

REPUBLIQUE DU BENIN



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (MESRS)



UNIVERSITE D'ABOMEY- CALAVI

ECOLE DOCTORALE PLURIDISCIPLINAIRE « ESPACES, CULTURES
ET DEVELOPPEMENT

LABORATOIRE DE BIOMEMBRANES ET SIGNALISATION CELLULAIRE

THESE DE DOCTORAT

Discipline : SCIENCES ENVIRONNEMENTALES ET DEVELOPPEMENT DURABLE
Spécialité : ENVIRONNEMENT SANTE ET DEVELOPPEMENT DURABLE

Présentée par :
Loïca Z. Jeanne d'Arc ZOHOUN

**CHRONOPHYSIOLOGIE DES RATS WISTAR ET EFFETS
DES EXTRAITS DES ECORCES DE KHAYA
SENEGALENSIS SUR LA LIBERATION HEPATIQUE DU
GLUCOSE**

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

Mention : Honorable

Directeur de Thèse
Professeur Alphonse SEZAN

Devant le Jury composé de:

Président du jury	Lamine Said BABA- MOUSSA	Professeur Titulaire Université d'Abomey-Calavi, Bénin
Directeur de thèse	Alphonse SEZAN	Professeur Titulaire Université d'Abomey-Calavi, Bénin
Rapporteur	Tchadjobo TCHACONDO	Maître de Conférences Université de Lomé, Togo
Rapporteur	Joachim Djimon GBENOU	Professeur Titulaire Université d'Abomey-Calavi, Bénin
Rapporteur	Emile Kou'santa AMOUZOU	Professeur Titulaire Université de Kara, Togo

Année : 2012-2017

DEDICACES

Je dédie ce travail

❖ A **DIEU** l'Éternel, en qui j'ai mis toute ma confiance et qui m'a donné la sagesse de surmonter les difficultés.

❖ A Mon époux **Dr Lionel S. SOGBOSSI**, ton affection, tes conseils sans cesse renouvelés et ta présence permanente à mes côtés ont été un grand soutien. Reçois en ce travail, le fruit de tes sacrifices et l'expression de mon amour pour toi.

❖ A mes enfants **Chancelle, Urielle, Sèdjro Lionel SOGBOSSI** vous me donnez la force de travailler. Ce travail est le vôtre.

❖ A vous mes parents **Cyriaque G. ZOHOUN** et **Ida QUENUM** pour l'amour que vous m'avez toujours témoigné ainsi que votre soutien moral et financier tout au long de mes études. Que chacun d'entre vous soit ici de tout cœur remercié d'avoir participé à cette aventure.

❖ A mes beaux-parents **Michel C. SOGBOSSI** et **Jeannette L. ZOLA**, pour toutes vos attentions spontanées.

❖ A mes mamans **Nicole, Gilberte** et mes belles mères **Pélagie, Agathe, Julie-Billart**.

❖ A vous mes frères et sœurs **ZOHOUN Roland, Loïc, Marie-Josée, Rose, Riabelle, Isabelle, Merveille, Guillone, Léon, Marcel, et Adèle**.

❖ A toute la **Famille ZOHOUN** et la **Famille SOGBOSSI**.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail qui marque la fin de tant d'années de travail, c'est avec une certaine émotion que je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse.

❖ A mon Directeur de thèse, Monsieur le **Professeur Alphonse SEZAN**, *Professeur Titulaire en Biologie Cellulaire - Biochimie, Directeur du Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Responsable des formations de Physiologie et Pharmacologie Cellulaire/Nutrition et de Sécurité alimentaire.*

Avec patience, vous m'avez guidé et conseillé lors de la réalisation de cette thèse. Je vous remercie pour la qualité de vos enseignements tout au long de mes études et plus encore de l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Veuillez trouver en ce travail le témoignage de ma profonde reconnaissance.

❖ Au **Professeur Michel BOKO**, *Professeur titulaire de Géographie-Climatologie. Directeur honoraire de l'ECOLE DOCTORALE PLURIDISCIPLINAIRE « ESPACES, CULTURES ET DEVELOPPEMENT » de la FLASH de l'Université d'Abomey-Calavi.*

Pour tous vos bienfaits et votre accompagnement paternel, je vous prie de trouver ici le témoignage de ma gratitude.

❖ Au **Professeur Joachim GBENOU**, *Professeur Titulaire, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de Natitingou (Université de Parakou) et Directeur du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi.*

Merci de nous avoir accueillis dans votre laboratoire ; pour la considération et la confiance que vous avez eues en nous en mettant à notre disposition le matériel nécessaire pour l'extraction et le screening phytochimique. *Sincères reconnaissances !*

❖ Au **Professeur Lamine BABA MOUSSA** *Professeur Titulaire en Microbiologie, Biochimie et Biologie Moléculaire, Directeur du Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi.* Merci pour votre aide sans cesse renouvelée, vos conseils et votre soutien indéfectible.

❖ Aux **honorables membres du jury**, merci d'avoir accepté évaluer ce travail. Vos approches et critiques seront les bienvenues pour parfaire ce document.

❖ A tout le corps professoral du Département de physiologie animale et application, de la Faculté des Sciences et Techniques, en particulier aux **Docteurs MICHODJEHOUN Laetitia, ATTAKPA Eugène, AHOKPE Mélanie, YESSOUFOU Ganiou, BEHANZIN Justin, BOYA Yekini**, pour votre soutien et vos conseils. Sincères Merci !

❖ A mes collègues et amis les **Docteurs Marcellin TAKIN, Esse AGOSSOU, Rodrigue AKOTEGNON, Eudoxie ASSOU** ; pour tout votre temps et vos conseils, je vous dis merci.

❖ Aux sieurs **Roland KANGBETO, Romaric SODE, Jérôme KAKPO**, merci pour toute l'attention et l'aide que vous m'aviez apporté.

❖ A tous les membres de l'équipe du laboratoire de biomembranes et de signalisation cellulaire pour leur disponibilité à me montrer les techniques d'analyses et leur soutien moral ; Sincères gratitudees !

❖ A l'administration rectoriale de l'Université d'Abomey-Calavi pour l'appui logistique.

❖ A l'administration de la Faculté des Lettres, des Arts et des Sciences Humaines et de L'Ecole Doctorale Multidisciplinaire pour leur accompagnement et encadrement.

❖ A l'administration de la Faculté des Sciences et Techniques pour leur suivi.

❖ A tous ceux que j'ai oublié de citer... **Sincères remerciements.**

TABLE DES MATIERES

DEDICACES.....	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES	iv
PUBLICATIONS	vii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTES DES GRAPHIQUES	xi
LISTE DES PHOTOS	xii
RESUME.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCTION.....	1
OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE RECHERCHE.....	3
Objectifs	3
Hypothèses	3
CHAPITRE I : GENERALITES.....	4
1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1.1. Etat Des Connaissances Sur <i>KHAYA SENEGALENSIS</i>	5
1.1.1. Description Botanique et distribution de <i>Khaya Senegalensis</i>	5
1.1.2. Description phytochimique de <i>Khaya senegalensis</i>	9
1.1.3. Rapports sur l'efficacité thérapeutique de <i>Khaya senegalensis</i>	14
1.1.4. Effets biochimiques des extraits de <i>Khaya senegalensis</i>	15
1.1.5. Effets tissulaires ou organiques des extraits de <i>Khaya senegalensis</i>	16
1.1.6. Risques toxicologiques.....	17
2. GENERALITES SUR LE RAT WISTAR.....	18
2.1. Origine et description du rat Wistar	18
2.2. Paramètres physiologiques du rat Wistar.....	19
2.3. Paramètres biochimiques.....	22
3. Les voies métaboliques, le rein, le foie et l'homéostasie du cholestérol	24

3.1. Métabolisme des lipides et homéostasie du cholestérol	24
3.1.1. Fonctions et origines du cholestérol.....	26
3.1.2. Lieux de synthèse du Cholestérol	26
3.1.3. Métabolisme du cholestérol	27
3.1.4. Régulation de la biosynthèse du cholestérol	28
3.2. Le rein, le foie et l'homéostasie du glucose.....	29
4. La Chronobiologie [7].....	34
4.1. La chronophysiologie et la notion de rythme biologique.	34
4.2. Horloge circadienne de fonctionnement de quelques organes vitaux selon la médecine chinoise.	38
4.3. De la chronopathologie à la chronothérapie [50 ; 54 ; 55]	41
4.4. Rythme biologique et chronopharmacocinétique des médicaments	42
CHAPITRE II : CADRE, MATERIEL ET METHODE D'ETUDE	47
2.1. Cadre d'étude	48
2.2. Matériels et méthodes.....	50
2.2.1. Matériel :	50
<i>Photo 2 : Ecorce de K. senegalensis</i>	50
<i>Photo 3 : Poudre de l'écorce de K. senegalensis</i>	50
<i>Photo 4 : Extrait du K. senegalensis</i>	50
2.2.2. Méthode	54
<i>Photo 6 : Rat disséqué</i>	62
<i>Photo 7 : Gavage des rats Wistar avec l'administration des extraits éthyliques de Khaya senegalensis.</i>	69
- Dosage du cholestérol	74
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	76
3.1 Effets Des Extraits Totaux De <i>Khaya Senegalensis</i> Sur La Liberation Hepatique Du Glucose	77
3.1.1. Resultats Partie I.....	77
Temps en abscisse	82
3.1.2. Discussions partie I.....	85

3.2. Resultat partie ii : chrononophysologie des extraits de <i>Khaya senegalensis</i> chez le rat wistar.....	91
3.2.1. Effet de l'administration unique des extraits de <i>Khaya senegalensis</i> sur les parametres biochimiques chez le rat.	91
3.2.1.1 Effet des extraits totaux de <i>k senegalensis</i> sur la liberation hepatique du glucose.....	92
3.2.1.2 Effet des extraits totaux de <i>k senegalensis</i> sur la liberation hepatique du cholesterol	93
DISCUSSION PARTIE II.....	101
3.2.2. Effets du <i>Khaya</i> sur la variation des différents paramètres :	
Chronopharmacologie du <i>Khaya</i>	105
CONCLUSIONS GENERALES	108
PERSPECTIVES.....	110
REFERENCES	111

PUBLICATIONS

PUBLICATION N°1

TAKIN MARCELLIN, AHOKPE MELANIE, ZOHOUN LOICA, BABA-MOUSSA LAMINE, SEZAN ALPHONSE, 2013. «Effect of total *Khaya senegalensis* (*Meliaceae*) barks extracts on hepatic liberation of glucose». National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology | 2014 | Vol 4 | Issue 2 | 105 – 110

PUBLICATION N°2:

LOICA ZOHOUN, SEMASSA M. I. HOTEYI, OMEDINE KOUKOU, ROLAND KANGBETO, JOACHIM GBENOU AND ALPHONSE SEZAN. Chronophysiology of Wistar rat under extracts from *Khaya senegalensis*. International Journal of Science and Research (JSR) ISSN (online) 2319-7064.

PUBLICATION N°3:

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>

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

C	: Degré celsius
ABCG5/8	: ATP-binding cassette G5/G8
ADP	: Adenosine DiPhosphate
ALAT	: ALanine Amino Transférase
Apo	: Apolipoprotéine
ASAT	: ASpartate Amino Transférase
ATP	: Adenosine TriPhosphate
CO₂	: Dioxyde de carbone
CoA	: Coenzyme A
DAP	: Dihydroxy-Acétone Phosphate
G6PD	: Glucose 6Phosphate Déshydrogénase
GK	: Glycérol Kinase
GPO	: Glycérol Phosphate Oxydase
HMG-CoA	:HydroxyMethyl-Glutaryl-CoA réductase
ISBA	: Institut des Sciences Biomédicales Appliquées
Kg	: Kilogramme
LDL	: Low Density Lipid
Mg	: Milligramme
Nm	: Nanomètre
NPC1L1	: Nieman Pick C1 Like1 Protein
P.A.S	: Periodic Acid Schiff
RE	: Réticulum Endoplasmique
TG	: Triglycérique
UAC	: Université d'Abomey-Calavi
µL	: MicroLitre
WHO	: World Health Organisation

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les systèmes endocriniens du pancréas (Nelson et Cox, 2004) [43] .	30
Figure 2: Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline [45]	31
Figure 3: Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline (Kahn B.B., 1992) [46].....	32
Figure 4: Illustration d'un rythme biologique hypothétique par une fonction sinusoïdale permettant de représenter de façon visuelle ses différents paramètres fondamentaux	38
Figure 5: Schéma récapitulatif des différents processus pharmacocinétiques d'un médicament administré par voie orale.	46
Figure 6: Zones agro-écologiques du Bénin (Attindéhou, 2013)	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Nom local de <i>Khaya senegalensis</i> en Afrique (Takin et al, 2014).....	7
Tableau II: Mode d'action de quelques molécules bioactives (Mishral et al. 2009).....	13
Tableau III: Efficacité thérapeutique d'extraits de <i>Khaya senegalensis</i>	14
Tableau IV: Normes biologiques chez le rat Wistar	23
Tableau V: Facteurs physico-chimiques influençant la vitesse pharmacocinétique d'un médicament.	46
Tableau VI: Mode opératoire du dosage des triglycérides	70
Tableau VII: Mode opératoire du dosage d'ASAT	71
Tableau VIII: Mode opératoire de dosage d'ALAT.....	72
Tableau IX: Mode opératoire du dosage de l'urée	73
Tableau X: Mode opératoire du dosage du glucose.....	74
Tableau XI: Mode opératoire du dosage du cholestérol.....	75
Tableau XII: Variation des taux moyens de glycémie chez les différents groupes de rats en fonction du temps	92
Tableau XIII: Variation des taux moyens du cholestérol chez les différents groupes de rats en fonction du temps	93
Tableau XIV: Variation des taux moyens d'ASAT chez les différents groupes de rats en fonction du temps.....	95
Tableau XV: Variation des taux moyens d'ALAT chez les différents groupes de rats en fonction du temps	96
Tableau XVI: Variation des taux moyens d'urée chez les différents groupes de rats en fonction du temps	97
Tableau XVII: Variation des taux moyens de tryglycérides chez les différents groupes de rats en fonction du temps	99

LISTES DES GRAPHIQUES

Graphe 1: Mesure de la variation de la densité optique aux différentes concentrations.....	79
Graphe 2: Comparaison de la courbe de la variation de la densité optique du témoin et celle de l'extrait à la concentration 10 µg/L	80
Graphe 3: Comparaison des courbes de la variation de la densité optique du Témoin et de l'extrait à concentration de 20µg/L.....	81
Graphe 4: Comparaison des courbes de la variation de densité optique du témoin et celle de l'extrait à la concentration de 2µg/L.....	82
Graphe 5: Comparaison de la courbe de la variation de la densité optique du témoin et celle de l'extrait à la concentration 5 µg/L	83
Graphe 6: Courbe dose réponse	83
Graphe 7: DO obtenues pour le dosage du glucose sous l'effet des extraits totaux de <i>Khaya senegalensis</i> aux concentrations 2 µg/L et 5 µg/L et celle obtenues sous l'effet de l'insuline à la concentration 2,5 UI.....	84
Graphe 8: Variation des taux moyens de la glycémie en fonction du temps après gavage.....	92
Graphe 9: Variation des taux moyens du cholestérol chez les différents groupes de rats en fonction du temps.....	94
Graphe 10: Variation des taux moyens d'ASAT chez les différents groupes de rats en fonction du temps	95
Graphe 11: Variation des taux moyens d'ALAT chez les différents groupes de rats en fonction du temps	96
Graphe 12: Variation des taux moyens d'urée chez les différents groupes de rats en fonction du temps	98
Graphe 13: Variation des taux moyens de triglycérides chez les différents groupes de rats en fonction du temps	99

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Tronc (A) et feuille (B) de <i>Khaya senegalensis</i> (Meliaceae)	7
Photo 2: Ecorce de <i>Khaya senegalensis</i>	50
Photo 3: Poudre de l'écorce de <i>Khaya senegalensis</i>	50
Photo 4: Extrait du <i>Khaya senegalensis</i>	50
Photo 5 : Rat wistar.....	52
Photo 6 : Rat disséqué	62
Photo 7 : Gavage des rats Wistar avec l'administration des extraits éthyliques de <i>Khaya senegalensis</i>	69

RESUME

Au Bénin en 2016, l’OMS évalue la prévalence du diabète à 5,1% aussi bien chez les hommes que les femmes. Ce taux est un des taux les plus élevés de la sous-région. Les traitements actuels du diabète sont efficaces dans la baisse de la glycémie, cependant le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas, ce qui conduit à long terme à l’émergence de complications très sérieuses. L’essor récent de la phytothérapie offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d’exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques.

Le présent travail a eu pour objectif de montrer l’effet des extraits de *Khaya senegalensis* sur la libération hépatique du glucose ainsi que l’intérêt de la chronophysiologie dans l’amélioration des thérapeutiques du diabète par ces extraits.

Après un screening phytochimique de l’extrait, le flux du glucose hépatique a été évalué en fonction du temps, par spectrophotométrie, dans des fragments (de poids identiques) de foie de rat Wistar soumis respectivement aux concentrations de 0, 2, 5, 10 et 20µg/L de l’extrait. Un groupe contrôle a reçu de l’eau distillée en lieu et place de l’extrait de *Khaya senegalensis*. Des coupes histologiques du foie ont été réalisées après l’abattage des rats. Après incubation à 37 ° C dans un four, le niveau de glucose dans la solution a été mesurée par le spectrophotomètre, en utilisant la méthode GOD-PAP®, pour chaque concentration d'extraits aux instants T = 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes.

Le screening phytochimique a révélé la présence de composés polyphénoliques (abondants), de saponines, de dérivés anthracéniques et de stéroïdes dans l’extrait.

Les taux de glucose dans la solution ont varié en fonction du temps à partir d'une concentration des extraits à l'autre. Les écorces des extraits totaux de *Khaya senegalensis* avaient réduit la libération hépatique de glucose. Cet effet a été comparable à l'effet de la solution d'insuline 2,5 IU utilisé comme substance de référence dans cette expérimentation. Les extraits totaux des écorces de *Khaya senegalensis* peuvent avoir donc une action sur les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose intra hépatocytaire. En ce qui concerne la chronophysiologie, nos recherches ont permis de noter que l’augmentation de la glycémie chez les rats se produirait durant les périodes de forte activité alimentaire par contre la diminution se produirait durant les périodes de pause alimentaire. Ainsi pour baisser de manière significative la glycémie des rats il serait préférable d’administrer le *Khaya senegalensis* entre 10h et 18h et entre et 22h et 06h au moment où l’activité alimentaire des rats est la plus élevée. Par ailleurs il a été révélé qu’une seule administration matinale de *Khaya senegalensis* suffirait à maintenir basse la glycémie durant toute la journée et que c’est à partir de 5mg de *Khaya senegalensis* que la baisse de la glycémie pourrait être observée. Le rat Wistar est le mammifère d’expérimentation le plus utilisé dans les laboratoires de recherche. L’alimentation des rats dans le laboratoire est faite à partir d’un mélange de céréales telles que : maïs, issues de céréales, tourteaux (soja-palmiste) prémélangés, acides aminés, globel toxin bind, calcaire, phosphate bicalcique, et son de riz.

Mots clés : *Khaya senegalensis*, rat Wistar, glycémie, chronophysiologie

ABSTRACT

In Benin in 2016, WHO is assessing the prevalence of diabetes at 5.1% for both men and women. This rate is one of the highest rates in the subregion. Current diabetes treatments are effective in lowering glycaemia, however adequate daily glycaemia control is very difficult to achieve in most cases, which in the long term leads to the emergence of very serious complications. The recent rise of phytotherapy offers an opportunity to find natural molecules capable of exerting beneficial effects on the regulation of carbohydrate metabolism while avoiding the side effects of synthetic substances.

The aim of this work was to show the effect of the extracts of *Khaya senegalensis* on the hepatic release of glucose as well as the interest of chronophysiology in the improvement of the therapeutics of diabetes by these extracts.

After phytochemical screening of the extract, the hepatic glucose flux has been evaluated by spectrophotometric with time in fragments (of identical weights) of Wistar rat liver subjected to concentrations of 0, 2, 5, 10 And 20 $\mu\text{g} / \text{L}$ of the extract. One control group received distilled water instead of *Khaya senegalensis* extract. Histological sections of the liver were performed after the slaughter of the rats. After incubation at 37 ° C in an oven, the glucose level in the solution has been measured by the spectrophotometer using the GOD-PAP® method for each concentration of extracts at times T = 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes.

Phytochemical screening revealed the presence of polyphenolic compounds (abundant), saponins, anthracene derivatives and steroids in the extract.

The glucose levels in the solution varied with time from one concentration of the extracts to the other. The bark of *Khaya senegalensis* total extracts had reduced hepatic glucose release. This effect has been comparable to the effect of the 2.5 IU insulin solution used as a reference substance in this experiment. The total extracts of the *Khaya senegalensis* bark may thus have an effect on the enzymes involved in intrahepatocytic glucose metabolism. As far as chronophysiology is concerned, our research has made it possible to note that the increase in glycaemia in rats would occur during periods of high food activity. On the other hand, the decrease would occur during periods of food break. Thus, in order to significantly reduce the glycaemia in rats it would be preferable to administer the *Khaya senegalensis* between 10 am and 6 pm and between 10 pm and 6 am at the time when the food activity of the rats is the highest. Moreover, it was revealed that it is from 5 mg of *Khaya senegalensis* that the drop in glycaemia could be observed and this when the *Khaya senegalensis* is administered in periods of high food activity.

Key words: *Khaya senegalensis*, Wistar rat, glycaemia, chronophysiology

INTRODUCTION

Selon le premier rapport mondial sur le diabète de l'OMS, publié en Avril 2016 à l'occasion de la Journée mondiale de la Santé, 422 millions d'adultes vivent avec le diabète, principalement dans les pays en développement. Selon ce même rapport plus de 80% des décès par diabète se produisent dans les pays à faible revenu ou à revenu intermédiaire comme le Bénin. Le diabète pourrait devenir la septième cause de décès dans le monde d'ici 2030 [1].

Par ailleurs l'OMS évalue la prévalence du diabète au Bénin en 2016 à 5,1% aussi bien chez les hommes que les femmes. Ce taux est un des taux les plus élevés de la sous-région [2].

Les traitements actuels du diabète sont efficaces dans la baisse de la glycémie, cependant le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas, ce qui conduit à long terme à l'émergence de complications très sérieuses. L'essor récent de la phytothérapie offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques [3]. Prouver l'efficacité du *Khaya senegalensis* ; cette plante tropicale, dans la baisse de la glycémie comme l'on déjà fait certains auteurs [4] ; [5] ; [6] est l'un des objectifs de ce travail.

Concernant la chronobiologie il faut noter que c'est la science de l'organisation rythmique des êtres vivants. Interprété comme une adaptation du vivant au changement régulier de son biotope, le rythme en biologie doit être compris comme une anticipation à l'imminence d'un événement prévisible et régulier. C'est par la sélection progressive des formes de vie les plus adaptées à leur environnement que la phylogenèse a progressivement inscrit la fonction

rythmée dans les gènes et, parce qu'il devance les variations à venir, le rythme biologique est devenu le lien le plus efficace entre le vivant et son biotope [7].

La chronophysiologie est l'application des connaissances chronobiologiques au domaine de la physiologie. La chronophysiologie permet une vision dynamique de la compréhension du fonctionnement du corps humain. Elle tient compte des fluctuations naturelles du fonctionnement corporel, à l'échelle d'une journée, d'un mois ou d'une année. Nous aboutissons donc sur le second objectif du présent travail qui est de prouver que la maîtrise de la chronophysiologie pourrait être utile dans l'amélioration des thérapeutiques du diabète par les extraits des écorces de *Khaya senegalensis*.

OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE RECHERCHE

Objectifs

L'objectif de ce travail est **de montrer les effets des extraits totaux de *Khaya* sur la libération hépatique du glucose ainsi que l'intérêt de la chronophysiologie dans l'amélioration des thérapeutiques du diabète par les extraits de *Khaya senegalensis*.**

De manière plus spécifique l'étude vise à :

- Evaluer l'effet de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sur la libération hépatique du glucose ;
- Apprécier l'efficacité de *Khaya senegalensis* dans la baisse de la glycémie journalière suivant les heures d'administration sur 24H ;
- Apprécier l'action de *Khaya senegalensis* sur les autres paramètres biochimiques que sont (les triglycérides, le LDL, l'HDL et cholestérol) suivant 24H.

Hypothèses

- L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya.senegalensis* inhibe la libération du glucose hépatique ;
- L'extrait de *Khaya senegalensis* serait plus efficace pour baisser la glycémie journalière à une heure précise de la journée ;
- L'extrait de *Khaya senegalensis* agirait sur les paramètres biochimiques (les triglycérides, le LDL, l'HDL et cholestérol) de façon différente suivant le moment de sa prise.

CHAPITRE I : GENERALITES

1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Etat des connaissances sur *Khaya senegalensis*

Khaya senegalensis (*Meliaceae*), une plante tropicale, est très largement utilisée pour des vertus thérapeutiques et de nombreux travaux scientifiques ont mis en évidence l'activité biologique de ces extraits.

1.1.1. Description botanique et distribution de *Khaya senegalensis*

➤ Taxonomie

Le genre de *Khaya* A. Juss. appartient à la famille des *Meliaceae*. Ce genre est constitué de cinq espèces bien connues :

- *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss,
- *Khaya grandifoliola* C. DC,
- *Khaya ivorensis* A. chev,
- *Khaya anthotheca* (Wlw) C. DC et
- *Khaya nyassica*.

En dehors de ces 5 espèces, il faut ajouter une autre *Khaya* *madagascarensis* dont le statut demeure incertain jusqu'à présent [8,9].

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

➤ Description de l'espèce

a- Morphologie

Le *Khaya senegalensis* est un grand arbre de 25 à 30 mètres de haut pouvant dépasser deux mètres de diamètre. Sur sol profond et humide, il présente un fût sans branche jusqu'à plus de 10 mètres surmonté par une cime très développée. Sur sol moins profond et sec, c'est un arbre moyen (15-20m de haut) assez bas branchu avec de très grosses dimensions en diamètre.

Son écorce est grise foncée, écailleuse, à tranche rouge, exsudant un peu de liquide rougeâtre à l'entaille voire Photo 1 [9].

b- Caractéristiques botaniques

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 (voir Photo 1).

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.



Cliché de : EncyclopédieWikipédia

Photo 1:Tronc (A) et feuille (B) de *Khaya senegalensis* (Meliaceae)

c- Noms de *Khaya* en Afrique

Tableau I: Nom local de *Khaya senegalensis* en Afrique [10]

Pays	Nom local	Langue
Sénégal	Hay	Wolof
Niger	Madotchi Farrey	Haoussa Djerma
Bénin	Zouzatin Aganwo	Fon Yoruba
Nigéria	Aganwo Madaci Ono	Yoruba Haoussa Igbo
Burkina Faso	Kuka	Mossi
Cameroun	Jola	Bambara
Togo	Mawogen	Ewe

➤ **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 [11].

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 [12].

