REPUBLIQUE DU BENIN

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

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

LABORATOIRE DE BIOMEMBRANES ET SIGNALISATION CELLULAIRE

ECOLE DOCTORALE PLURIDISCIPLINAIRE « ESPACE, CULTURES ET DEVELOPEMENT »

THESE DE DOCTORAT N°

Discipline : Physiologie
Spécialité : Pharmacologie

Présentée par :

Kaï Sidoine-Eudoxie ASSOU

Action de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. Meliaceae sur l'organisation structurale des membranes des hépatocytes de rats : Evaluation de la toxicité

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat de l'Université D'Abomey-Calavi
Soutenue publiquement le : 27 Juillet 2015
Devant le jury composé de :

Président : Professeur **Brice SINSIN**, Professeur Titulaire. Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Rapporteur : Professeur **Lamine Saïd BABA-MOUSSA**, Professeur Titulaire. Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Rapporteur : Docteur **Tchadjobo TCHACONDO,** Maître de Conférences. Université de Lomé (Togo)
Rapporteur : Docteur **Aly SAVADOGO,** Maître de Conférences. Université de Ouagadougou (Burkina- Faso)

Directeur de thèse : Professeur **Alphonse SEZAN**, Professeur Titulaire. Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

DEDICACE

Du plus profond de mon cœur, je dédie cette œuvre à : **MES PARENTS : Symphorien et Bernadette ASSOU.**

Vous avez consenti beaucoup de sacrifices pour mon éducation et ma formation.

MERCI POUR VOTRE AMOUR ET POUR VOTRE SOUTIEN. QUE DIEU VOUS BENISSE !

Remerciements

Je remercie tous les membres du Jury :

Le **Président du jury**, pour ce grand honneur que vous me faites en présidant ce jury de soutenance de Doctorat malgré vos lourdes responsabilités. Je vous en suis gré et je vous prie de recevoir l'expression de ma très respectueuse sympathie.

Le Professeur **Lamine Saïd BABA-MOUSSA**, qui a spontanément accepté d'être également rapporteur de cette Thèse.

Les **Drs Tchadjobo TCHACONDO** et **Aly SAVADOGO**, qui ont accepté la tâche pénible d'être rapporteurs de cette thèse

INFINI MERCI A VOUS TOUS!

Je tiens sincèrement à dire un mot à l'endroit de ceux et celles dont l'existence a nourri la mienne et sans qui le bonheur que je ressens ne serait à ce point. Nombreux êtes vous à avoir contribué à mes succès notamment à la réussite de cette thèse : recevez tous mes remerciements et accepter mes sentiments de gratitudes à votre égard.

A l'administration de la Faculté des Lettres, Arts et des Sciences Humaines de l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire j'adresse mes remerciements pour leur encadrement et leur accompagnement.

Professeur Alphonse SEZAN, Professeur Titulaire en Biochimie / Biologie Cellulaire à la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin).Directeur du Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, laboratoire dans lequel les travaux ont été réalisés, vous m' avez suggéré ce travail, et guidé pour son élaboration. Votre rigueur scientifique, ainsi que le travail bien fait sont tant de valeurs qui nous ont impressionnées et insitées à aller au bout du travail. Merci.

Professeur **Alphonse SEZAN**, merci parce que vous m'aviez fait confiance en acceptant de m'accueillir dans votre équipe.

Mon Directeur de cette thèse de Doctorat : en sollicitant votre direction pour mon mémoire de Maîtrise, vous m'avez dit ceci : « De toi je ferai la différence, une référence…. » Et nous voici faisant notre petit bonhomme de chemin. Professeur, en espérant qu'on ira encore plus

loin ensemble dans la recherche, recevez mes sincères remerciements pour tous vos enseignements, vos conseils d'homme averti et votre rigueur scientifique sans lesquels je ne saurais voir ce jour. Que Dieu vous bénisse et vous comble au-delà de vos attentes.

Vous aussi qui avez accepté avec spontanéité d'accompagner le professeur dans son ambition malgré vos multiples occupations, soyez en gratifié.

TROUVEZ ICI, L'EXPRESSION DE NOTRE PROFONDE GRATITUDE !

Aux Professeurs J. GBENOU, LAMINE Said BABA-MOUSSA , Marcel SENOU j'adresse mes sincères gratitudes pour nous avoir guidé dans la réalisation de ce travail, et pour les nombreux conseils.

Aux Professeurs Hyacinthe AHISSOU et LALEYE Anatole, je dis un sincère merci **p**our leurs soutiens et leurs conseils.

Aux enseignants qui ont fait de nous les adeptes de la science depuis la maternelle en passant par le primaire, le secondaire puis ceux de l'Université d'Abomey-Calavi spécialement aux Docteurs Eugène S. ATTAKPA , Mélanie AHOKPE, Ganiou YESSOUFOU, TAKIN C. Marcellin, Justin BEHANZIN, Laetitia MITCHODJEHOUN et Omédine KOUKOUI, je dis merci pour m'avoir montré le chemin, avoir partager avec moi vos connaissances et vos conseils.

A mes aînés Mouléro Marcellin, hugues Tchoukpa, Mr. Jèrome ACAKPO, et Me ZOHOUN, Brice F. K. pour leur disponibilité , pour tout les nombreux aides et soutiens, je dis toutes mes gratitudes

Aux étudiants de la formation licence et Master de Physiologie et Applications, aux membres du laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, à tout le personnel du laboratoire de Biologie et de typage Moléculaire en Microbiologie, aux responsables du laboratoire de Pharmacognosie et des huiles essentielles et aux différentes équipes de recherche ainsi qu'à tout le laboratoire de Cytogénétique j'adresse toutes mes gratitudes pour leur contribution à la réalisation du travail.

Au Révérend **Père Roger MEDJI,** je dis infiniment merci pour tout ce qu'il a pu faire pour moi

A mes sœurs et frères : Mireille, Huguette, Cendra, Igor, Freddy et Michael.

A mes nièces Magnificat et conceptia, à mon neveux Pio -Urièl et Charbel.

A mes cousins et cousines

A la famille OMYALE, SONON, GNELE, MAKIN, AGNIWO, SEZAN puis à toutes familles proches de la famille ASSOU et KLOUBOU,

Je présente mes sentiments fraternels et je dis merci pour le soutien

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, j'adresse ma profonde gratitude et ma reconnaissance.

A vous : Messieurs Guy Médard ALAPINI, Charles HOUNWANOU, Honnoré, Marius Adjabga, Richard FEHICHITANT, Fidel ASSOGBA et Mme Marthe ZINSOU, pour votre disponibilité et votre détermination à la bonne réalisation de ce travail je prie *Dieu de vous bénir et de vous combler de ses grâces.*

A vous les frères et sœurs du groupe liturgique de la Pastorale des malades , de la chorale « Petit David » de Lobozounkpa, les amis du renouveau des jeunes et la fraternité Maranatha d'Atrokpocodji, mes camarades de promotion, Messieurs Odilon KOTTO, Thibault Djibodé, Carlos Da- Costa, frank Sossou, Régis AZON, Honnorat ASSEVY, aux familles Bokossa, Gbaguidi, Mahussi, les ami (s) (es) notamment Patrick GBEGBE, Edith HOUNYE, Cyran AIZAN, Essé, Orianne, Bénédicte, Mirabelle, Laetitia, Nadine, Noelie, Synélia, Francisca, ABIKO, Prisca, ulrich, Djaharatou, Hermione, Agnès, Pélagie, Estève Boris, Arnaud Gouda, Adjaka Mathurin etc... Enfin, à vous dont je n'ai pas pu citer les noms, j'adresse mes sincères remerciements et présente mes a*mitiés profondes !*

QUE DIEU VOUS BENISSE TOUS ET VOUS ACCOMPAGNE DANS LA GRANDEUR DE VOS OEUVRES!

