two neutral lipids in small quantities. As at doses of 5mg / kg and 10mg / kg was well visible four spots, so the presence of four lipids in large quantities compared to the control and 2.5 mg / Kg.

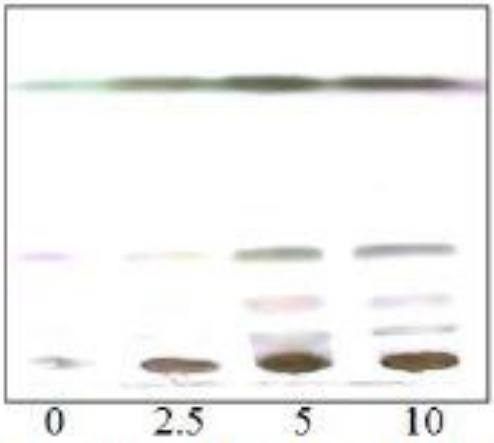


Figure 2:Photo of the plate obtained after migration of different neutral lipids.

The first deposit corresponds to the negative control and the others are respectively doses 2.5 mg / kg; 5mg / Kg; 10mg / kg, ethyl extract from the bark of Khayasenegalensis

Action of ethyl extract of the bark of Khayasenegalensis on the profile of phospholipids in rat hepatocytes

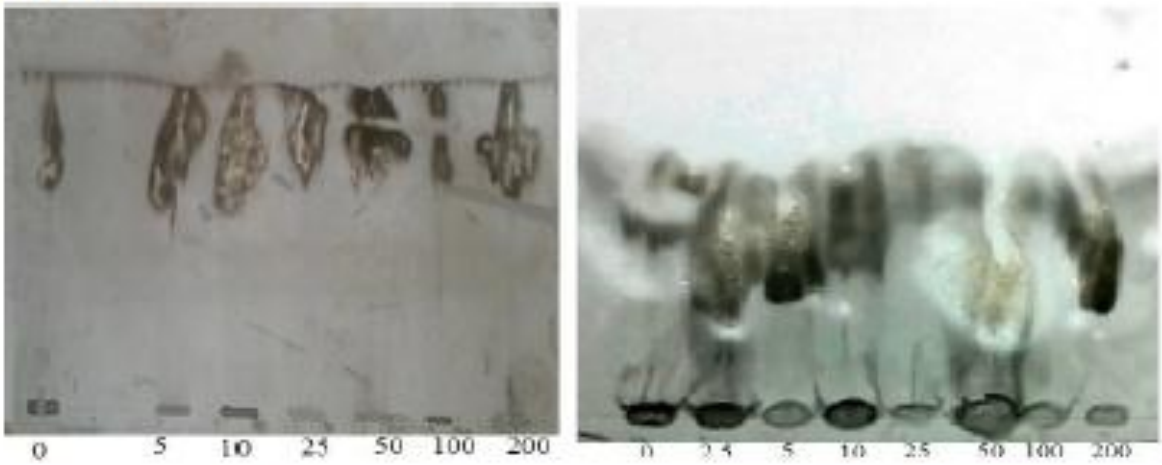


Figure 3: Photograph of the plates obtained after migration of different phospholipids with a mixture (a) chloroform / acetone / methanol / glacial acetic acid / water (50: 15: 10: 10: 5 v / v); (b) chloroform / methanol / glacial acetic acid / water (25: 15: 4: 2)

Daily administration of different doses of the extract of the bark of ethyl Khayasenegalensis in groups of rats treated with the extract relative to the control group during 14 days influenced phospholipids in cells. Figure 2 shows the plates obtained after migration with a mixture (a) chloroform / acetone / methanol / glacial acetic acid / water (50: 15: 10: 10: 5 v / v); (b) chloroform / methanol / glacial acetic acid / water (25: 15: 4: 2) to 1 cm from the edge of the plate; This allows to separate the various phospholipids. The first deposit corresponds to the negative control and the others are respectively doses 2.5 mg / kg, 5mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg 100mg / kg and 200mg / kg of ethyl extract of the bark of Khayasenegalensis. Indeed, different eluent used do not allow to see the separation of different groups of phospholipids; but it is noted that according to the eluent, phospholipids form a cluster of spots on the one hand, which migrates to the solvent front (a) and are on the other hand dragged (b). In addition, we note that these clusters are larger spots at doses 5mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg 100mg / kg and 200mg / kg compared to the negative control and the 2.5 mg / Kg dose which are smaller. Phospholipids are therefore low in quantity at the negative control and 2.5 mg / kg dose when they are in large quantity at doses 5 mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg 100mg / Kg and 200mg / Kg. The barks of Khayasenegalensis used are those collected by the team in 2011 and used by TAKIN et al. The yield of 16.6% obtained after extraction is low compared to that of TAKIN et al (22.62%). This could be explained by the conditions and shelf life of bark on the one hand; and the concentration of ethanol was used as the other. The administration of ethyl extract of Khayasenegalensis bark at various doses: 5-200mg / Kg Figure 1 shows the picture that there is an increase in neutral lipids in cells that have undergone the action of K. senegalensis that in negative control cells; and this increase is proportional to the dose administered K. senegalensis. So we can infer that K. senegalensis is stimulates the process of biosynthesis of neutral lipids or be neutral lipids are derived from the degradation of membrane phospholipids. The process of each neutral lipid biosynthesis highlights stimulating several voice signaling, the synthesis of several enzymes and thus the transcription of several genes. The idea that the molecule can K. senegalensis has itself initiated this whole process seems unlikely. But these processes could be triggered by the presence of lesions in the membrane to compensate for losses of phospholipids. In the process of biosynthesis of phospholipids, neutral lipids (mono, di and tri glycerides) serve as precursors [16, 14]. Inversely in the case of phospholipid degradation it would release neutral lipids. Thus, the increase of neutral lipids by the action of Khayasenegalensis come from the degradation of membrane phospholipids. In addition, administration of the extract ethyl bark of Khayasenegalensis the dose 2.5mg / kg 20 shows the picture that there is no significant change in the profile of neutral lipids

by negative control report. So in the 2.5mg / kg dose there may be degradation of phospholipids. Figure 3 shows the action of ethyl extract of Khayasenegalensis bark at various doses: 2.5; 5-200mg / Kg on phospholipids. It is noted that there yardstick increased phospholipids in doses 5-200mg / kg compared to the negative control, while in the 2.5mg / kg dose there is no significant change compared to the negative control. Phospholipids are molecules specifically membrane, their strong presence in lysates under the action of K. senegalensis compared to the negative control could be explained by the fact that even before cell lysis by extraction solvents the K. senegalensis extract had induced the lysis of the plasma membrane; lysis and this is nothing other than the result of necrosis. This result allows us to understand that the degradation of membrane lipids cited above is actually the result of necrosis. Our results are consistent with the results of Adébayo et al (2003) showed in their study on some biochemical parameters of rat kidneys, the administration of the extract ethyl Khayasenegalensis (2 mg / kg body weight) for 18 days causing hypernatremia due to the diffusion of Na + from the pool in the environment and also a decrease in alkaline phosphatase (ALP), an enzyme "label" is often used to assess the integrity of the plasma membrane and endoplasmic reticulum. According to these authors attributed this reduction would be the loss of membrane components (including the alkaline phosphatase) or in extracellular fluids is to inhibition of the enzyme or its inactivation by the in situ sample; therefore there would be necrosis of tissue from the body is that the contact with foreign substances including the extract [17]. Similarly, our results are consistent with those of UN et al (2013) have shown in their research on the effect of aqueous extract of the bark of Khayasenegalensis on some biochemical and hematological parameters and histopathological rats that following administration of doses of 400, 800, 1200, 1600 and 2000 mg / kg of extract for 28 days, they also observed a significant increase in biochemical and hematological parameters Na +, K +, creatinine, ALT, AST, ALP and a significant reduction in the total protein concentration. These authors conclude that have hypernatremia and hypercalcemia are due to a failure or renal dysfunction, resulting in poor control of the balance of electrolytes by the kidneys. The significant increase of aminotransferases shows lysis of hepatocytes and that of the enzyme "marker" ALP confirms the disruption of the plasma membrane of the liver (necrosis). As regards the total protein, it is said that in case of very extensive damage in the liver, their concentration is reduced entirely. [15]In addition, our results allow us to confirm the renal or muscle cell damage particularly in the liver, heart, suspected by Takin et al (2013) after dosing kidney and liver enzymes ALT, AST, GGT and G6PDH on the one hand and histological studies of the liver and kidneys on the other hand. Indeed these authors have shown that following administration of the extract of Khayasenegalensis ethyl was a significant

increase of enzymes ALT, AST and GGT respectively greater than or equal to 2.5 mg / kg doses, 1 mg / kg 1mg / kg body weight; or generally, the extension of the lesion is directly proportional to the increase of the activity of these enzymes. They also noted a significant reduction in G6PDH and some changes in the hepatic tissue (connective tissue accumulation, expansion of the space of Disse, appearance of pyknotic nuclei in hepatocytes) and kidney tissue (glomerular abnormalities, tubular dilation) in doses of 10mg, 25 and 50mg / kg body weight; then they inferred that there is a correlation between the decrease of tissue damage and G6PDH [18]. Moreover, other authors have shown that the problem of toxicity caused by the ethyl Khayasenegalensis extract in high doses could be corrected by a synergy with cinnamon (work in process of publication). So there is a similarity between these results wholes; when the administration of the extract ethyl Khayasenegalensis (greater than 2.5 mg / kg body weight doses) is prolonged and repeated the integrity of underlying tissues (liver, kidney, heart) and their function is compromised. Recall that the necrosis is a "pathological judgment, abnormal functioning of a cell." It was the first form of cell death highlighted. It comes after a severe attack of the cell. It is not determined by intrinsic factors, but only by environmental disturbances. It is the result of extreme non-physiological conditions and is not engaged in a "voluntary". It is a passive, rapid and non-specific mechanism. It can be induced by various factors such as the lack of oxygen supply (hypoxia, ischemia), physical agents (mechanical trauma, thermal, radiation), chemical and infectious (viruses, bacteria, fungi, parasites), reactions immunological, nutritional imbalances. Unlike apoptosis (programmed cell death, necrosis is considered a "disorderly" cell death. Early loss of ion flow control at the membrane causes massive and excessive penetration of the water and later, the lysis of the plasma membrane. This leads to the release of cytoplasmic contents into the surrounding medium. Organelles tend to swell. The permeability of the inner and outer mitochondrial membranes is modified by increasing the concentration of calcium in these organelles. Lysosomes will break, releasing the cytoplasm of hydrolytic enzymes that contribute to the destruction of the cell. Nuclear DNA is degraded in a "random" endonuclease activated by serine proteases including [19].

CONCLUSIONS

In Africa and Benin in particular, people are resorting to traditional medicine for health needs. For decades, *Khayasenegalensis* is used in the treatment of several diseases and even diabetes is a scourge. Our study was to evaluate the action of ethyl bark extract of this plant on the lipid profile of rat hepatocytes. At the end of this study, it appears that in high doses: 5 mg / kg; 10mg / Kg; 25mg / Kg; 50mg / Kg; 100mg / kg and 200mg / kg of KhayaSenegalensis causes necrosis of

hepatocytes and hence is toxic. Moreover, this work allows us to circumvent this toxicity; because in the 2.5mg / kg dose lipid profile there was no significant change from the negative. These results suggest a great hope for the future as they will advise traditional healers compared to administration doses of Khayasenegalensis for the treatment of patients to prevent the development of liver disease. Our results are remarkable for us as they open for future experimental perspectives.

REFERENCES

1. CTFT. *Khayasenegalensis* (Desr.) A. Juss. Bois etForêts des Tropiques, (1988). N°218, pp 43-55.
2. Lompo M. Activité anti-inflammatoire des extraits d'écorces de tronc de Khayasenegalensis A. Juss (Meliaceae): mise au point d'une forme galénique topique (Phase 1). Thèse de l'Université de Ouagadougou; première partie, (1999 :16-30.
3. Sokpon N., Ouinsavi C.Gestion des plantations de *Khayasenegalensis* au Bénin. Bois et Forêts des Tropiques. Dossier 37, N°2004 ;279 (1) : 10.
4. Takin M. C.Pharmacodynamie de la bioactivité de l'extrait éthylique de *Khayasenegalensis*sur les fonctions hépatiques et rénales chez le lapin (Orytholaguscuniculus). Thèse de l'Université d'Abomey-Calavi,Chapitre I 2014 :7-17.
5. Nikiema, A. & Pasternak, D.Khayasenegalensis (Desr.) A.Juss. [Internet] Fiche de PROTA4U. Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale) ,2008. Wageningen, Pays Bas. <http://www.prota4u.org/search.asp>.
6. Honeycutt AA, Boyle JP, Broglio KR, Thompson TJ, Hoerger TJ, Geiss LS, Narayan KM. ADynamic Markov model for forecasting diabetes prevalence in the United States through 2050. Health Care Manag Sci.;2003 Aug; 6(3):155-64.
7. Prajapati R. and Patel R.Isolation of rat hepatocyte using cold trypsinization method and total rna isolation using hot sds/phenol extraction method. Int J Current Pharma Res 2011;3:3.
8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.Molecular Cloning. A laboratory Manual. Chapitre III: méthodesexpérimentaes.l Cold Spring Harbor Laboratory pressN.Y., 1989.
9. Medraoui L.Techniques de séparation et d'analyse des acides nucléiques: adn, arn& plasmides.Td N°1- Biologie Moleculaire, Module M21- Elément E2.2007.
10. FernandaStreit. Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de lactobacillus delbrueckiisubsp. bulgaricus cfl1. Thèsede l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).2008 ;91-95.

11. Clement B., Segui-real B., Savagner P., Kleinman H. K. and Yamada Y. Hepatocyte attachment of laminin is mediated through multiple receptors. Laboratory of developmental biology and anomalies. National Institute of Dental Research, National Institute Of Health, Bethesda, Maryland 20892; 1990; 8.
12. Sonia DoCarmo. Étude fonctionnelle de l'apolipoprotéine d humaine en situations de stress. Thèse de l'université du Québec à Montréal ; 2009 ; 33-38
13. Marlene Cot.Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae*au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse del'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse 2006 ; 71-87
14. Rattray, J. B. M. Yeasts In *Microbial Lipids* ed. Ratledge, C. and Wilkinson, S.G.(1988) pp. 555-698. Harcourt Brace Jovanovich
15. Onu A., Saidu Y., Ladan M. J., Bilbis L. S., Aliero A.A., Sahabi S. M.Effect of aqueous stem bark extract of *Khayasenegalensis* on some biochemical, haematological, and histopathological parameters of rats. Journal of Toxicology (2013), Article ID 803835,9P. http://dx.doi.org/10.1155/2013/803835
16. Le grand F.Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques etfonctions cellulaires: cas des hémocytes de bivalves atteints de néoplasie disséminée. These soutenuele 14 mai 2010. Université De Bretagne Occidentale. 2010; 40-69
17. Adebayo J. O., Yakubu M. T., Egwim E. C., Owoyele V. B., Enaibe B. U. Effect of ethanolic extract of *Khayasenegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. Journal of Ethnopharmacology2003; 88: 69–72.
18. Takin M. C., Attindehou S., Sezan A., Attakpa S. E. and Baba-moussaL.Bioactivity, Therapeutic utility And Toxicological risks of khayasenegalensis. Indian J Pharma Biological Res 2013;1(4):122-129.
19. Sandra Carmaux. Caractérisation de la mort des cellules animales cultivees en bioréacteur ; Thèse de l'Université Henri Poincare – Nancy I. 2008 ; 19-21 ; 66-67

AJPTR is

- Peer-reviewed
- bimonthly
- Rapid publication

Submit your manuscript at: editor@ajptr.com




Le Journal de la SOCIETE
DE BIOLOGIE
CLINIQUE-BENIN

PERTURBATIONS THYROÏDIENNES DANS LA REGION A RISQUE DE TANGUIETA



SEZAN A[1], GANGBO F[2], SENOU M[3], AHOKPE M[4], AGOSSOU E[1] et AKPONA S[4]

[1]Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
[2]Département de Biologie humaine, Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou ; 01BP188, Cotonou, Bénin
[3]FSA Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
[4]Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou ; 01BP188, Cotonou, Bénin

RESUME

Les perturbations thyroïdiennes sont connues pour être un problème de santé dans presque tous les pays du monde. Au Bénin, rien n'est fait afin de comprendre l'ampleur et l'évolution de ces perturbations.