➤ **Phénologie**

Le caïlcédrat est une espèce sempervirente qui montre une feuillaison quasi permanente. On observe une chute des feuilles en saison sèche mais elles sont renouvelées au fur et à mesure.

La floraison a lieu de février à mai en zone sud-soudanienne et de mars à mai en zone Nord-soudanienne [11]. A Ouagadougou, la floraison a lieu principalement de Novembre à Décembre [8]. La maturation des graines dure presque une année. La dissémination des graines a lieu de février à avril. La floraison peut être bisannuelle en Côte d'Ivoire [9] : la floraison principale allant d'août à décembre. Et la fructification correspondante, de Janvier à Avril ; puis la deuxième fructification, de Juillet à Septembre.

Au Bénin la fructification a lieu de Décembre à Février et peut s'étendre jusqu'en Mars.

➤ **Pépinière**

Les graines de *Khaya senegalensis* (5000 à 7000/ kg) peuvent se conserver pendant environ six mois à la température ambiante et environ huit mois en

chambre froide à 4°C. Elles ont un pouvoir germinatif assez élevé (de 90 à 95%) qu'elles perdent aussi rapidement.

Avant semis un décortilage complet de la capsule ligneuse est conseillé. Le trempage dans l'eau (20 - 30°C) pendant 24h est nécessaire pour une bonne germination. Les essais réalisés au Bénin [13] ont montré que le trempage à l'eau pendant 48h des graines de *Khaya senegalensis* augmente le taux de germination (96%). Il est déconseillé d'extraire les graines de leur enveloppe avant la mise en germination pour éviter les cas de pourriture.

Les graines sont semées en sachet de polyéthylène ou sur planche en ligne avec un écartement de 7 à 10 cm sur ligne et 20 à 25 cm entre ligne, sous légère ombre pendant la période pré-germinative. La pépinière ne doit pas être sous ombre pendant toute une journée [9].

1.1.2. Description phytochimique de *Khaya senegalensis*

Les travaux qui ont porté sur la phytochimie de l'écorce de *Khaya senegalensis* révèlent d'une part la présence d'une forte quantité de composés polyphénoliques (les tannins catéchiques, les anthocyanes et les leucoanthocyanes) ; des saponines ; moins de dérivés anthracéniques et très peu de stéroïdes [10].

D'autre part, Lompo (1993) [14] a révélé dans ses études sur le screening du tronc de *K. senegalensis*, la présence d'acides gras, de caroténoïdes, de coumarines, de composés réducteurs, de flavonoïdes, de carbohydrates, de saponines, de tannins, de composés anthracéniques, de stéroïdes, de glycosides, d'anthocyanes, de stérols et de triterpènes. D'autres travaux révèlent l'existence d'alcaloïdes dans l'écorce et les feuilles, mais plusieurs auteurs signalent aussi la présence des limonoïdes dans les fruits, les feuilles et les écorces. Ces limonoïdes de types phragmalines pour la plupart ont pour noms : les

Khayanolides A, B et D ; le *Khayalactol*, le 1-O-acetyl*Khayanolide* A, le 2-hydroxyseneganolide, le methylangolensate. **Caventou (1869)** [15] isole du macérat de l'écorce de *Khaya senegalensis* la caïlcédrine.

➤ **Pharmacologie**

Divers essais d'applications thérapeutiques ont été tentés au cours de la deuxième moitié du siècle dernier. **DUVEAU** [16], cité par **Kerharo (1974)** [20], dans sa thèse soutenue en 1856 signale que la poudre d'écorce a été utilisée dans le pansement des ulcères atoniques. **Kerharo (1974)**, médecin fait des essais à l'hôpital de Gorée sur l'extrait mou de caïlcédrat employé, à la dose de 1 à 3 g par jour, contre les fièvres intermittentes. Il obtient de bons résultats. Il administre également contre les diarrhées, la dysenterie chronique ; il préconise le vin de quinquina, la poudre de caïlcédrat contre les stomatites et les ulcères. A Paris, à l'Hôtel-Dieu il essaie sur trois fébriles l'extrait mou de caïlcédrat à la dose de 1.25g par jour et obtient de bons résultats.

Malcom et Coll. (1969) Cités par **Kerharo** [20] ont détecté une certaine action antibiotique des extraits aqueux de tige vis-à-vis de *Sarcina* et *Staphylococcus aureus*.

Pares et Coll. (1979) [17] pratiquent des antibiogrammes positifs avec des extraits alcooliques d'écorces de tronc sur la Mycobactérie nouvelle dont les caractères et le comportement donnent à penser qu'il s'agit du *Mycobacterium leprae*.

Selon **Kerharo** [20], les essais du caïlcédrat brut (principe amer) ont montré que les solutions étaient assez toxiques pour les paramécies qui sont tuées en 20 minutes à la dose de 1/10000. Injecté par voie intraveineuse, le caïlcédrat n'est pas toxique pour le chien (chez lequel, il ne produit qu'une légère hypotension), ni pour le cobaye. Injecté chez le cobaye par voie sous cutanée ou intrapéritonéale à la dose de 50 mg/kg, il a une action hypothermisante

particulièrement nette chez l'animal mis en état d'hyperthermie expérimentale ; l'abaissement de la température pouvant atteindre 2 à 3° par rapport au témoin.

Il serait alors étonnant que la réputation extraordinaire de cette drogue en médecine traditionnelle sénégalaise ne soit pas fondée.

La mise en évidence de son action hypothermisante justifie déjà dans une certaine mesure son emploi comme fébrifuge. Il a été révélé aussi que l'extrait hydro-alcoolique des écorces de tronc à raison de 2g/kg provoque une dépression, une sédation et réduit l'activité locomotrice chez la souris. Il protège 70% des souris contre les convulsions induites par le leptazol. **Njoku et Coll (1988)** [18] indiquent que les extraits de graines, d'écorces et de racines étaient toxiques pour les trypanosomes (*Trypanosomagambiense*), les Plasmodies et encore plus toxiques pour la filaire de l'onchocercose. **Olayinka et Coll. (1994)** [19] montrent que l'extrait méthanolique à 1 mg/kg chez le rat anesthésié à l'urethane provoque une élévation de pression artérielle qui passe de 122 ± 3 mm Hg chez le lot contrôle à $145 \pm$ mm Hg chez le lot testé. Les auteurs indiquent que cette action hypertensive est en partie due à la stimulation des trois récepteurs et des alpha-adréno-récepteurs.

En 1993 les travaux de **Lompo (1993)** [14] mettent en évidence l'activité anti inflammatoire de l'extrait aqueux sur l'œdème à la carragenine de la patte de rat, tandis que **Tidjani (1993)** [21] met en évidence le même effet avec un extrait hydro-alcoolique et une inhibition de l'œdème de l'oreille de souris induit par l'huile de croton.

Olayinka [19] met en évidence la double action (contracturante et relaxante) de l'extrait méthanolique sur le muscle lisse de la vessie du rat en fonction des doses administrées : (relaxation dose dépendante aux doses faibles ; contraction dose dépendante aux fortes doses). La relaxation serait due à la fois à la stimulation des récepteurs adrénergiques et à une action directe dépressive

sur la vessie. La contraction serait levée par la quinacrine et due à la stimulation des récepteurs purinergiques. En 1995, les travaux de **Lompo (1995)** [22] démontrent une activité antispasmodique et spasmolytique des extraits aqueux de poudre d'écorces sur des contractions intestinales de rat provoquées par l'acétylcholine et le chlorure de baryum. Ils confirment par ailleurs l'effet hypothermisant annoncé par **Kerharo** [20] qui pourrait être un corollaire des manifestations de la toxicité aiguë de la plante.

Selon **Kolawole** [23] les extraits aqueux de l'écorce de *Khaya senegalensis* présentent une activité antihyperglycémiant empêchant ainsi la montée de la glycémie dans le sang. Aussi le traitement avec l'extrait aqueux de *Khaya senegalensis* révèle d'une part une activité hépatoprotectrice contre les dommages liés au foie [24] et d'autre part une forte activité antioxydante [25]. De même, l'extrait aqueux de l'écorce du tronc de cette plante a révélé des effets anti-inflammatoires et les feuilles ont montré des propriétés anti-diarrhéiques. Plusieurs études ont également révélé ses propriétés antihelminthiques contre certains parasites [26] et son efficacité dans le traitement des infections à Trypanosomiase [27] en particulier *Trypanosoma evansi* [28]. Outre ces infections parasitaires, l'extrait méthanolique de *Khaya senegalensis* intervient aussi dans le traitement des infections bactériennes [29] et du cancer [30].

Les travaux de **Lompo** [22] ont montré une activité antispasmodique spasmolytique des extraits aqueux de poudre d'écorces sur des contractions intestinales de rat provoquée par l'acétylcholine et le chlorure de baryum. L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux des différentes parties de cette plante a montré une meilleure activité pour les écorces du tronc suivi des feuilles, des graines et des coques en ce qui concerne les extraits aqueux. Pour cette propriété de la plante, les écorces du tronc sont préférables aux autres parties. De même, les extraits hydroéthanoliques sont aussi doués d'activité antioxydante importante. Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que la

combinaison de l'extrait éthanolique de *Khaya senegalensis* et de piroxicam a un effet bénéfique sur la protection gastrique. Ce résultat suggère l'impact de ces extraits dans la synthèse de prostaglandine.

Tableau II: Mode d'action de quelques molécules bioactives [14] .

Composés	Modes d'action
Alcaloïdes	Inhibent l'activité de l'alpha glucosidase et ralentissent le transport du glucose à travers l'épithélium intestinal.
Les dérivés de l'imidazol	Stimulent la sécrétion de l'insuline glucose dépendant.
Polysaccharides	Stimulent la sécrétion de l'insuline par les îlots de cellules pancréatiques, réduit le taux de glucose plasmatique et améliore la tolérance glucidique.
Flavonoïdes	Baissent le taux de glycémie, réduit le taux de cholestérol plasmatique active l'activité de la glucokinase et probablement stimule la sécrétion de l'insuline par les îlots de cellules pancréatiques.
Les fibres diététiques	Retardent la diffusion du glucose et inhibent l'activité de l'alpha amylase et est peut-être responsable de la baisse de la glycémie postprandiale.
Saponine, (Triterpènes + stéroïdes, glycosides)	Stimulation de la libération de l'insuline et blocage de l'élévation du taux du glucose dans le sang.
Acide férulique	Stimulation de la sécrétion de l'insuline.

1.1.3. Rapports sur l'efficacité thérapeutique de *Khaya senegalensis*

Divers extraits de feuilles, d'écorces ou de graines de *Khaya senegalensis* ont été éprouvés dans des tests d'efficacité. Le tableau III donne une synthèse des usages thérapeutiques ainsi que des confirmations d'efficacité.

Tableau III: Efficacité thérapeutique d'extraits de *Khaya senegalensis*

Indications thérapeutiques	Substances médicamenteuses	Rapports d'efficacité	Références
Diarrhée	Extraits aqueux et méthanoïques de feuilles	Ralentissement du transit intestinal = propriété anti diarrhéique	Nwosu et al. (2012)
Infections bactériennes	Extraits aqueux de feuilles	Potentiel antioxydant et antibactérien contre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus cereus</i>	Konaté et al. (2011)
Cancer colorectal	Extraits d'écorce	Effet antiprolifératif, anti-inflammatoire et pro-apoptotique sur les cellules HT-29, HCT-15 et HCA-7.	Androulakis et al. (2006)
Helminthiases	Extraits d'écorce	Efficacité de modérée à forte contre les genres <i>Haemonchus</i> , <i>Cooperia</i> , <i>Oesophagostomum</i> et <i>Trichostrongylus</i>	Chiezey et al. (2000) ; Okpara et al. (2004)

Trypanosomose	Extraits d'écorce	Réduction significative de la parasitémie avec 60 – 100 mg.kg ⁻¹ de poids vif en 6 jours en infection expérimentale par <i>Trypanosoma brucei</i> sur des rats	Ibrahim et al. (2008)
Diabète	Extraits de feuilles	Activité anti - <i>Trypanosoma evansi</i> mais persistance de l'anémie	Umar et al. (2010)
		Inhibition de 45 – 75% de l'activité de α -amylase	Funke et Melzig (2006)

1.1.4. Effets biochimiques des extraits de *Khaya senegalensis*

Des études effectuées à divers horizons ont montré que les extraits d'organes de *Khaya senegalensis* induisent des variations significatives des paramètres biochimiques et sanguins. **Ayo et al.** (2007) [31], après une étude physicochimique réalisée signalent que l'huile extraite des graines de cette plante est riche en substances bioactives susceptibles d'induire des effets prophylactiques et thérapeutiques.

Selon **Kolawolé [23]**. L'extrait aqueux de l'écorce de *Khaya senegalensis*, aux doses de 100 et 200 mg.kg⁻¹ de poids vifs 18 jours durant, provoque une élévation du taux plasmatique des enzymes hépatiques en l'occurrence, l'Aspartate Amino-Transférase (AST), l'Alanine Amino-Transférase (ALT) et de l'Alcaline Amino-Phosphatase (ALP). Le même effet a été enregistré par **Abubakar et al. (2010) [32]**, avec de bien plus faibles dosages (10–40 mg.kg⁻¹ de poids vifs) administrés pendant 28 jours.

Yakubu et al. (2009) [39], ont rapporté que l'administration quotidienne de l'extrait éthanoïque de l'écorce de *Khaya senegalensis*, à la dose de 2 mg.kg-1 de poids vifs pendant 18 jours, entraîne chez le rat une augmentation de la concentration et de l'activité des enzymes hépatiques (ALP, AST et ALT). Les auteurs ont alors conclu à un effet cytolytique de l'extrait sur le foie.

Cependant, des effets bloqueurs de l'activité de l'Alcaline Amino-Transférase sont révélés par l'administration prolongée d'une dose de 2mg.kg-1 de poids vif de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* [39]. **Ali et al. (2011) [40]** ont aussi rapporté une nette diminution de l'activité des enzymes hépatiques (AST, ALT et ASP) chez des rats albinos traités aux doses de 250 mg.kg-1 et 500 mg.kg-1 de poids vifs pendant 5 jours.

Une augmentation dose-dépendante des taux sanguins de protéines totales, de l'urée, de la globuline et de la créatinine a été rapportée chez le rat [23]. Les dits effets se seraient significativement révélés aux doses de 100 et 200 mg.kg-1 de poids vif administrées pendant 18 jours. Mais **Ali et al. [40]** ont signalé, pour des doses plus élevées (250 mg.kg-1 et 500mg.kg-1 de poids vif) et pour une plus courte durée de traitement (5 jours) une réduction des concentrations des mêmes paramètres. Cette divergence entre les deux résultats laisse présager de ce qu'un long traitement aux extraits a des effets inverse des effets biochimiques des extraits de *Khaya senegalensis* et sur l'intégrité histologique du foie, des reins, du cœur.

Les extraits de cette plante auraient également une action élévatrice de la concentration sérique des ions sodium et potassium [23] ; [33].

1.1.5. Effets tissulaires ou organiques des extraits de *Khaya senegalensis*

La réduction du taux sérique de l'Asparate Transaminase (AST), de l'Alanine Transaminase (ALT) et de l'Alcaline Phosphatase (ALP) correspond à des effets hépato protecteurs des extraits de *Khaya senegalensis*. Cette

potentialité a été mise en évidence par **Ibrahim et al.** [27] qui ont enregistré une baisse du taux de transaminases chez des rats infectés expérimentalement par *Trypanosoma brucei*, parasite réputé pour être un grand destructeur du parenchyme hépatique [28] puis traités avec de l'extrait aqueux. **Sule et al.** [24] ont évalué cet effet hépato protecteur d'un extrait aqueux d'écorces de *Khaya senegalensis* administré à des rats dont le foie a été soumis à l'effet toxique du tétrachlorure de carbone (CCl₄). Ces auteurs ont observé qu'avec une dose de 80 mg par kg de poids vif pendant 6 jours le poison a pu induire ces effets toxiques. L'effet protecteur de l'extrait est ainsi mis en exergue par cette étude.

L'élévation de la globuline sanguine traduit quant à elle que l'extrait possède une action renforçatrice du système immunitaire [41].

D'après **Sabllassou et al.** [42], l'extrait éthanolique des feuilles sèches de *Khaya senegalensis* a des effets antispasmodiques et spasmolytiques sur l'iléon du cobaye. Ces auteurs ont indiqué qu'à la dose de 1mg.ml⁻¹, l'extrait fait chuter de 100% le plateau de la contracture induite par l'acétylcholine à 0,1p.g.ml⁻¹.

Même un enrichissement du milieu en calcium ne permet pas un retour des contractions. Cet extrait végétal agirait comme un bloqueur de canal calcique relaxant du muscle lisse iléal du cobaye. Ceci s'accorde avec le débrayage de la motricité gastro-intestinale obtenu par **Nwosu** [38] sur des rats traités aux doses de 100-300 mg.kg⁻¹ de poids vif.

1.1.6. Risques toxicologiques

Khaya senegalensis présente un risque de toxicité élevé sur le foie et les reins dans le cas où elle est administrée de façon chronique pendant plusieurs semaines [10]. Les études qui ont porté sur l'effet de l'extrait aqueux de l'écorce de *Khaya senegalensis* sur les paramètres biochimiques, hématologiques et histopathologiques en utilisant des rats, montrent qu'une administration répétée de l'extrait entraîne l'augmentation des globulines, de l'urée, de la créatinine et des électrolytes (Na⁺, K⁺). Cela produit aussi dans un premier temps, une

élévation de l'activité des enzymes hépatiques à savoir : l'Aspartate Amino-Transférase (ASAT), l'Alanine Amino-Transférase (ALAT) et l'ALkaline Phosphatase (ALP) et dans un second temps, à la même dose, une diminution significative des taux de globules rouges et d'hémoglobines [23]. Les études histologiques sur le foie ont révélé une dégénérescence des cellules et une nécrose cellulaire. Un traitement chronique et prolongé de l'extrait aqueux de l'écorce de *Khaya senegalensis* entraîne des dysfonctionnements au niveau des organes vitaux comme le foie, les reins et le cœur [23].

Nwosu et al. [38] ont montré que la DL50 de l'extrait aqueux des feuilles de *Khaya senegalensis* est supérieure à 3000 mg/kg de poids corporel pour le rat Wistar et celle de l'écorce de tronc est supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel dans le cas d'une toxicité subchronique.

2. GENERALITES SUR LE RAT WISTAR

2.1. Origine et description du rat Wistar

Après la souris de laboratoire, le rat est le mammifère d'expérimentation le plus utilisé et compte pour à peu près 20 % du nombre total de mammifères utilisés dans la recherche. Le rat est connu pour son intelligence. Il est capable de modifier son comportement pour échapper aux pièges et trouver de la nourriture. C'est donc un candidat idéal aux tests de comportement. De même, le rat est un petit animal résistant bien aux opérations, extrêmement prolifique, entre autres. Ces qualités-ci sont appréciées des chercheurs. Très étudié, on dit que c'est un organisme modèle. Il existe de nombreuses souches dont les Wistar, ayant des caractéristiques et des comportements propres [34]. En effet, de nombreuses lignées utilisées aujourd'hui proviennent de cette souche albinos « Wistar » créée par croisements consanguins à partir de l'espèce *Rattus norvegicus* dans le Wistar Institute en 1906 pour une utilisation en recherche biomédicale. Cette souche de rats a été développée pour produire un organisme

modèle à un moment où les laboratoires utilisaient principalement la souris de laboratoire (*Mus musculus*). Plus de la moitié de toutes les souches actuelles de rats de laboratoire descendent d'une colonie initiale établie par le physiologiste Henry Donaldson, le scientifique et administrateur Milton J. Greenman, et la généticienne/embryologiste Helen Dean King. Ce rat est caractérisé par une tête large, de longues oreilles, et ayant une longueur de queue toujours inférieure à celle du corps. Il est plus actif que le Sprague Dawley. C'est à partir de cette lignée qu'ont notamment été développées les souches de rats Sprague Dawley et Long-Evans ou encore le rat spontanément hypertendu et rat Lewis, mais il en existe bien d'autres [36].

Le rat a réalisé de nombreuses expériences permettant de faire avancer la recherche médicale. Une équipe internationale de chercheurs a mis en évidence la capacité du rat à distinguer les causes des effets, ce qui est une découverte majeure car auparavant on pensait que seul l'homme était capable de « raisonnement causal ».

Un rat mange l'équivalent de 8 à 10 % de son poids par jour, ce qui n'est pas très important. Il se nourrit principalement de grains : mais son caractère omnivore opportuniste ne lui fera pas dédaigner les croquettes du chat ou du chien, les fruits et légumes [34].

Selon une étude menée par les Laboratoires Harlan, son alimentation doit respecter les taux de 14 % de protéines et 4 % de lipides, pour un rat adulte en bonne santé. La dose quotidienne, donnée à heure fixe, est de 20 grammes environ de nourriture par jour par rat, ceci variant évidemment selon la taille, l'âge et l'activité du rat [34].

2.2. Paramètres physiologiques du rat Wistar

Il existe, à ce propos, de nombreuses variations d'un auteur à l'autre. D'après HARKNESS (1994) [37], les données ci-dessous sont des valeurs

moyennes ; elles ne représentent pas un intervalle de valeurs pour un échantillon particulier.

- Le poids d'un adulte est de 450 à 520 grammes pour les mâles et de 250 à 300 grammes pour les femelles. Le poids d'un petit à la naissance est de 5 à 6 grammes ;

- La durée moyenne de vie varie de 2,5 à 3,5 ans. La durée de vie maximale décrite est de 56 mois soit un peu plus de 4 ans et demi ;

- La température rectale moyenne est comprise entre 35,9 et 37,5° C ;

- La fréquence respiratoire est comprise entre 70 et 115 inspirations par minute, la fréquence cardiaque entre 70 et 115 inspirations par minute, et la fréquence cardiaque entre 250 et 450 battements par minute ;

- Le nombre de chromosomes (diploïdes) est de 42.

➤ **Alimentation et physiologie digestive**

Le rat est omnivore. Pour 100 grammes de poids vif, il consomme environ 5 à 6 grammes de nourriture et boit 10 ml d'eau par jour. En outre, il est caecotrophe c'est-à-dire qu'il ingère ses excréments afin de pouvoir digérer complètement la cellulose.

En laboratoire, l'alimentation est standardisée et on utilise des régimes complets commercialisés par les grands groupes d'alimentation animale. Ces régimes composés principalement d'une source de protéines, d'une source de glucide sous forme de saccharose ou d'amidon de maïs et enfin de minéraux et vitamines en plus faibles quantités

La formule dentaire est la même que pour les autres rongeurs soit : incisives 1/1, canines 0/0, prémolaires 0/0, molaires 3/3. Les incisives ont une croissance continue.

L'estomac est divisé en deux parties dont une seule est glandulaire. Le vomissement est impossible du fait de l'anatomie de l'abouchement de l'œsophage à l'estomac.

Le rat ne possède pas de vésicule biliaire. Le caecum est très développé et adapté à la digestion de la cellulose grâce à une microflore particulière. C'est un point important à souligner, car chez les souches indemnes de germes, le caecum peut parfois se dilater et tourner autour de son axe. Cette torsion est alors fatale [37].

➤ **Reproduction**

Les mâles et les femelles atteignent leur maturité sexuelle entre 65 et 110 jours [46] c'est-à-dire entre 2 et 4 mois environ, quand les mâles pèsent au moins 300 grammes et les femelles 250 grammes. La reproduction cesse vers 12-18 mois [35].

Le mode de reproduction peut être monogame. Dans ce cas, un mâle et une femelle sont élevés dans la même cage et on enlève chaque portée après le sevrage. Si on choisit un mode polygame, un mâle est élevé avec deux à six femelles, chaque femelle est séparée dans une cage individuelle juste avant la mise-bas [35].

Le cycle œstral de la femelle dure 4 à 5 jours et l'ovulation est spontanée. La durée de la gestation est de 21 à 23 jours mais peut être allongée de 3 à 7 jours si la femme allaite encore une portée précédente pendant la gestation. L'œstrus post-partum est fécond [35].

La femelle possède 6 paires de mamelles et le tissu mammaire est très développé. Il s'étend du cou jusqu'en région inguinale, ainsi que sur les flancs et sur le dos [35].

Les portées comprennent 6 à 12 petits environ car il existe des variations en fonction des souches et de l'âge des parents. Les petits naissent aveugles et sans poils dans le nid préparé par la mère. Ils sont sevrés à l'âge de 21 jours. La croissance est très longue, surtout chez le mâle pour qui les os ne sont complètement ossifiés que vers l'âge de 2 ans [35].

➤ **Autres particularités**

Le rat a une très mauvaise vue mais un odorat fortement développé. Il possède une glande lacrymale particulière, normée glande de Harder, qui sécrète des larmes riches en lipides et en porphyrines. En temps normal ces larmes lubrifient l'œil, mais en cas de stress important ou de pathologie aigue, elles s'écoulent par le canthus internes et par le nez, laissant apparaître des croûtes rouges qui ne sont pas du sang. Ce phénomène est appelé Chromodacryorrhée.

Parmi les autres spécificités, on peut citer la présence de masse de graisse brune, située entre les épaules et en région cervicale, qu'il ne faut pas confondre avec des glandes salivaires ou des ganglions. Leur rôle est métabolique et thermorégulateur [35].

2.3. Paramètres biochimiques

Les normes biologiques varient d'une espèce animale à une autre. Le tableau IV fait un récapitulatif des valeurs normales de paramètres biochimiques sanguins chez le rat Wistar.

Tableau IV: Normes biologiques chez le rat Wistar [35]

Paramètres biochimiques	Valeurs normales
Glucose	4,3 – 8,6 mmol/L
Urée	1,6 – 4,7 mmol/L
Créatinine	44 – 230 µmol/L
Bilirubine totale	0 – 12,5 µmol/L
Bilirubine conjuguée	- µmol/L
Acides uriques	58 – 250 µmol/L
Lipides totaux	- g/L
Cholestérol total	0,3 – 2 mmol/L
Cholestérol estérifié	- mmol/L
Triglycérides	0,2 – 0,6 mmol/L
Phospholipides	-- mmol/L
Acides gras libres	-- mmol/L
Protéines totales	-- g/L
Albumines	-- g/L
Alpha-1 globulines	-- g/L
Alpha-2 globulines	-- g/L
Beta-globulines	-- g/L
Gamma-globulines	-- g/L
Sodium	138 – 155 mmol/L
Potassium	3,7 – 6,8 mmol/L
Chlore plasmatique	92 – 112 mmol/L
Chlore globulaire	-- mmol/L
Bicarbonates	16 – 32 mmol/L
Phosphates	0,7 – 2,3 mmol/L
Calcium	1,5 – 3,4 mmol/L
Magnésium	0,8 – 2,2 mmol/L
A.S.A.T	16 – 98 UI/L
A.L.A.T	33 – 80 UI/L
Phosphatase alcaline	4 – 40 UI/L
Phosphatase acide	0,3 – 2,7 UI/L
C.K	0,2 – 2,5 UI/L
L.D.H	33 – 130 UI/L
S.D.H	-- UI/L
A.L.D	-- UI/L
G.G.T	-- UI/L
Lipase	-- UI/L

3. Les voies métaboliques, le rein, le foie et l'homéostasie du cholestérol

Les voies métaboliques ont comme finalité d'assurer qualitativement et quantitativement les besoins indispensables à la vie de l'organisme. Ces besoins sont de 4 ordres : ils permettent l'élaboration ou le renouvellement des structures micro ou macroscopiques ; Ils participent au maintien des grands équilibres qu'ils soient de l'ordre osmotique, ionique, etc. ; Ils sont nécessaires au bon fonctionnement de toutes grandes fonctions de l'organisme. D'une façon plus générale, ils sont nécessaires à la couverture des besoins énergétiques, laquelle provient du catabolisme des 3 principaux nutriments : glucides, protides, lipides.