TABLE DES MATIERES

DEDICACE i
REMERCIEMENTS ii
PUBLICATIONS ix
LISTE DES PHOTOS x
LISTE DES TABLEAUX xi
LISTE DES FIGURES xii
LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES xiv
RESUME xvi
ABSTRACT xix
INTRODUCTION 1
I. Synthèse bibliographique 4
I.1. Bref aperçu sur *Khaya Senegalensis* A. Juss (Meliaceae) 4
I.1.2. Propriétés chimiques 5
I.2. Le lapin 6
I.2.1. Origine du lapin 6
I.2.2. Description du lapin 6
I.2.3. Nutrition du lapin 7
I.2.4. Comportement de cæcotrophie 7
I.3. Le métabolisme glucidique 8
I.3.1. Métabolismes lipidiques 9
I.3.2. Sels biliaires 10
I.3.3. Lipase pancréatique. 10
I.4. LES RATS DE LABORATOIRE : SOUCHE « WISTAR » 11
I.5.LE DIABETE 12
I.5.1. Différents types de diabète 13
I.5.1.1. Diabète du type I ou diabète insulinodépendant (DID) 13
I.5.1.2. Diabète du 2ème type ou Diabète non insulinodépendant (DNID) 14
I.5.2. Régulation de la glycémie 15
I.5.2.1 Rôle du pancréas et de l'insulino-sécrétion 15
I.5.2.2.Rôle du foie 17
I.5.2.3. Rôle du rein 18
I.6. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité 19
I.7.Inventaire des constituants cellulaires 20
I.7.1. Diversités des lipides 20
I.7.2. Structure des lipides membranaires 21

I.7.2.1. Acides gras 21
I.7.2.2. Phospholipides.....22
I.7.2.3. Stérols.....25
I.7.2.4.Glycolipides.....25
I.7.2.5. Diversité des protéines.....26
I.7.2.5.1. Protéines Intrinsèques 26
I.7.2.5.2. Protéines Périphériques ou Extrinsèques 27
I.7.2.5.3. Protéolipides (protéines ancrées dans la membrane par l'intermédiaire d'un lipide) 27
I.7.2.5.4. Glycoprotéines.....27
I.7.2.6. Diversité des glucides 28
I.8. LE FOIE.....28
I.8.1. Organisation architecturale du foie.....28
I.8.1.1. Morphologie du foie 28
I.8.1.2. Anatomie du foie.....28
I.8.1.3. Segmentation du foie 29
I.8.1.4. Vascularisation du foie 29
I.8.1.5. Voies biliaires attachées au foie.....30
I.8.1.6. Innervation du foie 30
I.8.1.7. Structure du foie 31
I.8.2. Composition cellulaire.....31
I.8.2.1. Cellules Hépatiques parenchymateuses.....31
I.8.2.2. Cellules non parenchymateuses.....32
I.8.2.2.1. Cellules sinusoïdales.....32
I.8.2.2.2. Cellules biliaires ou cholangiocytes 33
I.8.3 Fonctions du foie 34
I.8.3.1 Stockage et conduite des nutriments 34
I.8.3.2 Traitement des déchets organiques.....38
I.8.4. Autres Fonctions 39
I.8.4.1. Production des acides (sels) biliaires.....39
I.8.5 Pathologies du foie 40
II Matériels utilisés.....45
II.1. Réactifs utilisés :.....45
II.1.1. Réactifs de dosage biochimique.....45
II.1.2. Réactifs utilisés pour la préparation des solutions impliquées dans l'Anatomo-pathologie.....45
II.1.3- Préparation de la solution des extraits totaux de *Khaya Senegalensis*.....46

II.2. Matériel végétal.....47
II.3. Matériel animal.....47
III. Méthodologie.....47
III.1. Obtention des extraits totaux des écorces de *Khaya senegalensis*.....47
III.2. Obtention du matériel animal :.....48
III.3. PROCEDURE DE DOSAGE.....48
III.4. Examens histologiques :.....54
III.5. Screening phytochimique.....58
III.6. Mesure des paramètres biochimiques.....49
III.6.1. Etapes préparatoires.....49
III.6.2. Dosage des paramètres biochimiques.....51
III.7. Evaluation statistique..... j
III.8. Gavage des rats.....63
III.9. Isolement des hépatocytes de rats utilisant la trypsinization à froid.....64
III.10. Extraction et Chromatographie sur couche mince des lipides cellulaires.....66
III.10.1. Extraction des lipides par méthode de Stephan *et al.* (2004).....66
III.10.2.Séparation des lipides neutres par CCM.....68
III.10.3.Révélation des lipides sur les plaques de CCM.....70
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION.....71
I.1. Principaux constituants chimiques de l'écorce de *Khaya senegalensis*.....72
I.2. Influence de l'administration d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la croissance générale des lapins.....72
I.3. Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur les paramètres biochimiques du sang des lapins normoglycémiques.....73
I.3.1. Influence de l'administration de l'extrait ethylique de *Khaya senegalensis* sur la glycémie (en g/l) des lapins normoglycémiques.....73
I.3.2. Influence de l'administration de l'extrait ethylique de *Khaya senegalensis* sur la Triglycéridémie (en g /l) des lapins normoglycémiques.....75
I.3.3 Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la cholestérolémie (en g/l) des lapins normoglycémiques.....76
I.4. Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur les paramètres biochimiques du sang des lapins en hyperglycémie temporaire.....78
I.4.1. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la glycémie (en g/l) des lapins en hyperglycémie temporaire.....78
I.4.2. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la triglycéridémie (en g/l) des lapins en hyperglycémie temporaire.....79
I.4.3. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la cholestérolémie (en g/l) des lapins en hyperglycémie temporaire.....80

I.5. Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur l'histologie du foie et des reins des lapins 82

I.6. Action de l'extrait éthylique des écorces de *K. senegalensis* sur le profil des lipides neutres des hépatocytes de rats 86

I.7. Action de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis* sur le profil des phospholipides des hépatocytes de rats 87

II. DISCUSSION 89

III-CONCLUSION ET PERSPECTIVES 92

BIBLIOGRAPHIE 93

WEBOGRAPHIE 103

ANNEXES ..... a

PUBLICATIONS

Publications recouvrant les données rapportées dans ce manuscrit :

- **Assou K. Eudoxie**, Béhanzin Justin, Ahokpe Mélanie, Wouetola Ermence, Agossou A. Essé, Sezan Alphonse. Action of ethyl extracts of *Khaya Senegalensis* rat hepatocytes: evaluation of toxicity: Am. J. Pharm Tech Res. 2014; 4 (6) 2249- 3387.

- Takin M., Ahokpè M., Zohoun L., **Assou E.**, Aîvodji N., Agossou E., Sezan A. Effect of total *Khaya senegalensis* (meliaceae) barks extract on hepatic liberation of glucose. National journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology (2014); vol 4 issue 2; 112-117. Doi: 10. 5455 njpp. 2014.4.290920133

- Agossou E, Behanzin Justin, **ASSOU E**, Gbenou Joachim, Sezan Alphonse. *Khaya senegalensis* action on liver and Kidney of rabbits. Role of glucose 6 phosphate deshydrogenase. Physiology and Pharmacology (soumi pour publication).