But : Nous avons initié ce travail dans le but d'établir le profil des différents types de perturbations. La ville de Tanguiéta au Nord du Bénin a été choisie comme ville d'étude.

Méthode : nous avons recueilli le sang veineux chez 320 individus dans la population sélectionnée selon les critères bien définis (sexe, âge profession) 51,87% dans la commune urbaine de Tanguiéta (Brouniassou et Biakou) et 48,13% dans la commune rurale de Taiacou (Natayoti et Tahongou). Les analyses suivantes ont été réalisées : Dosage de T3, T4 libre, TSH ultra sensible par la technique d'ELISA.

Résultats : Les perturbations thyroïdiennes apparaissent chez les deux sexes (32% dans la population masculine et 46,11% dans la population féminine). D'une façon générale 41,4% des sujets prélevés avaient une perturbation thyroïdienne ; avec un taux de perturbations le plus élevée dans le village de Tahougou et le moins élevée dans le village de Brouniessou. Les perturbations thyroïdiennes touchent les cultivatrices et ménagères (46%) les cultivateurs (35,84%) et les élèves (32,61%). Les perturbations thyroïdiennes sont abondantes dans la ville et régions environnantes de Tanguiéta. Elles touchent principalement les femmes (hypothyoïdies : 19,68%. 13,43% des hommes entre 45-60 ans sont ont une hyperthyroïdie. Les autres perturbations thyroïdiennes (taux isolement élevés de T3, T4 libre ou TSH) sont évaluées à 7,5%.

Conclusion : Les perturbations thyroïdiennes sont présentes dans cette région du Bénin. Une étude approfondie sur les autres indicateurs biologiques (facteurs goitrigènes) permettra d'élucider profondément la question.

Mots clés : **Hormones thyroïdiennes, perturbations thyroïdiennes, goitre, carence iodée**

SUMMARY

Thyroid disturbances are known to be a health problem in almost every country in the world. In Benin, nothing is done to understand the extent and evolution of these disturbances.

Objective: That is the purpose of this work, to profile the different types of disturbances. Tanguiéta city in northern Benin has been chosen as target.

Method: We collected venous blood from 320 individuals in the population selected according to defined criteria (sex, age, profession) 51.87% in the urban commune of Tanguiéta (Brouniessou and Biakou) and 48.13% in the rural of Taiacou (Natayoti and Tahongou). The following tests were performed: determination of T3, free T4, TSH by highly sensitive ELISA technique.

Results: The thyroid disturbances occur in both sexes (32% in males and 46.11% in women) in general 41.4% of subjects had taken a thyroid disturbance, with a rate of disorder on higher in the village of Tahougou and lower in the village of Brouniessou. Thyroid disturbances affecting women farmers and housewives (46%) farmers (35.84%) and students (32.61%). Thyroid disturbances are abundant in the city and surrounding areas of Tanguiéta. They primarily affect women (hypothyroidies: 19.68% and 13.43% there is male between 45-60 years are affected by hyperthyroidism). Other thyroid disturbances (high isolation rate of T3, free T4 or TSH) are 7.5%.

Conclusion: The thyroid disturbances are present in this region of Benin. A detailed study of other biological indicators (goitrogenic factors) will clarify further the issue.

Keywords: Thyroid hormones, thyroid disturbances, goiter, iodine deficiency

INTRODUCTION

Les perturbations thyroïdiennes regroupent les hypothyroïdies, une hyperthyroïdies et d'autres perturbations parmi lesquelles figurent les taux isolement élevés de T3, de T4 ou de TSH. Elles demeurent un problème de santé publique en ce début du nouveau millénaire [1,2] et un problème d'anthropologie générale du point de vue de leur distribution naturelle. Environ un milliard d'individus sont à risque de perturbations thyroïdiennes [1,2] et deux cents millions en sont atteints.

Les perturbations thyroïdiennes sévissent sur tous les continents mais plus encore dans les pays en voie de développement où elles sont généralement dues à une carence de l'iode au niveau de l'alimentation. [3]

La République du Bénin comporte des foyers à risque dans le Zou-Nord et la partie Septentrionale du pays [1,2]. La rareté des données ne permet pas d'en évaluer l'ampleur.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la fréquence des perturbations thyroïdiennes dans la région de Tanguiéta à travers le dosage des hormones thyroïdiennes et de la thyréostimuline et d'en établir leur profil.

CADRE D'ETUDE

Cette étude s'est déroulée dans la sous préfecture de Tanguiéta, située dans la partie septentrionale du Bénin à 518 km de Cotonou. Cette sous préfecture a une superficie de 5.456 km^2 et comporte cinq communes : la commune urbaine de Tanguiéta et quatres communes rurales : Cotiakou, N'dahonta, Taïacou, Tanougou.

Les prélèvements ont été effectués dans les communes urbaine de Tanguiéta et rurale de Taïacou.

Les échantillons sanguins ont été centrifugés dans le Laboratoire de Biologie médicale de l'hôpital Saint Jean de Dieu de Tanguiéta. La partie biochimique de l'étude a été effectuées dans le Laboratoire de pharmacologie et d'hormonologie de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA).

MATERIEL ET METHODE

Nous avons recueilli, chez 320 sujets, 5 ml de sang veineux sur des tubes secs. Leurs sérums ont été conservés à 4 degrés et acheminés au Laboratoire de pharmacologie et d'hormonologie de l'ISBA de Cotonou.

Sur chaque échantillon, les dosages biochimiques suivants ont été effectués par la technique ELISA : dosage de la TSHus, dosage de la T3 et dosage de la T4 libre.

La technique ELISA a été réalisée en phase solide. Elle repose sur le principe du sandwich : l'antigène/la substance à doser doit posséder deux sites de fixation antigéniques. Chaque cupule a été recouverte d'un anticorps monoclonal dirigé contre un site antigénique de la chaîne beta de l'hormone à doser.

L'échantillon de sérum à tester a été incubé dans la cupule en même temps que le conjugué marqué par l'enzyme ; ce conjugué est un anticorps monoclonal dirigé contre un site antigénique de la chaîne alpha de l'hormone.

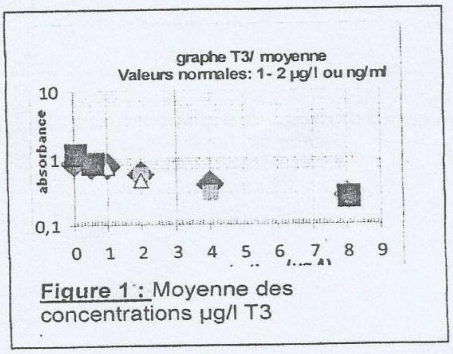


Figure 1 : Moyenne des concentrations µg/l T3

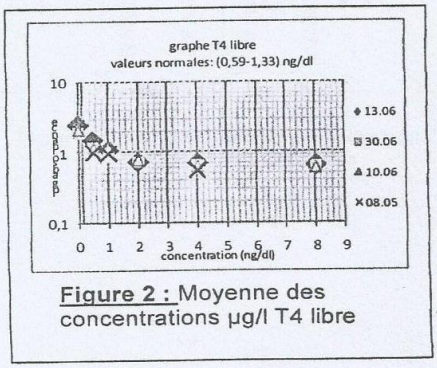


Figure 2 : Moyenne des concentrations µg/l T4 libre

Les figures représentant l'étalonnage de T3 (Figure 1), de T4 libre (Figure 2) et de TSH (Figure 3) sont construites à partir de la technique ELISA et utilisées respectivement pour la détermination des paramètres thyroïdiens T3, T4 libre et TSH.

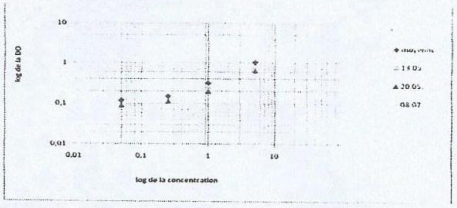


Figure 3 : Courbe d'étalonnage TSH graphe TSH : valeurs normales 0,54 à 4,62 µUI/m

Après l'incubation, l'excès d'anticorps marqué est éliminé grâce à des lavages. L'addition du substrat au chromogène permet d'obtenir dans chaque cupule, une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'hormone de l'échantillon. [4]

RESULTATS

Répartition selon les communes

Le nombre de sujets prélevés dans la commune urbaine de Tanguiéta (51,87%) est peu différent du nombre de sujets prélevés dans la commune rurale de Taïacou (48,13%).

Selon le sexe et selon les localités dans les communes

Parmi les échantillons sanguins révélant la présence de perturbations thyroïdiennes :

- 46,15% proviennent du sexe féminin (Figure 4) ;
- 49,43% proviennent de Tahongou, un village de la commune rurale de Taïacou 33,33% de Brouniessou, un quartier de la commune urbaine de Tanguiéta (Figure 5).

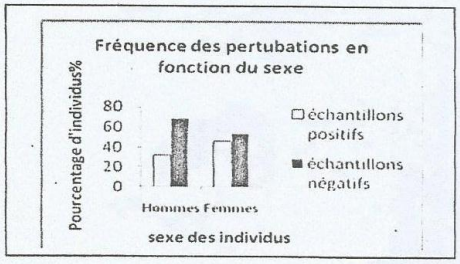


Figure 4 : Fréquence des perturbations en fonction du sexe

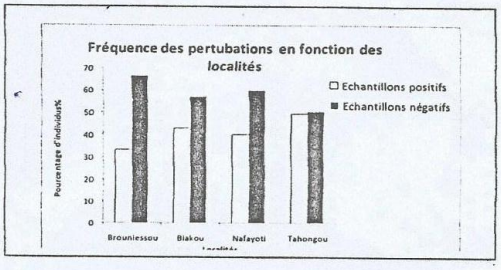


Figure 5 : Fréquence des perturbations en fonction des localités

Selon les professions
Lorsqu'on considère les professions, les cultivatrices et ménagères sont les plus touchées (47,99%). Viennent ensuite, les cultivateurs (35,84%) et les élèves (32,65%). Notre étude n'a pas mis en évidence de perturbations thyroïdiennes au sein des autres professions (Figure 6).

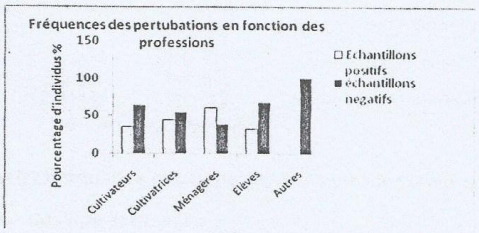


Figure 6 : Fréquence des perturbations en fonction des professions

Perturbations thyroïdiennes, âge et sexe
Trois types de perturbations thyroïdiennes ont été observés : l'hypothyroïdie, l'hyperthyroïdie et d'autres perturbations qui sont marquées par des taux isolement élevés de T3, T4 ou TSH (Figure 7).

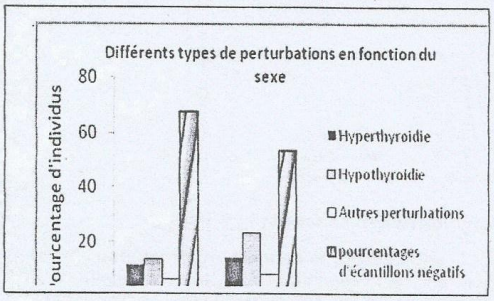


Figure 7 : Différents types de perturbations en fonction du sexe

Hyperthyroïdies en fonction de l'âge et du sexe
Parmi les sujets porteurs d'hyperthyroïdies, ce sont plus les femmes qui sont les plus touchées (65,13%), comparées aux hommes (34,87%). Les femmes adultes âgées de 45 ans à 60 ans sont les plus concernées (62,81%) (Figure 8).

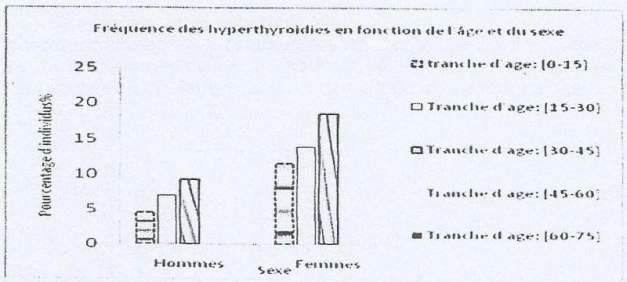


Figure 8 : Fréquence des hyperthyroïdies en fonction de l'âge et du sexe

Hypothyroïdies en fonction de l'âge et du sexe

Parmi les sujets porteurs d'hypothyroïdies, ce sont les femmes qui sont les plus atteintes (73%) comparés aux hommes (27%). Il s'agit d'avantage des femmes adultes dont l'âge est compris entre de 45 ans et 60 ans (Figure 9).

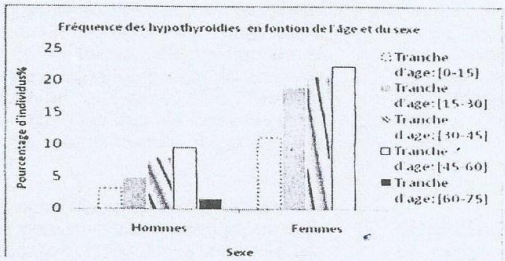


Figure 9 : Fréquence des hypothyroïdies en fonction de l'âge et du sexe

3.1 Perturbations thyroïdiennes et professions

Les ménagères sont plus touchées par les hyperthyroïdies que les cultivatrices porteuses d'hypothyroïdies. Quant aux autres perturbations ceux sont les élèves qui sont les plus atteints. Les autres professions par contre ne sont affectées d'aucune perturbation (Figure 10).