En conditions physiologiques normales, les glucides couvrent 50 à 55 % des besoins, les lipides 25 à 30 % et les protides 12 à 15 %.

Ces trois nutriments et leurs utilisations ne sont pas cloisonnés : les voies métaboliques interagissent entre elles, sous la dépendance de régulateurs hormonaux eux-mêmes dépendants de facteurs internes (état de nutrition, période de la journée, etc.) et de facteurs externes (stress, température, activité physique).

Cette régulation intégrée est hiérarchisée, dans l'organisme, avec des niveaux grossiers jusqu'à des niveaux plus fins. (Notion de compartiments tissulaires et cellulaires).

3.1. Métabolisme des lipides et homéostasie du cholestérol

Au niveau des cinq compartiments (souvent les organes) impliqués dans le métabolisme des lipides, les régulations y seront différentes et plus ou moins fines.

➤ **Au niveau de l'intestin** : il se réalise l'entrée des nutriments (apport exogène par l'alimentation de lipides, protéines et glucides). Les macromolécules lipidiques sont dégradées puis absorbées sous forme de chylomicrons. Les lipides du chyme sont hydrolysés dans le duodénum par

les enzymes pancréatiques : lipase, phospholipase, cholestérol estérase. L'hydrolyse des lipides nécessite une émulsification en gouttelettes grâce aux sels biliaires.

Les sels biliaires sont indispensables à l'action de la lipase pancréatique ainsi qu'un cofacteur protéique, la colipase.

Les produits de la digestion des lipides sont des monoglycérides, des acides gras, du cholestérol et des lysophospholipides. Ces nutriments sont associés aux sels biliaires sous forme de micelles qui permettent leur absorption par la bordure « en brosse » des entérocytes (= cellules intestinales)

Dans les entérocytes, les lipides sont à nouveau synthétisés à partir du glycérophosphate pour les phospholipides (voie de KENNEDY) et à partir des monoglycérides pour les triglycérides (voie de CLARK et HUBSCHER). Le cholestérol est en partie estérifié dans les entérocytes et en partie réexcrété vers la lumière intestinale.

➤ **Au niveau du tissu adipeux** : les lipides alimentaires sont pour plus de 90% des triglycérides. Les quels sont à 75% captés et dégradés par le tissu adipeux. Le tissu adipeux met en réserve de l'énergie (besoins 24H/24)

➤ **Au niveau du foie** : les 25% restants des triglycérides vont dans le foie pour donner du glycérol et des acides gras libres par la TG lipase thermosensible (régulée par l'insuline, donc par la glycémie) Les acides gras libres sont ensuite stockés. Le foie fournit les lipides en fonction des niveaux de régulation fine (apport endogène). Les triglycérides formés ne seront pas stockés dans cet organe mais transformés en acides gras libres. Les acides gras libres donnent de l'énergie par la b-oxydation avec libération de CO₂, permettent la formation de corps cétoniques et la synthèse de cholestérol pour la formation des sels biliaires.

➤ **Au niveau du tissu extra hépatique** : le cholestérol peut s'associer aux triglycérides pour former les VLDL qui vont se diriger vers le tissu extra

hépatique (comme le tissu musculaire). Ce tissu consomme d'énergie. Les muscles tirent 60% de leur énergie à partir de lipides. Les VLDL transportent des triglycérides du foie vers le tissu extra hépatique ; les LDL (issues des VLDL) apportent le cholestérol. Les triglycérides sont donneurs de CO₂ via la β-oxydation.

➤ **Au niveau du sang** : les échanges entre les différents organes sont assurés.

3.1.1. Fonctions et origines du cholestérol

Le cholestérol a plusieurs fonctions :

- ✓ Précurseur des acides biliaires
- ✓ Précurseur des hormones stéroïdes
- ✓ Précurseur de la vitamine D₃
- ✓ Participe à la structure des membranes cellulaires.

Il est d'origine :

- Exogène : 100 à 500 mg par jour.
- Endogène : 700 à 900 mg par jour (à partir de l'acétate).

Environ 70% du cholestérol circule lié aux LDL.

La cholestérolémie dépend de la concentration plasmatique en LDL.

L'enzyme clé de la synthèse du cholestérol est l'HMG CoA réductase.

3.1.2. Lieux de synthèse du Cholestérol

Elle peut avoir lieu dans toutes les cellules de l'organisme mais seul l'intestin et le foie contribuent de façon importante au cholestérol circulant.

La synthèse du cholestérol est cytoplasmique. Tous les carbones du cholestérol proviennent de l'acétate qui provient lui-même de l'acétyl CoA du métabolisme glucidique.

3.1.3. Métabolisme du cholestérol

Le foie est le lieu exclusif de transformation du cholestérol en acides biliaires. Il est aussi un lieu important de synthèse de cholestérol.

L'intestin lui représente le lieu d'absorption du cholestérol alimentaire ou biliaire.

Au niveau hépatique : en période postprandiale le cholestérol est incorporé aux VLDL. Les VLDL sont sécrétées dans la circulation où elles subissent une dégradation rapide par les lipoprotéines lipases activées par les Apo CII présentes à la surface des VLDL. Les VLDL auxquels on a enlevé une partie de leur TG deviennent des IDL.

Les IDL seront métabolisés de deux façons :

- Une partie sera dégradée par le foie
- Une partie est transformée dans la circulation par la lipase hépatique en LDL.

Les LDL seront reconnus par l'ensemble des cellules de l'organisme via leur Apo B-100. Ils vont apporter le cholestérol aux cellules.

Au niveau intestinal : le cholestérol alimentaire ou biliaire est absorbé par les entérocytes qui vont l'incorporer aux chylomicrons. Ceux-ci via la lymphe se retrouvent dans la circulation subissent l'action de la LPL libèrent leur TG et deviennent des HDL ou des chylomicrons résiduels.

Au niveau hépatique 2 : les chylomicrons résiduels riches en cholestérol arrivent au foie (reconnue via leur Apo-E). C'est la voie d'arrivée au foie de cholestérol majoritaire. Le foie récupère aussi le cholestérol excédentaire des tissus périphériques (via les HDL). Le cholestérol sera alors soit remis en circulation soit excrété dans la bile directement ou après transformation en acides biliaires.

3.1.4. Régulation de la biosynthèse du cholestérol

L'HMG CoA réductase (hydroxyméthyl-glutaryl-CoA réductase) est l'enzyme qui régule la synthèse de cholestérol. Elle subit un rétrocontrôle négatif de la part du cholestérol.

➤ A court terme dans le foie :

L'HMG CoA réductase est inactive à l'état phosphorylé elle est activée par déphosphorylation sous l'action d'une réductase-phosphatase.

Ce système est sensible au glucagon et à l'insuline :

Le glucagon va diminuer l'activité de l'HMG-CoA réductase et donc la synthèse de cholestérol.

L'insuline va au contraire favoriser la synthèse de cholestérol.

A long terme dans les tissus périphériques :

Elle est due au rétrocontrôle négatif exercé par le cholestérol qui peut presque totalement inhiber l'HMG-CoA réductase en ne laissant qu'une faible activité pour la synthèse des dérivés isoprénoides qui sont indispensables au cycle cellulaire. Une augmentation du cholestérol entraîne une diminution des Rc LDL et donc une augmentation du temps de séjour de ceux-ci dans la circulation et la formation de plaques d'athérome.

➤ Apport du cholestérol :

Chez l'homme, la majorité du cholestérol de l'organisme est produit par synthèse (~700 mg/jour). Le reste est fourni par l'alimentation. Le foie synthétise ~10% du cholestérol total et l'intestin ~10%.

Cette synthèse se fait surtout dans la fraction microsomiale (RE) et cytosolique de la cellule.

Les cellules qui ont besoin de cholestérol pour leur métabolisme expriment à leur surface un récepteur capable de reconnaître les lipoprotéines porteuses d'Apo B (ou Apo E) riches en cholestérol [50].

Il s'agit des récepteurs Apo B/E. Ils ont été découverts par Goldstein et Brown en 1974 : PM= knb 160 kDa.

3.2. Le rein, le foie et l'homéostasie du glucose.

La régulation de la glycémie met en jeu le système hormonal, ainsi que plusieurs organes (pancréas, foie et rein principalement). Cette régulation fait partie des processus du maintien de l'homéostasie au sein de l'organisme.

➤ Rôle du pancréas et l'insulino-sécrétion

Bien que les apports de glucose soient très variables dans le temps, la glycémie reste toujours comprise entre 0.7 et 0.8 g/l. Cette régulation est assurée par les sécrétions endocrines du pancréas qui pénètrent dans le flot sanguin par la veine mésentérique.

Le pancréas est une glande double, à la fois exocrine et endocrine, située dans une anse du duodénum. La glande endocrine est représentée par de petits îlots cellulaires disséminés dans le parenchyme exocrine, les îlots de Langerhans, dont le diamètre varie de 100 à 300 µm et dont le total ne représente guère que 1% environ de la glande, soit un poids total de 1 à 2 g (Figure 1).

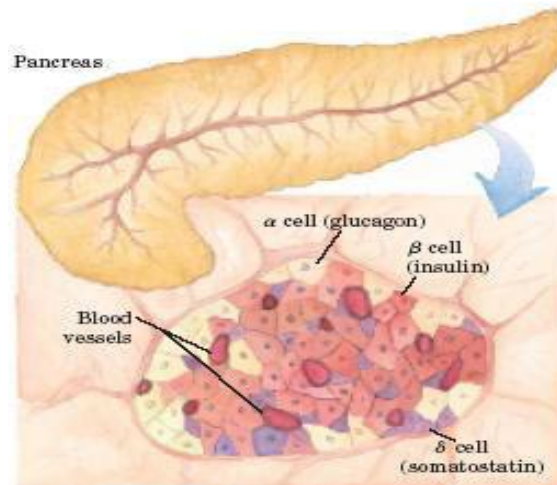


Figure 1: Les systèmes endocriniens du pancréas (Nelson et Cox, 2004)[43]

Les sécrétions de l'insuline rejoignent la circulation sanguine via le foie.

Le pancréas sécrète plusieurs hormones dont l'insuline et le glucagon [43]

L'insuline est une hormone peptidique synthétisée dans les glandulaires des îlots de Langerhans ou cellules Bêta. L'incapacité de ces cellules à produire suffisamment l'insuline, entraîne un diabète. Elle stimule l'absorption du glucose sanguin par les tissus dits insulino-dépendants (foie, muscles squelettiques et tissu adipeux) et son stockage sous forme de glycogène. De plus, elle inhibe les voies de production hépatique de glucose (néoglucogenèse et glycogénolyse). Elle intervient enfin dans la régulation du métabolisme lipidique en inhibant la lipolyse des triglycérides adipocytaires et en facilitant leur synthèse, ainsi que celle de protéines dans le foie et le tissu adipeux [44].

L'action de l'insuline est représentée sur la figure suivante :

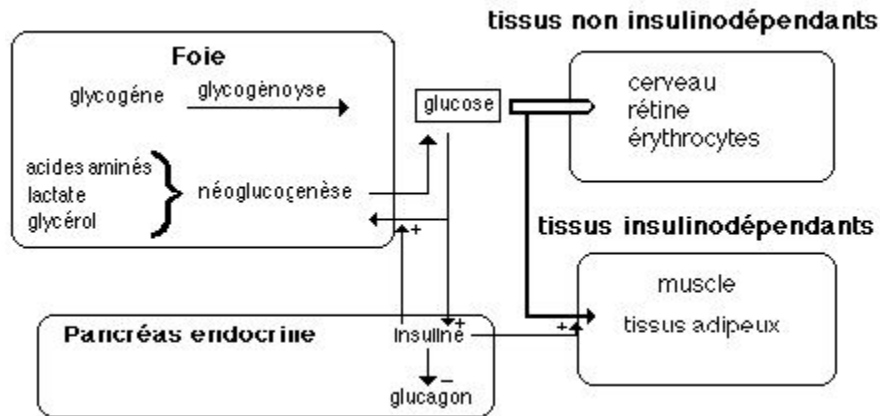


Figure 2: Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline [45]

Au niveau des cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans les cellules en augmentant la perméabilité de leur membrane via des récepteurs au glucose (exemple : les GLUT 4). Au niveau du foie, elle stimule la glycogénogenèse. En fait, l'insuline abaisse le taux de glucose dans le sang en activant son utilisation dans l'organisme ; au niveau de tous les tissus, le glucose étant le « carburant » de choix de l'organisme. A cet endroit, la molécule du glucose entre dans les cellules et est utilisée comme source énergétique (cœur, cerveau, peau, reins, muscle). Les mécanismes par lesquels l'insuline stimule ce processus dans les cellules musculaires et adipeuses sont indiqués dans la Figure 3.

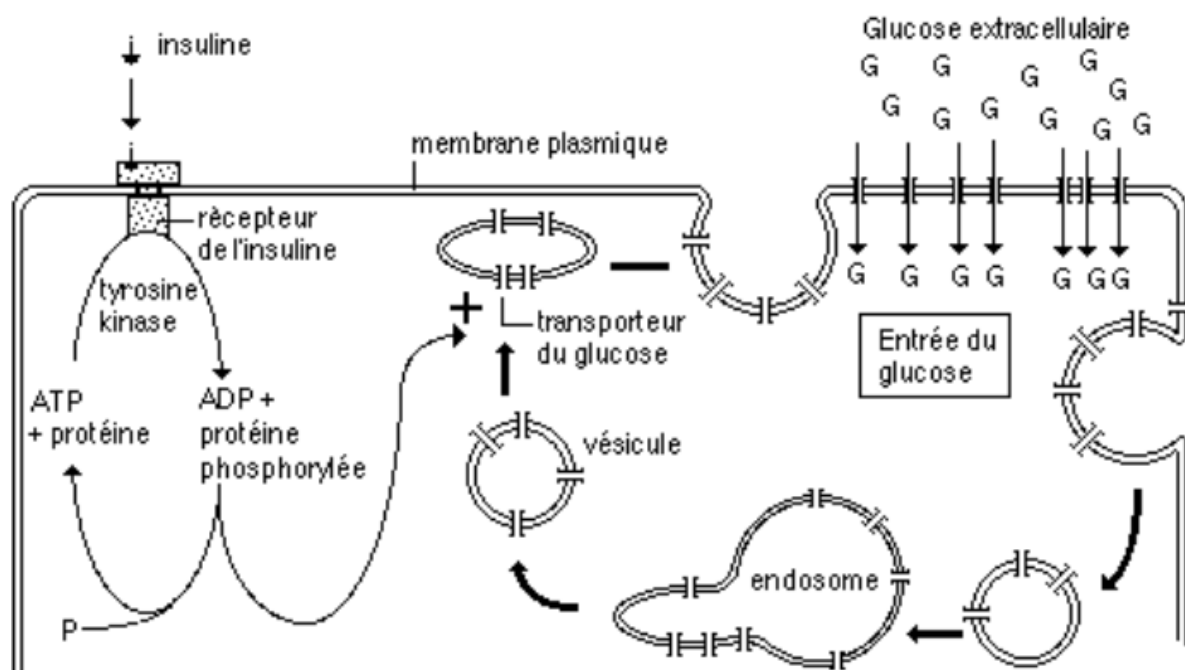


Figure 3: Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline (Kahn B.B., 1992)[46]

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'insuline stimule l'enrichissement de la membrane plasmique en transporteurs GLUT 4, où des vésicules contenant les transporteurs fusionnent avec la membrane [47].

Le glucagon : hormone peptidique synthétisée par les cellules α , qui est une hormone hyperglycémiant. C'est un facteur antagoniste de l'insuline. Cette hormone agit en stimulant la glycogénolyse hépatique.

➤ Rôle du foie

Les glucides appelés également sucres, ou hydrates de carbone, représentent le « carburant » principal de notre organisme. L'énergie qu'ils fournissent est en effet rapidement utilisable et, comme nous l'avons signalé, il doit fournir au moins 45 à 55% de calories quotidienne. Via la veine porte hépatique, le foie reçoit le glucose issu de l'alimentation. L'une de ses fonctions est de réguler la glycémie en synthétisant de glycogène ou des lipides (acides gras et glycérol) après un apport important (*repas copieux*), et de libérer du

glucose pendant des périodes de jeûne, afin que la glycémie reste constante et égale à sa valeur normale (entre 3.9 et 6.1 mmol/L ; soit entre 0.8 et 1 g/L). Pour ce faire, le foie régule la production et le stockage du glucose grâce à trois voies métaboliques :

- La glycogénogénèse qui est une voie de synthèse du glycogène qui permet le stockage du glucose dans le foie sous forme de glycogène;
- La glycogénolyse qui est une voie d'hydrolyse du glycogène [48] qui libère le glucose, sous forme de glucose-6-phosphate, par phosphorylation du glycogène: c'est ce qu'on appelle le déstockage;
- La néoglucogénèse qui est une voie de synthèse du glucose à partir d'éléments non glucosidiques tel que l'oxaloacétate. Elle produit du glucose ou, en dernier recours, d'acides aminés. Elle est déclenchée par une baisse de la glycémie en dessous de sa valeur normale associée à un, épuisement des réserves de glycogène et est nécessaire au bon fonctionnement du cerveau.

➤ **Rôle du rein**

Grâce à sa fonction néo glucoformatrice, le rein secrète une hormone : le cortisol, produit par la glande corticosurrénale dans le cas d'un stress émotionnel fort. Le cortisol active dans le foie les enzymes de la néoglucogénèse, permettant de produire du glucose qui sera libéré dans le sang, afin d'augmenter la glycémie. Au niveau du tissu adipeux, il va inhiber l'entrée de glucose et activer la lipolyse.

Par ailleurs, le rein favorise la production de glucose à partir de substances non glucidiques, des acides aminés et de l'oxydation des acides gras via la formation de corps cétoniques. Le rein peut sécréter du glucose si sa concentration circulante est très élevée (diabète sucré), ce qui ne se produit pas chez un sujet sain ; la glycosurie normale est nulle. Le glucose produit dans

l'urine primitive est réabsorbé activement vers le sang au niveau du tubule proximal, pour maintenir une glycémie constante.

4. La Chronobiologie [7]

4.1. La chronophysiologie et la notion de rythme biologique.

Les variations rythmiques, dans la nature, existent depuis la naissance du monde. Elles se déroulent dans le temps et se répètent à peu près identiques à elles-mêmes : exemple de l'alternance du jour et de la nuit, l'alternance des saisons et la rotation de la terre en 365 jours.

Ces variations temporelles touchent également l'espèce vivante et on les appelle des rythmes biologiques. Ces rythmes se retrouvent depuis l'être unicellulaire aux cellules les plus complexes tant dans leur organisation que dans leur fonctionnement.

➤ La chronophysiologie

La chronophysiologie est l'analyse de la physiologie humaine sous l'angle du temps. Elle permet d'identifier des fonctions métaboliques, neurologiques ou endocrines qui ne se déclenchent qu'à certaines heures chaque jour, pour préparer le corps à un événement prévisible.

➤ Le rythme biologique [52 ; 56]

Le rythme biologique est une variation physiologique reproductible donc prévisible dans le temps définis par sa périodicité. Celle-ci permet ainsi de décrire des rythmes quotidiens hebdomadaires, mensuels ou plus rarement annuels. Il en est ainsi du système endocrinien riche en fonctions chronomodulées : les glandes surrénales, par exemple, sécrètent du cortisol en quantité cinq fois supérieure le matin entre 6 et 8 h par rapport à la nuit (par l'hyperglycémie qu'elle provoque, cette hormone prépare le fonctionnement musculaire au réveil et évite les faiblesses qu'une nuit sans apport alimentaire aurait pu induire) ; la glande thyroïde sécrète le maximum de thyroxine le matin

vers 9 h (préparant le cerveau au stress de la journée) ; le pancréas sécrète de l'insuline de façon pulsatile en dehors de l'alimentation (assurant un stockage glucidique en adéquation avec l'activité physique) ; la glande pinéale ne sécrète de la mélatonine que la nuit (conditionnant l'endormissement) ; l'hypophyse sécrète deux fois plus d'hormones de croissance la nuit que le jour (assurant la croissance osseuse de l'enfant au repos et participant à la stabilisation glycémique nocturne) ; les ovaires ont une périodicité sécrétoire mensuelle en œstrogènes (régulant les périodes de fécondité féminine).

La chronophysiologie peut aussi décortiquer le processus complexe de la rythmicité du sommeil. Elle révèle que cette périodicité est liée à une commande automatique cérébrale située dans les neurones thermosensibles de l'hypothalamus, responsables de l'oscillation quotidienne de la température corporelle. C'est la chute de la température, après son maximum de 19 h, qui induit le sommeil, tandis que le réveil n'apparaît que lorsque le niveau thermique minimal (vers 4 h) est dépassé. Le réveil physiologique est provoqué par la remontée de la température centrale. Contrairement à ce qui est couramment pensé, ce n'est pas le sommeil qui influence la température mais l'inverse. Sur cette base, intervient l'obscurité qui stimule la sécrétion en mélatonine, facilitant la baisse de la température et la diminution de la vigilance: le sommeil apparaît environ une heure après le début de la sécrétion en mélatonine et le réveil a spontanément lieu trois heures après son pic plasmatique. En fait, cette fluctuation cyclique du sommeil est considérée comme la partie visible d'un rythme ultradien d'alerte dont la période est approximativement de trois heures. Il semble en effet qu'il existe physiologiquement, tout au long de la journée, une alternance entre des états de moindre vigilance et d'acuité performante. Ces phases, nettement visibles chez le nourrisson et le petit enfant, tendraient à être effacées par la pression sociale à l'âge adulte.

Les travaux consacrés aux rythmes scolaires de l'enfant révèlent ainsi l'existence de plages de moindre vigilance entre 8 h 30 et 9 h 30 puis entre 14 et 15 h, tandis qu'entre 9 h 30 et 11 h 30 puis entre 15 et 16 h 30, la disponibilité intellectuelle est maximale, les performances plus grandes et le niveau de vigilance accru [7].

Un rythme biologique peut être caractérisé par la quantification de quatre paramètres :

La période **T** (corrélée à la fréquence = $1/r$)

L'acrophase Θ

L'amplitude **A**

Le niveau moyen ou MESOR (Midling Estimating Statistic Of Rythm)

➤ **La période et la fréquence** [49] ; [52]

Afin d'estimer une période **T**, il faut faire des mesures temporelles pendant un temps suffisamment long et à des intervalles de temps assez courts. Graphiquement, la période correspond à l'intervalle de temps mesuré entre deux épisodes ou accidents qui vont se reproduire, identique à eux-mêmes, au cours de la variation c'est-à-dire un cycle complet d'une variation rythmée. Il peut exister plusieurs périodes pour une même fonction physiologique.


- Les rythmes ultradiens ou rythme de haute fréquence : $T < 20$ heures. Ils sont surtout observés chez les enfants.
- Les rythmes circadiens signifiant que leur période est égale ou proche de 24 h (du latin circa : environ, die : jour) ou rythmes de moyenne fréquence : $20 \text{ heures} < T \leq 28 \text{ heures}$. Ils sont observés chez les adultes.
- Les rythmes nycthémeraux (nuit + jour en grec) lorsque la période est égale à 24 h. Ce sont les rythmes les plus connues car ils sont étudiés à propos de très nombreuses fonctions et variables.

- Les rythmes infradiens ou rythmes de basse fréquence 't >28 heures se subdivisent en :

-  Rythmes circaseptidiens T = 7 jours

-  Rythmes circavigintidiens T = 20 jours

-  Rythmes circatrigintidiens T = 30 jours

-  Rythmes circamensuels T = 1 mois avec des jours qui varient entre 28 à 31 jours.

-  Rythmes circannuels T = 1 an

Il est intéressant et important de remarquer qu'une variable, comme le cortisol plasmatique ou la température corporelle, peut manifester sa rythmicité dans plusieurs périodes [57].

- **L'acrophase Θ** [49] ; [52]

Elle correspond à la localisation du sommet de la variation dans l'échelle du temps pour la période considérée (au contraire de la batyphase qui correspond au minimum du rythme). L'acrophase doit toujours être donnée par rapport à une phase de référence. Exemple pour un rythme dont la période est de 24 heures, la référence est soit une heure quelconque, en général minuit, soit le milieu du sommeil ou le milieu du temps d'obscurité.

- **L'amplitude A** [49] ; [52]

Elle correspond à la moitié de la variabilité totale, donc de la différence entre le pic et le creux de la variable étudiée.

- **Le MESOR M** [49] ; [52]

Il correspond à la moyenne des valeurs obtenues par unités de temps pour la période considérée [49].

Le milieu intérieur des animaux doit être constant pour assurer des conditions satisfaisantes aux diverses fonctions physiologiques. Et, suivant ce principe tout changement, toute perturbation devrait être rapidement corrigée par une contre- réaction, un rétrocontrôle (feed-back) ramenant l'organisme [49].