LISTE DES PHOTOS

Photos 1: Rat Wistar (photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)..... 12
Photos 2 : poudre des écorces de Khaya s. obtenue (a) ; macération sous agitation (b) ; évaporation au ROTAVAPOR (c) ; extrait éthylique obtenu (d). (Photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)..... 48
Photos 3 : lapin disséqué (photo de K. S.E. ASSOU 2013)..... 48
Photos 4 : Gavage de lapins (photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2013)..... 50
Photos 5: Incubation des morceaux de foie dans RPMI+Trypsine (photo de K. S .Eudoxie, ASSOU. 2014)..... 66
Photos 6 : Séparation de la phase (inférieure) choroformique contenant les lipides par décantation..... 67
Photos 7:de la deuxième élution dans l'hexane après une première élution dans hexane: éther éthylique: acide acétique glacial (80:20:2 v/v/v) jusqu'à moitié de la plaque (photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)..... 69
Photos 8 : plaque obtenue après une première migration avec un mélange hexane/éther éthylique/acide acétique glacial (40 :10 :1 v/v/v) jusqu'à la moitié de la plaque, puis une deuxième migration avec de l'hexane seul jusqu'à 1 cm du bord de la plaque. 86
Photos 9: plaque obtenue après une première migration avec un mélange hexane/éther éthylique/acide acétique glacial (40 :10 :1 v/v/v) jusqu'à la moitié de la plaque, puis une deuxième migration avec de l'hexane seul jusqu'à 1 cm du bord de la plaque. (Photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014) 87
Photos 10: plaques obtenues après migration avec un mélange..... 88
Photos 11: Organes dans du formol..... h
Photos 12: une hotte chimique..... h
Photos 13: circulateur ..... h
Photos 14: une étuve..... h
Photos 15: distributeur de paraffine ..... h
Photos 16: coupes histologiques..... h
Photos 17: Une micro- onde i
Photos 18: Un peson i
Photos 19: des organes dans les cassettes en paraffine i
Photos 20 : Coupes d'organes dans des cassettes i
Photos 21: un microtome i
Photos 22: Prise de Parafine sur les organes..... i
Photos 23 : Contenu du coffret de cholestérol HDL..... m
Photos 24: Spectrophotomètre allumé..... m
Photos 25: Centrifugeuse montrant la plaque et les godets dans lesquels on envoie les tubes contenant les échantillons ..... m
Photos 26: Une centrifugeuse ouverte..... m
Photos 27: Centrifugeuse fermée..... m
Photos 28 : coffret de cholestérol HDL ..... m
Photos 29 : Coffret de cholestérol HDL (matériel de dosage)..... m
Photos 33: Coffret de triglycéride (matériel de dosage)..... n
Photos 32: Contenu du coffret de triglycéride ..... n
Photos 30: Spectrophotomètre non allumé..... n
Photos 31: Spectrophotomètre montrant le flux lumineux ..... n
Photos 37: Photo du contenu du coffret de cholestérol total ..... o
Photos 36: Photo du coffret de cholestérol total (matériel de dosage)..... o
Photos 35 Coffret de glucose (matériel de dosage)..... o
Photos 34: Contenu du coffret de glucose..... o

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Dosage du glucose *52*
Tableau 2: Dosage des triglycérides..... *53*
Tableau 3: Dosage du cholestérol..... *54*
Tableau 4: Résultats du screening phytochimique..... *72*
Tableau 5: Appellations locales de Khaya senegalensis en Afrique ..... *f*
Tableau 6 : Les triterpenoïdes contenu dans le principe amer de Khaya senegalensis ..... *g*
Tableau 7 : Formule de la Provende..... *k*
Tableau 8 : montrant les résultats de l'analyse de variance. Elle stipule que la dose a une influence significative (p = 0,02) sur le nombre de spot au seuil de 5%. Sortie des résultats de l'analyse de variance..... *l*
Tableau 9: Efficacité thérapeutique d'extraits de Khaya senegalensis..... *q*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photo de Khaya senegalensis et de ses différentes parties 4
Figure 2:Lapin de laboratoire (photo K. S. Eudoxie ASSOU. 2014) 8
Figure 3 : formule chimique du cholestérol 11
Figure 4: Les systèmes endocriniens du pancréas [73]. 15
Figure 5: Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline [75]. 16
Figure 6: Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline [76]. 17
Figure 7: Exemple des effets et relations insuline/glucagon/catécholamines sur le métabolisme glucidique [74] 19
Figure 8: Eléments structuraux d'une membrane cellulaire [16] 20
Figure 9: Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories : les lipides de réserve, composés de lipides simples et neutres, et les lipides membranaires, majoritairement composés de lipides complexes et polaires [16] 21
Figure 10: Structure et nomenclature des acides gras. A : Représentation plane. B : Représentation « 3D ». [16] 22
Figure 11: Structure des principaux phospholipides [16] 24
Figure 12: Structure chimique du cholestérol [18 ; 21] 25
Figure 13: Représentation schématique des sphingoglycolipides [16] 26
Figure 14: Ancrage des protéines dans les membranes ; polytopiques (A et B) monotopiques (C, D, E et F) 27
Figure 15: Dessin anatomique du foie : vue de la face supérieure (a) et de la face inférieure (b) [23] 29
Figure 16: Représentation du réseau sanguin alimentant le foie [23] 30
Figure 17 : schéma montrant les voies biliaires, les canaux hépatique et cholédoque 30
Figure 18 : Vue antérieure du foie et structure des hépatocytes avec leurs différents domaines [27] 32
Figure 19: Zones agro-écologiques du Bénin montrant le milieu d'étude 42
Figure 20: courbe montrant la variation du poids corporel en fonction du temps 73
Figure 21: courbe montrant la Variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de K.S en fonction du temps 74
Figure 22: courbe montrant la Variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de K.S en 24H 75
Figure 23: courbe montrant la Variation de la Triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de K.S en fonction du temps 76
Figure 24 : courbe montrant la Variation de la Triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de K.S en 24H 76
Figure 25: courbe montrant la Variation de la Cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de K.S en fonction du temps 77
Figure 26 : courbe montrant la Variation de la Cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de K.S en 24H 77
Figure 27 : Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthylique de Khaya senegalensis sur la glycémie des lapins en hyperglycémie temporaire 79
Figure 28 : Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthylique de Khaya senegalensis sur la Triglycéridémie des lapins en hyperglycémie temporaire 80
Figure 29 : Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthylique de Khaya senegalensis sur la cholestérolémie des lapins en hyperglycémie temporaire 81
Figure 30: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de K.S/Kg de PC 82
Figure 31: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de K.S/Kg de PC 82
Figure 32: Coupe de foie d'un lapin sans traitement (témoin 0 mg de K.S/Kg de PC) La veine centrolobulaire (flèche non pleine) et les travées hépatiques (flèches) ont un aspect normal. Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100) 82
Figure 33: Coupe de foie d'un lapin sans traitement. Les travées hépatiques (T) et les sinusoïdes veineux (S) sont normaux. Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200) 82
Figure 34: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de K.S/Kg de PC 83
Figure 35 : Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC 83
Figure 36: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC 83
Figure 37 : Coupe de rein d'un lapin sans traitement montrant un glomérule normal (flèche pleine) et des tubules normaux (têtes de flèches). Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 400) 84

Figure 38 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de K.S/Kg de PC _____ *84*
*Figure 39: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de K.S/Kg de PC*_____ *84*
*Figure 40: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de K.S/Kg de PC*_____ *85*
Figure 41 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de K.S/Kg de PC _____ *85*
*Figure 42 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçula dose de 50 mg de K.S/Kg de PC*_____ *85*

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

Qsq : Quantité suffisante pour

Mg : Milligramme

Na Cl : Chlorure de Sodium

CMV : Concentration de Minéraux- Vitaminés

MS : Matière Sèche

CB : Cellulose Brute

MG : Matière Grasse

EM : Energie métabolisable

ED : Energie Disponible

PB : Protéines Brutes

Lys : Lysine

Met : Méthionine

AAS : Acide Aminé Soufré

Ca: Calcium

P: Phosphore

Na: Sodium

Kcal: Kilocalorie (4, 18 Joule)

GOD: Glucose Oxydase

GPO: Glycérine-3-Phosphate-Oxydase

CO: Cholestérol Oxydase

CE: Cholestérol Estérase

POD: Peroxydase

PAP : 4-amino-antipyrine

GVS : Groupe Véto Service

ADP : adénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

4-CP : Chloro-4-phénol

CE Cholestérol estérase

CO: Cholestéroloxydase

DAG Diacylglycérol.