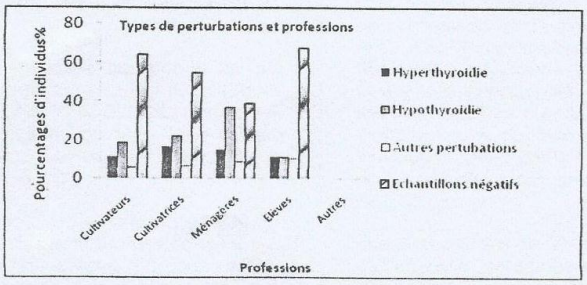


Figure 10 : Types de perturbations et professions

Perturbations thyroïdiennes et localités

Lorsqu'on considère les localités communales, la fréquence d'hyperthyroïdie en tête de liste est observée chez les cultivatrices de Brouniessou (25,4 %) ; viennent celle des ménagères de Nafayoti (15,9 %), des cultivateurs de Brouniessou et des élèves de Tahongou (9,5 %) (Figure 11).

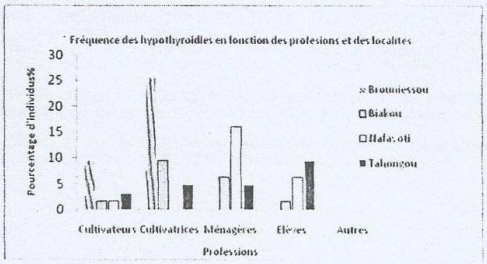


Figure 11 : Fréquence des hupothyroïdies en fonction des professions et des localités

DISCUSSION

Des différents dosages effectués sur les prélèvements issus de la région de Tanguiéta il ressort que la fréquence des perturbations thyroïdiennes est importante dans la zone de Tanguiéta avec un taux de 40,62%.Elles touchent les femmes plus que les hommes avec les taux élevés dans la tranche d'âge de 45 à 60 ans.

Les résultats notre étude interpellent chacun et tous, car les perturbations thyroïdiennes peuvent être secondaires soit à des maladies bénignes telles que la maladie de Basedow, la thyroïdite de Hashimoto, soit à des maladies malignes dont le cancer de la thyroïde.

Chez les femmes où elles sévissent, les perturbations thyroïdiennes peuvent être à l'origine de pathologies diverses et variées sur la santé reproductive, telles que : les avortements provoqués, les mortalités infantiles, l'infertilité, etc.

Des résultats semblables aux nôtres ont été décrits par d'autres auteurs qui ont retrouvé des taux de 33,7%, 70% et 62%, respectivement dans les régions de Man Côte d'Ivoire [5], de Fouta Djalon en Guinée [6] et en Casamance au Sénégal [7].

D'après les données de la littérature [5] et [8], ces taux élevés de perturbations seraient dus à une carence alimentaire en iode, oligo–élément indispensable à la synthèse des hormones thyroïdiennes.

Une supplémentation iodée externe s'avère certainement indispensable dans ces régions montagneuses et enclavées dépourvues aussi d'eau de mer.

Le taux élevé d'hyperthyroïdie observé dans notre étude pourrait être lié à l'alimentation artificiellement enrichi en iode comme la consommation du sel iodé par une frange de cette population de Tanguiéta, hypothèse à vérifier dans d'autres études.

CONCLUSION

La région de Tanguiéta choisi comme site d'étude en vue d'une enquête épidémiologique sur les perturbations thyroïdiennes a permis de notée que celle – ci est une zone d'endémie avec une prévalence de 40,62%.

En tenant compte des facteurs écologiques, physiques et sociologiques du milieu, les fréquences de l'hyperthyroïdie et de l'hypothyroïdien soulèvent les questions de stratégie de distribution systématique du sel iodé et surtout des conditions de son application dans cette région.

Une étude approfondie sur les autres indicateurs biologiques du statut thyroïdien doublée d'une enquête nutritionnelle et d'une évaluation des facteurs goitrigènes dans cette région permettra d'élucider profondément la question.

Une mobilisation de la population, des responsables de la santé publique à divers niveaux et des partenaires au développement pour freiner l'ampleur de ce fléau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- ROSS HA, den HEIJER M, HERMUS AR, SWEEP FC. COMPOSITE: - Reference Interval for thyroid-Stimulating Hormone and Free Thyroxine, Comparison with Common Cutoff Values, and Reconsideration of Subclinical Thyroid Disease. 2009. Clin Chem.

2- TAKEDA K, MISHIBA M, SUGIURA H, NAKAJIMA A, KOHAMA M, HIRAMATSU S : - Evaluated Reference Intervals for Serum Free Thyroxine and Thyrotropin Using the Conventional Outliner Rejection Test without Regard to Presence of Thyroid Antibodies and Prevalence of thyroid Dysfunction in Japanese Subjects. 2009. Endocr J.

3- . JL SCHLIENGER : - S.O.S. Thyroïde éditions FRISON-Roche, Paris, 1998

4- KAMOUN : Dosage immuno - enzymatiques dans appareils et méthode en biochimie ; 2ème édition Flammarion 1997 page 203 à 207

5- P KOUAME, M GAIMARD, I DILUMBU, G BELLIS, F ROUX, I CHASTIN, JP DELAFOSSE, NJ DIARRA, A CHAVENTRE : - Approche clinique et épidémiologique du goitre endémique en Cote d'Ivoire : le cas de GLANLE dans la région de MAN Médecine d'Afrique Noire : 1998 ; 45 (12)

6- M KONDE, Y INGENBLEEK, M DAFFE, B SYLLA, O BARY, S DIALLO : - Goitrous endemic in Guinea, lancet 1994. (89, 88)

7- J LAZARUS, AB PARKER, R JONH, M N'DIAYE, SG PRYSOR JONES : - Endemics goitrous in Sénégal. Thyroïd fonction etiological factous and treatment with oral iodized oil act a endocrinol 1992, 126 (149 à 154)

8- THILLY C H, P BOURDOUX, B CONTEMPRE, B SWENNEN : - Les stratégies de lutte contre le goitre dans l'enfant en milieu tropical ; N° 175-176 ; Paris, 1988 Page 5-27

Revue CAMES
Série A - Vol. 04, 2006
Semestriel du Conseil africain et malgache pour l'Enseignement supérieur

Sciences et Médecine

β-adrenoceptor stimulation regulates intracellular pH (pH)i via inhibition of Na+/H+ exchanger in rat parotid cells

SEZAN A.*, AHOKPE M., AGOSSOU E., AKPONA S.

ABSTRACT

In this study, isoproterenol, an agonist of β–adrenergic receptors, was found to inhibit the activation of Na+/H+ exchanger in BCECF-loaded rat parotid acini. This inhibitory effect is mimicked by the addition of amilorode, an inhibitor of Na+ influx. EIPA {5-(N-ethyl-N-isopropyl) amilorode}, a specific inhibitor of Na+/H+ antiporter, also dose-dependently inhibited increases in (pH)i in these cells. In order to understand the mechanisms underlying in the inhibition of Na+/H+ antiporter by isoproterenol, we conducted studies on the (pH)i recovery that is mainly assured by the activation of Na+/K+/2Cl- co transporter. Hence, we observed that the (pH)i recovery after an alkaline load was inhibited by the loop diuretic bumetanide. Isoproterenol enhanced the (pH)i recovery but this β-adrenergic agonist failed to do so in the presence of bumetanide. These results altogether suggest that isoproterenol inhibits the Na+/H+ antiporter by upregulating the Na+/K+/2Cl- co-transporter in rat parotid acinar cells.

Key words: *β–adrenergic receptors, Na+/H+ exchange, Na+/K+/2Cl- co-transport.*

La stimulation des récepteurs β- adrénergiques régule le pH intracellulaire (pH)i via l'inhibition des antiports Na+/H+ dans les cellules de la glande parotide du rat

RÉSUMÉ

Dans cette étude, il a été montré que l'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs β-adrénergique, inhibe l'activation de l'échangeur Na+/H+ dans les acini de parotide du rat chargées au BCECF. Cet effet inhibiteur est amplifié par l'addition d'amiloride, un inhibiteur de l'influx Na+. {EIPA {5-(N-ethyl-N-isopropyl} amiloride}, un inhibiteur spécifique de l'antiporteur Na+/H+ dose-dépendante, inhibe aussi l'augmentation du (pH)i dans ces cellules. Pour comprendre les mécanismes intrinsèques de l'inhibition de l'antiport Na+/H+ par isoprotérénol, nous avons entrepris des études sur l'augmentation du (pH)i en activant le symport Na+/K+/2Cl-. En conséquence, nous avons remarqué une augmentation du (pH)i après inhibition de la boucle diurétique du bumetanide par l'alcalinisation. L'isoprotérénol a provoqué l'augmentation du (pH)i laquelle est inhibée en présence du bumetanide.

Ces résultats suggèrent entièrement que l'isoprotérénol inhibe l'antiport Na+/H + par une corégulation de symport Na+/K+/2Cl- dans les cellules acineuses de la glande parotide du rat.

Mots clés : *Récepteurs β–adrénergique, échangeur Na+/H+, symport Na+/K+/2Cl-.*

INTRODUCTION

Parotid gland has been proved to be a useful model for the study of exocrine functions like secretion of protein, fluid and electrolytes (Butcher and Putney, 1980). In this gland, secretion is regulated by two stimulus-response coupling pathways which occur upon receptor activation. One involves the increases in cytosolic free Ca2+ concentrations via the formation of the second messenger inositol 1, 4, 5 trisphosphate (InsP3) after stimulation of β–adrenergic or vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors (Snowdone et al, 1992). This Ca2+-dependent pathway regulates mainly fluid and electrolyte secretion. Another pathway is cAMP-dependent that regulates primarily protein discharge (Guizouarn, 1993). Hence, the majority of studies on ionic movements have been conducted, in parotid gland, in the presence of cholinergic muscarinic agonists (Evans et al, 1999; Robertson et al, 1997). Nevertheless, it has been demonstrated that stimulation of parotid acini with the β–adrenergic agonist like isoproterenol, induces an upregulation of the acinar Na+/K+/2Cl- cotransporter (Martinez et al, 1988). Besides, Reddy et al, 2009 have find that structural and mutagenesis work correlate structure, dynamics and function for the seventh transmembrane segment of the human Na(+)/H(+) exchanger isoform 1. Besides, in anesthetized animals, NHE3 inhibition has also been shown to stimulate the central chemosensitive drive (Pasaro R. et al, 2009). A Na+/H+ antiporter has also been reported to be implicated in exocrine functions in basolateral membrane vesicles of parotid gland (Park et al,1999; Manganel et al, 1991) In the present study, we have investigated the effect of isoproterenol on Na+/H+ exchange in isolated rat parotid acini. We demonstrate an inhibitory effect of this β–adrenergic agonist, independently

*SEZAN Alphonse**
Laboratoire de Biomembranes et Signalisation, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey -Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
AHOKPE Mélanie
Laboratoire de Biochimie FSS, Université d'Abomey- Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
AGOSSOU Essé
Laboratoire de Biomembranes et Signalisation, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey- Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
AKPONA Simon
Laboratoire de Biochimie FSS, Université d'Abomey- Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
** To whom all the correspondences should be adressed*
Postal adress: 06 B.P. 3041 Cotonou, Benin. Portable: 00 229 97 57 38 50 or 00 229 94 14 31 60
Email address: alphonse.sezan@fast.uac.bj

of its effects on cAMP production, on the functioning of Na+/H+ exchanger.

I. MATERIALS AND METHODS

1.1. Materials

Hyaluronidase (type I-S), (-)isoproterenol bitartrate, bumetanide and amiloride were from Sigma, USA. Collagenase (type II) was from Seromed, USA. BCECF/AM (acetoxymethyl ester of 2', 7'-bis-(2 carboxylmethyl)-5, 6'-carboxyfluoresceine, BCECF) was obtained from Molecular Probes (USA) and 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) was from Research Biochemicals Incorporated, USA.

1.2. Acinar preparation

Rat parotid acini were prepared by collagenase/hyaluronidase digestion according to the previously published procedure (Sezan et al, 1995). In brief, parotid glands, isolated from male Sprague Dawley rats, were rapidly transferred into Krebs-Ringer/Hepes medium containing the followings: 100 mM, NaCl; 7 mM, KCl; 1 mM, CaC_{12}; 1.2 mM, KH2PO4; 25 mM, NaHCO3; 10 mM, Hepes; 0,55 mM, glucose and bovine serum albumin (BSA), 1% (w/v). Glands were incubated with collagenase (190 U/ml) and hyaluronidase (0.25mg/ml) at 37°C with continual shaking of 110 cycles per min under O_2/CO_2 (95%/5%). At the intervals of 15 min, the glands were dispersed by pipetting with a pipette of 5 ml. After 30 min, the fragments of parotid gland were collected by centrifugation (50g x 3 min). The supernatant was replaced by the same volume of the medium, and the process was repeated again. After one hour of digestion, the acini were washed and filtered through nylon filter. The acini then were sedimented/harvested in the same medium as described above. One fraction of acini was incubated with 0.1 % of Trypan blue to assess the cell viability.

1.3. Measurement of intracellular pH, (pH)i

Isolated parotid gland acini were loaded with the fluorescent probe BCECF/AM (2 µM) at 37° for 25 min as described elsewhere (Manganel and Turner, 1989). After loading, the acini were washed twice, centrifuged (50g x 15min) and resuspended in Krebs Ringer/Hepes medium gassed with 95% CO2 and 5% O2 or deprived of NaHCO3 and equilibrated with 100% O2. BCECF fluorescence was continuously monitored with fixed excitation wavelength of 490 nm and emission wavelength of 525 nm, by using Kontron spectrofluorometer. The relative fluorescence was converted to intracellular pH, (pH)i, using in situ calibration curve obtained by using nigericin-K+ (Manganel and Turner,1990).

II. RESULTS

(Isoproterenol Inhibition of Na+-H+ exchange)

In the following series of experiments, acini were incubated in the buffer deprived of NaHCO3 and gassed with 100% O2. Figure 1 shows the recovery of intracellular pH, (pH)i, by BCECF-loaded rat parotid acini following to an acute acid load by exposure to 15 mM propionic acid. Hence, after the acid load, (pH)i is decreased and Na+/H+ exchanger is activated. It is interesting to note that addition of isoproterenol alone in the place of propionic acid did not influence the (pH)i in these cells (results not shown). On the contrary, the recovery of (pH)i, following to the acid load, is retarded (30.7±2.4 %) by the addition of isoproterenol (Fig. 1). Amiloride, an inhibitor of Na+ transport (Kleyman and Cragoe, 1988), also delayed the (pH)i recovery in rat acini. Figure 2 illustrates that (pH)i recovery is also blocked by EIPA,{5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride)}, a specific inhibitor of Na+/H+ exchange (Kleyman and Cragoe,1988). Furthermore, figure 4 shows that forskolin and 8-bromo-cAMP, the two agents that increase intracellular cAMP concentrations, failed to influence the (pH)i in rat acini.