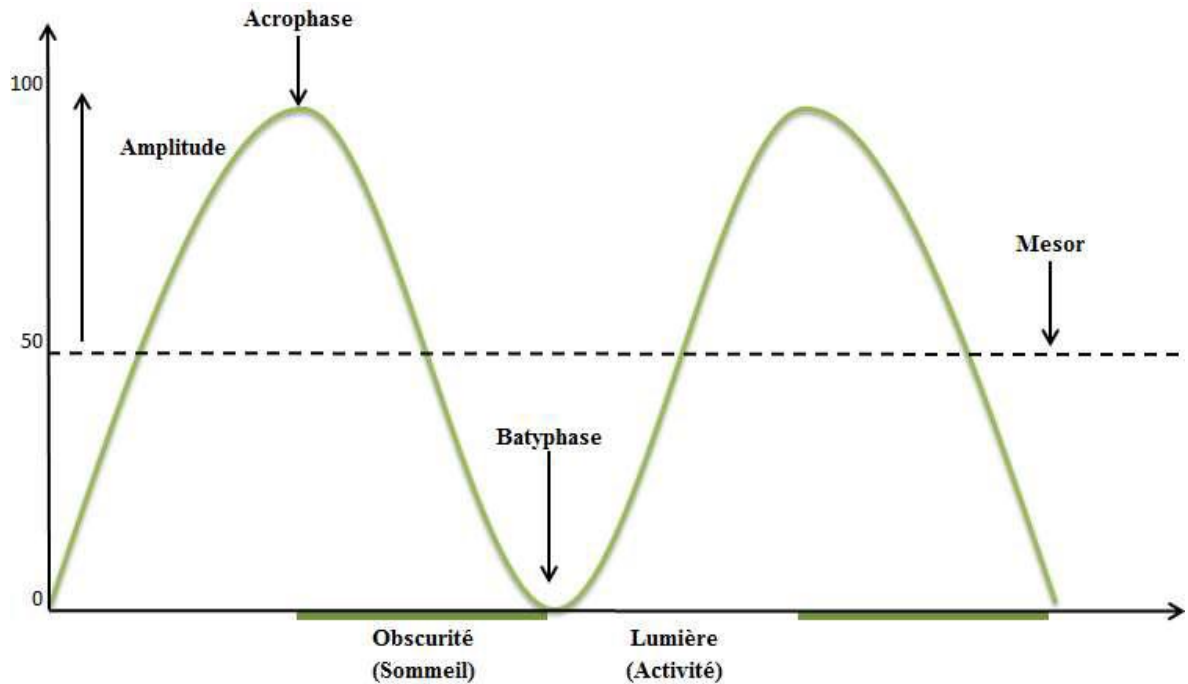


Figure 4: Illustration d'un rythme biologique hypothétique par une fonction sinusoïdale permettant de représenter de façon visuelle ses différents paramètres fondamentaux

(Source : adapté d'après [49 ; 52])

4.2. Horloge circadienne de fonctionnement de quelques organes vitaux selon la médecine chinoise.

➤ LES POUMONS (3 heures à 5 heures)

Les déchets toxiques de nos poumons se libèrent en principe entre 3 à 5 heures du matin. Voilà pourquoi on tousse parfois. Si nous toussons le matin, ceci peut signifier que notre régime alimentaire et notre mode de vie doivent être modifiés afin de réduire le mucus et la toxicité. Se sentir malade à ce moment peut aussi être une indication d'une douleur profonde qui doit être traitée.

➤ **LE GROS INTESTIN (5 heures à 7 heures)**

Pour commencer la journée du bon pied il est bon d'aller aux toilettes. Cette période est également idéale pour s'hydrater et la pire pour absorber de la caféine. La caféine est diurétique et emmène l'eau loin de notre côlon. Or, notre corps a besoin d'eau dans la matinée pour maintenir sa réparation et entretenir l'intestin.

➤ **L'ESTOMAC (7 heures à 9 heures)**

Dans cet intervalle du rythme biologique, le flux d'énergie se déplace vers l'estomac pour stimuler la faim. C'est le moment de manger le repas le plus copieux de la journée car le corps est au maximum de sa capacité digestive. Des symptômes désagréables dans ces heures peuvent indiquer que notre estomac est trop froid.

➤ **Le PANCRÉAS / RATE (9 heures à 11 heures)**

La rate est considérée comme un organe très important dans la digestion, à tel point que même un petit déjeuner tardif sera digéré facilement. C'est dans la période 9-11 heures que les allergies peuvent apparaître le plus fortement car la rate est occupée à travailler avec le foie et le système immunitaire. Une rate saine produit des anticorps quand il y a une infection et observe scrupuleusement le sang à la recherche d'impuretés. Des sensations désagréables pendant cet intervalle peuvent témoigner d'une rate déficiente. Au niveau émotionnel cela peut être révélateur de problèmes d'estime de soi.

➤ **Le CŒUR (11 heures à 13 heures)**

On note généralement une accélération du rythme cardiaque aux alentours de midi. La recherche montre que 70% des crises cardiaques se produisent entre 11 heures et 13 heures. Etre plein de joie et d'enthousiasme rend le cœur plus fort, tandis que les émotions opposées, comme la tristesse, affaiblissent le cœur.

➤ **L'INTESTIN GRÊLE (13 heures à 15 heures)**

Avez-vous remarqué qu'entre 1 à 3 heures vous êtes plus susceptibles d'avoir une indigestion, des douleurs et des ballonnements ? L'horloge

biologique interne nous dit que cela peut être lié à notre intestin grêle. Peut-être que nous avons un sentiment d'insécurité ou que nous doutons de nous-même. Il est également possible que nous souffrions de malabsorption intestinale.

➤ **LA VESSIE (15 heures à 17 heures)**

Les symptômes annonciateurs de désordre durant cette période se manifestent essentiellement par de la fatigue.

➤ **Les REINS (17heures à 19 heures)**

Lorsque les reins sont en bonne santé et fonctionnent correctement, nous nous sentons plus énergique. Les reins sont alignés avec les glandes surrénales qui produisent le cortisol nous aidant à sortir du lit le matin. L'énergie des reins est la plus faible le matin entre 5 et 7heures, c'est pourquoi on a souvent du mal à se réveiller à ce moment de la journée.

➤ **Le PÉRICARDE (19 heures à 21 heures)**

➤ **Le TRIPLE RÉCHAUFFEUR (21 heures à 23 heures)**

Le triple réchauffeur régit les vaisseaux sanguins et les artères. Les vaisseaux sanguins « passent en mode de réparation ». Si nous avons des maux de tête, nous nous sentons anormalement fatigué ou faible, cela signifie que les vaisseaux sanguins sont en réparation.

➤ **Le FOIE (1 heure à 3 heures)**

Le foie et la vésicule biliaire entrent en action entre 23 heures et 3 heures. En cas d'insomnies cela peut signifier que les déchets ne sont pas en train d'être dégradés par le foie et irritent notre corps. De ce fait, ils causent l'insomnie et mettent nos nerfs à vif.

L'alimentation (horaires des repas et apports nutritionnels) inter agit avec le réseau des horloges circadiennes. En chrononutrition, il se dégage un principe valable pour tout mammifère : lorsque la nourriture est abondante, l'horloge centrale est prédominante et entraîne l'organisme sur l'alternance jour / nuit. Mais lorsque la nourriture est rare ou lorsqu'elle est disponible lors d'une fenêtre temporelle restreinte, beaucoup des rythmes circadiens endogènes des

organes liés à la digestion se découplent des signaux en provenance de l'horloge centrale pour que la phase active de recherche de nourriture coïncide avec la disponibilité réelle. L'heure du repas au sens strict n'aurait pas d'effet [50].

4.3. De la chronopathologie à la chronothérapie [50 ; 54 ; 55]

La chronopathologie est l'identification de variations circadiennes dans l'apparition des symptômes de la maladie et/ou de leur exacerbation pendant le nyctémère.

La chronopharmacologie se définit comme l'étude des effets des médicaments en fonction du temps biologique (heure dans l'échelle des vingt-quatre heures) et sur les paramètres qui caractérisent les rythmes biologiques (T, O, A et M). Les effets sont d'une part ceux qui sont désirés et d'autre part ceux qui ne le sont pas. Puisque c'est le cas de tous les médicaments il convient de s'efforcer d'augmenter les effets désirés et/ou de réduire les effets non désirés. Les moyens classiques (modifications de la molécule, choix de sa voie d'administration, de la formulation galénique, etc.) ont à leur actif d'indiscutables progrès ; mais ceux-ci sont souvent limités (dans le cas des anticancéreux par exemple). La chronothérapie permet de réduire (voire de supprimer) les effets non désirés et/ou d'augmenter les effets désirés en choisissant l'heure d'administration du médicament. Celle-ci peut être prédite par l'expérimentation animale. Les heures optimales d'administration résultant d'études chronothérapeutiques cliniques sont déjà connues pour un grand nombre de substances : cortisol et corticostéroïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens (utilisés en rhumatologie), antihistaminiques H1 (en allergologie) et H2 (utilisés dans le traitement des ulcères gastroduodénaux), anticoagulants et antihypertenseurs (utilisés en cardiologie), anesthésiques locaux, bronchodilatateurs (pneumologie et asthmologie), analgésiques, hormones diverses, anticancéreux, etc. En outre, des moyens d'administration originaux sont disponibles sous forme de pompes programmables dans le temps.

4.4. Rythme biologique et chronopharmacocinétique des médicaments

4.4.1. La modification du rythme biologique par les médicaments

L'altération de rythmes biologiques suite à la prise de molécule médicamenteuse peut être à l'origine d'effets indésirables.

La mise en application des connaissances issues de la chronobiologie dans les domaines de la toxicologie ou pharmacologie a démontré que le moment d'administration d'un médicament pouvait avoir une influence majeure sur l'efficacité ou la toxicité de cette molécule médicamenteuse [56].

L'un des objectifs de la chronopharmacologie est d'étudier l'influence de la prise de médicaments sur les rythmes biologiques. Le but est alors de trouver le moment ou le rythme d'administration minimisera l'altération des différents rythmes biologiques [49].

4.4.2. Les rythmes en pharmacocinétique

Avant d'aboutir à l'effet thérapeutique recherché, un médicament administré par voie orale va subir plusieurs transformations.

L'étude du devenir du médicament dans l'organisme est appelée pharmacocinétique.

La durée et l'intensité de l'effet thérapeutique du médicament administré sont principalement fonction de la concentration en principe actif présente in fine dans l'organe cible.

Au-delà de la dose administrée, cette concentration dépend des différents processus pharmacocinétiques successifs que va subir le médicament.

Les principales étapes du devenir d'un médicament administré par voie orale sont :

- la résorption ;
- la distribution ;
- la métabolisation ;
- l'élimination.

La chronopharmacocinétique va permettre de prévoir les variations des paramètres cinétiques d'un médicament en fonction du temps (C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, AUC) [58].

La détermination de la fréquence d'administration se fait selon la vitesse d'absorption ainsi que selon la demi-vie d'élimination du médicament. Cela dans le but d'arriver à un état d'équilibre où la concentration plasmatique du médicament sera plus ou moins stable dans le temps.

Ce processus est basé sur le principe de l'homéostasie décrit par Claude Bernard, qui considère que « les fonctions physiologiques et biochimiques de tout organisme vivant sont relativement constantes en fonction du temps » [49].

Selon cette notion, les processus biologiques étant constants dans le temps, le moment d'administration d'un médicament n'aurait aucune conséquence sur l'effet thérapeutique obtenu.

Or, une concentration plasmatique constante ne permet pas d'obtenir un effet thérapeutique constant [59].

Tout comme les processus biologiques ou physiologiques, les paramètres pharmacocinétiques présentent également des fluctuations au cours des 24 heures.

La chronopharmacocinétique est donc l'étude des variations rythmiques de l'absorption, de la distribution, de la métabolisation et de l'élimination d'un médicament [49].

L'étude de ces variations apparaît primordiale dans certaines circonstances particulières, notamment lors de la prise d'un médicament à marge thérapeutique étroite, lors de l'administration d'un médicament à prise unique quotidienne ou encore lors du traitement de pathologie dont les symptômes eux-mêmes présentent des variations chronobiologiques [58].

L'intérêt est donc de mettre en évidence des modifications de l'effet thérapeutique en fonction de l'heure de prise d'un médicament [60].

4.4.3. La chronopharmacocinétique des médicaments

La pharmacocinétique d'un médicament peut être modifiée par de multiples facteurs, notamment physiologiques (âge, sexe, ...), pharmacologiques (interactions médicamenteuses,...), pathologiques (insuffisance rénale ou hépatiques, ...), ou encore environnementales (alimentation, tabac, ...). L'importance du moment d'administration d'un médicament est liée à la présence de facteurs sous la dépendance de rythmes biologiques.

Chacune des étapes de la cinétique d'un médicament peut subir des variations temporelles, cependant c'est au niveau du processus de résorption des médicaments que les données sont les plus développées et les plus manifestes [58].

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine des variations temporelles au cours du processus d'absorption par voie orale d'un médicament.

La prise d'un repas avec la présence du bol alimentaire, une modification du pH gastro-intestinal, la vitesse de la vidange gastrique, une formulation galénique particulière peuvent ainsi être à l'origine d'une fluctuation dans l'absorption d'un médicament.

La chronopharmacocinétique permet donc de mettre en évidence un des processus expliquant les variations de l'effet thérapeutique d'un médicament en fonction de l'heure d'administration [59].

Les études menées depuis les années 80, ont montré qu'il existait des variations répétées et reproductibles au niveau des paramètres pharmacocinétiques des médicaments, à l'origine d'une modification de la cinétique de certains médicaments en fonction de l'heure d'administration [51].

4.5. Les rythmes circadiens du métabolisme du glucose [61]

Pour mettre en évidence un rythme circadien dans la réponse de l'organisme face à un apport de glucose exogène, des études sont menées par des tests d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) [62]. Il est

clairement établi que la glycémie obtenue 60 minutes après l'ingestion de 1 g/kg de glucose est supérieure quand l'ingestion est réalisée dans l'après-midi par rapport au matin. Ce rythme de réponse au glucose implique des variations circadiennes de la sécrétion pancréatique d'insuline.

En plus d'une sécrétion suivant des rythmes circadiens, l'insuline voit son efficacité hypoglycémiant varier en fonction de la journée. D'après Gibson et coll. [63], chez l'homme sain, la chute de glucose après une injection IV d'insuline est supérieure à 8H00 (48 %) par rapport à 17H00 (30 %). Des résultats montrant les mêmes conclusions ont été obtenus chez des patients diabétiques [64].

Enfin, Mirouze et coll. [65], ont montré grâce à un dispositif de pancréas artificiel chez un patient diabétique insulino-dépendant que les besoins en insuline varient au cours du nycthémère. Les besoins les plus importants en insuline se situent en fin de matinée ou au début de l'après-midi, tandis que les besoins minimaux sont retrouvés pendant la nuit.

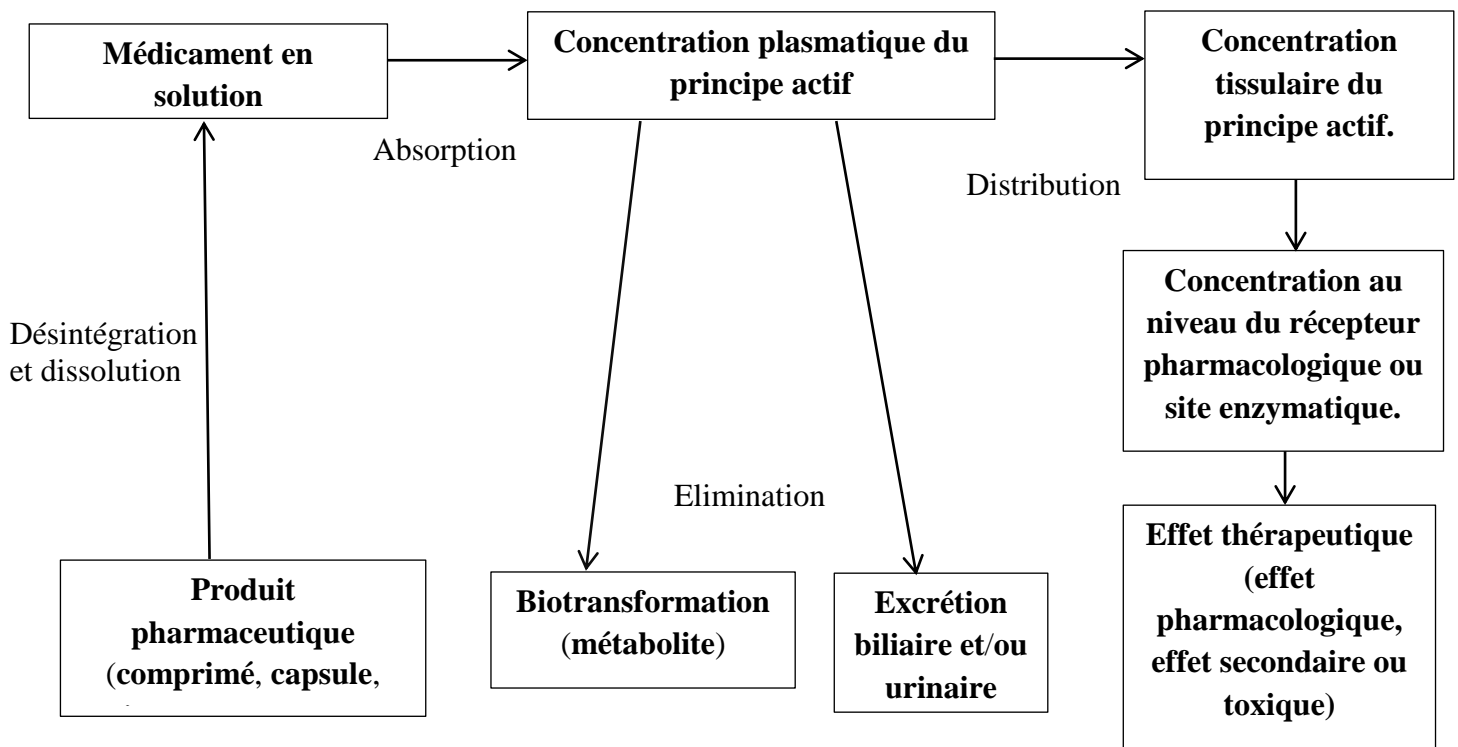


Figure 5: Schéma récapitulatif des différents processus pharmacocinétiques d'un médicament administré par voie orale.

Tableau V: Facteurs physico-chimiques influençant la vitesse pharmacocinétique d'un médicament.

Facteurs physico-chimiques	Facteurs biologiques
<ul style="list-style-type: none"> - Vitesse de désintégration de la forme solide et du granule du médicament, - Excipients pharmaceutique, - Viscosité, - Potentiel d'ionisation, - Solubilité dans l'eau et les solvants organiques, - Aire de surface et état polymorphique du médicament à l'état cristallin, - Etat hydraté ou anhydre des cristaux du médicament, - Etat chimique (acide ou base libre, sel organique). 	<ul style="list-style-type: none"> - Perfusion sanguine des organes, - Filtration glomérulaire, - Etat pathologique, - Vidange gastrique, - transit intestinal et P^H de l'intestin, - Sécrétion biliaire - Perméabilité membranaire, - Fixation aux protéines plasmatiques et tissulaires, - Activités enzymatiques, - Transport actif et spécialisé, - aire de surface et péristaltisme intestinal.

CHAPITRE II : CADRE, MATERIEL ET METHODE D'ETUDE

2.1. Cadre d'étude

L'étude a été réalisée entre les mois de Juillet 2012 et Octobre 2016 dans la commune d'Abomey -Calavi, zone agro écologique VI, au sud du Bénin.

Cette zone a un climat de type Guinéen avec deux saisons de pluies (avril à juillet, septembre à novembre) ; la pluviométrie varie de 1000 à 1400mm et son sol est latéritique, ferrugineux ou hydromorphe.

Les écorces de *Khaya senegalensis* ont été récoltées en Juillet 2012. Elles ont été séchées à l'ombre dans un local aéré après identification suivant les clés de reconnaissance de la flore analytique du Bénin.

Les travaux d'extraction ont été effectués au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles essentielles à l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), Cotonou, au sud du Bénin.

Les essais biochimiques ont été réalisés au Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi.

Les coupes histologiques ont été réalisées au Laboratoire d'histologie et de biologie humaine de l'ISBA.

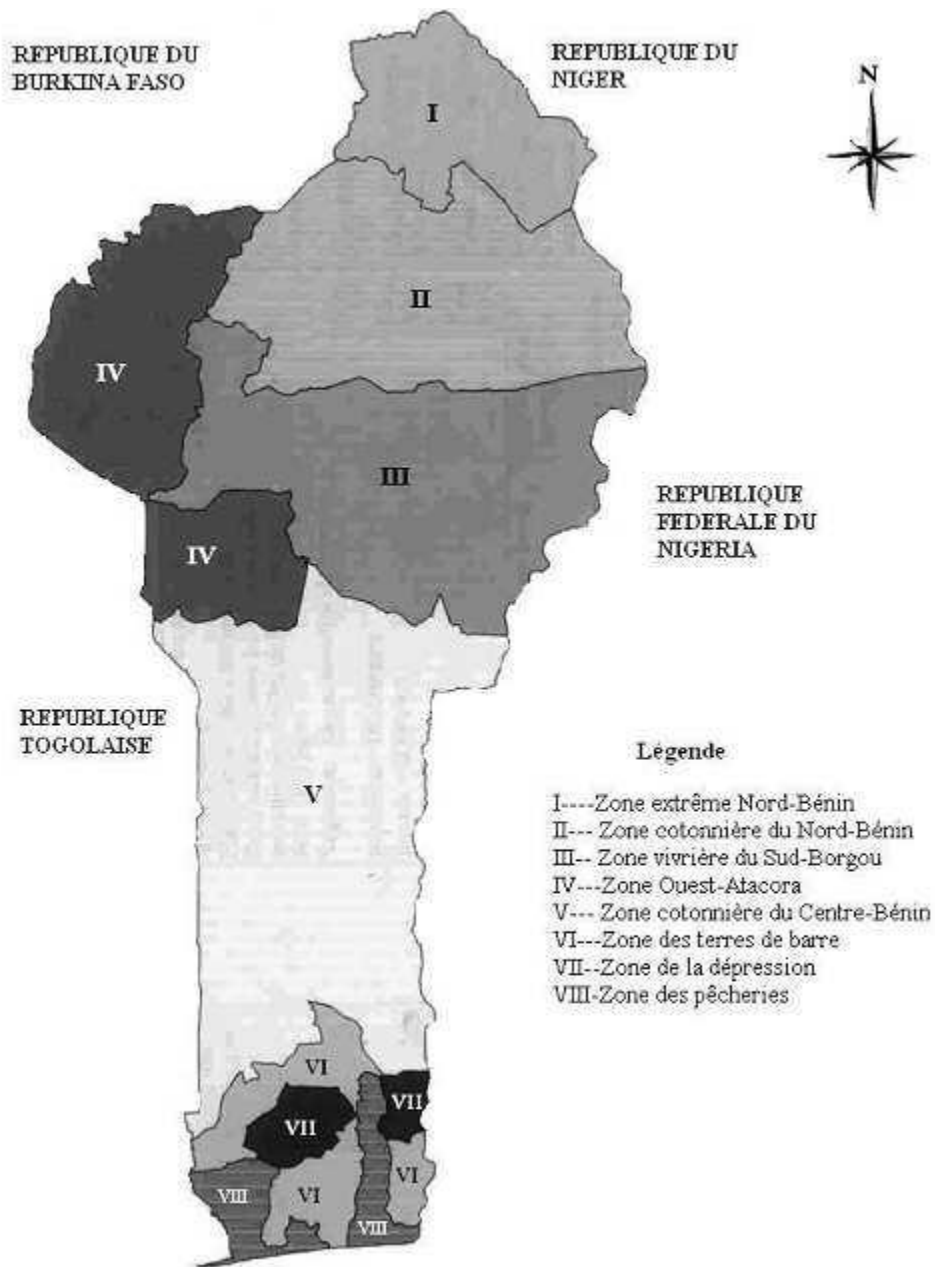


Figure 6: Zones agro-écologiques du Bénin (Attindéhou, 2013)

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Matériel :

➤ Matériel végétal

Le matériel végétal est exclusivement constitué d'écorces de *Khaya senegalensis* réduit en poudre, et extrait par la suite.



Cliché de Z. Loïca J. A. ZOHOUN, 2012

Photo 2 : Ecorce de *K. senegalensis*

Cliché de Z. Loïca J. A.

Photo 3 : Poudre de l'écorce de *K. senegalensis*



Cliché de Z. Loïca J. A. ZOHOUN, 2012

Photo 4 : Extrait du *K. senegalensis*

➤ Matériel animal

Deux matériels biologiques ont été utilisés :

- a. Le foie du rat Wistar pour la recherche des effets de *Khaya* sur la libération hépatique du glucose

b. Le rat Wistar entier pour l'étude de la chronophysiologie des extraits de *Khaya*

Le rat est connu pour son intelligence. Il est capable de modifier son comportement pour échapper aux pièges et trouver de la nourriture. C'est donc un candidat idéal aux tests de comportement. De même, le rat est un petit animal résistant bien aux opérations, extrêmement prolifique, entre autres. Ces qualités-ci sont appréciées des chercheurs. Très étudié, on dit que c'est un organisme modèle.

Après la souris de laboratoire, le rat est le mammifère d'expérimentation le plus utilisé et compte pour à peu près 20 % du nombre total de mammifères utilisés dans la recherche. Il existe de nombreuses sous-souches de la lignée Wistar, ayant des caractéristiques et des comportements propres. Elles sont créées par les laboratoires de recherche et répondent à des besoins spécifiques.

Il sert aussi à réaliser de nombreuses expériences permettant de faire avancer la recherche médicale. Une équipe internationale de chercheurs a mis en évidence la capacité du rat à distinguer les causes des effets, ce qui est une découverte majeure car auparavant on pensait que seul l'homme était capable de « raisonnement causal ».

Un rat mange l'équivalent de 8 à 10 % de son poids par jour, ce qui n'est pas très important. Il se nourrit principalement de grains : mais son caractère omnivore opportuniste ne lui fera pas dédaigner les croquettes du chat ou du chien, les fruits et légumes.

Selon une étude menée par les Laboratoires Harlan, son alimentation doit respecter les taux de 14 % de protéines pour 4 % de lipides, pour un rat adulte en bonne santé. La dose quotidienne, donnée à heure fixe, est de 20 grammes environ de nourriture par jour par rat, ceci variant évidemment selon la taille, l'âge et l'activité du rat.



Cliché de Z. Loïca J. A. ZOHOUN, 2012

Photo 5 : Rat Wistar

Neuf rats Wistars de poids corporel entre 205g et 250g, fournis par l'animalerie du département de l'Université d'Abomey Calavi ont été utilisés à chaque fois pour les différents tests.

➤ **Matériel de laboratoire**

Trois différents types de matériel ont été utilisés au laboratoire :

a- Réactifs

Les réactifs utilisés sont :

- eau distillée,
- alcool éthylique,
- solution réactionnelle,
- GODPAP : pour le dosage du glucose,
- actrapid NOVO NORDISK (insuline à 100UI /ml) : solution de référence,
- acide chlorhydrique,
- réactif de MAYER,
- ammoniacque à 10%,
- éther chloroformique,
- sulfate sodique anhydre,
- chlorure ferrique,

- réactif de STIASNY,
- acétate sodique,
- réactif de SHINODA,
- chloroforme,
- alcool éthylique à 70° C,
- acétate de plomb 10%,
- phosphate disodique à 10%,
- acide acétique sulfurique,
- acide dinitrobenzoïque,
- hydroxyde de sodium,
- solution alcoolique de métadinitrobenzène,
- acide picrique,
- alcool absolu,
- éther,
- ammoniacale à 25%,
- réactif de FEHLING,
- chlorure ferrique à 10%.

b- Appareillage

L'appareillage utilisé est constitué de :

- 01 moulin à couteaux,
- 01 balance analytique SARTORIUS,
- 01 évaporateur ROTAVAPOR,
- 01 thermomètre chimique,
- 01 agitateur magnétique,
- 01 étuve,
- 01 mortier en porcelaine,
- micropipettes P100 et P1000,

- cônes,
- 01 pipette de 5mL,
- 01 spectrophotomètre.