DAP: Dihydroxyacétone phosphate

DID Diabète insulinodépendant.

DNID Diabète non insulinodépendant.

ED : Eau distillée

FAST : Faculté des sciences et techniques

GK:Glycérol Kinase

GOD: Glucoseoxydase

GPO: Glycérol-3-phosphate oxydase

GLUT-4 Glucose transporteur 4

H_2O_2 Peroxyde d'hydrogène.

HPVO : Hyperglycémie provoquée par voie orale

HDL: High density lipoprotein.

K.S: Khaya senegalensis

LDL :Lipoprotéine de faible densité

PAP : 4-amino-antipyrine

PC : poids corporel

µl : Microlitre

UI/l : Unité Internationale par litre

USA :Etats unis d'Amériques

U. V. : Ultra violet

V/V : Volume par volume

VLDL**:** Very low density lipoprotein.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

AGS : Acides gras saturés

AGMI : Acides gras monoinsaturés

AGPI : Acides gras polyinsaturés

GPI: GlycosylPhosphatidylInositoI

NO: Monoxyte d'azote

Glc-6P: Glucose 6-phosphate

Frc-1P: Fructose 1-phosphate

Frc-6P: Fructose 1-phosphate

ATP: Adénosine TriPhosphate

Rpm: rotation par minute

UDP: Uridine Diphosphate

C-RP: C-Reactive Protein

CM: Chylomicrons

HDL: High Density Lipoprotein

VLDL Very Low Density Lipoprotein

NH3: Ammoniac

NH_4OH : Ammoniaque

SNA : Système Nerveux Autonome

SNC: Système Nerveux Central

IGF: Insulin Growth Factor

PBS: Phosphate Buffered Saline

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

$CHCl_3$: Chloroforme

CH_3OH : Méthanol

H_3PO_4 : Acide phosphorique

LBSC : Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire

FAST : Faculté des Sciences et Techniques

LAPHE : Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles

ISBA : Institut des Sciences Biomédicales Appliquées

UAC : Université d'Abomey-Calavi

RESUME

Au Bénin beaucoup de personnes souffrent de diabète (tout type confondu), et 80% environ de cette population font recours à la médecine traditionnelle pour les besoins de santé qui tient une place majeure dans le traitement du diabète. Le diabète est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de cette hormone. Des solutions sont trouvées dans la médecine moderne. Il s'agit de l'insulinothérapie et de l'utilisation des molécules antidiabétiques (sulphonylurés, biguanide, methformine, …) dont l'administration régulière est souvent à la base de certains effets indésirables. Récemment, les diabétologues sont arrivés à l'évidence qu'un complément thérapeutique constitué par les extraits de plantes est nécessaire pour optimiser le traitement du diabète. Vu l'utilisation potentielle de *Khaya senegalensis* dans le traitement traditionnel du diabète au Bénin, cette étude s'est proposée de rechercher l'efficacité de cette plante afin d'encourager la production locale de médicaments traditionnels à toxicité et efficacité déterminées et à faible coût. Il s'est agi d'étudier les effets des extraits totaux de *Khaya senegalensis* sur les taux glucosidiques et lipidiques puis d'évaluer l'incidence de ces extraits sur le foie et les reins. Selon le poids de l'animal, 10-25-50mg/kg de l'extrait de l'écorce de *Khaya senegalensis* ont été administrées par voie orale. Un prélèvement sanguin a été effectué tous les 15 jours pendant un mois et demi après le début de la manipulation. Ce liquide a servi au dosage des paramètres biochimiques (glucose et lipides). Une anatomo-pathologie a été faite sur le foie et les reins prélevés après sacrifice des animaux. Puis on a évalué l'effet hypoglycémique, hypolipidémique de différentes doses (10-25-50mg/kg) d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur des lapins normoglycémiques et des lapins hyperglycémiques puis, l'incidence de cet extrait sur le foie et les reins. Les résultats obtenus dans la présente étude montrent, l'effet hypoglycémique de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* et d'autre part les effets néfastes graves sur le foie et les reins des lapins normaux. L'utilisation prolongée d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* aux doses 10-25-50mg/kg de PC pourrait entraîner l'hépatite et à plus long terme le cancer du foie et l'insuffisance rénale.

Nos résultats indiquent que chez les lapins normoglycémiques, en 24H la dose 50mg/kg de PC de l'extrait présente une activité hypoglycémiante, elle diminue la glycémie de 25,30%. Cette même dose administrée 2H avant l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale a entraînée une réduction significative du pic hyperglycémique chez des lapins en diminuant de 38,48% la concentration du glucose. Par contre, l'extrait n'a aucun effet significatif sur la

concentration sérique des triglycérides et du cholestérol total. D'autre part, nous avons montré que l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* provoque une détérioration du foie et des reins des lapins. *Khaya senegalensis* a un effet bénéfique sur le contrôle du diabète par diminution de la glycémie.

Enfin, un gavage sub-chronique a été réalisé sur 8 lots de 3 rats Wistar ayant reçu respectivement, par administration orale l'extrait aux doses de 2,5mg/Kg ; 5mg/Kg ; 10mg/Kg ; 25mg/Kg ; 50mg/Kg ; 100mg/Kg et 200mg/Kg de poids corporel pendant 14jours (un groupe contrôle a reçu à la place de l'extrait de *Khaya senegalensis* de l'eau distillée) et l'isolement des hépatocytes a été faite après abattage des rats. Ensuite, l'ensemble des lipides (lipides neutres et phospholipides ont été extraits, puis séparés par chromatographie sur couche mince sur deux plaques différentes.

La CCM des lipides (neutres, phospholipides) a révélée une augmentation de ces lipides sous les dose de 5mg/Kg ; 10mg/Kg ; 25mg/Kg ; 50mg/Kg ; 100mg/Kg et 200mg/Kg par rapport au témoin, alors que sous la dose de 2,5mg/Kg il n'y a pas de modification significative par rapport au témoin. L'augmentation des lipides neutres vient de la dégradation des phospholipides et celle des phospholipides stipule que *Khaya senegalensis* a lysé la membrane des hépatocytes, ce qui a conduit à la dispersion des phospholipides. Donc ce n'est qu'après dispersion, que ces lipides ont commencés à se dégrader en lipides neutres.

L'administration de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* à forte dose engendre une **nécrose** des cellules hépatiques, donc à forte dose *Khaya* est toxique. Et les doses les plus efficaces pour pallier les risques de toxicité sont celles inférieures ou égales à 2,5mg/Kg.

Mots clés: *Khaya senegalensis*, diabète, CCM, médecine traditionnelle, toxicité

ABSTRACT

In Benin lot of people have diabetes (any type mistaken), and 80% of this population make use of traditional medicine for their health needs that plays a major role in the treatment of diabetes. Diabetes is a group of metabolic diseases characterized by chronic hyperglycemia resulting from a defect in insulin secretion and / or action of this hormone. Solutions are found in modern medicine. This is insulin therapy and the use of antidiabetic drugs (sulphonylurés, biguanide, methformine ...) whose regular administration is often at the root of the side effects. Recently, diabetologists arrived clearly a therapeutic supplement consisting of plant extracts is necessary to optimize the treatment of diabetes. Given the potential use of *Khaya senegalensis* traditionnal in the treatment of diabetes in Benin, this study has proposed to investigate the efficacy of this plant in order to encourage local production of traditional medicines for toxicity and efficacy determined at low cost . It came to study the effects of total extracts of *Khaya senegalensis* to the glucoside and lipid levels and to assess the impact of these extracts on the liver and kidneys. The rabbit has been used for this purpose. According to the weight of the animal, a quantity of macerated bark of *Khaya senegalensis* was administered orally. A blood sample was taken every 15 days for a month and a half after the start of the operation. This liquid was used for the determination of biochemical parameters (glucose and lipids). A pathology was made on the liver and kidneys removed after sacrificing the animals. Then evaluated possible hypoglycemic effect, a hypolipidemic different doses (10-25-50mg / kg) of ethyl extract of *Khaya senegalensis* normoglycemic on rabbits and rabbits rendered temporarily hyperglycemic glucose overload by then, the incidence of extract on the liver and kidneys of these rabbits. The results obtained in this study clearly show the one hand, the *Khaya* hypoglycemic effect of the ethyl extract senegalensis and the other significant adverse effects on the liver and kidneys of normal rabbits few of the dose (10 -25-50mg / kg BW). Prolonged use of ethyl extract of *Khaya senegalensis* at doses 10-25-50mg / kg BW may cause hepatitis and longer-term liver cancer and kidney failure.