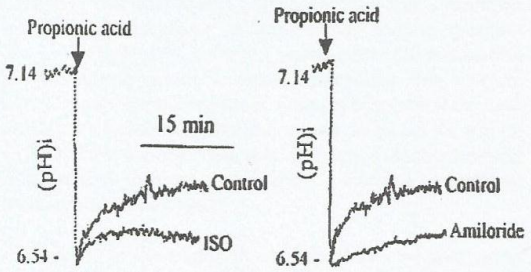


Figure.1. Effects of isoproterenol and amilorode on the response of rat parotid acini to an acute acid load. In these experiments, acini were incubated in the buffer deprived of NaHCO3 and gassed with 100% O2. A the time indicated by the arrows, BCECF-loaded acini were exposed to an acute acid load by adding propionic acid (15mM). The traces represent changes in (pH)i in control and isoproterenol, ISO (2µM) or amilorode (500µM) treated acini.
Traces are representative of three experiments conducted indepentdly

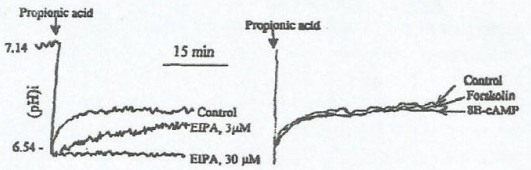


Figure 2. Effects on different pharmacological agent on the response of rat parotid acini to an acute acid load. In these experiments, acini were incubated in the buffer deprived of NaHCO3 and gassed with 100% O2. At the time indicated by the arrow, BCECF-loaded acini were exposed to an acute acid load as indicated in Fig.1. The traces represent (PH)i of control and (5-N-ethyl-N-isopropyl amilorode) EIPA (3µM and 30µM), forskolin (10µM) and 8- bromo cAMP, 8B-cAMP (2mM) treated acini. Traces are representative of three experiments conducted independently.

This intracellular alkalinization is a common result of NH4+ addition to cells, and is caused by equilibrium between NH3 and H+ to form NH4+. Hence, by employing NH4+Cl, we can elucidate the intrinsic buffering capacity of these cells. We observed that isoproterenol stimulated the Na+/K+/2Cl- cotransport in these cells. Furthermore, the (pH)i recovery is largely slowed by 100 µM bumetanide which inhibits the cotransporter (Fig 3). Isoproterenol-induced (pH)i recovery is markedly inhibited by bumetanide (Fig. 3) whereas EIPA and amilorode treatment exerted no effects (results not shown). (Fig. 4) shows that forskolin and 8-bromo-cAMP did not influence the (pH)i recovery in these cells.

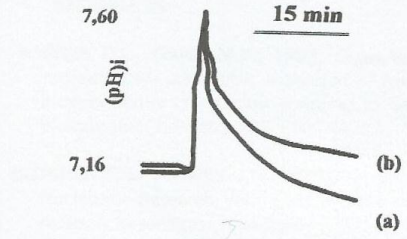


Figure. 3. Effects on bumetanide on the response of (pH)i of rat parotid acini to an acute alkaline load. At time indicated (arrow) BCECF-loaded acini were exposed to NH4CL (20mM). The traces represent (pH)i in control (a) and in acini treated with (b) bumetanide (100μM).

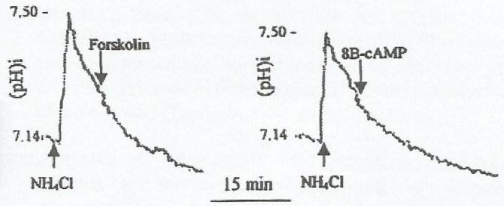


Figure. 4. Effects of forskolin and 8-bromo-cAMP on the response of (pH)i of rat parotid acini to an acute alkalin load. At time indicated (arrow) BCECF-loaded acini were exposed to NH4CL (20mM). The traces represent (pH)i in control and in acini treated with, forskolin (10μM) an 8-bromo-cAMP (2mM).

III. DISCUSSION

In this study, we have investigated the role of isoproterenol in the modulation of Na+/H+ antiporter and Na+/K+/2Cl- co-transporter in rat parotid gland. As far as the functioning of the former (Na+ influx and H+ efflux) is concerned, we have observed that in BCECF-loaded and propionic acid treated acini, the (pH)i recovery is retarded by the addition of amiloride. Furthermore, EIPA, a specific inhibitor of Na+/H+ antiporter completely blocked the (pH)i recovery in these cells. These results suggest the presence of Na+/H+ exchanger in rat parotid glands. The agents like 8-bromo-cAMP and forskolin known to stimulate the intracellular cAMP concentrations failed to affect the (pH)i recovery in the acini, indicating that the Na+/H+ antiporter is not coupled to the cAMP production. Our results are is close agreement with the findings of Barber and Ganz (Barber and Ganz,1992) who have characterized Na+/H+ exchange, independently of cAMP production, in canine enteric endocrine cells, though some authors have reported the cAMP-coupled Na+/H+ antiporter in fish blood cells (Guizouarn et al, 1993). We have observed that isoproterenol, known to stimulate the β–adenoceptors at 2 μM of concentration (Tanimura et al, 1990), inhibits the Na+/H+ exchanger in rat parotid cells. These observations corroborate the findings of Hall et al (Hall et al, 1998) who have recently demonstrated that β2-adrenergic receptors via their interaction with an exchange factor regulate Na+/H+ antiporter.

A possible mechanism for the inhibition of the Na+/H+ antiporter in rat parotid acini by isoproterenol may be an increase in intracellular concentration in free Na+ consecutive to the stimulation of the cotransport of Na+/K+/2Cl-. In fact, a number of studies have demonstrated that Na+/K+/2Cl- cotransporter is responsible for driving the bulk of acinar chloride secretion associated with fluid production in salivary glands (Martinez et al, 1985; Melvin et al, 1987). Hence, Na+/K+/2Cl- cotransporter concentrates Cl- above electrochemical equilibrium in acinar cytoplasm, using the extracellular to intracellular sodium gradient generated by Na+/K+-ATPase. Consequently, the stimulation by secretagogogues increases intracellular free calcium concentrations, inducing the opening of basolateral calcium-activated K+-channels. This phenomen on allows K+ and Cl- to flow out of the cell down their respective electrochemical gradients, Cl- into the lumen and K+ into the interstitium (Paulais and Turner, 1992).

In order to shed light on our hypothesis, we conducted further studies on NH4Cl-induced alkalinization in acini. At first, we employed bumetanide, the loop diuretic, considered to be an inhibitor of NH4+ entry through the basolateral Na+/K+/2Cl- cotransporter. As expected, we observed that bumetanide markedly inhibited the recovery of (pH)i in BCECF-loaded acini. The treatment of acini with isoproterenol resulted into the prolonged delay of the (pH)i recovery and a pretreatment of these cells with bumetanide abolished the action of this β–adrenergic agonist, suggesting that isoproterenol is activating the Na+/K+/2Cl- cotransporter and, thereby, is retarding the (pH)i recovery. Our observations agree well with the results of Paulais and Turner (Paulais and Turner, 1992) who have also observed that isoproterenol upregulated the Na+/K+/2Cl- cotransport activity in rat parotid acini. It is also interesting to note that the agents like 8-bromo-cAMP and forskolin, though increased the cAMP production (not shown), failed to upregulate the recovery of (pH)i these cells. Hence, we can allude that isoproterenol will modulate the (pH)i without the production of intracellular cAMP concentrations in rat acini.

Finally, we can conclude that isoproterenol increases the Na+/K+/2Cl- cotransporter activity as also recently demonstrated by Chaib et al. (Chaib et al.,2000) and, thereby, diminishes the Na+/K+ antiporter activation in rat parotid acini. Our study bears a medical significance on the use of β–blockers that induce side effects like dry mouth and dry eyes by preventing the upregulation of Na+/K+/2Cl- cotransporter in cells implicated in exocrine secretions.

Acknowledgement:
Authors are thankful to Solange Goubiyi for her assistance in typing the manuscript.

REFERENCES

BARBER D.L., GANZ M.B., 1992. Guanine nucleotides regulate beta-adrenergic activation of Na-H exchange independently of receptor coupling to Gs., Journal of Biology and Chemistry; 267 : 20607-12.

BUTCHER F.R., PUTNEY J.W., 1980. Advances in Cyclic Nucleotide Research, vol. 13, ed. P. Greengard and G. A. Robison, Raven Press, New York.

CHAIB N., KABRE E., METIOUI M., FRANCO M.C., DEHAYE J.P., 1999. Regulation of the Na+:K+(NH4+)/2Cl- cotransporter of rat submandibular glands. Journal of Cellular Physiology; 180: 422-30.

EVANS R.L., BELL S.M., SHULTHEIS P.J., SCHUL G.E., MELVIN J.E., 1999. Targeted disruption of the Nbe 1 gene prevents muscarinic agonist-induced up-regulation of Na+/H+ exchange in mousse parotid acinar cells. Journal of Biology and Chemistry.; 274: 29025-29030.

GUIZOUARN H., BORGESE F., PELLISSIER B., GARCIA-ROMEU F., MOTAIS R., 1993. Role of protein phosphorylation and dephosphorylation in activation and desensitization of the cAMP-dependant Na+/H+ antiport Journal of Biology and Chemistry; 268 : 8632-8639.

HALL R.A., REMONT R.T. R., CHOW C.W., BLITZER J.T., PITCHER J.A., CLAIN A., STOFFEL R.H., BARAK L.S., SHENOLIK S.R., WEINMAN E.J., GREINSTEIN S., LEFKOWITZ R.J., 1998. The beta2-adrenergic receptor interacts with Na+/H+ exchanger regulatory factor to control Na+/H+ exchange. Nature; 392: 626-630.

KLEYMAN T.R., CRAGOE E.J., 1985. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. Journal of Membrane Biological. 105:1-21, 1988.

MARTINEZ JR., CASSITY N. 1985 Cl- requirement for saliva secretion in the isolated perfused rat submandibular gland, American Journal of Physiology; 249:G464-G469.

MARTINEZ JR, CASSITY N., REED P., 1988. Effects of isoproterenol on Cl transpor in rat submandibular salivary gland acini. Arch. Oral Biol.; 33: 505-509.

MANGANELL M., TURNER R.J., 1991. Rapid secretagogueèinduced activation of N+/H+ exchange in rat parotid acinar cell. Possible interrelationship between volume regulation and stimulus-secretion coupling. Journal of Biology and Chemistry; 266: 10182-10188.

MANGANELL M., TURNER R.J., 1989. Agonist-induced activation of Na+/H+ exchange in rat parotid acinar cells. Journal of Membrane Biological; 111: 191-198.

MANGANELL M., TURNER R.J., 1990. Agonist-induced activation of Na+/H+ exchanger in rat parotid acinar cells is dependent on calcium but not on protein kinase C. Journal of Biology and Chemistry; 265: 4284-4289.

NOVAK, YOUNG J.A., 1986. Two independant anion transport systems in rabbit mandibular salivary glands. Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol. ; 407: 649-656.

PARK K., OLSCHOWKA J. A., RICHARDSON L.A., BOOKSTEIN C., CHANG E.B., MELVIN J.E., 1999. Expression omultiple Na+/H+ exchanger idoforms in rat parotid acina American Journal of Physiology. ; 276 : G470-8.

PASARO R, RIBAS-SALGUEIRO JL, MATARREDONA ER, SARMIENTO M, RIBAS J. 2009. Systemic inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger type 3 in intact rats activates brainstem respiratory regions. Adv Exp Med Biol. 648:395-401.

PAULAIS M., TURNER R.J., 1992. β-adrenergic upregulation of the Na+/K+ /2Cl- cotransporter in rat parotid acinar cells. Journal of Clinical Investigation; 89: 1142-1147.

REDDY T., LI X., FLIEGEL L., SYKES B.D., RAINEY J.K., 2009. Correlating structure, dynamics, and function transmembrane segment VII of Na(+)/H(+) exchanger isoform 1. Biochem Biophys Acta Jul 10

ROBERTSON A., WOODSINE M., FOSKETT J.K., ORLWSKI J., GREINSTEIN S., 1997. Muscarinic agonist induced phosphorylation-independent activation of Na+/H+ antiporterin salivary acinar cells. Journal of Biology and Chemistry; 272: 287-294.

SEZAN A., EBOUE D., ROSSIGNOL B., 1995. Effect of adrenergic β-agonist on intracellular free calcium concentration in isolated acini of the parotid gland in rats C. R. Soc. Biol.; 189: 281-288.

SNOWDONE K.W., WAY B., THOMAS G., CHEN H.Y., CASHMAN J.R., 1992. Phi controls cytoplasmic calcium in rat parotid cells. Biochem. Biophys. Acta; 1108: 145-152.

TANIMURA A., MATSUMOTO Y., TOYO Y., 1990. Evidence that isoproterenol-induced Ca+2-mobilization in rat parotid acinar cells is not mediated by activation of β–adrenoceptor. Bioch. Biophys. Acta; 1055: 273-277


JOURNAL

DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DE

L'UNIVERSITÉ DE LOMÉ

[redacted]

[redacted]

[redacted]

J. Rech. Sci. Univ. Lomé (Togo), 2009, série A, 11(1) : 11-15

IMPLICATION DES GOITRIGENES D'ORIGINE ALIMENTAIRES DANS LE FONCTIONNEMENT DE LA GLANDE THYROÏDE : CAS DU MANIOC DANS LA PRODUCTION DU H_2O_2

SEZAN Alphonse[1]*, GANGBO Flore[2], AHOKPE Mélanie[3],
AGOSSOU A. Essé[4] et AKPONA Simon[5]

1- Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
2- Département de Biologie Humaine, Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou 01BP188, Cotonou, Bénin
3- Laboratoire de Biochimie FSS, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
4- Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin
5- Laboratoire de Biochimie FSS, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin

* Toutes les correspondances peuvent être adressées à:
Adresse Postale: 06 B.P. 3041 Cotonou, Benin. Portable: 00 229 97 57 38 50 ou 00 229 94 14 31 60
Adresse Email: alphonse.sezan@fast.uac.bj

(Reçu le 05 mars 2009 ; Révisé le 02 novembre 2009 ; Accepté le 26 novembre 2009)

RESUME

Le goitre endémique est principalement dû à la carence iodée. Le paradoxe selon lequel on retrouve le développement de goitre dans des régions sans déficience iodée a fait penser à d'autres facteurs alimentaires : le manioc. Le caractère goitrigène du manioc vient de ce qu'il contient deux glucosides cyanogéniques, la linamaroside et lotaustraloside dont l'hydrolyse libère du cyanure. Le cyanure est détoxifié en thiocyanate qui possède des propriétés goitrigènes évidentes. Les tranches de thyroïde de porc ont produit continuellement de H_2O_2 avec une brusque augmentation en présence de l'extrait du manioc. Ce saut de H_2O_2 peut être expliqué par un arrêt d'entrée de I^- dans les thyrocytes provoquant ainsi une inhibition du symport Na^+/I^- par l'extrait. En conséquence l'accumulation des molécules de H_2O_2 non utilisées a été mise en évidence.
Ces résultats, à l'étape actuelle, ne permettent pas d'envisager une action quelconque sur la NADPH-oxydase et par conséquent sur le système générateur de H_2O_2

Mots clés : Manioc, goitrigène, goitre, thyrocytes.