2.2.2. Méthode

➤ Préparation des extraits totaux de *Khaya senegalensis*

Les différentes étapes de la préparation de l'extrait de *Khaya senegalensis* sont :

- Récolter les écorces de *Khaya senegalensis* ;
- Sécher les écorces, puis les réduire en poudre ;
- Peser 100 g de poudre de *Khaya senegalensis* ;
- Mettre dans des bouteilles de mayonnaise, et étiqueter avec du papier adhésif ;
- Ajouter 500 mL de solvant qui peut être alcool ou de l'eau, et homogénéiser ;
- Mettre en agitation magnétique continue pendant 72 heures si on utilise de l'alcool comme solvant et 48 heures si c'est l'eau qui est le solvant ;
- Filtrer et récupérer la solution ;
- Evaporer le filtrat à 40°C (pour l'extrait éthylique) et à 80°C (pour l'extrait aqueux), à l'aide de l'évaporateur ROTAVAPOR ;
- Les extraits récupérés sont mis à l'étuve à 45°C pour séchage ;
- Racler et concasser les extraits desséchés dans le mortier de porcelaine ;
- Peser les extraits desséchés obtenus et calculer le rendement ;
- Mettre dans des flacons en verre et étiqueter ;

➤ **Screening phytochimique**

Le Screening phytochimique 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.J. et RAMAN A. (1998) revue et adaptée aux conditions du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielle. Cette analyse comporte :

- Recherche des alcaloïdes

Elle s'est faite grâce à deux tests :

- Test général en milieu acide.

On mélange 5 g de la poudre à 25 mL 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.

- Extraction des alcaloïdes

On met 5g de poudre dans 5 mL d'ammoniaque dilué au demi. A ce mélange, on ajoute 2 mL d'éther chloroformique et on laisse macérer pendant 24 heures dans un flacon bouché. Le filtrat est séché sur du sulfate sodique anhydre et ensuite épuisé avec 5 mL d'acide chlorhydrique à 5 % deux fois de suite. Au filtrat épuisé, on ajoute 5 gouttes de réactif de MAYER. En cas de présence d'alcaloïde, on observe un précipité dans le tube.

- Recherche des composés polyphénoliques

Dans un erlenmeyer, on met 5g de poudre auxquels on ajoute 100mL d'eau bouillante. Le mélange infusé est laissé 15 minutes sous agitation continue, puis filtré. Ce filtrat réparti en 2 portions servira aux recherches ci-après :

- Recherche des tanins

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

- Recherche des tanins catéchiques

A 30 mL de la seconde portion, nous ajoutons 15 mL 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 %. Une teinte bleue ou noire indique la présence de tanins galliques.

- Recherche de flavonoïdes

- A 5mL de la deuxième portion, nous ajoutons 5mL d'alcool chlorhydrique (réactif de SHINODA) et une pincée de poudre de magnésium : c'est la réaction de la cyanidine, dite réaction de SHINODA. L'apparition d'une coloration :

- orangée indique les flavones,
- rouge indique les flavonols
- violette indique les flavonones
- 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'accroît et vire au bleu-violacé ou verdâtre indique la présence d'anthocyane.

- Recherche de leuco-anthocyane

A 5mL de la deuxième portion, nous ajoutons 5 mL 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.

- Recherche des dérivés quinoniques

Dans un erlenmeyer, nous mélangeons 2 mL de HCl à 5 % et 2 g de poudre. A ce mélange, nous ajoutons 20 mL 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.

- Recherche des saponosides

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 100 mL d'eau distillée avec une ébullition modérée. Le filtrat refroidi puis ajusté à 100 mL 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..., 10 mL de décocté ; ajuster le volume de chaque tube à 10 mL 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 ≥ 1 cm dans l'un des tubes, la dilution dans ce tube est l'indice de mousse cherché. Sinon, l'indice est inférieur à 100 (négligeable).

- Recherche de triterpénoïdes et de stéroïdes y compris les cardénolides

Pour cette recherche, nous ajoutons à 1 g de poudre 10 mL d'alcool éthylique à 70°C et nous agitons pendant 30 min. A ce mélange, nous ajoutons 10 mL d'eau distillée puis 2 mL d'acétate de plomb à 10 % à volume égal V/V. Après 15 minutes de repos, nous ajoutons au filtrat 2 mL 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 5 mL 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 3 mL 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.

- Recherche de dérivés cyanogéniques

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

- Recherche des mucilages

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

- Recherche de coumarines

A 20 mL 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 20 mL avec l'éther. 5mL de filtrat ont été évaporés dans une capsule à l'air libre. Au résidu obtenu, nous avons ajouté 2 mL d'eau chaude et partagé la solution dans deux tubes à essai. Dans l'un des tubes, nous avons ajouté 0,5 mL 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.

10 g de poudres sont mis dans un erlen de 500 mL. On y verse 180 mL d'éthanol et 20 mL d'eau distillée. On met l'eren sous agitation magnétique pendant une nuit. Après filtration, la solution est concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à siccité. L'extrait hydro-éthanolique concentré est traité, dans une capsule de porcelaine, avec une goutte de solution saturée de chlorhydrate

d'hydroxylamine 10% et une goutte de solution alcoolisée de KOH (7, 5% de KOH dans l'éthanol). Ce mélange est chauffé pendant 2 mn. Après refroidissement, on ajoute une petite quantité d'HCl 0,5N et de FeCl₃ 1%. Un test positif consiste en une coloration violette.

- Recherche des composés réducteurs

Le décocté à 10 % est obtenu par ébullition modérée pendant 3 minutes d'un mélange de 50 mL d'eau distillée et de 5 g de poudre. Après refroidissement, le filtrat a été ajusté à 50 mL 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 1 mL 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.

p- Recherche des dérivés anthracéniques

- Anthracéniques libres

A 1 g 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 10 mL avec le chloroforme. 1 mL de l'extrait chloroformique est additionné de 1 mL 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'hydrolysate est obtenu après filtration et ajustement à 10mL. On prélève 5mL de l'hydrolysate qu'on agite avec 5mL de chloroforme. La phase organique soutirée est introduite dans un tube à essai et additionnée de 1 mL 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 5 mL d'hydrolysate qu'on additionne de 3 à 4 gouttes de FeCl₃ (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 1 mL de FeCl₃ 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 1 mL d'ammoniaque dilué à 1/2 et on agite. Une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence de génines de C-hétérosides.

- Recherche des huiles essentielles

La présence d'huile essentielle décelable lors des essais organoleptiques est confirmée par entraînement à la vapeur d'eau dans l'appareil du type CLAVENGER. Le distillat est recueilli dans le tube gradué, éventuellement en présence de xylène.

On dépose 10 µL du mélange huile essentielle – xylène sur une plaque CCM. Le développement se fait avec un mélange de solutions toluène – acétate

d'éthyle : 93V/7V. La plaque est révélée avec de la vanilline ou de l'anisaldéhyde puis chauffée aux environs de 105 °C. Le nombre de spots présents sur la plante indique le nombre de composés présents dans l'huile essentielle.

➤ **Préparation du matériel biologique**

Deux tissus ont été prélevés chez des rats : le foie et le sang.

a. Foie de rats Wistar (Effets des extraits totaux de *Khaya* dans la libération hépatique du Glucose)

Prélèvement du foie du rat :

- disséquer un rat,
- prélever le foie du rat,
- conserver l'organe prélevé dans un bocal contenant de la solution réactionnelle.



Photo 6 : Rat disséqué

b. Sang des rats Wistar (pour chronophysiologie)

Le prélèvement sanguin est réalisé selon le protocole expérimental employé par WOUETOLA (2014). La ponction du sinus retro-orbitaire a été réalisée sans anesthésie. L'animal est maintenu d'une main en décubitus latéral, et tenu par la peau du cou. La pression du pouce sur le cou, derrière l'angle de la mâchoire, permet de réaliser une compression de la veine jugulaire, et donc une stase veineuse vers la tête, favorisant le remplissage du sinus rétro-orbitaire.

En effectuant une légère traction sur la paupière supérieure avec l'index, nous créons une exophtalmie facilitant le prélèvement de sang à l'aide de tube à hématocrite hépariné ou non. L'extrémité du tube est introduite lentement dans l'angle latéral de l'œil. La progression à travers les tissus est facilitée en imprimant une légère rotation à la pipette. Dès qu'on atteint le plexus veineux, le sang jaillit dans l'espace périorbitaire et monte par capillarité dans le tube. Le volume de sang collecté est de 0,5 à 2 ml.

Avant le retrait du tube, on relâche la compression et le saignement cesse spontanément lorsque la pression oculaire se normalise. Le sang récupéré est utilisé pour le dosage des différents paramètres biochimiques. Le sang est récupéré dans des tubes à hémolyse sans anticoagulant et centrifugé à 3000 tours/mn pendant 15mn à une température de 4°C. Après la centrifugation du sang, le sérum obtenu est conservé dans des tubes eppendorf à une température de -4° C en vue de l'analyse des différents paramètres biochimiques

➤ **Préparation de la solution Mack EWEN**

Les réactifs utilisés sont :

- le chlorure de sodium (NaCl) de concentration 100 mM,
- le chlorure de potassium (KCl) de concentration 7 mM,
- le dichlorure de calcium (CaCl₂) de concentration 1,2 mM,
- le sodium dihydrogène phosphate(NaH₂PO₄) de concentration 25 mM,
- le disodium d'hydrogène phosphate(Na₂HPO₄) de concentration 10 mM,
- le BSA (protéine) de concentration 1%.

➤ **Calcul des masses des différents réactifs utilisés**

$$m = cvM$$

Avec

m = masse des réactifs

v = volume du solvant

c = concentration du produit

M = masse molaire moléculaire du réactif

$$M(\text{NaCl}) = (23 + 35,5) \text{ g}$$

$$M(\text{NaCl}) = 58,5 \text{ g}$$

$$M(\text{KCl}) = (40 + 35,5) \text{ g}$$

$$M(\text{NaCl}) = 75,5 \text{ g}$$

$$M(\text{CaCl}_2) = (35,5 + 35,5 + 39) \text{ g}$$

$$M(\text{CaCl}_2) = 110 \text{ g}$$

$$M(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = (23 + 2 + (16)4 + 31) \text{ g}$$

$$M(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 120 \text{ g}$$

$$M(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = (23 + 23 + 1 + 31 + (16)4) \text{ g}$$

$$M(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 142 \text{ g}$$

$$V = 250 \text{ mL}$$

$$m(\text{NaCl}) = 1,46 \text{ g}$$

$$m(\text{KCl}) = 0,13 \text{ g}$$

$$m(\text{CaCl}_2) = 0,033 \text{ g}$$

$$m(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 0,75 \text{ g}$$

$$m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,35 \text{ g}$$

BSA 1%

$$1 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ mL}$$

$$X = 2,5 \text{ g}$$

$$X \longrightarrow 250 \text{ mL}$$

X = masse du BSA

On dissout différents ces différents produits, mettre le tout dans un flacon et compléter de l'eau distillée jusqu'à 250 mL, homogénéiser et mettre au réfrigérateur.

➤ **Préparation de la solution des extraits totaux de *Khaya senegalensis***

La solution d'extrait est préparée avec la solution réactionnelle.

$$C = 10 \text{ g/l} \quad v = 5 \text{ mL}$$

$$100 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ mL}$$

$$mE \longrightarrow 5 \text{ mL}$$

mE = masse de l'extrait

$$mE = 0,05 \text{ g}$$

On dissout 0,05g d'extrait dans 5 mL de la solution réactionnelle, homogénéiser et conserver au réfrigérateur.

➤ **Détermination des paramètres biochimiques**

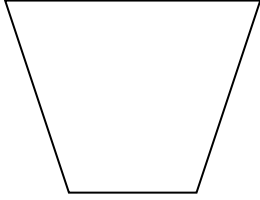
a- Dosage du glucose aux différentes concentrations des extraits totaux de *Khaya senegalensis* (Effet des extraits totaux sur libération hépatique du glucose)

Nous avons réalisé un texte in vitro en se servant du foie de rat comme matériel biologique. Les extraits totaux de *Khaya senegalensis* ont été appliqués à différentes concentrations à savoir : 2µg/L, 5µg/L, 10µg/L, 20µg/L contre un blanc réactif et un contrôle. Les taux de glucose dans les milieux ont été mesurés aux temps t=0, t=10, t=20, t=30, t=40, t=50, t=60 minutes d'incubation à l'étuve à 37°C.

- Mettre 5 mL de la solution réactionnelle dans les 5 boîtes contenant le foie coupé en petits morceaux, ajouté la solution d'extraits à différente concentration.

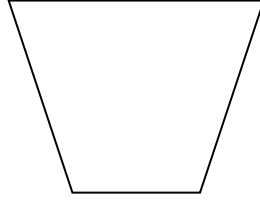
•

1



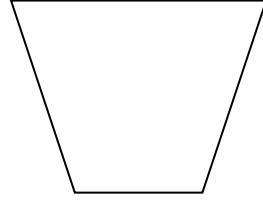
Témoin
Pas d'extrait

2



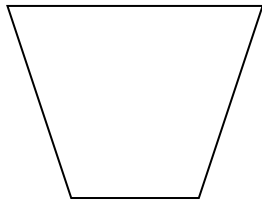
2 μ g/L
d'extrait

3



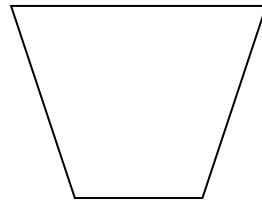
5 μ g/L
d'extrait

4



10 μ g/L
d'extrait

5



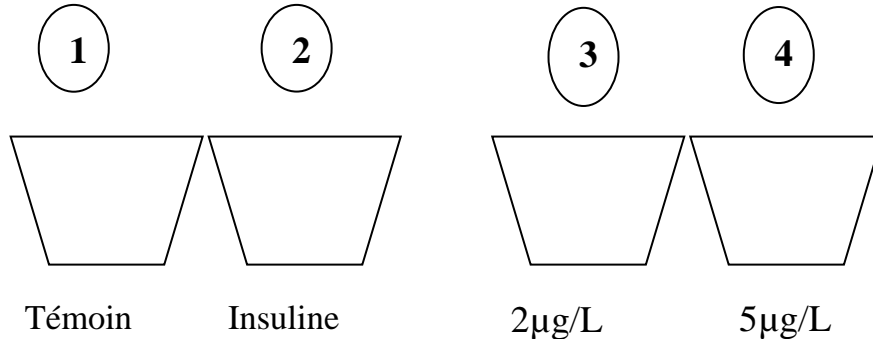
20 μ g/L
d'extrait

- Prélever 10 µl de chaque préparation dans différent tube avant de mettre à l'étuve, continuer le prélèvement tous les 10 minutes ;
- Doser le glucose à la spectrophotométrie.

a- Expérimentation avec l'insuline

On répète la même manipulation en utilisant d'une part les concentrations 2 µg/L et 5 µg/L des extraits totaux de *Khaya senegalensis* et d'autre part 2,5 UI de la solution d'insuline à 100 UI/ml.

- Répartir à part égale le foie du rat dans 4 boîtes de Pétri ;
- Ajouter 5 ml de la solution réactionnelle à chaque boîte ;
- Mettre de l'eau distillée dans la boîte de Pétri n°1, de l'insuline dans la boîte n°2, 2µg/L d'extraits de *Khaya senegalensis* dans la boîte n°3, et 5 µg/L d'extraits de *Khaya senegalensis* dans la boîte n°4.



- Mettre les boîtes à l'étuve à 37°C et prélever 10µl tous les 10mm.

Doser à chaque fois le glucose par spectrophotométrie (méthode GODPAP)

a. Dosage des paramètres biochimiques sanguins (chronophysiologie des extraits totaux de *Khaya*)

Pour doser la glycémie, les triglycérides, l'urée et les transaminases chez les rats Wistar, le prélèvement est effectué au niveau de la veine

jugulaire, le sang est recueilli dans des tubes eppendorfs et est ensuite centrifugée à 3000 tours pendant 10 minutes et le sérum surnageant a été décanté et stocké pour la détermination de ces paramètres

Notons qu'avant d'arriver à ce niveau les rats ont été au préalable gavés avec du *Khaya*

-Gavage des rats

Le principe consiste à administrer par voie orale des extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* à des rats Wistar mâle et femelle de 200 g de poids moyen. Ces rats sont nourris ad libitum et ne reçoivent aucun autre traitement médicamenteux durant la période expérimentale en dehors de l'extrait. Les rats sont répartis au hasard en 03 lots, de 03, puis on attribue respectivement aux lots les doses par kg de poids corporel. Au début de l'expérience, on pèse chacun des rats de chaque lot afin de trouver le poids moyen et on calcule la dose effective d'extrait qui lui sera administrée.

Le lot ₁ est le lot témoin. Les rats de ce lot recevront de l'eau distillée. Au niveau du lot ₂, les animaux recevront 2,5 mg/kg de poids corporel de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* et les animaux du lot ₃ recevront 5 mg/kg de poids corporel. L'administration des diverses solutions se fera par voie orale à l'aide d'une seringue munie d'une sonde. On a effectué le gavage à 9 h. Après gavage, des prélèvements sont faits à intervalle de 4 h pour voir l'effet de l'extrait sur les paramètres biochimiques et donc la durée d'action de l'extrait sur ces paramètres.



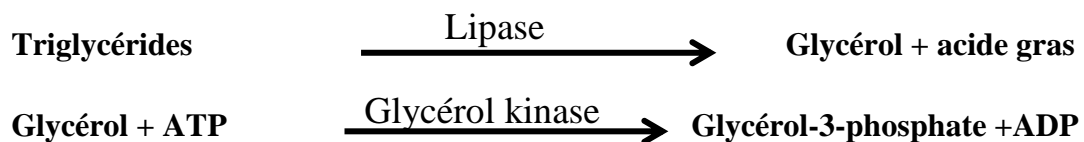
Photo 7 : Gavage des rats Wistar avec l'administration des extraits éthyliques de *Khaya senegalensis*.

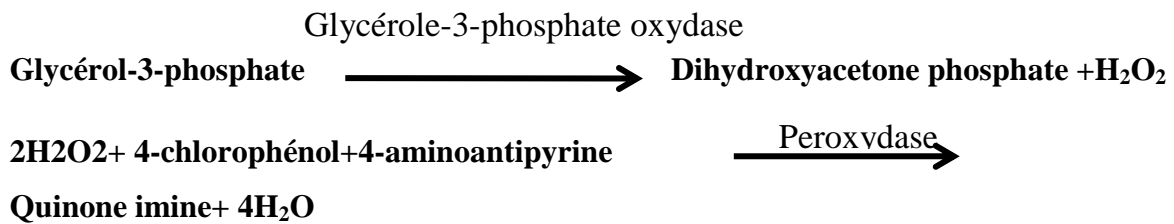
**Cliché : Loïca ZOHOUN 2016
-Dosage des triglycérides**

Principe

Il repose sur le dosage enzymatique du glycérol libre après action de la lipase. 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). Le Glycérol-3-phosphate est oxydé en Dihydroacétone phosphate (DAP) par le glycérol phosphate oxydase (GPO) en produisant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Lors d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase, le H₂O₂ réagit avec le 4-aminoantipirine et le 4-chlorophénol pour produire un colorant rouge.





L'intensité de la coloration de la quinone imine mesurée à 500nm est directement proportionnelle à la quantité des triglycérides dans l'échantillon du sérum.

Tableau VI: Mode opératoire du dosage des triglycérides

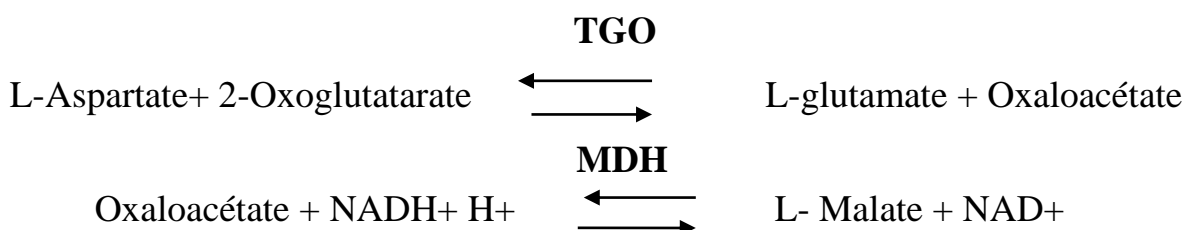
Mesurer dans des cuves bien identifiées	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	10µL	–	–
Etalon	–	10µL	–
Echantillon	–	–	10µL

-Les transaminases

•*Dosage d'ASAT*

Principe

Le principe est basé sur la détermination de l'activité de GOT-ASAT ou de GPT-ALAT selon les réactions suivantes :



L'activité catalytique de la TGO est déterminée en mesurant la vitesse de disparition du NADH à 340 nm.

Tableau VII: Mode opératoire du dosage d'ASAT

Introduire dans une cuve de lecture de 1cm de trajet optique :	
Réactifs	1 ml
Laisser la température s'équilibrer à 37°C puis ajouter :	
Echantillons	100 µl
Mélanger. Après 1minute, lire l'absorbance à 340 nm toutes les minutes pendant 3minutes.	
Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minutes (variation Abs/mn)	

Le calcul se fait selon la règle suivante :

$$UI/l = (\text{variation Abs/min}) * 1746 \text{ ou } \mu\text{kat/l} = (\text{variation Abs/min}) * 29,1$$

- **Alanine aminotransférase**

Anciennement appelée transaminase glutamique pyruvique (TGP) a pour nom officiel L-alanine : 2 oxoglutarate selon un mécanisme réactionnel qui fait intervenir le pyridoxal-5'-phosphate ou vitamine B6 comme co-enzyme.

L'ALAT est essentiellement trouvée dans le foie, mais elle se rencontre aussi par ordre de concentration dans le rein, le cœur, le muscle squelettique, le pancréas, la rate, les poumons et le sérum.

-Dosage d'ALAT

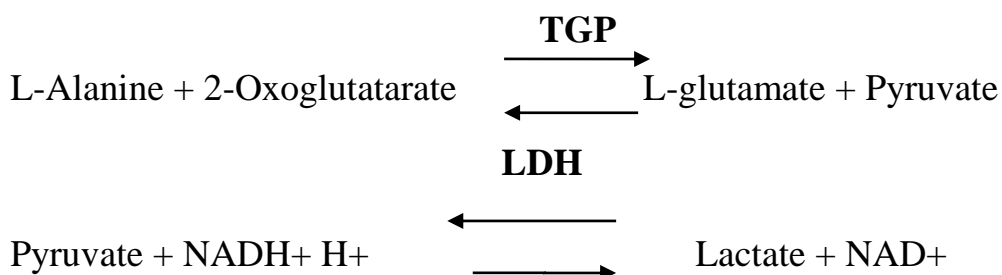


Tableau VIII: Mode opératoire de dosage d'ALAT

Introduire dans une cuve de lecture de 1cm de trajet optique :

Réactifs 1 ml

Laisser la température s'équilibrer à 37°C puis ajouter :

Echantillons 100 µl

Mélanger. Après 1minute, lire l'absorbance à 340 nm toutes les minutes pendant 3minutes.

Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minutes (variation Abs/mn)

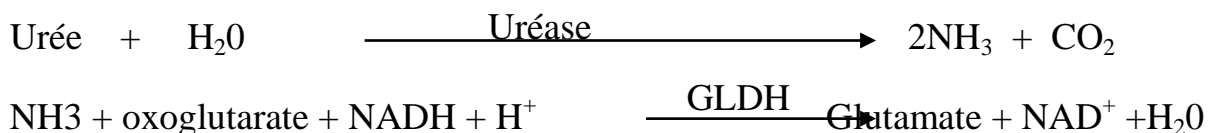
Le calcul se fait selon la règle suivante :

$$UI/l = (\text{variation Abs/min}) * 1746 \text{ ou } \mu\text{kat/l} = (\text{variation Abs/min}) * 29,1$$

-Dosage de l'urée

Principe

La méthode utilisée est la méthode enzymatique basée sur la réaction décrite par Talke (1895) . Le schéma de la réaction est le suivant:



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ , mesurée pendant un temps donné à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en urée dans le spécimen.

Tableau IX: Mode opératoire du dosage de l'urée

Mesurer dans une cuve thermostatée (30°C ou 37°C)	Etalon	Echantillon
Réactif	1ml	1ml
Etalon	5µl	
Spécimen(remarque1)		5µl
Mélanger. Lire les concentrations à 340nm. 1ere lecture A1 en 30 secondes. 2è lecture A2 à 90 secondes.		

-Dosage du glucose (Glycémie)

Principe

Au cours de ce dosage, le D-glucose est oxydé par la glucose oxydase en acide gluconique avec libération d'une mole de peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène se combine avec le phénol et de la 4-aminoantipyrine pour former un chromophore (quinone imine) quantifié à 500nm faisant apparaitre une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la concentration du glucose.

Le principe du dosage du glucose se résume comme suit :

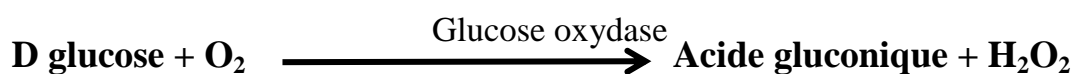


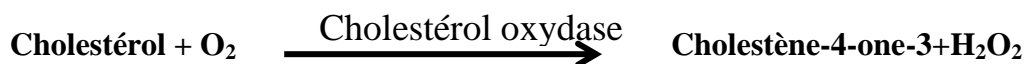
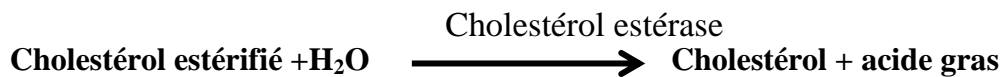
Tableau X: Mode opératoire du dosage du glucose

Mesurer dans des cubes identifiés	Blanc	Etalon	Echantillon
Eau distillée	10µl	-	-
Glucose standard	-	10µl	-
Réactif	1ml	1ml	1ml
Echantion	-	-	10µl

-Dosage du cholestérol

Principe

Les esters de cholestérol sont hydrolysés enzymatiquement la cholestérol estérase qui les décomposent en cholestérol et en acide gras libres. Le cholestérol libre, y compris celui initialement présent, est ensuite oxydé par le cholestérol oxydase pour former du cholestène-4-one-3 et du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène se combine avec de l'acide hydroxy benzoïque et de la 4-aminoantipyrine pour former un chromophore (quinone imine) quantifié à 500nm.



L'intensité de la coloration de la quinone imine mesurée à 500nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol dans l'échantillon du sérum.

Tableau XI: Mode opératoire du dosage du cholestérol

Mesurer dans des cuves bien identifiées	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	10 μ L	–	–
Etalon	–	10 μ L	–
Echantillon	–	–	10 μ L

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Effets Des Extraits Totaux De *Khaya Senegalensis* Sur La Liberation Hepatique Du Glucose

3.1.1. Resultats Partie I

Tableau II : Résultats des analyses phytochimiques

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

+++ Abondant

++ Peu abondant

+ Faible

Nous avons des tanins, des tanins catéchiques, des leuco-anthocyane qui ont pour groupe chimique des composés polyphenoliques 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.