Our results indicate that in normoglycemic rabbits, 24H dose 50 mg / kg BW of the extract has hypoglycemic activity, it decreases blood glucose 25.30%. This same dose 2H before the glucose tolerance test orally resulted in a significant reduction in the hyperglycemic peak in rabbits rendered temporarily hyperglycemic glucose overload by decreasing 38.48% of the glucose concentration. For cons, the extract had no significant effect on serum triglycerides

and cholesterol total. Another hand, we have shown that the extract of *Khaya senegalensis ethyl* causes deterioration of the liver and kidneys of rabbits. *Khaya senegalensis* has a beneficial effect on diabetes control by lowering blood sugar. Finally, a sub-chronic oral gavage was performed on 8 lots of 3 Wistar rats respectively, by oral administration to extract the 2.5 mg / kg doses; 5mg / Kg; 10mg / Kg; 25mg / Kg; 50mg / Kg; 100mg / kg and 200mg / kg body weight for 14 days (control group received instead of the extract of *Khaya senegalensis* distilled water) and isolation of hepatocytes was made after slaughter of rats. Then, all the lipids (neutral lipids and phospholipids were extracted and separated by thin layer chromatography on two different plates. TLC of lipids (neutral phospholipids) revealed an increase in these lipids in the dose of 5 mg / kg; 10mg / Kg; 25mg / Kg; 50mg / Kg; 100mg / kg and 200mg / kg compared to control, while in the dose of 2.5 mg / kg there was no significant change compared to the control. The increase in neutral lipids is due to degradation of the phospholipids and the phospholipids provides that *Khaya senegalensis* lysed membrane of hepatocytes, which leads to the dispersion of the phospholipids. So it was only after dispersion, these lipids have started to deteriorate in neutral lipids.

The administration of the extract of the ethyl *khaya* trunk bark *senegalensis* high dose causes necrosis of liver cells, so *Khaya* high doses is toxic. And the most effective dose to alleviate the risk of toxicity are those less than or equal to 2.5 mg / Kg.

Keywords: *Khaya senegalensis*, diabetes, CCM, traditional medicin, toxicity.

INTRODUCTION

Le diabète est une grave maladie due à un excès de glucose, c'est à dire de sucre dans le sang. En d'autres termes c'est « un état d'hyperglycémie chronique qui peut résulter de nombreux facteurs génétiques et/ou liés à l'environnement, agissant souvent de concert ». Cette pathologie est due soit à un déficit dans la sécrétion de l'insuline, soit à une mauvaise utilisation de la dite substance dans l'organisme d'où la classification du diabète en deux groupes spécifiques **[1]**. Le premier groupe constitue le diabète insulinodépendant (DID) ou diabète de type I ou diabète maigre, qui est rencontré chez le sujet jeune. Ce type de diabète se caractérise principalement par une insuffisance en insuline. Le second groupe représente le diabète non insulinodépendant (DNID) ou diabète de type II ou diabète gras et est surtout dû à une mauvaise utilisation de l'insuline par les tissus de l'organisme. Il est surtout rencontré chez le sujet de plus de 40 ans mais de plus en plus chez le sujet jeune et obèse.

En Afrique comme partout dans le monde, le diabète constitue un véritable problème de santé publique. Il a touché 180 millions individus en Afrique de l'Ouest (OMS, 2010). Au Bénin, le diabète constitue la deuxième cause d'hospitalisation après le VIH sida avec une prévalence de 02% de la population (www.diabete.com).Parmi ces patients, 90% sont traités pour le diabète sucré de type II et 10% pour le diabète sucré de type I selon l'OMS. En outre, il représente plus de 95% des consultations en médecine interne, toutes spécialités confondues.

Des prévisions annoncent pour l'an 2030 un chiffre de 438 millions de diabétiques dans le monde **[Jaffiol, 2011]**. Par ailleurs, le diabète constitue une maladie chronique avec un taux de mortalité de 2% et les médicaments modernes utilisés dans les centres hospitaliers s'avèrent trop onéreux pour une population africaine dont plus de la moitié vit en dessous du seuil de pauvreté.

Le diabète est une maladie grave, qui sans traitement approprié, peut être à l'origine de plusieurs maladies dont l'impuissance sexuelle, les maladies cardiaques, la cécité, voire de l'amputation des membres surtout du pied.

Face à l'expansion de ces maladies dont la prise en charge est élevée, l'OMS, dans sa résolution AFR/RC50/R3 du 31 août 2000, encourageait les pays africains à élaborer des stratégies régionales sur la médecine traditionnelle afin d'entreprendre des recherches sur les plantes médicinales et de promouvoir leurs utilisations optimales dans les systèmes de prestation des soins de santé.

Aujourd'hui, environ 80% de la population vivant dans la région africaine font recours à la

médecine traditionnelle pour leurs besoins en soin de santé **[1]**. Les raisons de ce regain d'intérêt pour la pharmacopée sont surtout liées au coût moins onéreux et de l'efficacité appréciable de la plupart des médicaments proposés par les tradipraticiens.

Face aux différents obstacles d'ordre financier et de l'ampleur que prend le diabète il est indispensable de rechercher de nouvelles substances à la fois efficace et à large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle. D'où la présente étude qui porte sur l'action de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. (**Meliaceae**) dans le traitement du diabète, une plante très impliquée dans le traitement de beaucoup de maladies dont le diabète selon la population béninoise. L'objectif principal de cette étude est « d'encourager la production locale de médicaments traditionnels à toxicité et efficacité déterminées et à faible coût». De façon spécifique, il s'est agi de :

- rechercher l'efficacité de *Khaya senegalensis* dans le traitement du diabète ;
- évaluer la toxicité de *Khaya senegalensis* sur les organes à savoir le foie et les reins.

Les hypothèses qui ont guidé cette recherche sont :

- les extraits totaux de l'écorce de *Khaya senegalensis* sont efficaces dans le traitement du diabète ;
- les extraits de l'écorce de *Khaya senegalensis* à fortes doses casseraient la membrane plasmique des hépatocytes de Rats.

Ce travail s'articule autour de trois parties. Après une synthèse bibliographique et la présentation du cadre d'études, la deuxième partie va aborder le matériel d'études et la méthodologie adoptée. La troisième partie sera consacrée aux résultats et discussions.