ABSTRACT

Endemic goiter is mainly due to iodine deficiency. The paradox that we find the development of goiter in areas without iodine deficiency was thinking of other dietary factors: the cassava. The goitrogenic nature of cassava is that it contains two cyanogenic glucosides, the linamaroside and lotaustraloside whose hydrolysis releases cyanide. Cyanide is detoxified to thiocyanate which has goitrogenic properties obvious. Thyroid slices of pork produced continuously H_2O_2, with a sudden increase in the presence of the extract of cassava. This leap of H_2O_2 can be explained by a stop-entry of I^- in thyrocytes causing an inhibition of symport Na^+/I^- by the extract. Therefore the accumulation of molecules of H_2O_2 used was not highlighted. These results, at this stage, do not consider any action on the NADPH oxidase and therefore on the H2O2-generating system.

Keywords: Cassava, goitrogenic, goiter thyrocytes

INTRODUCTION

La cause principale du goitre endémique est la carence en iode [1]. Néanmoins, le rôle d'autres facteurs de la déficience iodée dans l'étiologie du goitre a été suspecté en raison du fait qu'il peut exister du goitre dans des régions sans déficience iodée et qu'inversement il n'existe pas nécessairement de goitre dans des régions sévèrement carencées en iode [2].

Le rôle adjuvant de goitrigènes d'origine alimentaire ou de l'environnement a été démontré dans une série de régions du monde [3].
Ainsi, le rôle du manioc dans l'étiologie du goitre endémique a été démontré en République Démocratique du Congo [3] et confirmé ultérieurement en Indonésie [4].
En effet le manioc est cultivé essentiellement pour ses racines qui entrent dans l'alimentation quotidienne de nombreuses populations, surtout africaines. Outre ses racines on utilise aussi ses feuilles et accessoirement ses tiges qui servent parfois à préparer un sel alimentaire.

Selon la teneur en acide cyanhydrique des racines, les variétés de manioc sont groupées en deux catégories principales: le manioc doux et le manioc amer.
Ce dernier contient en forte proportion deux glucosides qui par hydrolyse libèrent l'acide cyanhydrique une substance toxique ou poison de l'hémoglobine. De plus, il provoque des troubles de la thyroïde en empêchant l'iode de s'y fixer (goitres, ralentissement de la croissance chez l'enfant). Ce poison est facilement éliminé par cuisson, séchage au soleil, fermentation. Il est en quantité plus importante dans l'écorce. Lorsque le manioc est bien préparé, il ne renferme plus de trace d'acide cyanhydrique. Cependant, il est souvent observé des problèmes de toxicité chronique (mauvais stockage des racines, mauvaise préparation) [5-7].

Le cyanure est détoxifié dans l'organisme en thiocyanate, qui possède des propriétés goitrigènes évidentes. Le thiocyanate agit à la fois en inhibant la pompe à iodure thyroïdienne et en augmentant l'élimination d'iode par voie rénale. Ces deux facteurs concourent à une déperdition d'iodure de l'organisme.

Le caractère goitrigène du manioc est dû au degré de surcharge en thiocyanate qu'il provoque, qui est variable en fonction de la nature du sol, du type de manioc cultivé, du mode de préparation du manioc et de la quantité de manioc consommée par la population [8].
Il a établi que le manioc n'acquiert un caractère goitrigène que lorsque le rapport urinaire Iode/thiocyanate descend au dessous d'un seuil critique d'environ 3 microgrammes par milligramme.
Ce seuil peut être atteint pour des surcharges en manioc modérées lorsque la déficience iodée est importante et même pour des apports en iode presque normaux lorsque la surcharge en thiocyanate est extrêmement marquée [9].

Des chercheurs avaient montré que les thyrocytes en culture produisaient de H_2O_2 utilisée dans l'oxydation de la thyroglobuline [10].

Il a été rapporté dans la littérature que les thyrocytes possèdent les NADH oxydase sur leur membrane apicale [11]. Cette enzyme utilise les électrons du NADPH pour réduire l'oxygène moléculaire. L'enzyme porcine utilise le NADPH (Km apparent = 20µM) préférentiellement au NADH (Km apparent =200µM) et la vitesse maximale d'oxydation du NADPH est deux fois plus rapide que celle du NADH. Deux mécanismes de production enzymatique de H_2O_2 ont été décrits. Certaines oxydases (le glucose oxydase par exemple) forment H_2O_2 directement par la réduction divalente de l'oxygène :

$$2e^- + O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Et l'on peut donc envisager un mécanisme identique pour une NAD(P)H oxydase :

$$NADPH+O_2 \rightarrow NADP^+ + H_2O_2$$

Les deux NADPH oxydases de mammifères colées à ce jour, la NADPH oxydase de phagocytes [12] et l'oxydase mitogénique de cellule vasculaire de muscle lisse (SAHACH, 2008) [13] ne fonctionnent cependant pas selon ce mécanisme. La catalyse la réduction monovalente de deux molécules d'oxygène en deux radicaux anioniques Superoxydes O_2^- :

$$NADPH+2O_2 \rightarrow NADP+ +2O_2$$

Ces radicaux libres dismutent ensuite spontanément ou enzymatiquement sous l'action d'une superoxyde dismutase (SOD) :

$$2O_2^- +2H+ \rightarrow H_2O_2+ O_2$$

Par ailleurs, on a observé que la NADPH oxydase de thyroïde ne forme pas, ou ne libère pas d'anions superoxyde, mais produit directement H_2O_2, ce qui la différencie de la NADPH oxydase du neutrophile et suggère qu'il s'agisse d'une nouvelle forme de NADPH oxydase [14]. (Dupuy, 1989).

Des auteurs ont observé que le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), mais non le FMN (Flavine Monocléotide), protégeait de l'inactivation la NADPH oxydase des membranes plasmiques de thyroïde incubées dans des conditions assez drastiques permettant l'élimination des cofacteurs flaviniques (membranes incubées à 40°C en présence de détergent, Puis centrifugées).

Le but de ce travail est d'étudier l'impact de l'extrait de manioc sur la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les tranches de thyroïde de porc.

MATERIEL ET METHODES

- **Matériel**

Thyroïde de porc
Solution de Mack Ewen ( )
Catalase de chez Sigma

- **Méthode**

Obtention de l'extrait de manioc

Des tubercules de manioc sont épluches et broyés. Le broyat est mis en solution pour l'obtention de l'empois d'amidon. Apres filtration, on obtient de l'extrait conservé à 4°C.

Mesure de la variation du peroxyde d'hydrogène

- Principe

Le principe du dosage de H_2O_2 est basé sur la réaction d'oxydoréduction se traduit par l'équation suivante :

$$H_2O_2 + 2I^- + 2H^+ \rightarrow I_2 + 2H_2O$$

Apres avoir isolé et pesé la thyroïde de porc, on la conservé dans une solution physiologique de Mack Ewen. On découpe très finement la thyroïde à l'aide d'une lame. Les fragments découpés sont placés dans des pots de 50 ml. On ajoute :
KI (10mg/l), eau distillé et catalase (10UI/ml). Le mélange est incubé à 37°C pendant 15min. Ou procède au mesure par paires de pots ; un pot témoin, un autre pot avec son contenu auquel on ajoute 400µl d'extrait de manioc. Les densités optiques sont alors mesurées à 450nm.

RESULTATS

- Production de H_2O_2 par les tranches de thyroïde de porc :

Sont portés sur la figure 1 les variations de H_2O_2 produits par les tranches de thyroïde de porc. En absence de l'extrait de manioc et pendant 60 minutes on observe une évolution constante. Les tranches de thyroïde de porc produisent du H_2O_2. Ce résultat confirme ceux de Dumont effectué sur la thyroïde de chien.

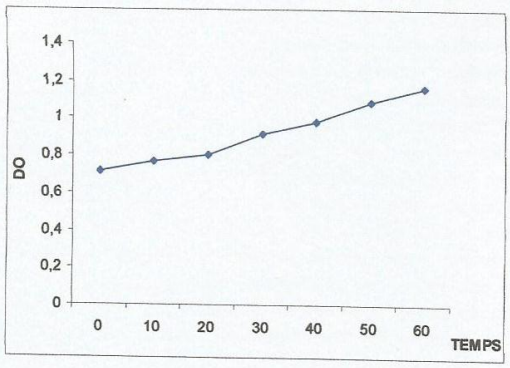


Figure 1 : Variation de la densité optique exprimant la production de H2O2 par les tranches de thyroïde de porc en fonction du temps

- Action de l'extrait de manioc sur la production de H_2O_2 par les tranches de thyroïde de porc :

Sur la figure 2 sont portées les variations de H_2O_2 produit par les tranches de thyroïde de porc en absence et en présence de l'extrait de manioc pendant 60 minutes.

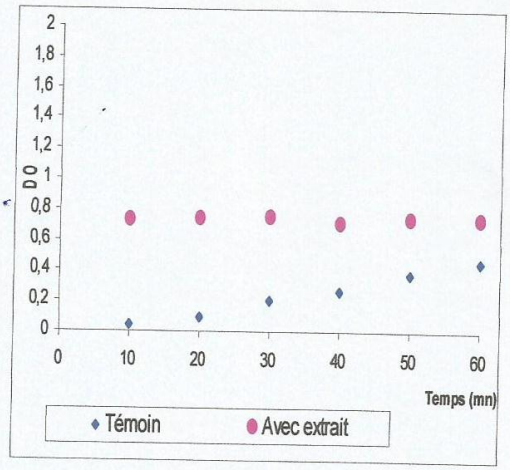
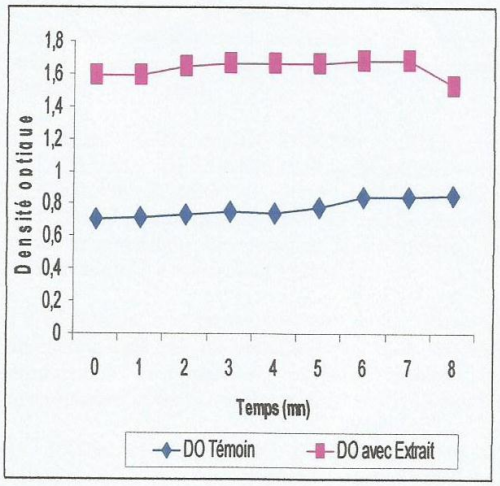


Figure 02: Variation de la densité optique exprimant la production de H2O2 par les tranches de thyroïde de porc en présence et en absence de l'extrait chaque 10 minutes.

En présence de l'extrait et dans les deux cas on observe un saut de H_2O_2. Il s'agit d'une augmentation brusque de H_2O_2 qui se stabilise durant tout le temps de la manipulation.

En évaluant la production de H_2O_2 dans un intervalle de temps réduit, (toutes les minutes pendant dix minutes), le même résultat se répète et le saut s'observe dès la première minute. (Figure 3)



DISCUSSION

Action de l'extrait de manioc sur la production de H_2O_2

Les fragments de la glande thyroïde isolés du porc produisent H_2O_2 durant au moins les soixante minutes qui suivent l'isolement de la glande.

Ce résultat confirme ceux obtenus par Dupuy et *al* [15] et par Corvilain et *al* [16]. Nos résultats présentés sur la figure indiqueraient une augmentation brutale suivie d'une stabilisation (saut). Ce saut de H_2O_2 peut être expliqué par un arrêt d'entrée de I^- c'est-à-dire le blocage du $Na+/I^-$ par l'extrait. Certains auteurs avaient déjà montré que l'extrait de manioc empêchait l'entrée d'iode dans la thyroïde [8].Son action sur le symport déplacerait l'équilibre de H_2O_2 pour l'iodation de la thyroglobuline lors de la synthèse des hormones thyroïdiennes. De ce fait, on peut suggérer que l'extrait de manioc n'a pas d'effet direct sur l'enzyme NADPH oxydase de la membrane apicale. Cette production linéaire s'explique par le fait que la réaction étant enzymatique, la chaîne d'oxydation de NADPH fonctionne continuellement en générant de. H_2O_2

La production de H_2O_2 est observée dans les fragments témoins.

Dans les fragments incubés en présence de l'extrait de manioc, nous avons obtenu une brusque augmentation qui se stabilise. Il n'y a pas de variation évolutive dans le temps. Il ne s'agit donc pas d'une réaction enzymatique. En effet, étant donné que le thiocyanate contenu dans le manioc bloque le symport NIS [8], la quantité d'iode qui entrerait dans la cellule serait faible. Seule une faible quantité d'eau oxygénée produite serait utilisée pour une éventuelle synthèse d'hormones. D'où accumulation des molécules non utilisées. Ceci entraîne un déplacement d'équilibre dans l'utilisant de H_2O_2.

CONCLUSION

Le fonctionnement de la glande thyroïde dépend de l'activité du symport Na^+/I^- situé sur la membrane basale des thyrocytes de porc. L'extrait de manioc affecterait ce symport et ainsi l'inhiberait. En revanche une action directe de l'extrait sur l'activité de la NADPH-oxydase n'est pas observée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BECKERS C., DELANGE F., 1980.- Etiology of endemic goiter. John Wiley, pp. 199-217, New York.

2. DELANGE F., THILLY C, ERMANS AM., 1968.- Iodine deficiency, a permissive condition in the development of endemic goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 28: 114-6.

3. DELANGE F., 1989.- Cassavaand the thyroide. In: Gaitan E. Ed. Environmental goitrogenesis. Boca Raton: CRC Press, pp. 173-94.

4. DELANGE F., 2001: *La thyroide.* Editions scientifiques et médicales. ELSEVIER SAS.

5. DELANGE F., BUSSONS F., 1965.- *Plantes alimentaires de l'ouest africain.* Statistiques de la FAO 1979-1980.

6. AUFRET M., 1957.- *Racines et tubercules,*

Nutrition et Alimentation tropicale.

7. CERIGUELLI, 1955.- *Cultures tropicales, plantes vivrières.*

8. ERMANS A., AHLUWALIA R., 1980.- *Role of cassava in the etiology of endemic goitre and cretinism.* Ottawa: International Development Research Centre.

9. DELANGE F., ITEKE FB, ERMANS A. M., 1982.- *Nutritional factors involved in a goitrigenic action of cassava. Ottawa.* International Development Research Centre publ.

10. MILENKOVIC M, DE DEKEN X, JIN L, DE FELICE M, DI LAURO R, DUMONT JE, CORVILAIN B, MIOT F., 2007.- Duox expression and related H_2O_2 measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult. *J. Endocrinol.*, 192(3): 615-26.

11. BIZUNOK NA, DUBOVIK BV., 2008.- Effect of adrenergic agents on NADPH oxydase evoked production of reactive oxygen species by macrophages. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 71(2): 43 6.