Calcul de rendement de l'extrait de *Khaya senegalensis*

Soit R le rendement de l'extrait,

$$R = \frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse de la poudre de l'écorce}} \times 100$$

Soit R (eau) le rendement de l'extrait avec l'eau ;

$$R (\text{eau}) = \frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse de la poudre de l'écorce}} \times 100$$

$$R (\text{eau}) = \frac{22,62}{100} \times 100$$

$$R (\text{eau}) = 22,62\%$$

Soit RE (alcool) le rendement de l'extrait avec l'alcool ;

$$R (\text{alcool}) = \frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse de la poudre de l'écorce}} \times 100$$

$$R (\text{alcool}) = \frac{42,79}{100} \times 100$$

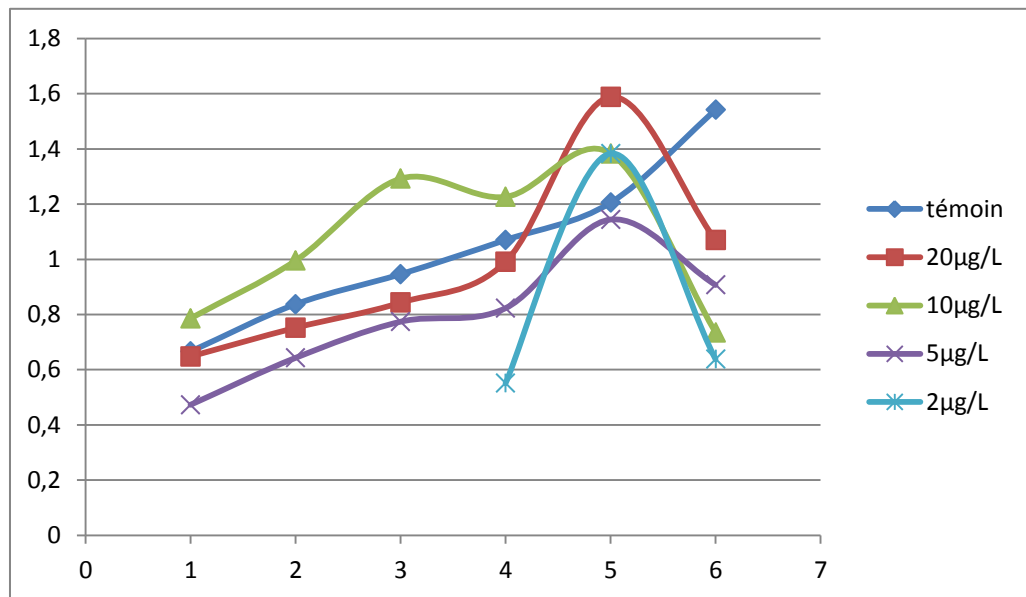
$$R (\text{alcool}) = 42,79 \%$$

L'extraction avec l'alcool a donné un bon rendement (42,79%) alors qu'on a 22,62% pour l'extraction avec de l'eau. L'alcool extrait mieux que l'eau, car nous avons un bon rendement avec l'alcool, mieux encore l'extraction avec l'alcool est très rapide.

Variation de la densité optique en fonction de la concentration des extraits totaux de *Khaya senegalensis*

Blanc 000
Etalon 0,783

Le graphique 1 montre l'évolution de la densité optique en fonction de la concentration des extraits totaux de *Khaya senegalensis*.



Graph 1: Variation de la densité optique aux différentes concentrations

Temps en abscisse

Densité optique en ordonné

Les variations de la densité optique obtenues pour le dosage du glucose sont consignées dans le graphe 1 pour les concentrations 2 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L des extraits totaux de *Khaya senegalensis* aux temps T = 0, T = 10, T = 20, T = 30, T = 40, T = 60 mn.

Les variations de densité optique pour le témoin évoluent en courbe linéaire et de manière ascendante dans le temps.

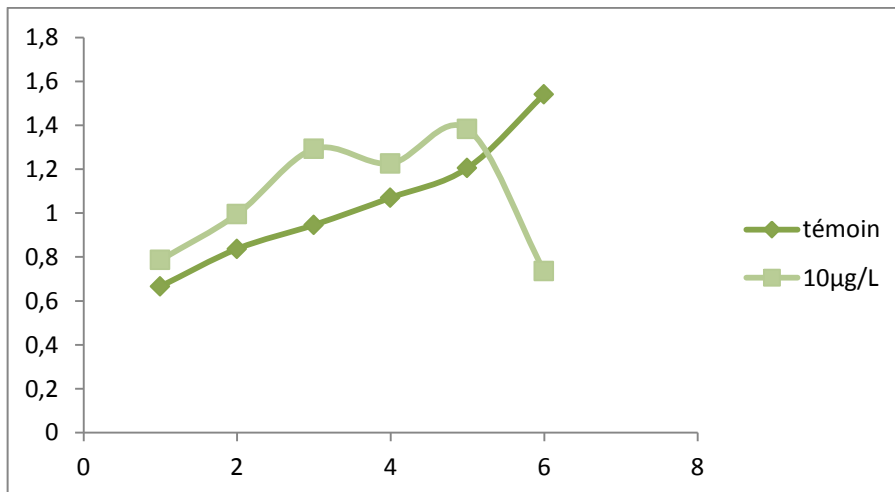
Les variations de densité optique pour les extraits totaux de *Khaya senegalensis* aux différentes concentrations sont dans leur ensemble plus basses que celles du témoin dans les mêmes temps.

Les variations de densité optique obtenues pour le dosage de glucose avec des extraits totaux de *Khaya senegalensis* à la concentration 10 µg/L se sont maintenues au-dessus de celles obtenues avec le témoin aux temps T = 0, T = 10, T = 20, T = 30, T = 40 mn.

Au temps t = 60 mn les extraits aux différentes concentrations ont maintenu une densité optique plus basse que celle du témoin à t = 60 mn.

Les extraits aux concentrations en dessous de 10 µg/L semblent enregistrer les plus basses densités optiques.

Le graphe 2 montre la comparaison entre les courbes de variation de la densité optique du témoin et de la densité optique de l'extrait à 10 µg/L.



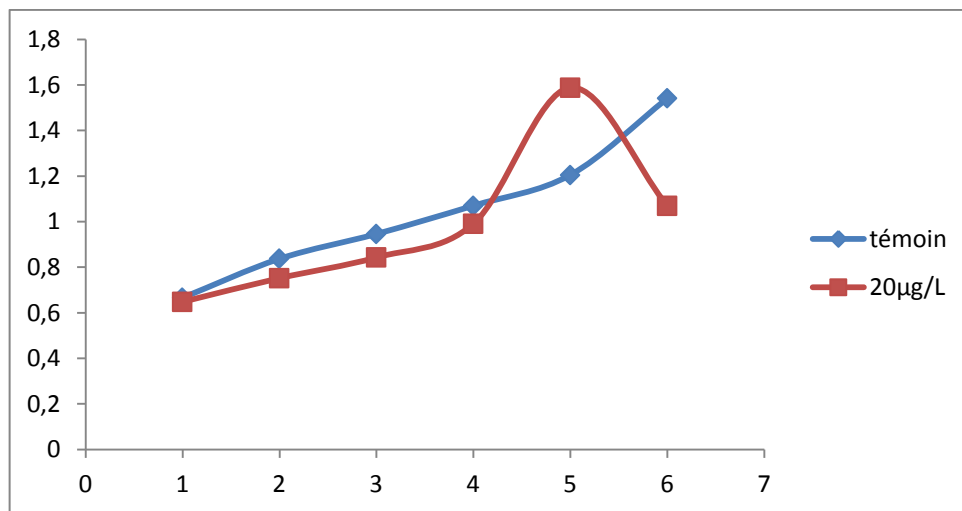
Graphe 2: Comparaison de la courbe de la variation de la densité optique du témoin et celle de l'extrait à la concentration 10 µg/L

Temps en abscisse

Densité optique en ordonné

La variation de la densité optique enregistrées aux temps $T = 0$, $T = 10$, $T = 20$, $T = 30$, $T = 40$, $T = 50$, (mn) sous l'effet des extraits à la concentration $10 \mu\text{g/L}$ sont élevés que celle du témoin. Au temps $T = 60$ mn la variation de la densité optique de l'extrait est en dessous de celle du témoin.

Le graphe 3 montre la comparaison entre les courbes de variation de la densité optique du témoin et de la densité optique de l'extrait à $20 \mu\text{g/L}$.



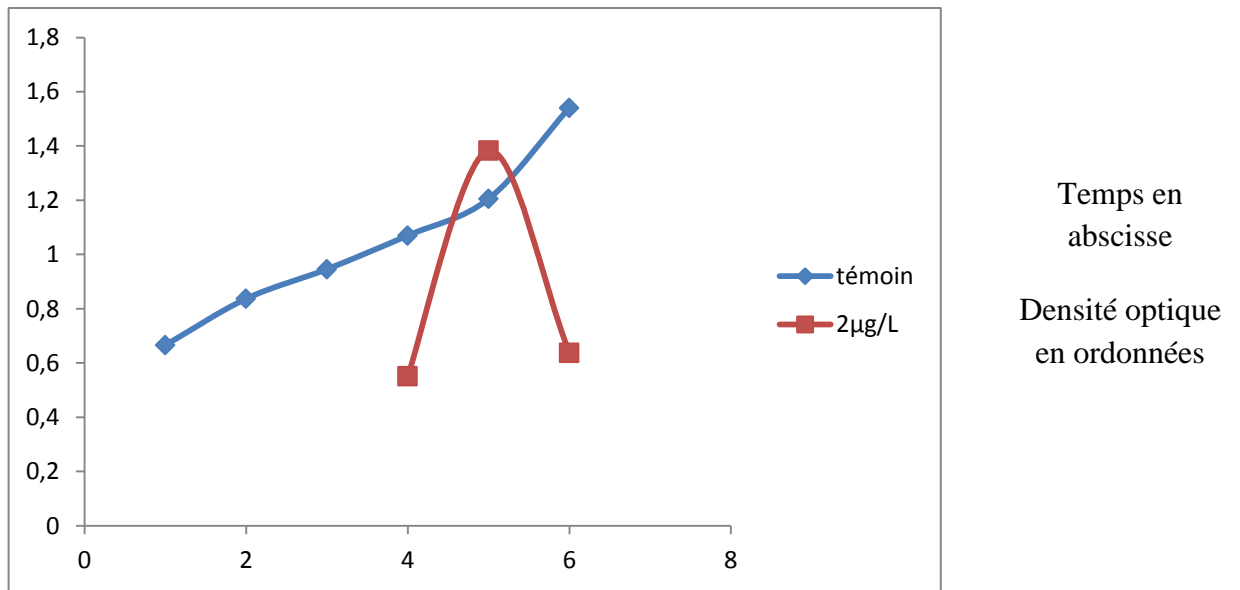
Graph 3: Comparaison des courbes de la variation de la densité optique du Témoin et de l'extrait à concentration de $20 \mu\text{g/L}$.

Temps en abscisse

Densité optique en ordonnées

Les valeurs de la densité optique enregistrées sous l'effet des extraits à la concentration $20 \mu\text{g/L}$ sont dans leur ensemble plus basses que celles du témoin aux temps $T = 0$, $T = 10$, $T = 20$, $T = 30$, $T = 40$, $T = 60$ (mn). Sous l'effet des extraits à la concentration de $20 \mu\text{g/L}$, on observe une valeur de la densité optique plus élevée que celle du témoin au temps $T = 50$ mn.

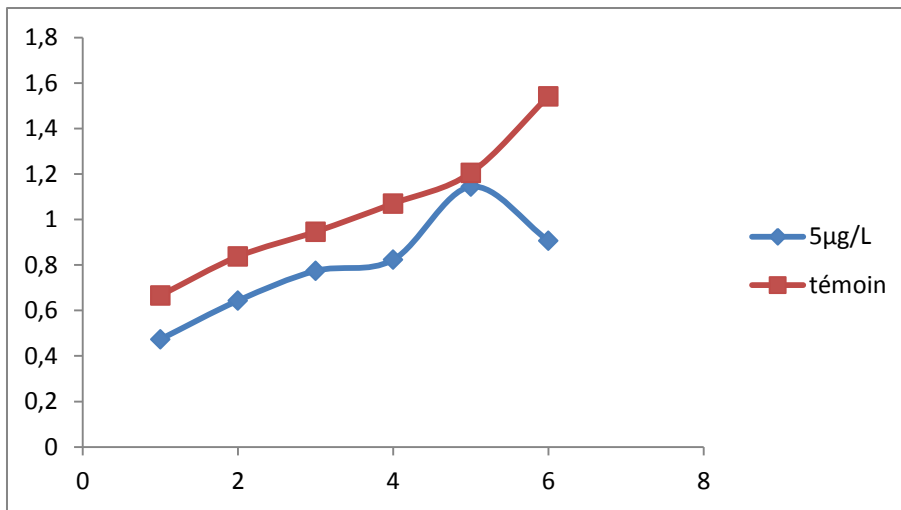
Le graphe 4 montre la comparaison entre les courbes de variation de la densité optique du témoin et de la densité optique de l'extrait à $2 \mu\text{g/L}$



Graph 4: Comparaison des courbes de la variation de densité optique du témoin et celle de l'extrait à la concentration de 2 µg/L

Les variations de la densité optique enregistrées sous l'effet des extraits à la 2 µg/L sont dans leur ensemble plus basses que celles du témoin aux temps T = 0, T = 10, T = 20, T = 30, T = 40, T = 60 mn. Sous l'effet des extraits à la concentration de 2µg/L, on observe une valeur de la densité optique plus élevée que celle du témoin au temps T = 50 mn

Le graphique 5 montre la comparaison entre les courbes de variation de la densité optique du témoin et de la densité optique de l'extrait à 5 µg/L



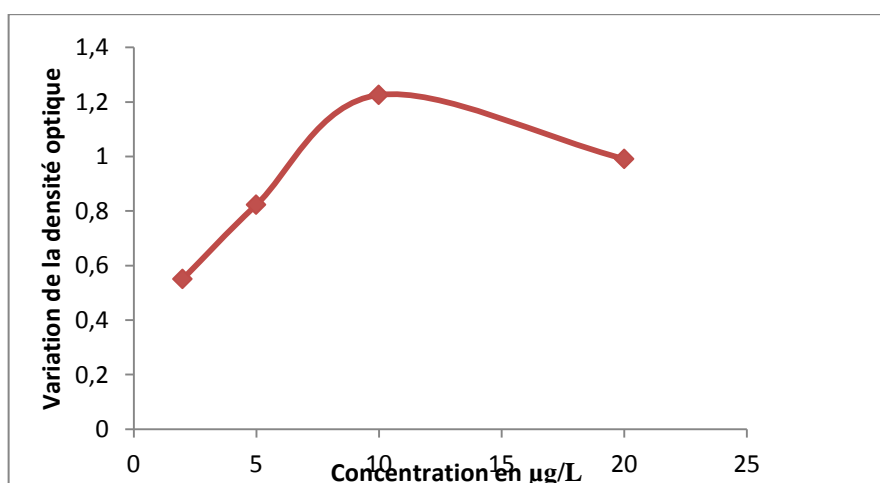
Temps en abscisse
 Densité optique en ordonnées

Graphe 5: Comparaison de la courbe de la variation de la densité optique du témoin et celle de l'extrait à la concentration 5 µg/L

Les valeurs de la variation de la densité optique enregistrées sous l'effet des extraits à la concentration 5 µg/L sont plus basses que celles du témoin aux différents temps.

Courbe dose réponse

Le graphe suivant quant à lui montre l'effet dose réponse de l'extrait



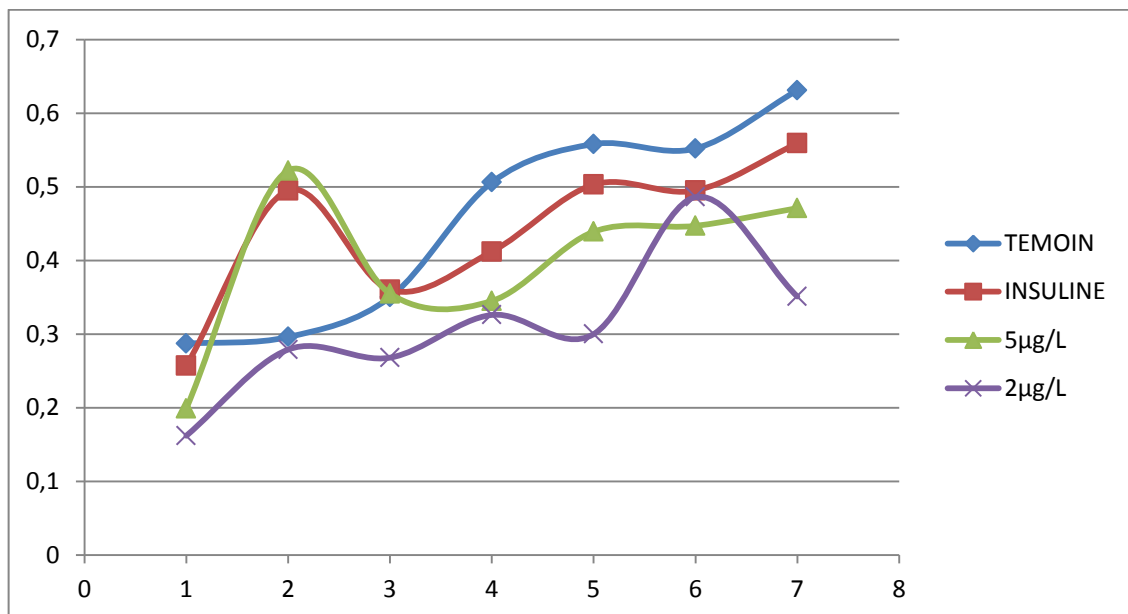
Graphe 6: Courbe dose réponse

Les extraits aqueux du *Khaya senegalensis* aux concentrations 2 µg/L et de 5 µg/L ont enregistré les plus basses valeurs de la variation de la densité optique.

Les valeurs de la variation de la densité optique semblent augmenter au fur et à mesure qu'on augmente la concentration de l'extrait pour atteindre un pic DO =1,2 avec l'extrait à la concentration 10 µg/L.

Aux concentrations supérieures à 10 µg/L l'extrait semble diminuer la valeur de la densité optique sans atteindre les valeurs de la densité optique enregistrées pour l'extrait à la concentration 2 µg/L et 5 µg/L.

Variations de densité optique obtenues avec l'insuline à la concentration de 2,5 UI et celle obtenue avec les extraits totaux aux concentrations 2 µg/L et 5 µg/L.



Temps en abscisse

Densité optique en ordonnées

Graph 7: DO obtenues pour le dosage du glucose sous l'effet des extraits totaux de *Khaya senegalensis* aux concentrations 2 µg/L et 5 µg/L et celle obtenues sous l'effet de l'insuline à la concentration 2,5 UI.

Les variations de densité optique obtenues avec l'insuline à la concentration 2,5 UI tout comme celles obtenues avec les extraits totaux de *Khaya senegalensis* aux concentrations 2 µg/L et 5 µg/L en T = 0, T = 10, T = 20, T = 30, T = 40, T = 50, T = 60 mn sont en dessous des DO du témoin.

L'allure de la courbe des extraits totaux de *Khaya senegalensis* aux concentrations de 5 µg/L est semblable à celle de la courbe de l'insuline.

Les variations de densité optique pour l'insuline sont au dessus des variations de densité optique pour les extraits aux concentrations 2 µg/L.

3.1.2. Discussions partie I

➤ Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est de 42,79 %. Ce résultat montre que les écorces sèches de tronc de *Khaya senegalensis* contiennent des principes actifs qui sont solubles dans l'éthanol à 96°, donc extractibles par ce solvant.

L'éthanol étant un solvant polaire, l'extrait obtenu contiendrait essentiellement des composés polaires selon le principe de la solubilité différentielle. Le rendement d'une extraction dépend du solvant utilisé. D'autres facteurs peuvent aussi influencer le rendement de l'extraction à partir de la matière végétale : la température, la méthode d'extraction, la structure chimique des composés, la granulométrie et le temps de macération.

➤ Composition de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis*.

Le screening phytochimique a révélé la présence d'abondants composés polyphénoliques tels que les tanins, les tanins catéchiques et les leucoanthocyanes, et d'abondants saponosides tels que les sanosides, dans l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis*. D'autres composés polyphénoliques tels que les anthocyanes, tout comme les dérivés anthracéniques tels que les O-hétérosides à génines réduites, sont peu abondants

dans l'extrait, contrairement aux stéroïdes lesquels s'y trouvent en faible quantité. Ces résultats concordent en partie à ceux obtenus par Moyse-Mignon [53] qui en 1942 avait déjà trouvé dans les feuilles du caïlcédrat, 2% de saccharose, un principe amer et avait également signalé la présence d'une saponine et du principe amer « caïlcédrin » dans les écorces de tronc de cette espèce végétale.

Le caïlcédrin serait un mélange de deux composés non saturés renfermant dans leur molécule un oxydryle phénolique. Des travaux plus avancés ont révélé la présence de triterpénoïdes à fonction lactone ou époxyde et cycle furanique, susceptibles d'exister sous différentes formes dans les organes de la plante. Les stéroïdes constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement le squalène. Ils se caractérisent par un *noyau cyclopentanophénanthrénique* (stérane) hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné. Habituellement, les carbones C₁₀, C₁₃ sont liés à un groupe méthyle -CH₃ et le carbone C₁₇ à un groupe alkyle. Par extension, les stéroïdes incluent également les lipides dont le noyau

cyclopentanophénanthrénique a été modifié par scission d'une liaison et l'ajout ou la délétion d'un carbone.

Lompo (1995) [22] a obtenu des résultats similaires à ceux de la présente étude ; le screening phytochimique des écorces de tronc lui a permis de mettre en évidence les principaux groupes chimiques que sont : acides gras, caroténoïdes, coumarines, emodols, tanins, composés réducteurs, anthracenosides, glycosides

stéroïdiques, flavonosides, glucides, saponosides, stérols et triterpènes, anthocyanosides. Le solvant utilisé dans l'extraction étant l'éthanol à 96° (solvant polaire), les poly phénols étant de solubilité variable (Maroua, 2009), ceux qui se trouvent en abondance dans l'extrait, tout comme les saponosides (composés polaires), seraient des polyphénols polaires, contrairement aux poly phénols de l'anthocyane et les o-hétérosides à génine

réduites, lesquelles sont moins polaires donc peu abondants dans l'extrait, et contrairement aux stéroïdes, lesquelles sont peu polaires donc en faible quantité dans l'extrait.

➤ **Influence de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sur la libération hépatique du glucose.**

a. Mouvement de glucose à travers la membrane des hépatocytes

Le graphe de dosage du glucose dans le tube témoin prend l'allure d'une droite ascendante dans le temps. Ce phénomène expliquerait un mouvement du glucose depuis l'intérieur des hépatocytes vers le milieu extérieur qu'est la solution réactionnelle (la solution de Mack-Ewen), exempt de glucose. En cas de déficit de glucose, le glycogène (forme de réserve de glucose dans le foie ou le muscle squelettique, ou autres tissus) se dégrade en libérant le glucose lequel diffuse à l'extérieur des cellules.

On pouvait à priori penser à une simple diffusion du glucose (mouvement du glucose suivant un gradient de concentration), mais ce phénomène est beaucoup plus complexe. Il implique un groupe d'enzymes telles que le glycogène synthétase, le glycogène-phosphorylase et la phosphatase, et des molécules telles que l'ATP et des protéines de type PEPCK. En effet lorsque le niveau de glucose baisse sensiblement dans le milieu extérieur des hépatocytes, le glycogène synthétase et la phosphatase sont inactivés, ce qui entraîne l'activation du glycogène phosphorylase par la phosphorylation (apport du groupe phosphate par l'ATP ou autre forme de réserve d'énergie cellulaire) laquelle va phosphoryler le glycogène et l'hydrolyse en glucose.

Le phosphoénol pyruvate carboxy-kinase (PEPCK), l'enzyme qui catalyse la gluconéogenèse (réaction de conversion des intermédiaires non glucidiques comme l'oxaloacétate en glucose) pourrait être aussi activée en augmentant ainsi le flux du glucose vers le milieu extérieur des hépatocytes. Alors cette sortie du glucose pourrait se justifier par le bon fonctionnement des enzymes du foie de

rat isolé, lequel serait conservé dans des conditions requises ou très proche des physiologiques qu'offre la solution réactionnelle. Cela serait aussi la marque d'une bonne préparation de ladite solution.

➤ **Effet des extraits totaux de *Khaya senegalensis* sur le taux de glucose**

La variation de densité optique obtenue dans cette expérimentation par spectrophotométrie est une grandeur qui renseigne sur la quantité de glucose présente dans le milieu. Elle est directement proportionnelle à la concentration du milieu en glucose.

Le phénomène que nous observons en absence des extraits totaux de *Khaya senegalensis* est une sortie graduelle du glucose des hépatocytes vers le milieu extérieur.

Dès que nous appliquons les extraits totaux de *Khaya senegalensis* aux différentes concentrations 2 µg/L, 5 µg/L, 20 µg/L aux temps $t = 0$, $t = 10$, $t = 20$, $t = 30$, $t = 40$, $t = 60$ minutes, nous remarquons une diminution du taux de glucose dans le milieu. Deux phénomènes possibles pourraient justifier ces résultats :

a. Une dégradation du glucose dans le milieu extérieur sous l'effet des extraits.

Toutefois il faudrait signaler que le pyruvate ne ferait pas partie dans ce cas des produits de dégradation du glucose ; ce produit de dégradation donnerait une lecture de variation de densité optique, à la longueur d'onde expérimentale de 500nm, laquelle s'ajouterait à celle des variations de la densité optique du témoin, la méthode de dosage étant elle-même fondée sur une oxydation du glucose en pyruvate ; on aurait donc eu des valeurs de variation de densité optique nettement au-dessus des valeurs de variation de densité optique du témoin, sous l'effet de l'extrait des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* aux différentes concentrations ; mais le dosage de glucose sous l'effet de l'extrait donne des valeurs de la variation de la densité optique qui sont en dessous de

celles des variations de densité optique du témoin. Ceci nous amènerait à écarter l'hypothèse d'une possible oxydation du glucose dans le milieu sous l'effet de l'extrait.

b. Une dégradation par oxydation du glucose à l'intérieur des hépatocytes.

On assisterait à une oxydation du glucose en pyruvate par l'activation ou induction du pyruvate kinase. Le pyruvate formé pourrait se dégrader par l'activation ou induction d'une décarboxylase, à l'acétyl-coenzyme A lequel entre dans le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) qui est une étape préparatoire à la chaîne respiratoire. Le produit final est l'ATP qui est la forme de stockage de l'énergie nécessaire pour le métabolisme cellulaire. Cette hypothèse entraînerait deux conséquences d'une part, une dégradation du glycogène par activation ou induction du glycogène phosphorylase tel que c'est expliqué plus haut ; cette réaction restait en amont de la cascade de réaction biochimiques qui conduirait à une glycolyse complète avec pour résultat la formation de l'ATP ; d'autre part une possible entrée du glucose à l'intérieur des hépatocytes par activation du glycogène synthétase. Si on extrapolait notre expérimentation in vitro au phénomène de la régulation de la glycémie, cette dégradation du glucose à l'intérieur des hépatocytes pour former l'ATP entraînerait une baisse du PEPCCK, donc du glucose, par entrée de ce substrat dans le foie ; les hépatocytes recherchant leur équilibre physiologique, et le stock de glycogène étant en équilibre dynamique avec le taux de glucose sanguin.