.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET CADRE D'ETUDES

1.1. Synthèse bibliographique

1.1.1. Bref aperçu sur *Khaya Senegalensis* A. Juss (Meliaceae)



. a : Tronc



b : Fruit



c : Fleur



d : Feuille



e : Ecorce



f : Plaies sur le tronc après des coupes

Figure 1 : Photo de *Khaya senegalensis* et de ses différentes parties

1.1.1.1. Dénominations et caractéristiques botaniques

Khaya senegalensis est connu sous diverses appelations. En français, on l'appelle acajou du Sénégal ou acajou des savanes ou caïlcédrat ou encore Quinquina du Sénégal **[6 ; 7 ; 12 ; 13].** Les noms locaux qui lui sont attribués au Bénin :Gbiribou (Bariba), Kahi kahibalehe ou Kaxi (Peul), Zunzantin (Fon) et Aganwo (Yoruba) **[8 ; 9].**

Anciennement classée comme *Swietenia senegalensis*, *Khaya senegalensis* est un grand arbre atteignant parfois 35 m de haut (photo 1a). Son fût est généralement court et trapu et peut atteindre 2 m de diamètre (photo 1-a). Les feuilles (photo 1-d) sont disposées au bout des rameaux. Elles sont alternes, paripennées, glabres à 3-4 (6) paires de folioles opposées ou subopposées. Les folioles présentent une forme variable qui va de oblongue à oblongue elliptique de 5-12 x 3-5 cm. Leur sommet est arrondi ou obtus plus ou moins acuminé, à base en coin ou atténuée, grisâtres dessous. Son écorce est grise et lisse, devenant plus ou moins

ferrugineuse et écailleuse, produisant un exsudat après une coupe. Lorsque les coupes sont excessives, la plante présente une écorce monstrueuse (photo 1-f). Dès les premières périodes de la saison sèche, *Khaya senegalensis* fait apparaître des fleurs blanches, à 4(-5) pétales étalés portant au centre les étamines (partie mâle) rouges réunies en tube. Cet arbre produit un fruit globuleux, ligneux de 5-10 cm de diamètre. A maturité, le fruit contenant des graines plates, est gris clair et s'ouvre par 4 valves en commençant par le sommet.

De point de vue habitat, *Khaya senegalensis* se retrouve dans les savanes soudaniennes à guinéennes et préfère les sols profonds et bien drainés, mais s'adapte aussi aux sols superficiels et latéritiques. 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 les îlots forestiers de reboisements [2]

Sa classification systématique est la suivante :

REGNE : Plantae

EMBRANCHEMENT : Magnoliophyta

CLASSE : Magnoliopsida

ORDRE : Sapindales

FAMILLE : Meliaceae

SOUS-FAMILLE : Swietenoïdeae

ESPECE: *Khaya senegalensis* A. Juss

GENRE: *senegalensis*

1.1.1.2. Propriétés chimiques

La détermination de la composition chimique de *Khaya senegalensis* a une longue histoire qui débuta au 19ème siècle avec les travaux de Caventou qui mit en évidence dans un macéré d'écorce une pierorésine non azotée qu'il dénomma « caïlcédrin », des substances colorantes, du sulfate de chaux, du chlorure de chaux, du phosphate de chaux, de la gomme, de l'amidon, de la cire et une très petite quantité d'essence **[93].** Un siècle plus tard, **[94]** on trouva dans les feuilles du caïlcédrat, 2% de saccharose, un principe amer. L'auteur a également signalé la présence d'une saponine et du principe amer « caïlcédrin » obtenu avec des rendements variables 0.90% dans les écorces de tronc **[9].**

Le caïlcédrin serait un mélange de deux composés non saturés renfermant dans leur molécule un oxydryle phénolique, un groupement méthoxylé et une fonction lactope. Des travaux plus

avancés ont révélé la présence de triterpenoïdes à fonction lactone ou époxyde et cycle furanique, susceptibles d'exister sous différentes formes dans les organes de la plante **[92]** en ont donné une répartition selon l'organe végétal considéré : **Ecorce de tige** (7-déacétyl-7-oxogédunine ; Angolensate de méthyle; méthyl-6-ydroxyangolensate; 3-destigloyl-déoxy-3B, 12B –diacétoxyswieténine) ; **Cœur du bois** (Mexicanolide ; Khayasine ; 3-déisobutyryl-3B tigloyloxy-Khayasine ; 3-déisobutyryl-313 benzoylooxykhayasine; Angolensate de Méthyle; 7-déacétyl-7-oxogédunine3-destigloyl-6-déoxy-3B; 213 – diacétoxyswieténine ;Senegalensate de méthyle) ; **Graine** (Khivorine ; 3-déacétylkhivorine ; 7-déacétyl-7-oxokhivorine 3, 7-didéacetyl-7-Oxokhivorine ; 3-destigloyl-6-déoxy-swietenine ;3-B-acetoxy-swietenine) ; **Racine** (Khayasine) ; **Ecorce de racine (**Méthyl-6 hydroxyangolensate) **[6 ; 9].**

Plus récemment, le screening (criblage) phytochimique des écorces de tronc a permis **[90]** de mettre en évidence les principaux groupes chimiques que sont : acides gras, caroténoïdes, coumarines, emodols, tanins, composés réducteurs, anthracenosides, glycosides stéroidiques, flavonosides, glucides, saponosides, stérols et triterpènes, anthocyanosides. **[6 ; 10 ; 14]. [91]** ont montrés d'après le screening phytochimique que Les extraits des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* contiennent les composés polyphénoliques abondants tels que des tannins, des tannins catéchiques, des leucoanthocyanines ; et des saponines abondantes telles que des saponosides avec un index de mousse de 4. D'autres composés polyphénoliques tels que des anthocyanines et les dérivés d'anthracèniques (0-glycosides aux aglucones réduits) sont observés. Les stéroïdes aussi sont présents mais en très faible quantité **[15]**.

1.1.2. Le lapin

1.1.2.1. Origine du lapin

Il existe plus de 100 races de lapins domestiques recensées au début du XXIe siècle, toutes descendent du lapin européen qui a été domestiqué au Moyen âge en Europe occidentale . Une époque relativement récente comparée avec d'autres animaux domestiques. Le lapin domestique est un lapin européen qui a été domestiqué, issus du « lapin de garenne » sauvage, élevé à l'origine en semi-liberté dans de vastes espaces clos

1.1.2.2. Description du lapin

Le lapin, de son nom scientifique *Oryctolagus cuniculus* fait parti de l'ordre des Lagomorphes, Famille des Léporidés. Il pèse 0,5 à 8 kg selon les races. Il possède des dents à pousse continue, dix à douze centimètres par an pour les incisives. Sa formule dentaire se compose de la façon suivante: Incisive 2/1, Canine 0/0, Prémolaire 3/2, Molaire 3/3. Cela

représente un total de vingt-huit dents avec la particularité d'avoir une deuxième paire d'incisives derrière les premières à la mâchoire supérieure. Son estomac a une fine paroi. L'intestin est d'environ dix fois la longueur du corps avec un large cæcum occupant la majeure partie de l'abdomen. Le champ de vision est de cent quatre-vingt dix degrés pour chaque œil. Une membrane nyctitante très développée vient recouvrir la cornée. Les oreilles sont richement vascularisées et de ce fait utilisées pour les ponctions et injections intraveineuses. Le squelette est relativement fragile représentant huit pour cent du poids vif contre 13% chez le chat. Le risque de fracture est important sur les os longs des pattes postérieures et les vertèbres**.** Les urines sont alcalines, parfois très colorées, normalement riches en cristaux triphosphates et carbonates de calcium. La lapine possède huit à dix mamelles.