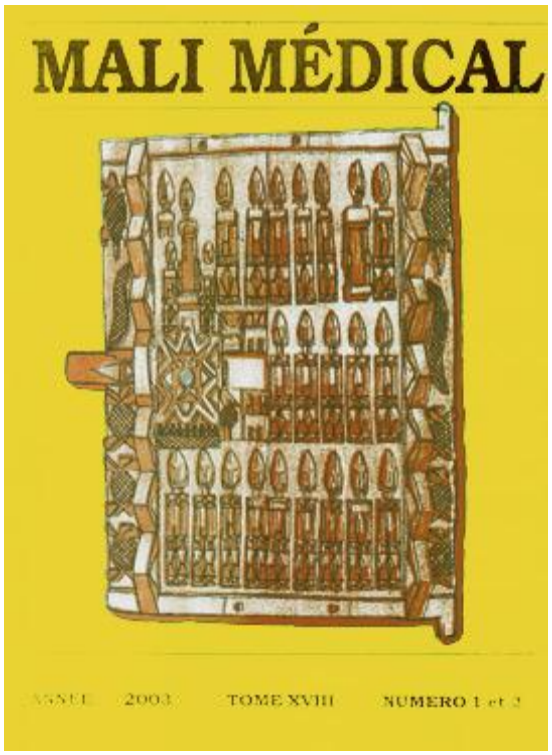
12. PACHUCKI J, WANG D, CHRISTOPHE D, MIOT F., 2004. Structural and functional characterization of the two human ThOX/Duox genes and their 5'-flanking regions. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 214(1-2): 53-62.

13. SAHACH VF, KORKACH LUP, KOTSIURUBA AV, PRYSIAZHNA OD., 2008.- The inhibition of oxidative and nitrosative stresses by ecdysterone as the mechanisms of its cardio- and vasoprotective action in experimental diabetes type I. *Fiziol Zh.*, 54(5): 46-54.

14 GINABREDA MG, CARDOSOLC, NOBREGA FM, FERREIRA AC, GONCALVES MD, VAISMAN M, CARVALHO DP., 2008.- Negative correlation between thyroperoxidase and dual oxidase H2O2-generating activities in thyroid nodular lesions. *Eur. J. Endocrinol.*, 158(2): 223-7.

15. DUPUY C., OHAYON R., VALENT A., N. HUDSON, DEME D., VIRION A., 1999.- Purification of a navel flavoprotein involved in thyroid/NADPHoxydase. Cloning of porcine and human CDNAS. *Journal Biochem.* 274: 372-659.

16. CORVILAIN B, COLLYN L., VAN SANDE J. and DUMONT J. E., 2000.- Stimulation by iodide of H_2O_2 generation in thyroid slices from several species Am. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 278 (4): 692-699.


MALI MÉDICAL
ANNEE 2003 TOME XVIII NUMERO 1 et 2

ETUDE DE LA PREVALENCE DES PERTURBATIONS THYROÏDIENNES NEONATALES AU BENIN

Title: Study of the prevalence of neonatal thyroid disturbances in Benin

YESSOUFOU G. : Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin

AGOSSOU A.E. : Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin

BABA- MOUSSA F. : Laboratoire de Microbiologie et de Technologie Alimentaire, FAST, Université d'Abomey Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin Calavi, B.P. 526, Cotonou République du Bénin

BABA-MOUSSA L. : Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, FAST, Université d'Abomey Calavi, 05 B.P. 1604 Cotonou République du Bénin

SEZAN A. * : Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, FAST, Université d'Abomey Calavi, 06 B.P. 3041, Cotonou République du Bénin

*Adresser toute correspondance à : Prof. SEZAN Alphonse 06 B.P.3041 Cotonou BENIN Tel: 00 229 96 81 79 14 ou 00 229 94 14 31 60 Email: alphonse.sezan@fast.uac.bj

Mots clés : Bénin, Thyroïde, Hypothyroïdie, congénitale, néonatales

Keywords: Benin, Thyroid, Hypothyroidism, congenital, neonatal

RESUME

But : La détermination des concentrations de thyroxine libre (T4 libre) et de thyrotropine (TSH), chez 177 nouveaux nés âgés de 0 à 7 jours à Cotonou au Bénin a permis d'établir le profil de perturbations thyroïdiennes néonatales.

Matériels et Méthode : L'état thyroïdien immunitaire a été mis en évidence par le dosage des anticorps anti thyroglobuline (Ac Anti Tg) et Anticorps anti Thyroperoxydase (Ac Anti TPO).

Résultats : La prévalence du dysfonctionnement de la glande thyroïde chez les nouveaux nés a été de 28% d'hypothyroïdie et 2,25 % d'hyperthyroïdie. Parmi les hypothyroïdiens, on note une hypothyroïdie franche de 53%, une hypothyroïdie primaire de 25%, une hypothyroïdie secondaire de 20% et une hypothyroïdie indéterminée de 2%. Aussi 73,33% des hypothyroïdiens présentent-ils un taux d'anticorps anti thyroglobuline supérieur au seuil de la normalité et 41,18% des euthyroïdiens, un taux élevé d'anticorps anti thyroglobuline. Ceci a permis de suggérer une thyroïdite lymphocytaire.

Conclusion : Les résultats des travaux ont montré l'apparition des affections thyroïdiennes néonatales par une l'hypothyroïdie très prononcée. Celle-ci est probablement due à un transfert de l'anticorps anti thyroglobuline d'origine maternelle vers le fœtus pendant la gestation.

Mots clés : Bénin, Thyroïde Hypothyroïdie, congénitale, néonatales

ABSTRACT

Study of the prevalence of neonatal thyroid disturbances in Benin

OBJECTIVE: The determination of concentrations of free thyroxine (FT4) and thyrotropin (TSH), in infants born in Cotonou, Benin has established the profile of neonatal thyroid disturbance.

DESIGN AND SUBJECTS: The detection of thyroid immune status by measuring antibodies to thyroglobulin (Tg Ab Anti) Antibody and Anti Thyroperoxidase (Anti TPO Ab) was performed. As venous blood was collected from 177 neonates aged 0 to 7 days.

RESULTS: We measured free thyroxine, thyrotropin , and antibodies to thyroglobulin, Anti Thyroperoxidase and detected a prevalence of dysfunction of the thyroid gland in neonates is from 28% for hypothyroidism, 2.25% of hyperthyroidism. Among hypothyroid, there was a frank hypothyroidism of 53%, hypothyroidism in 25% Primary, secondary hypothyroidism of 20% and hypothyroidism unspecified 2%. Also 73.33% of hypothyroid shows an antibody against thyroglobulin above the threshold of normality and 41.18% of euthyroid have a high Anti thyroglobulin Antibody This allows us to suggest lymphocytic thyroiditis.

CONCLUSION: The results of our studies show the onset of thyroid disease after neonatal hypothyroidism very pronounced. This is probably due to a transfer of the Anti- thyroglobulin Antibody of maternal origin to the fetus during pregnancy.

Keywords: Benin, Thyroid, Hypothyroidism, congenital, neonatal

INTRODUCTION

La thyroïde est une glande endocrine dont le méconisme d'action est mieux connu de nos jours [1]. Dans le cas particulier du nouveau-né, les hormones thyroïdiennes interviennent dans la croissance staturale et le développement du cerveau [2].

Classiquement le placenta est considéré comme une barrière au transport de T3 et T4 libres, cependant les études récentes ont évoqué la possibilité d'un passage transplacentaire d'hormones thyroïdiennes de la mère vers le fœtus dès le début de la grossesse [3]. La glande thyroïde du fœtus commence à fonctionner entre la dixième et la douzième semaine de gestation. Les hormones thyroïdiennes sont importantes pour le développement du système nerveux du fœtus et proviennent probablement de la sécrétion de sa propre glande thyroïde aussi bien que de petites quantités d'hormones thyroïdiennes de la mère qui traversent le placenta. L'iode et la TRH maternels traversent facilement le placenta, tandis que la TSH n'arrive pas à la franchir. La TRH peut être détectée dans l'hypothalamus fœtal à la fin du premier trimestre ; dans la même période la thyroïde fœtale commence à concentrer l'iode qu'elle utilise pour produire ses propres hormones thyroïdiennes [3].

Chez les nouveau-nés atteints d'hypothyroïdie congénitale, la glande thyroïde, pour des raisons inconnues, ne se développe pas (athyréose) ou est beaucoup plus petite que la normale (atrophie). Environ 10 % des nouveau-nés atteints d'hypothyroïdie congénitale seront incapables de sécréter les hormones thyroïdiennes, même si la glande thyroïde est présente (goitre congénital). La mutation des gènes codant pour la synthèse du symport NIS, de la TPO et de la Tg peut aussi en être la cause [4].

L'hypothyroïdie chez le nouveau-né est réellement une situation d'urgence. Comme le développement normal du cerveau et des tissus neufs au début de la vie exige un niveau adéquat d'hormones thyroïdiennes, une déficience en hormones thyroïdiennes provoque des handicaps mentaux et physiques graves, irréversibles, étant connu sous le nom de crétinisme. Il est connu que la majeure partie du développement du cerveau, soit 90 %, survient durant les deux premières années de la vie [5].

Au cours de la grossesse les Ac antithyroïdiens de type Ig G de la mère traversent le placenta. L'Ac anti Tg se fixe sur la Tg par ses récepteurs et l'empêche d'exercer sa fonction. L'Ac anti TPO se fixe sur ses récepteurs membranaires et par un mécanisme de transduction désactive la TPO. La conséquence est une hypothyroïdie [6].

Les résultats d'un travail préliminaire au Bénin a montré que l'hypothyroïdie touche 19% de la population étudiée dont 13 % de femmes [7]. L'objectif de ce travail est d'identifier les perturbations thyroïdiennes néonatales au Bénin.

MATERIEL ET METHODES

Le travail a été mené à la Maternité Lagune dans le service de Néonatologie et à l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) de Cotonou au Bénin.

L'enquête a concerné 177 nouveau-nés dont 103 de sexe masculin et 74 de sexe féminin, âgés de 0 à 7 jours dans le service de néonatologie. Ils ont été tirés de façon aléatoire par ordre d'arrivée avec un taux de sondage de 24,30 %. La répartition de cette population est représentée par la figure 1.

Dosage de T4 libre ou Free T4 : La technique ELISA pour la détermination quantitative de T4 libre a été utilisée.

Les microcupules recouvertes d'un extrait d'un Ac polyclonal sont incubés avec les étalons ou les échantillons de patients et une solution d'Ac anti T4 monoclonal spécifique. Durant l'incubation la fraction libre de T4 présente dans le sérum se lie à l'Ac anti T4 monoclonal qui se lie à son tour à l'Ac polyclonal. Après avoir rejeté toutes les molécules non liées par des lavages, on ajoute T4-HRP (horse Raddish peroxydase conjugated to T4). On rejette à nouveau toutes les molécules non fixées, les microcupules sont incubées avec un substrat contenant du peroxyde d'hydrogène et une solution tampon de tétraméthylbenzidine.

Une coloration bleue proportionnelle à la concentration de T4 se développe dans les microcupules.

La réaction est arrêtée en ajoutant le $2NH_2SO_4$.

Les DO (densités optiques) sont lues à la longueur d'onde de 450nm

La concentration de T4 libre est déterminée en projetant les DO des échantillons sur la courbe tracer à partir des valeurs obtenues pour les étalons.

Les valeurs normales : 0,59 – 1, 33 ng / dl. Les coffrets de réactifs proviennent de chez la société Randox Laboratories. Les courbes de calibration sur représentées sur la figure 1

Dosage de TSHus:

Nous avons utilisé les réactifs de dosage ultra sensible de TSH (TSHUS) en coffret provenant de la société Randox Laboratories.

Il s'agit d'une méthode de dosage immuno-enzymatique en phase solide (ELISA ou enzyme linked immunosorbent assay) basée sur le principe du sandwich. Les microcupules de la plaque du kit sont recouvertes d'un anticorps monoclonal dirigé contre un site antigénique unique d'une molécule de TSH humaine. Une aliquote d'échantillon contenant de la TSH endogène est incubée avec le conjugué enzymatique, qui est un anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre la molécule de TSH

et conjuguée à une peroxydase de raifort. Le conjugué non lié est éliminé. La quantité de peroxydase liée est proportionnelle à la concentration de TSH dans l'échantillon. Lorsque l'on ajoute un substrat et un chromogène, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de TSH dans le sérum.

La lecture se fait à 450 nm et les densités optiques sont rapportées à la courbe tracée à partir des valeurs obtenues par rapport aux étalons. Lorsque les valeurs normales sont entre:

- 0,54 et 4,62 µUI / ml on parle d'euthyroïdie
- < 0,13 µUI / ml il y a hyperthyroïdie

Les courbes de calibration sur représentées sur la figure 2

Dosage des Ac anti Tg : C'est une méthode enzymatique quantitative en phase solide (ELISA) basée sur le principe du sandwich pour la mesure des Ac dans sérum et le plasma humain Les puits sont recouverts de l'antigène (Ag). Une prise de sérum est incubée dans le puits recouvert. L'auto Ac lié à l'Ag est détectés en utilisant un enzyme conjugué (E-Ab) dirigé contre les Ac humains.

Après incubation les E-AB non liés sont rejetés par lavage. La quantité de l'E-Ab lié est proportionnelle à la concentration de l'Ag dans l'échantillon.

Après addition de la solution de substrat TMB l'intensité de la couleur obtenue est proportionnelle à la concentration de l'Ag. La mesure des DO des étalons est utilisée pour construire la courbe de calibration. Figure 3

Ac anti TPO : L'Ac anti TPO ELISA est basée sur le principe de dosage immuno-enzymatique. On recouvre les parois des microplaques par le recombinant (E. Coli) de l'Ag TPO (110 kD).

On prélève les sérums, étalons ou les contrôles dans les puits.

L'Ac se lie à l'Ag fixé à la paroi. Après une heure d'incubation à la température ambiante, la plaque est rincée avec une solution de lavage diluée pour rejeter les éléments non liés.

On ajoute un conjugué d'Ac anti peroxydase humain et incube pour 30 minutes. On lave et on ajoute le substrat (TMB) qu'on incube pendant 20 minutes. La couleur bleue développée est arrêtée par l'addition d'une solution de stoppage. On obtient une couleur jaune lue à 450 nm. La concentration des Ac est proportionnelle à l'intensité de la couleur. On trace une courbe de calibration à partir des D.O des étalons. Figure 4

RESULTATS

Dosage de T4libre et de TSHus : Les figure 5a et figure 5b montrent la répartition des dysfonctionnements de la glande thyroïde chez les nouveaux nés : on note un taux de 28% d'hypothyroïdie néonatale et 2,25% d'hyperthyroïdie et de 69,75% d'euthyroïdie (Figure 6a). La répartition de différentes formes d'hypothyroïdies est représentées sur la figure 6b.

Dosage des anticorps anti thyroglobulines (Ac-AntiTg) et Anticorps anti thyroperoxidases (Ac-Anti TPO) : Les Ac anti Tg sont présents dans 18 cas sur les 30 échantillons testés avec un taux élevé. Dans 7 cas, le taux est resté bas. le reste conserve un taux moyen. Par contre, les Ac anti TPO sont non significatifs dans tous les cas. Les anomalies des Ac antithyroïdiens concernent 10 nouveau-nés hypothyroïdiens. Ces anomalies n'ont pas été testées chez les sujets suspects d'hyperthyroïdie.