Cet effet de l'extrait pourrait favoriser in vivo une accumulation excessive de glucose dans le foie et provoquer un stress oxydatif dans les hépatocytes par inhibition de la G6PD via activation du PKA.

c. Pour les concentrations 10 µg/L et 20 µg/L il se serait produit une saturation des enzymes impliquées dans la dégradation intra cellulaire du glucose à ATP.

En effet les extraits de *Khaya senegalensis* aux concentrations inférieures à 10 µg/L sembleraient enregistrer des variations plus basses de la densité optique que les extraits aux concentrations 10 µg/L et 20 µg/L. Il se produirait pour les concentrations 10 µg/L et 20 µg/L un excès de substrat (glucose) pour l'enzyme pyruvate kinase (lequel dégrade le glucose en pyruvate pour emprunter le cycle de KREBS et la voie de la respiration avec formation d'énergie ATP), cela s'expliquerait par la saturation des récepteurs et par conséquent, une partie du glucose s'échapperait des hépatocytes d'expérimentation par le mécanisme de transport facilité du glucose à travers la membrane biologique pour influencer l'activité du PEPCCK, comme expliqué plus haut ; ceci expliquerait des valeurs élevées de la variation de la densité optique pour des extraits aux concentrations 10 µg/L et 20 µg/L contrairement à celles obtenues pour les concentrations 2 µg/L et 5 µg/L.

d. L'effet des extraits à la concentration 5 µg/L sur le taux de glucose montrerait une cinétique d'intérêt car à cette concentration le taux de glucose a été pratiquement maintenu constant 30mn après application

➤ **Comparaison de l'effet des extraits totaux de *Khaya senegalensis* à l'effet de l'insuline.**

Nous remarquons que la courbe de l'effet des extraits de *Khaya senegalensis* à la concentration 5 µg/L et celle de l'effet de l'insuline semblent avoir une même cinétique. On pourrait penser à une similitude entre le mode d'action de l'insuline et celui des extraits à cette concentration. Le rôle de l'insuline dans la régulation de la glycémie est d'accélérer la dégradation du glucose pour la formation de l'ATP ou de stimuler l'entrée puis le stockage du

glucose sous forme de glycogène dans le foie. L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* a réduit la libération hépatique du glucose et cet effet est plus marqué avec cet extrait qu'avec une solution d'insuline à 2.5UI.

Notons que cette partie de nos travaux ont fait l'objet d'une publication :

PUBLICATION N°1 (voir Annexes)

Références : ¹Takin Marcellin, ¹AHOKPE Mélanie, **¹ZOHOUN Loica,**
²BABA-MOUSSA Lamine, ¹SEZAN Alphonse, **2013. «Effect of total *Khaya senegalensis* (*Meliaceae*) barks extracts on hepatic liberation of glucose». National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology | 2014 | Vol 4 | Issue 2 | 105 – 110**

3.2. Resultat partie ii : chronophysiole des extraits de *Khaya senegalensis* chez le rat wistar

3.2.1. Effet de l'administration unique des extraits de *Khaya senegalensis* sur les parametres biochimiques chez le rat.

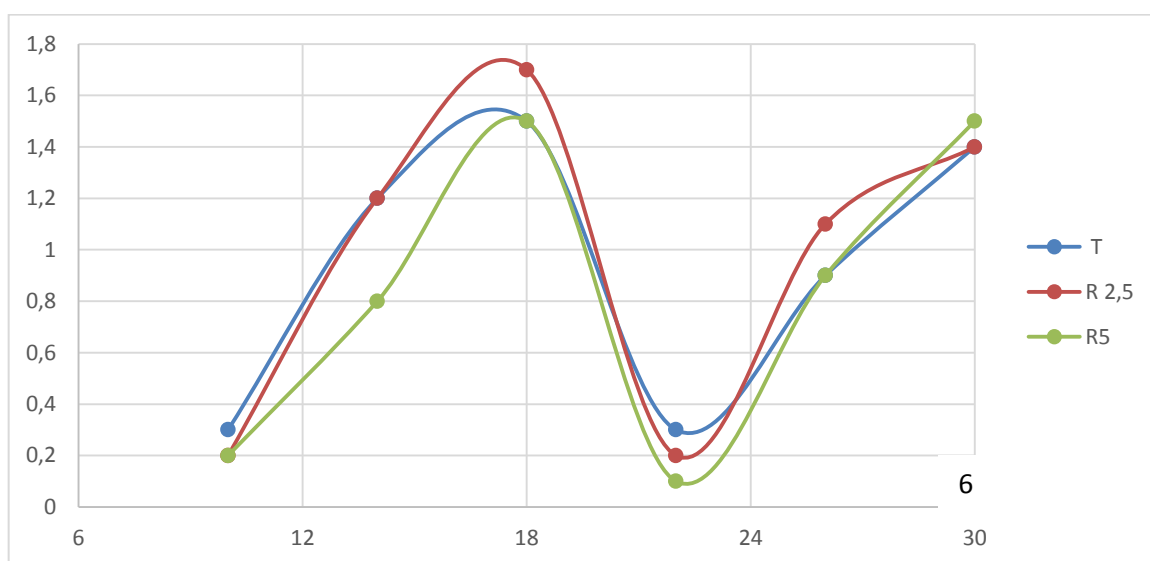
Dans cette partie nous présenteront les résultats en fonction de la moyenne par groupe de rats. Rappelons que nous avons trois groupes de rats :

- Le groupe des témoins ayant reçu que de l'eau distillée : T
- Le groupe des rats ayant reçu 2,5 mg de *Khaya* : R 2,5 mg
- Le groupe de rats ayant reçu 5 mg de *Khaya* : R 5 mg

3.2.1.1 Effet des extraits totaux de *k senegalensis* sur la liberation hepatique du glucose

Tableau XII: Variation des taux moyens de glycémie chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement.

Groupes	T	R 2,5mg	R 5mg
10h	0,3	0,2	0,2
14h	1,2	1,2	0,8
18h	1,5	1,7	1,5
22h	0,3	0,2	0,1
02h	0,9	1,1	0,9
06h	1,4	1,4	1,5



Graphe 8: Variation des taux moyens de la glycémie en fonction des heures de prélèvement.

Le Graphe 8 nous montre la variation des différentes glycémies chez les trois groupes de rats. Il ressort de ce graphe plusieurs constats :

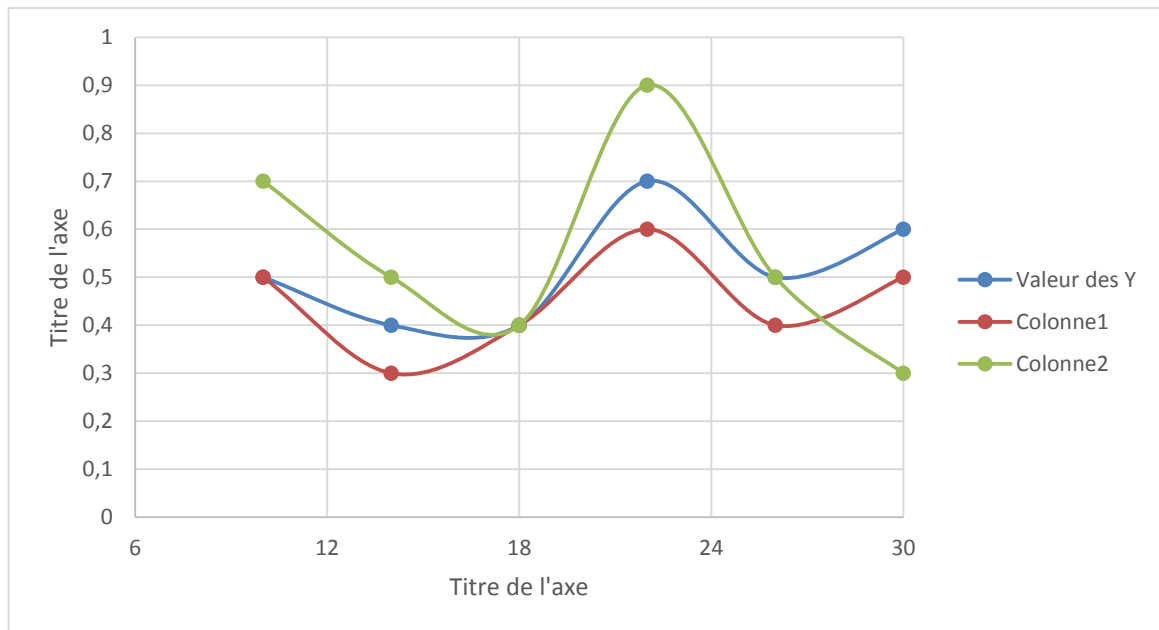
- Les trois courbes de variation de la glycémie ont la même allure générale
- Elles présentent toutes une augmentation des taux moyens de la glycémie de 10 h à 18 h et de 22 h à 06 h avec deux pics à 18 h et 06 h et une baisse des taux moyens de la glycémie de 18h à 22h.

Par ailleurs on remarque que la courbe R 2,5 celle qui représente les rats qui ont reçu 2,5 mg de *Khaya* est au-dessus de la courbe T des rats témoins qui n'ont reçu que de l'eau distillée. La courbe R5 des rats qui ont reçu 5mg de *Khaya* est celle qui est en dessous de toutes les autres courbes donc ayant les valeurs les plus basses de glycémie.

3.2.1.2 Effet des extraits totaux de *k senegalensis* sur la libération hépatique du cholestérol

Tableau XIII: Variation des taux moyens du cholestérol chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement

Groupes	T	R 2,5mg	R 5mg
Heures			
10h	0,5	0,5	0,7
14h	0,4	0,3	0,5
18h	0,4	0,4	0,4
22h	0,7	0,6	0,9
2h	0,5	0,4	0,5
6h	0,6	0,5	0,3



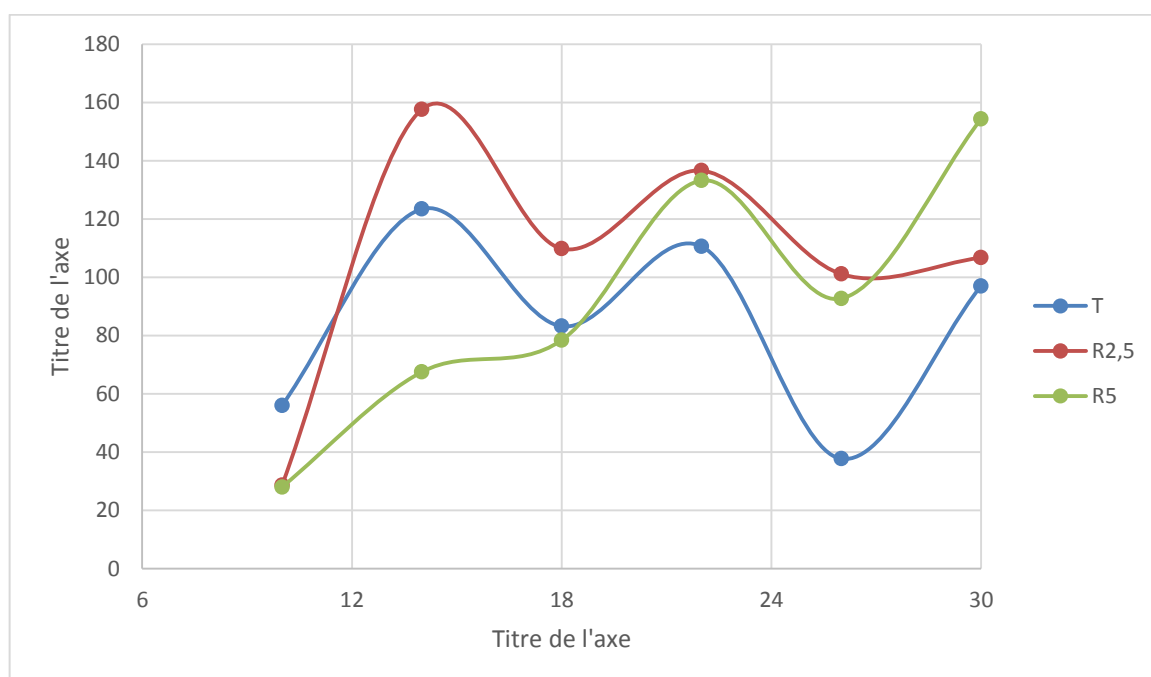
Graph 9: Variation des taux moyens du cholestérol chez les différents groupes de rats en fonction du des heures de prélèvement

Le Graphe 9 nous montre les variations des taux moyens de cholestérol au niveau de chaque groupe de rats. Les trois courbes ont toutes la même allure générale. La courbe T des témoins est au milieu des courbes R2,5 qui est en bas de toute les courbes et de la courbe R5 qui est au-dessus de toutes les courbes.

3.2.1.3 Effet Des Extraits Totaux De *K Senegalensis* Sur La Liberation Hepatique D'asat

Tableau XIV: Variation des taux moyens d'ASAT chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement

Groupes	T	R 2,5mg	R 5mg
10h	56	28,6	28
14h	123,4	157,6	67,6
18h	83,2	109,8	78,4
22h	110,6	136,6	133,2
2h	37,7	101,1	92,7
6h	97	106,7	154,3



Graphe 10: Variation des taux moyens d'ASAT chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement.

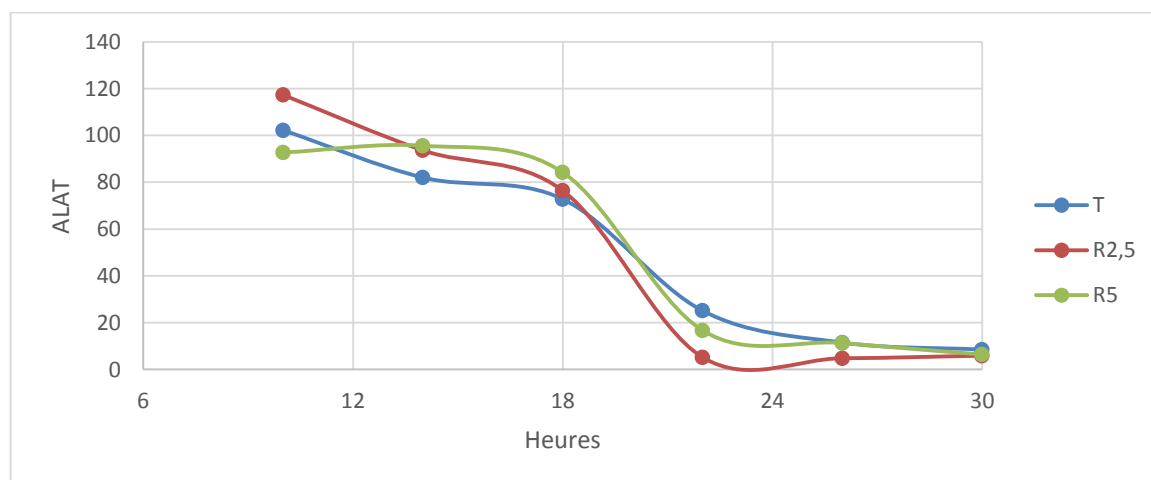
Le Graphe 10 nous montre les variations des taux moyens d'ASAT chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement.

Les courbes R2,5 et R5 des rats ayant reçu 2,5 mg et 5 mg de *Khaya* ont toutes la même allure générale que la courbe T des rats témoins pour les valeurs d'ASAT. Mais notons que la courbe R2,5 est au-dessus de la courbe T déjà à partir de T= 10 h jusqu'à T= 30 h alors que la courbe R5 est passée au-dessus seulement à T =18 h jusqu'à T = 30 h.

3.2.1.4 EFFET DES EXTRAITS TOTAUX DE *K SENEGALENSIS* SUR LA LIBERATION HEPATIQUE D'ALAT

Tableau XV: Variation des taux moyens d'ALAT chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement

Groupes Heures	T	R2,5mg	R 5mg
10h	102,2	117,3	92,7
14h	82	93,6	95,6
18h	72,8	76,4	84,2
22h	25,1	5,2	16,7
2h	11,5	4,8	11,3
6h	8,5	5,9	6,4



Graphe 11: Variation des taux moyens d'ALAT chez les différents groupes de rats en fonction des heures prélèvement

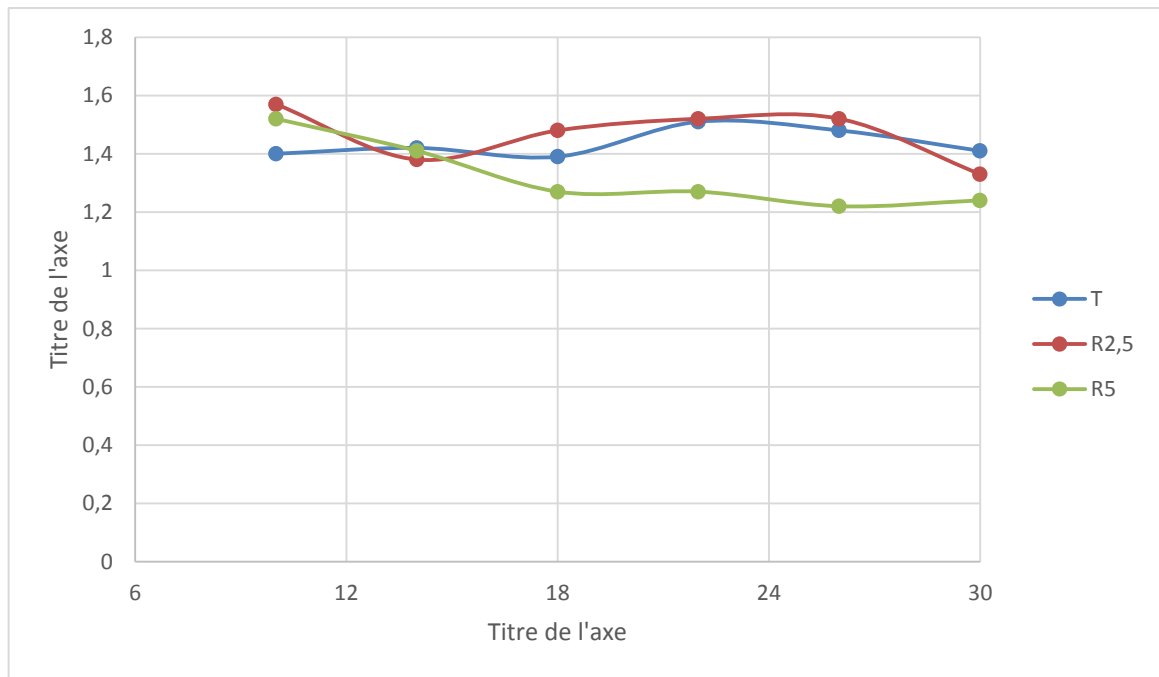
Le Graphe 11 nous montre les variations des taux moyens d'ALAT chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement.

Les courbes R2,5 et R5 des rats ayant reçu 2,5 mg et 5 mg de *Khaya* ont toutes la même allure générale que la courbe T des rats témoins pour les valeurs d'ALAT. Il est pourtant important de noter que de 09 H à 18 H la majorité des valeurs de R2,5 et R5 étaient au-dessus des valeurs de T et qu'après 18 H jusqu'à 30 H ces valeurs sont descendues en dessous des valeurs d'ALAT des rat témoins.

3.2.1.5 Effet des extraits totaux de *k senegalensis* sur la libération hépatique d'urée

Tableau XVI: Variation des taux moyens d'urée chez les différents groupes de rats en fonction du temps

Groupes Heures	T	R 2,5mg	R 5mg
10h	1,4	1,57	1,52
14h	1,42	1,38	1,41
18h	1,39	1,48	1,27
22h	1,51	1,52	1,27
2h	1,48	1,52	1,22
6h	1,41	1,33	1,24



Graphe 12: Variation des taux moyens d'urée chez les différents groupes de rats en fonction du temps

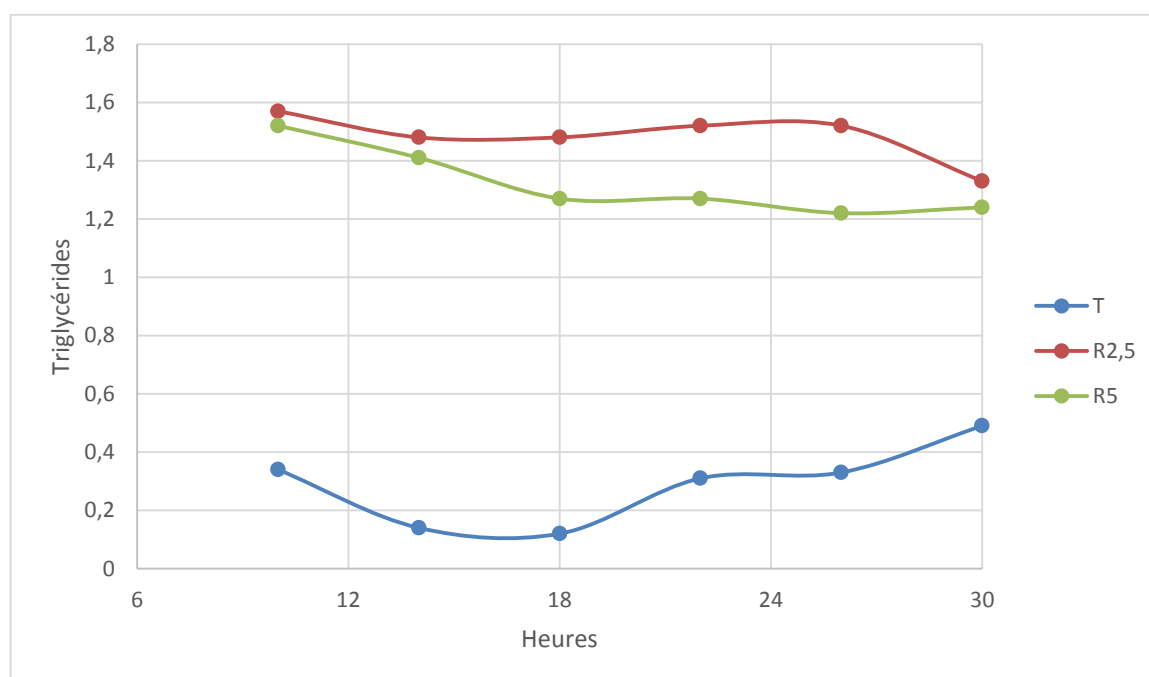
Le Graphe 12 montre la variation des taux moyens d'urée chez les différents groupes de rats en fonction du temps.

Il en ressort que les courbes R2,5 et R5 des rats ayant reçu 2,5 mg et 5 mg de *Khaya* ont toutes la même allure générale que la courbe T des rats témoins pour les valeurs d'Urée. Mais la courbe R5 des rats ayant reçu 5mg de *Khaya* ont des valeurs nettement au-dessous des valeurs de la courbe T des témoins déjà à partir de 14 H alors que pour la courbe R2,5 les valeurs sont pratiquement les mêmes que les valeurs du Témoin.

3.2.1.6 Effet des extraits totaux de *k senegalensis* sur la liberation hepatique du triglyceride

Tableau XVII: Variation des taux moyens de triglycérides chez les différents groupes de rats en fonction du temps

Groupes	T	R2,5	R5
10h	0,34	1,57	1,52
14h	0,14	1,48	1,41
18h	0,12	1,48	1,27
22h	0,31	1,52	1,27
2h	0,33	1,52	1,22
06h	0,49	1,33	1,24



Graphe 13: Variation des taux moyens de triglycérides chez les différents groupes de rats en fonction du temps

Le Graphe 13 montre la variation des taux moyens d'urée chez les différents groupes de rats en fonction des heures de prélèvement.

Il en ressort que les courbes R 2,5 et R 5 des rats ayant reçu 2,5 mg et 5 mg de *Khaya* ont toutes la même allure générale que la courbe T des rats témoins pour les valeurs d'Urée. Mais les courbes R 2,5 et R 5 des rats ayant reçu respectivement 2,5 mg et 5 mg de *Khaya* ont des valeurs très nettement au-dessus des valeurs de la courbe T des témoins.

La courbe R 2,5 est celle qui se trouve au-dessus de toutes les autres courbes et donc ayant les valeurs les plus élevées.

DISCUSSION PARTIE II

Rythme biologique des différents paramètres dosés

Rythme biologique de la Glycémie des rats

Le **Graphe 8** nous montre la variation des différents taux moyens de glycémies chez nos trois groupes de rats en fonction du temps. Il ressort de ce graphe plusieurs constats :

- Les trois courbes de variation de la glycémie ont la même allure générale
- Elles présentent toutes une augmentation des taux moyens de la glycémie de 10 h à 18 h et de 22 h à 06 h avec des pics à 18 h et 06 h.
- Elles présentent toutes une diminution des taux moyens entre 18 h et 22 h.

On pourrait donc retenir sur une base chronophysiologique que la glycémie des rats en 24 h suit la chronologie suivante :

- ✓ De 10 h à 18 h elle augmente pour atteindre un premier pic autour de 18h
- ✓ De 18 h à 22 h elle diminue pour atteindre sa valeur la plus basse autour 22 h
- ✓ De 22 h à 06 h nous avons une nouvelle augmentation et un nouveau pic autour de 06 h
- ✓ Et de 06 h à 10 h nous avons une nouvelle diminution pour être au plus bas vers 10 h.

La courbe de variation des différentes glycémies est donc une courbe cosinus ou cosinor avec une période, une amplitude, une acrophase, une batyphase et un mésor.

La période de ce cycle de variation de la glycémie est d'environ 12 heures. La glycémie évolue alors selon un rythme ultradien [51]. Il s'agit d'un cycle avec deux acrophases situées à 18 h et à 06 h ; et deux batyphases observées à 22 h et à 10 h.

Effet du rythme alimentaire des rats sur les variations de la glycémie

La variation ultradienne de la glycémie constatée serait en effet liée à la prise de nourriture qui est aussi ultradienne qu'à la variation jour/nuit ou lumière/nuit qui est plutôt circadien.

Plusieurs études [49 ; 50] dont celles de **BUISSART A. [51]** en 2013 avaient déjà prouvés que la prise alimentaire suit un rythme biologique ultradien alors que la variation du cycle éveil/sommeil suit plutôt un rythme circadien chez la plupart des mammifères et l'homme.

Il en résulte donc que l'augmentation de la glycémie chez les rats se produirait durant les périodes de forte activité alimentaire par contre la diminution se produirait durant les périodes de pause alimentaire et qu'elle n'est pas synchronisée avec le cycle éveil/sommeil.