1.1.2.3. Nutrition du lapin

Le lapin est un herbivore monogastrique qui présente la particularité d'ingérer une partie de ses crottes:

1.1.2.4. Comportement de cæcotrophie

Le lapin digère environ deux tiers de ses aliments au crépuscule et à l'aube et le reste dans la journée, le tout en une trentaine de petits repas. Son régime alimentaire se compose d'environ 13% de matières azotées et autant de fibres végétales. Il digère très bien les protéines végétales mais est un mauvais transformateur des fibres. Seule une partie est attaquée par les micro-organismes au niveau du cæcum et du colon proximal et forment les cæcotrophes que le lapin digère en les prélevant directement à l'anus. Ces cæcotrophes permettent au lapin de valoriser des fourrages grossiers et d'épargner de l'eau particulièrement lorsqu'il se trouve dans des conditions climatiques ou alimentaires difficiles. Les cæcotrophes sont émis à la fin de la nuit, le matin. Ce comportement est aboli dès qu'il y a perturbation du transit, ce qui conduit le lapin à des pertes en eau et en électrolytes sévères lors des diarrhées. Les besoins en énergie sont de 2100 kcal/kg de poids pour un lapin à l'entretien et de 2500 lorsqu'il est en gestation, lactation ou croissance. Un lapin adulte doit être rationné à cinquante grammes de granulés par kilo et par jour. Ses besoins en eau sont élevés, de l'ordre de cent vingt millilitres par kilo et par jour. Une ration équilibrée doit apporter quinze à dix huit pour cent de protéines et un minimum de dix pour cent de fibres. Le mieux est de distribuer un aliment complet sous forme de granulés riches en protéines additionné de foin pour le lest. On peut utiliser les céréales comme le blé, le maïs, le sarrasin mais c'est surtout l'avoine qui convient

le mieux au lapin. Les fourrages de luzerne, de trèfle et de sainfoin sont plus nourrissants que les fourrages de paille de blé, d'orge ou d'avoine. Les fourrages verts sont à distribuer progressivement en petite quantité pour prévenir tout risque de météorisme. On peut ajouter des aliments traditionnels tels que des croûtons de pain, des navets, des carottes. Il faut éviter la salade, les choux qui peuvent conduire à des fermentations excessives et entraîner du météorisme. Le bouton d'or, la digitale, le colchique et le coquelicot sont toxiques. L'apport de vitamines est peu utile puisque le lapin synthétise ses vitamines B, C, K, PP. Une attention particulière doit même être portée à la vitamine D dont le surdosage est toxique, caractérisé par de l'amaigrissement, une urolithiase et des calcifications aberrantes.



Figure 2:Lapin de laboratoire (photo K. S. Eudoxie ASSOU. 2014)

1.1.3. Le métabolisme glucidique

La digestion des glucides commence **dans la bouche par une amylase (**α-amylase aussi appelée ptyaline) contenue dans la salive **[102]** et dont le pH optimum est 6,5. Son action est activée par des ions Cl^- aussi présents dans la salive et est limitée à cause du court temps buccal. Au niveau de l'estomac, la digestion continue et les molécules glucidiques subissent l'effet des secrétions acides (acide chlorhydrique). Le suc gastrique pur a un pH égal à 1. Dans l'intestin grêle l'**action prépondérante de l'α-amylase pancréatique** est similaire à celle de l'α-amylase salivaire, avec des coupures de l'amidon et du glycogène. On obtient des éléments maltoses, maltotrioses, soit, des oligosaccharides ramifiés en 1-6 et non ramifiés plus un peu de glucose. Le suc intestinal est sécrété par les glandes de Brunner et de

Lieberkühn. On trouve des oligosaccharidases et des disaccharidases spécifiques ; par exemple, la maltase qui agit à pH compris entre 5,4 et 6 et une lactase qui agit de 5 à 6. On peut aussi citer une saccharase dont le pH optimum est compris entre 5,8 et 6,2. Ces hydrolases restent attachées à la bordure en brosse des enthérocytes. Il existe un complexe saccharase/Isomaltase qui hydrolyse le saccharose et la liaison α1-6 des dextrines. La saccharase a aussi le nom d'invertase car le saccharose est dit « sucre inverti » ou bien encore de sucrase (saccharose se dit sucrose en anglais).

L'absorption du glucose est complexe et a surtout lieu dans le jéjunum (la partie haute de l'intestin grêle comprise entre le duodénum et l'iléon). L'absorption se fait par un transport actif secondaire : cotransport (ou symport) avec Na^+ au pôle apical de l'enthérocyte. La concentration en glucose de l'enthérocyte est supérieure à celle de l'intestin grêle. Cette absorption nécessite donc de l'énergie. L'énergie utilisée est associée au gradient de sodium assuré par les pompes Na/K 'sur les faces baso-latérales). On obtient alors un gradient électrochimique de sodium entre la lumière intestinale et l'intérieur des enthérocytes qui va dans le sens de l'entrée du sodium dans l'enthérocyte. Il y a entrée du glucose et du sodium au pôle apical de l'enthérocyte. Le glucose passe dans le sang au pôle basal par diffusion facilitée. Le glucose est le nutriment glucidique principal (≈80%). Le transport du glucose est actif, pour preuve, celui-ci est inhibé lorsque l'on ajoute de la ouabaïne (glucoside caryotonique qui inhibe les pompes à sodium).

1.1.3.1. Métabolismes lipidiques

A l'état naturel, les lipides sont sous forme de globules gras, maintenus dispersés et stables, à 37°C et sous l'action émulsifiante des lécithines. Au froid, les globules montent à la surface et forment la crème **[26,27].** Les acides gras sont généralement des C16, C18 ou C20. Parmi les lipides, on trouve les triglycérides, le cholestérol, les vitamines liposolubles (A : vision de nuit par le carotène ; D : ossification ; E : impliquée dans le vieillissement mais aussi la gestation ; K : impliquée dans la coagulation).

La digestion des lipides met en jeu la salive. Il existe une lipase linguale, sécrétée par la face dorsale de la langue, par les glandes d'Ebner. C'est une enzyme peu importante chez l'Homme, mais importante chez le rat, la souris.

Dans l'estomac, il y a des effets chimiques par l'HCl ainsi que l'action de la chaleur et du péristaltisme. Les lipides vont ainsi commencer à s'émulsionner. Dans le suc gastrique, on cite l'existence d'une lipase gastrique « pré duodénale ». Finalement, on obtient l'hydrolyse

des triglycérides qui aboutit à la formation d'acides gras à chaîne courte et d'acides gras insaturés à chaîne longue. Au final, on obtient des acides gras libres et des 1,2diglycérides.

Dans la période néonatale, l'activité de la lipase pancréatique est faible ; les lipides du lait doivent être digérés ; 30% des triglycérides ingérés du lait seraient digérés dès l'estomac ; dans les triglycérides du lait, on retrouve beaucoup d'acides gras à chaînes courtes et moyennent hydrophiles qui sont absorbés par voie sanguine directe, par la muqueuse gastrique, comme l'alcool.

1.1.3.2. Sels biliaires

Grâce à l'émulsion des graisses dès le duodénum. Ils ont des propriétés leur faisant diminuer la tension superficielle. Leur action est indispensable :

- pour que les lipides se transforment en globules de 0,5 à 1µm de diamètre (indispensable à l'action de la lipase pancréatique),
- pour l'absorption des vitamines liposolubles,
- pour la digestion des autres aliments car si les lipides ne sont pas digérés, ils entourent les aliments, ce qui empêche les enzymes d'agir. Il y aurait dans ce cas une prolifération de bactéries intestinales avec un phénomène de putréfaction et un surplus de gaz (aussi appelé, météorisation).

1.1.3.3. Lipase pancréatique.

Cette lipase a un rôle majeur et déterminant car elle agit à l'interface huile/eau des gouttelettes lipidiques finement émulsifiées. La Co-lipase. C'est une protéine qui est sécrétée en pro-enzyme. Elle est présente dans le suc pancréatique et a une action synergique à la lipase. La phospholipase, également sécrétée en pro-enzyme, va former des phospholipides.

Ces deux enzymes passent du stade pro-enzyme au stade enzyme par coupure d'un pentapeptide, ce qui les active. La lipase pancréatique agit en surface, sur les globules émulsionnés, en libérant un mélange de diglycérides, de monoglycérides, de glycérol libre et des acides gras libres. Dans ce processus, les sels biliaires interviennent en plus en favorisant la formation de particules hydrosolubles (les micelles). La structure des micelles est analogue à celle de l'émulsion lipidique mais plus petite. Les groupements non polaires (acides gras, monoglycérides et sels biliaires) sont orientés vers le centre. Les groupements polaires, hydrophiles, sont en surface. Les micelles ont un diamètre de 3 à 00nm. Il s'agit de quelques milliers de molécules (solution claire). La solution lipidique a des particules de diamètre de

0,5 à 10µm qui forment une solution sombre. Après la digestion intraluminale des lipides, il y a au contact de la membrane des enthérocytes, trois fractions différentes :

- Gouttelettes d'émulsion lipidiques insolubles,
- Micelles solubles,
- Molécules libres (acides gras, monoglycérides, glycérol et stérols).