Les décès

On observe 57% de décès parmi les euthyroïdiens et 43% parmi les hypothyroïdiens (Figure 6)

DISCUSSION

Hyperthyroïdie : La faible fréquence d'hyperthyroïdie constatée (2,25 %), témoigne d'une perturbation thyroïdienne pouvant être liée à un passage non important des hormones maternelles à travers le placenta vers le fœtus. Classiquement les hormones thyroïdiennes ne traversent pas le placenta. Mais ces dernières années, certains auteurs ont montré une diffusion possible des hormones thyroïdiennes à travers le placenta [8]. Nos résultats concordent bien avec ceux de BERNARD et al [9] qui ont montré que chez l'homme, les hormones thyroïdiennes T3 et T4 sont détectables pendant le premier trimestre de vie dans le cerveau fœtal, avant que la glande thyroïde du fœtus ne soit active. Ce résultat suggère bien un transfert de T4 libre maternel vers le fœtus. Le résultat de 2,25% d'hyperthyroïdie obtenu dans notre étude serait dû à un transfert d'hormones thyroïdiennes maternelles vers le fœtus qu'une hyperthyroïdie réelle. Une hyperthyroïdie dans ce cas mériterait d'être confirmée 2 mois après la naissance ce que nous n'avons pas vérifié.

Hypothyroïdie

Chez les nouveau-nés testés nous avons obtenu 28 % hypothyroïdie. Cette hypothyroïdie peut avoir plusieurs origines :

- *Hypothyroïdie congénitale* : Dans la littérature, l'hypothyroïdie congénitale est bien décrite et les raisons ne sont pas tout à fait connues. Certains auteurs ont montré que cela peut être causé par la mutation du gène de la sous unité β de la TSH. [10].
- *Hypothyroïdie néonatale* : Parmi les 28 %, une part doit être accordée à l'hypothyroïdie néonatale qui peut avoir plusieurs origines :

1) Déficience en iode alimentaire de la mère pendant la grossesse : Des auteurs ont montré que l'iodure alimentaire traverse librement le placenta. La conséquence est que lorsque la mère manque d'iode, le fœtus en manque aussi. Cette situation peut être à l'origine d'une hypothyroïdie néonatale [11].
2) L'auto-immunité : Deux anticorps qui perturbent les étapes clés de la synthèse des hormones thyroïdiennes ont été découverts. Il s'agit de l'Anticorps antithyroglobuline qui est dirigé contre la thyroglobuline (Tg), protéine principale impliquée dans la synthèse des hormones thyroïdiennes et l'Anticorps antithyroperoxydase dirigé contre la thyroperoxydase qui favorise l'organification de l'iode minérale.
Pour rechercher d'autres origines possibles de cette hypothyroïdie néonatale nous avons émis l'hypothèse d'une présence possible d'anticorps dans le sang du nouveau-né. Notre étude a mis en évidence des taux d'anomalies des anticorps antithyroglobuline sur 80 échantillons hypothyroïdiens. Les 73,33% des hypothyroïdiens présentent un taux d'anticorps antithyroglobuline supérieur au seuil de normalité. La présence de l'Ac nous a amené à suggérer que l'hypothyroïdie pourrait être due à l'Ac, que l'Ac pourrait être d'origine maternelle et que l'Ac aurait traversé le placenta. Ces résultats concordent bien avec les données de la littérature qui signalent que les Ac anti Tg, de type IgG traversent librement le placenta [12].
Le dosage des Ac anti Tg effectué sur les échantillons euthyroïdiens montre une présence de l'anticorps avoisinant le taux de 41,18 %. La présence de cet Ac peut être sans conséquence sur le fonctionnement de la thyroïde ou au contraire induire une thyroïdite avec une hypothyroïdie.
Il a été montré que lorsque les anticorps anti Tg sont présents dans le sang, la thyroïde est remplie de cellules lymphocytaires conduisant à la destruction à terme du tissu thyroïdien [8]. Ces résultats permettent de suggérer une thyroïdite lymphocytaire, mais des études complémentaires sont nécessaires pour le confirmer.
Cas des décès : Dans notre étude nous avons observé 7 décès (4%) globalement. Parmi ces décès 42,85% sont révélés hypothyroïdiens.
Le faible taux de décès observé est explicable par la période d'étude limitée à 7 jours, alors que la période néonatale couvre les 28 premiers jours. Il est difficile de tirer de conclusions.

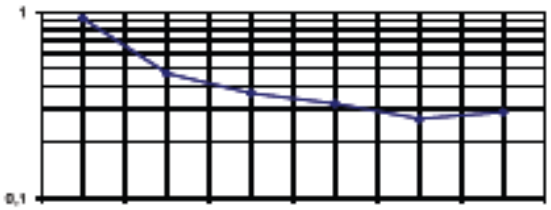
CONCLUSION

Les perturbations thyroïdiennes néonatales existent dans notre milieu. Ce sont des affections ayant des répercussions graves parfois irréversibles. Les répercussions observées sont à la fois d'ordre général et cérébral (crétinisme). Cette hypothyroïdie est probablement due à un transfert de l'Ac Anti Tg d'origine maternelle pendant la gestation.

REFERENCES

1. ROSS HA, DEN HEIJER M, HERMUS AR, et al. Composite Reference Interval for thyroid. Stimulating Hormone and Free Thyroxine, Comparison with Common Cutoff Values, and Reconsideration of Subclinical Thyroid Disease. Clin. Chem. 2009;Nov55 (11):2019-25
2. Iokeda K, Mishiba M, Sugiura H, Nakajima A, Kohsmo M, Hiromatsu S. Evaluated reference intervals for serum free thyroxine and thyrotropin using the conventional outliner rejection test without regard to presence of thyroid antibodies and prevalence of thyroid dysfunction in Japanese subjects Endocr J. 2009;56(9):1059-663.
3. MOLETI M., LO PRESTI VP, MATTINA F.et al. Gestational thyroid function abnormalities in conditions of mild iodine deficiency: early screening versus continuous monitoring of maternal thyroid status. Eur J Endocrinol. 2009; 160 (4): 611 – 617.
4. CHAN S. and KILBY M. D. Thyroid Hormon and Central nervous system development. Journal of Endocrinology 2000 165: 1-8
5. Montanelli L, Agretti P, Marco G, Bagattini B, Ceccarelli C, Brozzi F et al. Congenital Hypothyroidism and late-onset Goiter: Identification and characterization of a Novel Mutation in the Sodium/Iodide Symporter of the Proband and Family Members. Thyroid, 2009, Dec;19(12):1419-25
6. LEVY R. L'hypothyroïdie chez le nourrisson et l'enfant. La Fondation Canadienne de la thyroïde, 2001, 165 :1-8
7. van den Briel T, West CE, Hautvast JG, Ategbo EA. Mild iodine deficiency is associated with elevated hearing thresholds in children in Benin. Eur J Clin Nutr. 2001 Sep;55(9):763-8
8. DELHERT A. and FISHER M. Fetal Thyroid function: diagnosis and management of fetal Thyroiddisorders. Clinical Obstetric and gynecology, 1997, 40: 16 - 31.
9. HERNARL J. and PEKONEN F. Ontogenesis of the nuclear 3, 5, 3' triiodothyronine receptor in human foetal brain. Endocrinology, 1984; 114: 67 – 7.
10 Cengul H, Morgan NV, Forman JR, Soglam H, Aycan Z, Yakut T, et al. Novel TSHR mutations in consanguineous families with congenital nongoitrous hypothyroidism Clin Endocrinol (Oxf). 2010 Nov; 73(5):671-7
11. RAYMOND J, LAFRANCHI S.H. Fetal and neonatal thyroid function: review and summary of significant new findings. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2010 Feb;17(1):1-7
12. Nor Azlin ML, Rokiah YD, Mustafa N, Wahab NA, Johari MJ, Kamaruddin NA et al. Thyroid autoantibodies and associated complications during pregnancy. J Obstet Gynaecol. 2010;30(7):675-8

Figure 1



jours.

Figure 2

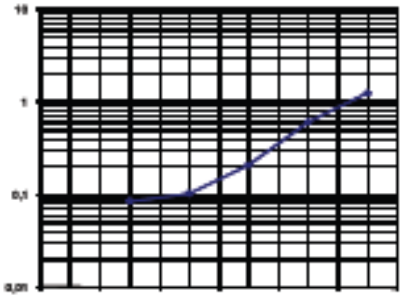


Figure 3

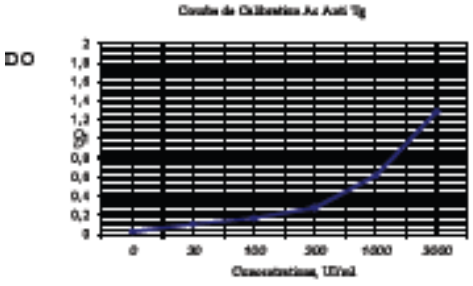


Fig 4

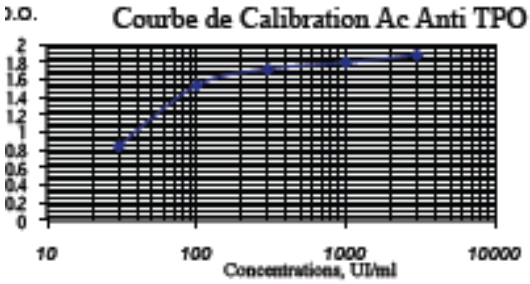
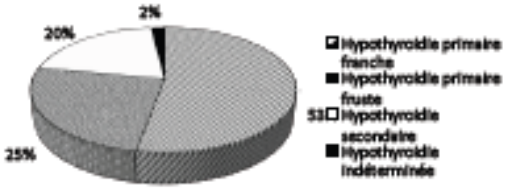


Figure 5 : Répartition de la population par âge de 0 à 7



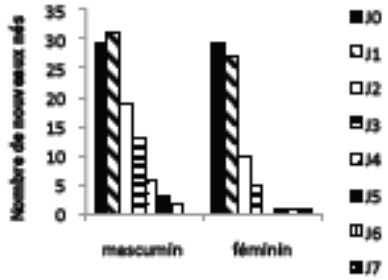


Figure 6a : Répartition des dysfonctionnements de la glande thyroïde chez les nouveaux nés

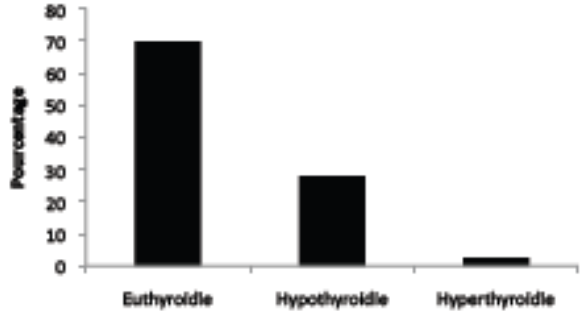


Figure 6b : Répartition des différentes formes d'hypothyroïdies chez les nouveaux-nés

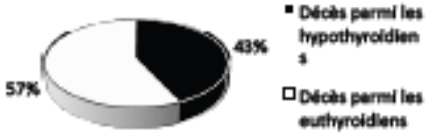


Figure 7 : Répartitions des décès

REFERENCES

ABDELGALEIL S.A.M. ET NAKATANI M., 2003. Antifeedant activity of limonoids from *Khaya senegalensis* (Meliaceae). *Journal of Apply Entomology* **127**: 236-239.

ABDELGALEIL S.A.M., IWAGAWA T., DOE M. ET NAKATANI M., 2004. Antifungal limonoids from the fruits of *Khaya senegalensis. Fitoterapia* **75**: 566-572.

ABREU P.M., MARTINS E.S., KAYSER O., BINDSEIL K.U., SIEMS K., SEEMANN A. ET FREVERT J., 1999. Antimicrobial, antitumor and antileishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytomedicine* **6**: 187-195

Abubakar, M.G., Lawal, A. and Usman, M.R. Hepatotoxicity studies of sub-chronic administration of aqueous stem bark of *Khaya senegalensis* in Albino rats. *Bajopas*, 2009; 3(1): 26-28.

ADEBAYO J.O., YAKUBU M.T., EGWIM E.C., OWOYELE V.B. ET ENAIBE B.U., 2003**.** Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters on rat kidney. *Journal of Ethnopharmacology* **88**: 69-72.

ADKINS et al. , 1987). **ADKINS BA, MYERS SR, HENDRICK GK, STEVENSON RW, WILLIAMS PE and CHERRINGTON AD. (1987**) - " Importance of the route of intravenous glucose delivery to hepatic glucose balance in the conscious dog". J Clin Invest, 79, 557-565.

AGBOR G., OBEN J., NGOGANG J., (2004). Toxicity study of Hibiscus cannabinus. Journal of the Cameroun academy of sciences Vol4 pp.27-32

ANDREELLI, F. AND GIRARD, J. (2005). Régulation de l'homéostasie glucidique. In: 366, 713-722.

ASSIMACOPOULOS-JEANNET FD, BLACKMORE PF and EXTON JH. (1977) - "Studies on □-adrenergic activation of hepatic glucose output". J Biol Chem, 252, 2662-2669.

AZZOUT B., BOIS-JOYEUX B., CHANEZ M. and PERET J. (1987)-" Development of **BALKS HJ and JUNGERMANN K (1984)**-" Regulation of the peripheral insulin/glucagon ratio by the liver". Eur J Biochem, 141, 645-650.

BALKS HJ and JUNGERMANN K (1984)-" Regulation of the peripheral insulin/glucagon ratio by the liver". Eur J Biochem, 141, 645-650.

BARIETY R., BONIOT R.,J.BARIETY, J.MOLINE (1978) Sémiologie médicale 5e edition Masson paris,Newyork, Barcelone Milan.PP179-181; 239-242

BARTELES H, LINNEMANN H and JUNGERMANN K. (1989)- " Predominant localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in the periportal zone of rat liver parenchyma demonstrated by in situ hybridation". FEBS Lett, 248, 188-194.

BECKH K, HARTMANN H, JUNGERMANN K and SCHOLZ R. (1984)-" Regulation of oxygen consumption in perfused rat liver ; decrease by □-sympathetic nerve stimulation and increase by the □-agonist phenylephrine". Pfluegers Arch, 401, 104-106.,

BENHAMOU J.P., MEHLYRE N.,RIZETTE M., RODES J.Hépatologie Clinique ,Ed.Flammarion.PP- 605-626

BITTNER R, BÖHME HJ, DIDT L, GOLTZSCH W, HOFMANN E, LEVIN MJ and SPARMANN G. (1979)- " Developmental change in the levels of hepatic enzymes in their relation to metabolic functions ". Adv Enzyme Regul, 17, 37-57..

BOUQUET et DEBRAY, 1974

BRINKMANN A, KATZ N, SASSE D and JUNGERMANN K. (1978)- " Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of the rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy". Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem, 359, 1561-1571.

CANIVET B, FEHLMANN M, and FREYCHET P. (1980)-" Glucocorticoid and catecholamine stimulation of amino-acid transport in rat hepatocytes. Synthesis of a high-affinity component". Molec Cell Endocrinol, 19, 253-261.