Ce premier constat nous permet déjà penser que pour baisser de manière significative la glycémie des rats il serait préférable d'administrer le *Khaya* entre 10h et 18h et entre et 22h et 06h au moment où l'activité alimentaire des rats est la plus élevée.

Les rats se nourriraient donc aussi pendant la nuit et cette alimentation jouerait un très grand rôle dans la variation ultradienne de la glycémie que nous avons constatée.

Pourquoi un rythme ultradien pour la prise alimentaire des rats Wistar et non circadien ?

Le rythme alimentaire ultradien observé chez nos rats serait dû à une insuffisance de la nourriture donnée à nos rats.

Bertrand KAEFFER [66] en 2010 affirmait qu'en chrononutrition, il se dégage un principe valable pour tout mammifère : lorsque la nourriture est abondante, l'horloge centrale est prédominante et entraîne l'organisme sur l'alternance jour / nuit. Mais lorsque la nourriture est rare ou lorsqu'elle est disponible lors d'une fenêtre temporelle restreinte, beaucoup des rythmes circadiens endogènes des organes liés à la digestion se découplent des signaux en provenance de l'horloge centrale pour que la phase active de recherche de nourriture coïncide avec la disponibilité réelle. L'heure du repas au sens strict n'aurait pas d'effet (**Reinberg, 2003**) [67] ; par contre, la fréquence des repas et leur répartition dans la journée par rapport aux efforts demandés à l'organisme ont un effet certain, non seulement chez le rat mais aussi chez l'Homme lors de jeûne.

L'hypothèse selon laquelle l'alimentation serait un synchroniseur aussi puissant que l'alternance jour / nuit repose sur de nombreuses observations réalisées sur des rongeurs de laboratoire. Un des plus beaux exemples dans le domaine a été réalisé avec des rats transgéniques pour un des gènes principaux des horloges circadiennes, le gène *period1* (**Stokkan et al., 2001**) [68]. Lorsque des animaux sont soumis à une fenêtre temporelle qui leur donne accès à la nourriture uniquement pendant 4 h au cours de la phase lumineuse du cycle jour / nuit, des changements dans le profil circadien d'expression des gènes de l'horloge ont été constatés dans le foie et d'autres tissus périphériques mais pas au niveau des noyaux suprachiasmatiques. Les oscillations de *period1* dans les organes (foie par exemple) ne sont plus synchrones avec celles des noyaux suprachiasmatiques.

Ainsi, lorsque la nourriture est abondante, l'horloge centrale est prédominante et entraîne l'organisme sur l'alternance jour / nuit. Mais

lorsque la nourriture est rare ou lorsqu'elle est disponible lors d'une fenêtre temporelle restreinte (seulement le jour pour le rat qui mange la nuit) beaucoup des rythmes circadiens endogènes des organes liés à la digestion (le foie, par exemple) se découplent des signaux en provenance de l'horloge centrale pour que la phase active du mammifère permettant la recherche de nourriture corresponde à la disponibilité réelle. Les rats décalent leur journée pour suivre une rythmicité correspondant à la fenêtre d'accès à la nourriture.

En revanche, lorsqu'une restriction nutritionnelle est associée à une restriction calorique, c'est-à-dire lorsque des rats normaux reçoivent uniquement 50-60 % de leur consommation journalière de nourriture une seule fois par jour, le rythme

circadien de l'horloge centrale est également affecté comme l'indiquent les avances de phase aussi bien dans l'activité locomotrice que dans la température corporelle et l'expression de gènes [69;70].

Rythme biologique des autres paramètres biochimiques

Des Graphes 9,10,11,12 et 13 représentant respectivement la variation des autres paramètres biochimiques que sont le cholestérol, les transaminases ASAT ET ALAT, l'Urée et les Triglycérides. Il ressort une évolution non cyclique. Les autres paramètres biochimiques n'ont pas alors des courbes cosinus ou cosinor et leurs variations ne suivent pas un rythme particulier comme pour celle de la glycémie. On ne saurait donc évaluer leurs variations selon un rythme biologique circadien ou ultradien

3.2.2. Effets du *Khaya* sur la variation des différents paramètres : Chronopharmacologie du *Khaya*

Sur la Glycémie

Nous avons constaté que les trois courbes (celle des rats témoins qui n'ont reçu que de l'eau distillée et celle des rats qui ont reçu respectivement 2,5 et 5 mg/kg) ont toutes la même allure. Le *Khaya* à ces doses n'a donc pas modifié le rythme biologique de la glycémie chez les rats Wistar car il est connu que la mise en application des connaissances issues de la chronobiologie dans les domaines de la toxicologie ou pharmacologie a démontré que la prise de molécule médicamenteuse peut être à l'origine d'altération de rythmes biologiques [51].

Le **Graph 8** montre aussi que la courbe R2,5 qui représente les rats qui ont reçu 2,5 mg de *Khaya* est au-dessus de la courbe T des rats témoins qui n'ont reçu que de l'eau distillée ce qui veut dire que la glycémie de ces rats a augmentée. Par ailleurs la courbe R5 des rats qui ont reçu 5mg de *Khaya* est celle qui est en dessous de toutes les autres courbes donc ayant les valeurs les plus basses de glycémie. Ceci se conçoit par le fait que les extraits de *Khaya* ne baissent la glycémie qu'à partir d'une certaine dose en dessous de laquelle elles pourraient entraîner plutôt un effet contraire.

Le glucose a été mesuré pour chacune des concentrations des extraits de *Khaya senegalensis* et pour chaque instant par spectrophotométrie (la lecture se faire 500nm de longueur d'onde) en utilisant le réactif de GOD-PAP. Ceci est une méthode enzymatique basé sur l'oxydation du glucose. L'augmentation des taux moyens de la glycémie pourrait être expliquée par une activation de la glycogène synthase, de la glycogène phosphorylase, d'enzyme phosphatase et des molécules tels que l'ATP.

La diminution du taux peut être expliquée par la glycogène synthase phosphatase sous forme de glycogène inactivée. Ce qui entraîne l'activation de la glycogène phosphorylase par phosphorylation (contribution d'ATP).

Par ailleurs malgré l'administration unique de *Khaya* en début de journée à 9 h la courbe R5 des rats ayant reçus 5mg de *Khaya* est restée en dessous de la courbe T des rats témoins pendant toute la journée. Ce qui veut dire que la seule et unique dose journalière administrée le matin a été suffisante pour maintenir les valeurs de la glycémie en dessous des valeurs normales du témoin durant toute la journée malgré que les rats se soient alimentés deux fois dans la journée.

Les études visant à optimiser le moment de prise de *Khaya* n'ont jamais été réalisées auparavant. **Mais nous constatons dans cette étude que comme pour certains antidiabétiques oraux comme la metformine et les sulfamides hypoglycémiant [61], le pouvoir hypoglycémiant de l'insuline étant plus marqué dans la matinée, il serait préférable de conseiller une prise de *Khaya* le matin au moment du petit déjeuner. Cependant, il conviendra de bien conseiller aux patients qui ne mangent pas suffisamment le matin, soit de changer leurs habitudes, soit de déplacer la prise le midi au moment du repas.**

Des études se sont intéressées à différents schémas d'administration des antidiabétiques oraux qui agiraient comme le *Khaya* (une prise quotidienne versus plusieurs prises par jour pour la même dose), mais aussi à l'articulation de leur prise autour des repas (répercussion pharmacocinétique d'une prise pendant le repas). Ainsi une étude de 2007, réalisée par **Matsuki et coll. [71]** a montré que la prise unique de glimépiride (2 mg) se révèle aussi efficace que la même dose administrée en deux fois dans la journée (1 mg matin et 1 mg soir). Dans cette étude la prise se faisant juste avant le petit déjeuner.

Les mêmes conclusions ont été retrouvées dans une étude concernant le glibenclamide. **Wan Mohamad et coll.[72]** ont en effet conclu qu'une prise

uniquotidienne induit la plupart du temps une meilleure observance de la part des patients, donc à terme un meilleur contrôle de la maladie et ce en l'absence d'effets secondaires supplémentaires.

Notre hypothèse de départ concernant l'efficacité du *Khaya* dans la baisse de la glycémie journalière lorsqu'elle est administrée à une certaine heure de la journée (09H ou le matin) se retrouve être totalement vérifiée et devrait donc prendre en compte aussi la dose de *Khaya* (Supérieure ou égale à 5mg).

Sur les autres paramètres biochimiques

Les autres paramètres biochimiques que sont le Cholestérol, les transaminases ASAT et ALAT, l'Urée et les Triglycérides n'ont pas présentés une variation rythmique biologique. Ils n'ont donc pas de valeurs réelles en ce qui concerne la chronophysiologie et la chronopharmacologie. Par conséquent nous n'allons pas discourir à leurs sujets.

Notons que cette partie du travail a fait aussi l'objet de Publication

ZOHOUN LOICA, AHOKPE MELANIE, KANGBETO ROLAND, GBENOU JOACHIM AND SEZAN ALPHONSE. Chronophysiology of Wistar rat under extracts from *Khaya senegalensis*. International Journal of Science and Research (JSR) ISSN (online) 2319-7064.

CONCLUSIONS GENERALES

Au Bénin, 80% environ de la population recourent à la médecine traditionnelle pour les besoins de santé. Celle-ci tient une place majeure dans le traitement du diabète.

Nos travaux ont permis de montrer que l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* est riche en composés polyphénoliques qui pourraient lui conférer des propriétés anti radicalaires ce qui aurait pu justifier les usages thérapeutiques multiples de cette espèce végétale. Les extraits totaux de *Khaya* entraîneraient une baisse de la libération hépatique du glucose et cet effet serait plus marqué à partir de 5mg/kg. Donc une meilleure connaissance de cette plante pourrait effectivement servir dans les thérapeutiques antidiabétiques. Malheureusement un usage prolongé (30 jours) de l'extrait altère de manière significative le système anti oxydant fondamental de l'organisme vivant (le système G6PDH, NAD⁺), ce qui prédisposerait des organes vitaux tels que le foie et le rein au stress oxydatif cellulaire lequel s'est traduit par quelques altérations histologiques de ces organes.

Par ailleurs l'administration du *Khaya* en dose unique de 5mg/kg le matin ou juste le repas du matin suffirait pour garder la glycémie a des valeurs basses durant toute la journée d'après notre étude. Ainsi cela pourrait induire la plupart du temps une meilleure observance de la part des patients, donc à terme un meilleur contrôle de la maladie et ce en l'absence d'effets secondaires supplémentaires.

Nouveau champ de recherche multidisciplinaire, la chronobiologie ouvre des perspectives n'ayant pas toujours une déclinaison pratique immédiate. Elle est d'abord un outil de compréhension du vivant et de son environnement.

Dans le domaine de la médecine, la chronobiologie couvre un large champ dont les retombées cliniques commencent à s'insinuer dans les pratiques :

- réalisation des dosages biologiques, notamment hormonaux, à un horaire précis de la journée pour en fiabiliser les résultats, tant on sait que les fluctuations peuvent parfois varier à 200% selon l'heure,

- adaptation des tests de stimulation ou de freination à la périodicité sécrétoire spécifique d'un organe, affinant l'interprétation des anomalies dépistées,

- analyse des troubles fonctionnels organiques, contribuant à l'élaboration de nouveaux concepts physiopathologiques comme dans certaines céphalées, dépressions ou hypertensions artérielles,

- chronomodulation thérapeutique qui ouvre de nouvelles perspectives : diabétiques et insuffisants surrénaliens en profitent pleinement mais certaines pathologies cancéreuses, respiratoires, cardiovasculaires et psychiatriques en bénéficient partiellement.

Qu'il s'agisse de recherches biochimiques fondamentales ou d'explorations pratiques par l'industrie pharmaceutique, il est probable que l'intégration du temps dans la perception du corps humain soit l'une des grandes voies ouvertes à la phytothérapie et médecine de demain.

PERSPECTIVES

A l'issue de cette étude nous envisageons approfondir les recherches, à travers des études fondamentales en collaboration avec les spécialistes médicaux pour une meilleure exploitation de la médecine traditionnelle et des plantes médicinales comme le *Khaya* afin d'en faire un véritable médicament amélioré. L'utilisation des données chronophysiologiques et chronopharmacologiques pourraient en effet réduire de manière considérable la toxicité cette plante et en améliorer l'usage.

Il serait intéressant, à terme, que les résultats de ce travail et des autres à venir puissent s'inscrire dans un programme d'éducation thérapeutique du patient. On pourrait très bien envisager un ou deux rendez-vous thérapeutiques annuels lors desquels le patient et son tradithérapeute tenteraient de faire un point sur le moment de prise de l'extrait de *Khaya*. Des rappels pourraient être faits ainsi qu'une optimisation s'adaptant le mieux possible à la vie du patient.

De plus, cette optimisation de l'administration s'inscrira dans un travail de collaboration tradithérapeutes et pharmaciens/médecins/infirmières et nécessitera un suivi régulier.

REFERENCES

1. **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Rapport mondial de l'OMS sur le diabète (Avril 2016).
2. **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE** – Profils des pays pour le diabète, 2016.
3. **EDDOUKS M, OUAHIDI M.L, FARID O. ET AL.** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc.
4. **TAKIN M, AHOKPE M, ZOHOUN L, ASSOUE E, AIVODJI N, AGOSSOU E ET SEZAN A. (2013).** EFFECT OF TOTAL *KHAYA SENEGALENSIS* (MELIACEAE) BARKS EXTRACTS on hepatic liberation of glucose. National Journal of Physiology & Pharmacology, 2(4):105-110.
5. **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>
6. **OBAFÈMI A. LALEYE, H. AHISSOU, A. P. OLOUNLADE , E.V. ZANDO , A. LALEYE.** Etude bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore béninoise: *Khaya senegalensis* (Desr) A. Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae)
7. **ERIC MARSAUDON.** « La chronobiologie, une conception dynamique du fonctionnement corporel », Les Tribunes de la santé 2006/4 (no 13), p. 39-44.
8. **KOUKOUÏ A.S.I. Omédine.** Etude 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 ; 169p

9. MOUMOUNI, A. M. Les travaux des recherches forestières et les essais d'éclaircies dans les plantations de teck de **Djigbé**, d'Agirneyet de Toffo. Mémoire de fin d'étude C P U M 1980 ; 99 p.

10. MARCELLIN COKOU TAKIN, S. ATTINDEHOU, A. SEZAN, S. E.ATTAKPA1, L. BABA-MOUSSA, 2013.Bioactivity, therapeutic utility and toxicological risks of *Khaya senegalensis*.Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, 2013;1(4):122-129.

11. CUNY P, SANOGO S. Espèces forestières locales : Phénologie et semis direct en zone soudanienne (sud du Mali). Revue Le Flamboyant No 47 Novembre 1998 ; 2630

12. GUYTON A.C. Tratato de Fisiologia Médica, TomoII. Sépcima edicion pages 804-805

13. DJODJOUWIN L. Etude des techniques de régénération du caïlcédrat (*Khayasenegalems*Juss.) et de l'acajou à grandes feuilles (*Khaya grandifoliola* D C.) dans les forêts dégradées de la région de Bassila (République du Bénin). Thèsed'ingénieur agronome. FSA, 1990 ; 169p.

14. LOMPO M (1993). Etude pharmaco-toxicologique chez la souris et le rat de *Khayasenegalensis* (Desr) A. Juss utilisé en tradithérapeutique au Burkina Faso 6-127.

15. CAVENTOU E (1849). Recherches chimiques sur l'écorce du Caïlcédrat. Pharm. Chim., 16:355-362.

16. DUVEAU N. M. (1856). De l'écorce de Caïlcédrat (*Khayasenegalensis*) et de l'emploi de ses préparations comme succédané du quinquina. Thèse diplôme Phann. Paris.

17. PARES Y., ANDRE M., NDOYE S., LEYE G. (1979). Etude des plantes utilisées en médecines traditionnelles africaines pour le traitement de la lèpre. 4ème Colloque du CAMES. Libreville (GABON), 65.

18. NJOKU C., OKUWASABA F.K., ISIGUZE G.O., UZOIGWE N.R., KEKU T.O., DADAH A.J., MAIDERI M. (1988). «Local Medicinal Plants in Health Care System in Parts of Plateau State, Nigeria, 1. Plant Extracts Used in the Treatment of Gastrointestinal Disorders», A Paper presented in the 4th Annual Conference of the Biotechnology Society of Nigeria, Von, Jos Nigeria. 22-23.

19. OLAYINKA A.O., ONORUVWE O., UDOH F.V., LOT T.Y. (1994). Effect of *Khaya senegalensis* Purinergic Transmission in the Rat Bladder. International Journal of Pharmacognosy, 32 (4),346-351.

20. KERHARO J., ADAM J.G. (1974). La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle: Plantes médicinales et toxiques. Edition Vigot frères. Paris, 3-545.

21. TIDJANI M.A., DIENG C., FAYE B., DIOUF A. (1993). Etude de l'activité anti-inflammatoire de *Khaya senegalensis* (A. Juss.), in vivo. Plantes médicinales et Phytothérapie, 26 (4), 404-409.

22. LOMPO M., GUISSOU J.P., SOME N. (1995). Effet hypothémissant et toxicité général aiguë chez la souris de l'extrait aqueux des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. (MELIACEAE). Rev. Méd. Pharm. Afr., 9 (2),97-106.

23. KOLAWOLE SO, KOLAWOLE OT, AKANJI MA (2011). Effect of aqueous extract of *Khaya senegalensis* stem bark on biochemical and haematological parameters in rats. Journal of pharmacology and Toxicology, 1-6.

24. SULE MS, ABDULRAHEEM RB AND AMINU BM (2008). Potency of aqueous stem bark extract of *Khaya senegalensis* against liver diseases in rats. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 1(1): 29-31.

25. KAROU D, DICKO MH, SIMPORE J AND TRAORE AS (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. Afr. J. Biotechnol., 4: 823-828.

26. CHIEZEY NP, GEFU JO, JAGUN AG, ABDU PA, ALAWA CBI, MAGAJI SO, ADEYINKA IA et al. (2000). Evaluation of some Nigerian plants foranthelmintic activity in young cattle. Proceedings of the International Workshop on Ethnoveterinary Practical, 14-18 August, Kaduna, Nigeria.

27. IBRAHIM MA, NJOKU GC AND SALLAU AB (2008). In vivo activity of stem barks aqueous extract of *Khaya senegalensis* against *Trypanosoma brucei*. Afr. J. Biotechnol., 7: 661- 663.

28. UMAR IA, WUROCHEKKE AU, GIDADO A AND IGBOKWE IO (1999). Effects of combined parenteral Vitamins C and E administration on the severity of anaemia, hepatic and renal damage in *Trypanosoma brucei*. Vet. Parasitol., 85: 43-47.

29. KONATE K, KIENDREBEOGO M, OUATTARA MB, SOUZA A, LAMIEN-MEDA A, NONGASIDA Y, BARRO N, MILLOGO RASOLODIMBY J AND NACOULMA OG (2011). Antibacterial potential of aqueous acetone extracts from five medicinal plants used traditionally to treat Infectious Diseases in Burkina Faso. Current Research Journal of Biological Sciences 3(5): 435 – 442.

30. ANDROULAKIS XM, MUGA SJ, CHEN F, KOÏTA Y, TOURE B AND WARGOVICH MJ (2006). Chemopreventive Effects of *Khaya*

senegalensis Bark Extract on Human Colorectal Cancer. Anticancer Research, 26: 2397-2406.

31. AYO RG, AUDU OT AND AMUPITAN JO (2007). Physicochemical characterization and cytotoxicity studies of seed extracts of *Khaya senegalensis* (Desr.). African Journal of Biotechnology, 6(7): 894-896.

32. ABUBAKAR MG, LAWAL A AND USMAN MR (2009). Hepatotoxicity studies of sub-chronic administration of aqueous stem bark of *Khaya senegalensis* in Albino rats. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 3(1): 26-28.

33. ADEBAYO JO, YAKUBU MT, EGWIM EC, OWOYELE VB AND ENAIBE BU (2003). Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. Journal of Ethnopharmacology, 88: 69-72.

34. LOMPO M., OUEDRAGO S., SOURABI S., GUISSOU I.P., Valorisation d'une plante médicinale anti-inflammatoire Pharm.MM.Trad.Afr, **1998** ; Vol.10,pp.68-79.Université de Ouagadougou

35. WOLFENSOHN S., LLOYD, M., Handbook of laboratory animal: Management and Welfare -2nd Edition, **1998**; Section 2, 179-184.

36. KOUKOUI A.S.I.O. Etude des Signaux Calciques Hépatocytaires Induits par Différents Agonistes Modulateurs De La Sécrétion Biliaire Et De La Production Hépatique Du glucose: Acides Biliaire, Prostaglandine Et Glucagon. Thèse de Doctorat soutenue le 22 Novembre; Université de Paris XI ORSAY, **2005**; PP 1-16

37. HARKNESS, J.E., The biology and medicine of Rabbits and Rodents 4 Edition-Philadelphie: Lea and Febiger, 1994; pages 65-73,93-96,130-136

38.NWOSU CU, HASSAN SW, ABUBAKAR MG AND EBBO AA (2012). Anti-diarrhoeal and toxicological studies of leaf extracts of *Khaya senegalensis*. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 7(1): 1-10.

39.YAKUBU MT, ADEBAYO OJ, EGWIM EC AND OWOYELE VB (2005). Increased liver alkaline phosphatase and aminotransferase activities following administration of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* stem bark to rats. *Biokemistri*, 17(1): 27-32.

40.ALI SAM, ELBADWI SMA, IDRIS TM AND OSMAN KM (2011). Hepatoprotective activity of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark in rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(24): 5863-5866.

41.PURI A, SAXENA R, SAXENA RP, SAXENA KC, STRIVASTAV V AND TANDON JS (1993). Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod.*, 58: 995-999.

42.SABLASSOU K, AKLIKOKOU AK AND GBEASSOR M (1998).Activité anti-contracturante de l'extrait de *Khaya senegalensis* sur l'iléon de cobaye. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 10: 3-15.

43.NELSON D.L., COX M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Ed. W H Freeman and Co. Ltd, 4 th edition, Newyork.p. 881-901.

44. CAPEAU J, DESBOIS-MOUTHON C, MAGRE J, CARON M, VIGOUROUX C, LASCOLS O, CHERQUI G (1996). Mécanisme moléculaires et cellulaires de l'action de l'insuline. Application à la physiologie et à la pathologie. *Nutr. Clin. Métabol*, **10**; 231 - 242.

45. OBERLEY LW. 1988. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 5: 113-124.

46. KAHN B.B., 1992. Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest.*, 89: 1367-71.

47. WANG Y, KOLE HK, MONTROSE-RAFIZADEH C, PERFETTI R, BERNIER M, EGAN JM. 1997. Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1

48. JUBINVILLE FERNANDE, *Notes de cours d'Histologie II*, Cégep de Saint-Jean-sur-Richelieu, 1980.

49. NGUYEN B. De la chronobiologie à la chronothérapie antihypertensive: les notions de base de la chronobiologie et son application dans le traitement de l'hypertension artérielle. [Thèse d'exercice]. [Nancy, France]. Université de Nancy I; 2001.

50. REINBERG A. Des rythmes biologiques à la chronobiologie. Gauthier-Villars; 1979

51. BUISSART A. Le conseil officinal dans le bon usage des médicaments à visée anti-hypertensive : Chronothérapie et optimisation thérapeutique. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Lille 2 ; 2013.

52. LABRECQUE G, SIROIS-LABRECQUE M. Chronopharmacologie: rythmes biologiques et administration des médicaments. PUM; 2003.

53. MOYSE-MIGNON H (1942). Recherches sur quelques Méliacées africaines et sur leurs principes amers. Université de Paris. France. Thesis, 112p.

54. BONNY O, FIRSOV D. L'importance des rythmes circadiens en pratique clinique. *Schweiz Med Forum* ; 2012 ; Vol 12(45) ; 879-881.

55. BRUGUEROLLE B. Chronopharmacologie: importance du moment d'administration des médicaments. Collection les grands médicaments, Ellipses; 1984.

56. REINBERG A, LABRECQUE G, SMOLENSKY MH. Chronobiologie et chronothérapie: Heure optimale d'administration des médicaments. Flammarion médecine-sciences; 1991

57. BRUGUEROLLE B. Rythmes biologiques et médicaments : une source de variabilité souvent négligée en pharmacologie. *Annales Pharmaceutiques Fr* ; 2008 ; Vol 66 : 185-190.

58. BRUGUEROLLE B. *Chronopharmacocinétique des médicaments.*
Revue française des laboratoires; Octobre 1998 ; N°306.

59. POITEAUX D. *De la chronobiologie à la chronothérapie à propos de l'asthme* [Thèse d'exercice]. [Lille, France]: Université du droit et de la santé; 1998.

60. HASLER C, BURNIER M. Rythme circadien de la tension artérielle et chronothérapie : Hypertension. Médecine Hygiène. 2003 ; Vol 61(2449):1694-1698.

61. BOUCHERIT M. Chronobiologie : Mise en place d'une base de données sur l'optimisation de prise des médicaments. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université d'Angers ; 2013.

62. GAGLIARDINO JJ, HERNANDEZ RE, REBOLLEDO OR. Chronobiological aspects of blood glucose regulation: a new scope for the study of diabetes mellitus. *Chronobiologia*. 1984;11(4):357-79.

63. GIBSON T, STIMMLER L, JARRETT RJ, RUTLAND P, SHIU M. Diurnal variation in the effects of insulin on blood glucose, plasma non-esterified fatty acids and growth hormone. *Diabetologia*. 1975;11(1):83-8.

64. DEL PONTE A, CAPARI F, DOMANI A. Diurnal variation of hypoglycemic action of insulin in diabetics. *Chronopharmacology*, Pergamon Press, Oxford. 1979;311-4.

65. MIROUZE J, SELAM JL, PHAM TC. Le pancréas artificiel extra-corporel: nouvelle orientation du traitement insulinique, XIVe Congrès Internat. Thérapeutique, Montpellier, Expansion Scientifique, Paris. 1977;79-91.

66. KAEFFER B. Alimentation et rythmes circadiens. Lettre scientifique IFN n° 144 - mai 2010. ISSN 1629-0119.

67. REINBERG AE. (2003) Chronobiologie médicale, Chronothérapeutique. Médecine-Sciences Flammarion p 298.

68.STOKKAN KA, YAMAZAKI S, TEI H, SAKAKI Y, MENAKER M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.

69.CHALLET E, CALDELAS I, GRAFF C, PEVET P. (2003)Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol Chem* 384: 711-719.

70.MENDOZA J, DREVET K, PEVET P, CHALLET E. (2008) Daily Meal Timing is Not Necessary for Resetting the Main CircadianClock by Calorie Restriction. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 251-260.

71.MATSUKI M, MATSUDA M, KOHARA K, SHIMODA M, KANDA Y, TAWARAMOTO K, ET AL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glimepiride in type 2 diabetic patients: compared effects of once- versus twice-daily dosing. *Endocr. J.* 2007;54(4):571–6.

72.WAN MOHAMAD WB, TUN FIZI A, ISMAIL RB, MAFAUZY M. Efficacy and safety of single versus multiple daily doses of glibenclamide in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2000;49(2-3):93–9.