CHRIST B. LÖHNE R., SCHMIDT H. and JUNGERMANN K. (1987) -"Modulation of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase by adenosine, but not ketone bodies or ammonia in rat hepatocyte cultures". Biol.Chem.Hoppe-Deyler, 368, 1579-1587

CONFALONIERE. (1967). Encyclopédie pour tous. Milan

CONNOLLY D.L., 1983. Chemistry of limonoids of the *Meliaceae* and *Cneoraceae*. In: Waterman P.G., Grundron M.F. (Eds) Chemistry and chemical taxonomy of the *Putales. Academic Press, London.*

Daniel-Yves, A. 2002. Initiation à l'agroforesterie en zone sahélienne: les arbres des champs du Plateau Central au Burkina Faso. KARTHALA Editions. Paris France. 220 p.

DIFIORE M.S.H. (1965). Atlas of human histology; 2nd ed. (Lea and Febiger) Philadelphia P224

EL TAHIR A., SATTI G.M. ET KHALID S.A., 1999. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Journal of Ethnopharmacology* **64**: 227-233.

FALLER A., S.SPRUMONT (1988). Le corps humain 3e Edition revue et remaniée, Doin éditeurs Paris.PP148-150 ; 247-257

FORSSMANN WG and ITO S. (1977)-" Hepatocyte innervation in primates". J Cell Biol, 74, 299-313.

FRIZZELL RT, CAMPBELL PJ and CHERRINGTON AD. (1988) -" Gluconeogenesis and hypoglycemia". Diabetes Metab Review, 4, 51-70.

GANKEMA HS, GROEN AK, WANDERS RJA and TAGER JM. (1983)- " Measurment of binding of adenine nucleotides and phosphate to cytosolic proteins in permeabilized rat liver cells ". Eur J Biochem, 131, 447-451.

GIRARD J. (1988)-"Contrôle hormonal de la mise en place de la gluconéogenèse hépatique chez le nouveau-né". Annales d'Endocrinologie, 49, 287-293.
Gluconeogenesis from various precursors in isolated rat hepatocytes during starvation or after feeding a high protein, carbohydrate-free diet". J. Nutr., 117, 164-169.

GOVINDACHARI T.R. ET KUMARI G.N.K., 1998. Tetranorterpenoids from *Khaya senegalensis*. *Phytochemistry* **47** (7): 1423-1425.

GRUENWALD J, FREDEN J, ARMBRUESTER N: Cinnamomum and health, Crit Rev Food Sci Nutr 2010, 50: 822-834)

GUYTON ET HALL (2003).Précis de physiologie médicale 2e édition française. PICCINNUOVA LIBRARIA S.P.A.PP813 ;886,878

HÄUSSINGER D, SIES H and GEROK W. (1985)- " Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle". J Hepatol, 1, 3-14

IGUCHI A KUNOH Y, MIURA H, UEMURA K, YATOMI A, TAMAGAWA T, KAWAHARA H and SAKAMOTO N. (1989)-" Central nervous system control of glycogenolysis and gluconeogenesis in fed and fasted rat liver". Metabolism, 38, 1216-1221.

JAVAPRAKASHA GK, RAO LG : chemistry, biogenesis and biological acivities of Cz. Crit Rev Food Sci Nutr 2011, 51 :547-562
JONES DP and MASON HS. (1978)- «Gradients of oxygen concentration in hepatocytes". J Biol Chem, 253, 4874-4880.

JUNGERMANN K and KATZ N. (1982) -" Metabolic heterogeneity of liver parenchyma". In: Metabolic compartmentation, edited by H. Sies. London: Academic, pp 411-435.

JUNGERMANN K, KATZ N, TEUTSCH H and SASSE D. (1977) - "Possible metabolic zonation of liver parenchyma into glucogenic and glycolytic hepatocytes". In Alcohol and Aldehyde Metabolizing systems, edited by RG Thurman, JR Williamson, HR Drott, B Chance, New York : Academic, 3, p.65-77.

JUNGERMANN K. and SASSE D. (1978)-" Heterogeneity of liver parenchymal cells". Trends Biochem. Sci., 3, 198-202.

JUNGERMANN K. and STÜMPEL F. (1999) -" Role of hepatic, intrahepatic and hepatoenteral nerves in the regulation of carbohydrate metabolism and hemodynamics of the liver and intestine".Hepato-Gastroenterology, 46, 1414-1417.

KATZ J and McGARRY J.D. (1984) - "The glucose paradox: is glucose a substrate for liver metabolism? » J Clin Invest, 74, 1901-1909.

KATZ J, KUWAJIMA D, FOSTER D.W and McGARRY J.D. (1986) - "The glucose paradox: new perspectives on hepatic carbohydrate metabolism". Trends Biochem Sci, 11, 136-140.

KATZ N, NAUCK M and WILSON P. (1979)-" Induction of glucokinase by insulin under the permissive action of dexamethasone in primary rat hepatocyte cultures". Biochem Biophys Res Commun, 88, 23-29.

KERHARO J. et ADAM JG., 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques. Ed Vigot frères Paris **ISBN 2 - 7114 – 0646 - 6.**

KERHARO, (1971). Recherches Ethnopharmacologiques sur les plantes medicinales et toxiques de la pharmacopee denegalaise traditionnelle. Thesed e pharmacie Dakar, 21:286

KESSLER M, HÖPER J and KRUMME BD. (1976) - «Monitoring of tissue perfusion and cellular function ". Anaesthesiology, 45, 184-197.

KHALID S.A., FRIEDRICHSEN G.M., KHARAZMI A., THEANDER T.G., OLSEN C.E. ET CHRISTENSEN S.B., 1998. Limonoids from *Khaya senegalensis. Phytochemistry* **49** (6): 1769-1772

KOLB E.1975.Physiologie des animaux domestiques domestiques.Ed.Vigot & Frères, 918 Pages.

KONE W.M., ATINDEHOU K.K., TERREAUX C., HOSTETTMANN K., TRAORE D. ET DOSSO M., 2004. Traditionnal medicine in north Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 43-49

LECHAT P., CALVO F., CREMOUX P.,GIROUD J.P.,LAGIER G.,LECHAT P.H.,ROUVEIX B., WEIBER S. (1990). Pharmacologie médicale.5e ed, Masson ,Paris.P741

LEVERVE X., GROEN AK., VERHOEVEN AJ and TAGER JM (1985) -" Kinetic analysis of shortterm effects of □-agonists on gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes". FEBS, 181, 43-46

LINDROS KO et PENTTILÄ KE. (1985)- " Digitonine-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes". Biochem J, 228, 757-760.

LOMPO M., GUISSOU I.P., KABORE Z.I. ET SAWADOGO M., 1995. Effet hypothermisant et toxicité générale aigue chez la souris d'écorces de tronc de *Khaya senegalensis*. *Revue de Médecine et Pharmacopée Africain**e*** **9 :** 99 – 106

LOUIS-SYLVESTER J and LE MAGNEN J. (1996) -" A fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats". Obesity Res, 4, 497-500.

LU F.C. (1992). Toxicologie : données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque Paris : Masson. 360 pages.

LUYCKX F. (1) ; **SCHEEN A. J.** (2) ; **GIELEN J.** (1) ; **LEFEBVRE P. J.** (2) ; **Comment j'explore... Le syndrome d'insulinorésistance grâce à ses marqueurs biologiques = Insulin resistance biological markers RMLG. Revue médicale de Liège** ISSN **0370-629X** 1997, vol. 52, n°10, pp. 686-691

Marieb E.Katja H. (2007). Anatomy and Human Physiology 7th Ed.De Boeck University PP813,886,878.

MARIEB E.N. (1999). Anatomie et Physiologie Humaine. Traduction de la 4è edition américaine. De Boeck Université. PP 811, 883,875

MATSUMURA T and THURMAN RG. (1983)-" Measuring rates of O2 uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule: stop-flow experiments with perfused liver". Am J Physiol, 244(Gastrointest Liver Physiol 7), G656-G659.

MATSUMURA T and THURMAN RG. (1984)-" Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule". Eur J Biochem, 140, 229-234.

MAYER J. (1969) – " Regulation of energy intake and the body weight: the glycostatic theory and the lipostatic hypothesis". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 157, 1176.

McCORMACK J.G, WESTERGAARD N., KRISTIANSEN M., BRAND C.L., and LAU J. (2001)-"Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy ". Curr Pharm Des, 14,1451-74.

MEYER, P. (1977). Physiologie Humain. Flammarion Médecine-Science, pp. 73-79.

MICHELITSCH, A., RITTMANNSBERGER, A., HÜFNER, A., RÜCKERT, U. AND LIKUSSAR, W. WILLIAMS, RH. (1980). Traité d'endocrinologie. Flammarion Médecine-Science, pp.666-781.

MIETHKE H, WITTIG A, NATH S, ZIERZ S and JUNGERMANN K. (1985)- " Metabolic zonation in liver of diabetic rats. Zonal distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphatase and succinate dehydrogenase". Biol Chem Hoppe Seyler, 366, 493-501.

NAKATANI M., ABDELGALEIL S.A.M., OKAMURA H., IWAGAWA T., SATO A. ET DOE M., 2000. Khayanolides A and B, new rearranged phragmalin limonoid antifeedants from *Khaya senegalensis. Tetrahedron letters* **41**: 6473-6477.

NDIAYE, S.S. 2013. *Khaya senegalensis* ou hay en wolof. Retrieval on 2013/04/28 at http://sambamara.com/

NEWBY AC. (1984) -"Adenosine and the concept of ≪ retaliatory metabolites ≫". Trends Biochem Sci, 9, 42-44.
NEWSHOLM EA and LEECH AR. (1983) - "Biochemistry for the medical sciences" p 538, (Wiley J & Sons eds), New York

NUBER R, TEUTSCH HF and SASSE D. (1980)- " Metabolic zonation in thioacetamide-induced liver cirrhosis". Histochemistry, 69, 277-288.

Okieimen F.E. et Eromosele C.O., 1999. Fatty acids composition of the seeds oil of *Khaya senegalensis. Bioresource technology* **69**: 279-280.

OLMO L.R.V., DA SILVA M.F.G.F., FO E.R., VIEIRA P.C., FERNANDES J.B., PINHEIRO A.L. ETVILELA E.F., 1997. Limonoids from leaves of *Khaya senegalensis Phytochemistry* **44**: 1157- 1161.

OLMO L.R.V., DA SILVA M.F.G.F., FO E.R., VIEIRA P.C., FERNANDES J.B., MARSAIOLI A.J., PINHEIRO A.L. ET VILELA E.F, 1996. Rearranged limonoids from *Khaya senegalensis Phytochemistry* **42**: 831-837.

PIERI, F. AND KIRKIACHARIN, S. (1992). Pharmacologie et thérapeutique. Elipses, 2, pp. 297-305.

PIERRE LOUISOT (1970).Sémiologie biochimique : analyse biologiques, explorations fonctionnelles.Simep éditions Villeurbanne PP39-69

PROBST I and JUNGERMANN K. (1983a) - «The glucagon-insulin antagonism and glucagondexamethasone synergism in the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase in cultured rat hepatocytes". Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem, 364, 1739-1746.

Ranasinghe et al BMC Complementary and alternative Medicine 2013, 13 :275)

ROCK R.C., WALKER W.G., JENNING C.D. (1987). Nitrogen metabolites and renal function.in Fundamentals of clinical chemistry Dietz N.W.edith..3th edition.Philadelphie WB Saunders PP669-704

SHIMAZU T et OGASAWARA S. (1975) - " Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver". Am J Physiol, 228, 1787-1793.

SHIMAZU T. (1987) -" Neuronal regulation of hepatic glucose metabolism in mammals". Diabetes Metab Rev, 3, 185-206.

SOKPON et OUINSAVI(2001Utilisation de Khaya senegalensis en médecine traditionnelle au Benin. Revue de Médecine et Pharmacopée africaines.).

SUZUKI, K. AND KONO, T. (1980). Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site.*Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, pp. 2542-2545.

THIOUNE O., POUSSET J.L. ET LO I., 1999. Anti-inflammatory activity of the bark of *Khaya senegalensis* (A Juss). Preliminary research of structure/activity relationship *Dakar Medicine* **44** (1): 12-15.

Traité de diabétologie (A. Grimaldi). Flammarion Médecine-Science. **2**, pp. 22-40.

TRON I., PIQUET O., BAERT A. (2002). Toxon : manuel de toxicologie, Agence de L'environnement et de la maîtrise de l'énergie, pp 32-34 ; 26-27.

WILLIAM J.MARSHALL, STEPHAN K.BANGERT(2005). Biochimie médicale pathologie et diagnostic.Elsevier 2005 PP59-87

WIMMER M and PETTE D. (1979)- " Microphotometric studies on intraacinar enzyme distribution in rat liver". Histochemistry, 64, 23-33..

WITTIG B, ZIERZ S, GUBERNATIS G, NATH A, and JUNGERMANN K. (1985)- "Glucostat capacity and metabolic zonation in rat liver after portocaval anastomosis". Biol Chem Hoppe Seyler, 366, 713-722.

WITTIG B, ZIERZ S, GUBERNATIS G, NATH A, and JUNGERMANN K. (1985) - "Glucostat capacity and metabolic zonation in rat liver after portocaval anastomosis". Biol Chem Hoppe Seyler,

WÖLFLE D and JUNGERMANN K. (1985)-" Long-term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocytes cultures". Eur J Biochem, 151, 299-303.

WRIGHT S.-1980-Physiologie appliquée à la Médecine. Ēd Flammarion. Médecine – Sciences, 668pages

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L and FRIEDMAN JM. (1994) -" Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue". Nature, 372, 425-432.

ZIEVE L, ANDERSON WR, LYFTOGT C and DRAVES K. (1986)- " Hepatic regenerative enzyme activity after pericentral and periportal lobular toxic injury ". Toxicol Appl Pharmacol, 86, 147-158.

ANNEXES

Université d'Abomey-Calavi
==========
Faculté des Sciences et Techniques
==========
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE
==========
LABORATOIRE DE BOTANIQUE ET ECOLOGIE VEGETALE
==========
HERBIER NATIONAL DU BENIN

CERTIFICAT D'IDENTIFICATION

Le Directeur de l'Herbier National du Bénin, soussigné, certifie que la plante récoltée par Mlles ASSOU K. Sidoine-Eudoxie et AGOSSOU A. Essé, dans le cadre de leurs travaux de recherche au Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire (FAST/UAC), est identifiée sous :

N° Identification	Nom scientifique	Famille
AA 6492/HNB	*Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss.	Meliaceae

En foi de quoi, le présent certificat leur est délivré pour servir et valoir ce que de droit.

Abomey-Calavi, le 14 Avril 2014

Le Directeur,

Herbier National du Bénin – Le Directeur – FAST/UAC

Professeur Akpovi AKOEGNINOU.-

Campus Universitaire d'Abomey-Calavi, 01 BP : 4521 Cotonou. Tél : 93 02 38 75 / 95 56 40 54


Ecorse Khaya Senegalensis
(Photo: AGOSSOU A.E.)


Poudre de Kpiaya Senegalensis
(Photo: AGOSSOU A.E.)




Heidolph