L'absorption des lipides est complexe. Les micelles sont au contact de la membrane apicale des enthérocytes, dans le feutrage de glycoprotéines. Les acides gras libres surtout, et les monoglycérides, passent dans l'enthérocyte, diffusion passive. Les micelles libèrent leurs composés pour en accepter d'autres, au fur et à mesure de l'action de la lipase pancréatique. Dans l'enthérocyte, les acides gras libres sont activés en AcylCoA. Ils se combinent ensuite à des monoglycérides et reconstituent des triglycérides, lesquels s'unissent à des protéines et forment de fines gouttelettes : les chylomicrons, de diamètre compris entre 0,1 et 0,5µm. Ces chylomicrons sont le mélange de lipoprotéines, de triglycérides, de cholestérol et de vitamines liposolubles. Les chylomicrons sont expulsé de l'enthérocyte au pôle basal par exocytose. Ils passent ensuite dans les vaisseaux chylifères. Ils ne peuvent pas passer par les capillaires sanguins car ils sont recouverts d'un réseau de polysaccharides qui s'y oppose ; mais aussi, le diamètre est trop faible pour pouvoir les accepter. Le glycérol et les acides gras à courte chaîne (inférieur aux C12) sont absorbés par voie sanguine (voie portale). Le cholestérol non estérifié prend la même voie que les acides gras libres, ré-estérifiés dans les enthérocytes

.

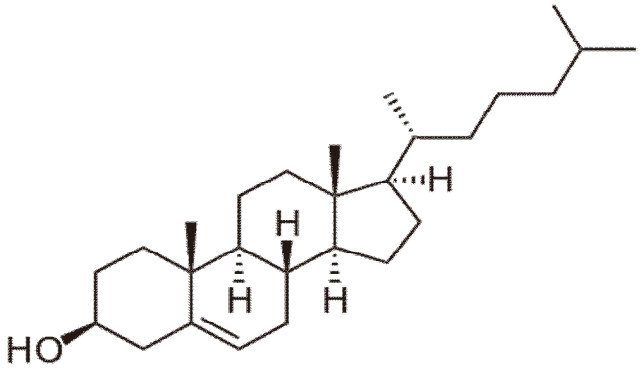


Figure 3 : formule chimique du cholestérol

1.1.4. LES RATS DE LABORATOIRE : SOUCHE « 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. Il est

connu pour son intelligence et sa capacité de modifier son comportement pour échapper aux pièges et trouver de la nourriture. Il a une grande capacité à distinguer les causes des effets. C'est donc un candidat idéal aux tests de comportement. De même, le rat est un petit animal résistant bien aux opérations de laboratoire et est extrêmement prolifique. Ces qualités sont appréciées des chercheurs et son implication excessive dans les études lui a value la dénomination *«organisme modèle »*. Il existe de nombreuses souches de rat. Parmi elles, la souche *Wistar* est très sollicitée du fait des meilleurs caractéristiques et comportements qu'elle présente **[9]**. En effet, le rat wistar 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 **[31]**.

En ce qui concerne l'alimentation, 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 **[9]**.



Photos 1: Rat Wistar (photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)

1.1.5. Le Diabète

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides entraînant une hyperglycémie. A l'origine, le terme

"diabète" désignait diverses maladies caractérisées par : une élimination importante d'urines, une déshydratation et une soif intense **[60]**. Cette pathologie se distinguait par la saveur sucrée des urines et fut nommée diabète sucré. Elle est répandue dans le monde où on dénombre 5 à 7% de la population mondiale **[40 ; 41 ; 42 ; 43]**. Selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est actuellement défini par deux glycémies à jeûn supérieures à 1,26 g/l soit 7 mmol/l. Ce chiffre a été retenu par le corpus médical parce que c'est à partir de cette valeur seuil qu'apparaît le risque de survenue de complications microvasculaires, et en particulier la rétinopathie **[62]**.

L'état d'hyperglycémie est, pour certains, accompagné d'une déficience du pancréas, l'organe chargé de produire l'insuline. Cette hormone, qui joue le rôle important d'abaisser le taux du glucose dans le sang, est en effet synthétisée par certaines cellules pancréatiques nommées « cellules bêta » elles-mêmes contenues dans les îlots de Langerhans. Il semble donc exister une relation évidente entre ces différents phénomènes. Chez une partie des diabétiques on peut constater un déficit presque total de production d'insuline, lié à une lésion de ces cellules pancréatiques. Cependant, d'autres diabétiques présentent des taux d'insuline un peu normaux et même parfois plus élevés que la normale **[63]**.

1.1.5.1. Différents types de diabète

1.1.5.1.1. Diabète du type I ou diabète insulinodépendant (DID)

Le Diabète du type I ou diabète insulinodépendant (DID) concerne le plus souvent les enfants, mais il peut survenir à tout âge. Les cellules qui sécrètent l'insuline sont détruites jusqu'à 90% de leur quantité normale. Il est dû à un déficit en insuline.

En fait le fil conducteur passe par une lésion du système immunitaire, qu'il soit programmé génétiquement ou activé par un agent nocif externe de nature virale **[63]**. Ce dernier amorcerait un mécanisme destructeur, en provoquant la non reconnaissance de la part des anticorps d'une structure amie jusque-là, à savoir les cellules bêta. Les cellules, malades de manière irréversible, ne produisent plus d'insuline, d'où l'apparition du diabète. Ce diabète se déclare en général avant l'âge de trente ans. Il se caractérise par un amaigrissement, de la fatigue, et provoque une soif intense, une faim dévorante, des envies d'uriner fréquentes, une brusque perte de poids, une sécheresse prononcée de la gorge, une grande fatigue et un état général affaibli, avec des sensations de malaises et de souffrance **[63]**.

Le diabète de type 1 ou diabète insulinodépendant (DID), est actuellement maîtrisé surtout après la synthèse de l'insuline recombinante **[47]**.

1.1.5.1.2. Diabète du 2ème type ou Diabète non insulinodépendant (DNID)

Le Diabète du 2ème type ou Diabète non insulinodépendant (DNID) débute généralement après l'âge de 40 ans et représente 90% de l'ensemble des cas mondiaux **[63 ; 64]**. Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline. L'insuline est soit basse ou soit élevée (insulinorésistance prédominante ou insulinopénie prédominante) **[60 ; 64]**.

L'hyperglycémie des diabétiques de type 2 est la conséquence de deux grands mécanismes physiopathologiques. Le premier correspond à une diminution de la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline (insulino-resistance) touchant les tissus périphériques que sont le muscle, le tissu adipeux et le foie **[65; 66]**. Cette résistance découle d'une altération de la signalisation de l'insuline qui toucherait notamment le nombre de récepteurs à insuline et/ou leur affinité pour l'hormone et le nombre de transporteurs membranaires dépendants de l'insuline qui permettent l'entrée du glucose dans les cellules **[65; 66]**. La capacité normale de production d'insuline, associée à une utilisation anormale de l'organisme serait alors dû à un mauvais fonctionnement d'une petite structure nommée « récepteur » situé sur la superficie des cellules. Si ces récepteurs ne fonctionnent pas de manière adéquate ou s'ils ne sont pas assez nombreux, le glucose ne peut être absorbé par la cellule et reste dans le sang à un taux trop élevé **[62]**. Le deuxième phénomène consiste en une anomalie de l'insulino-sécrétion. La production de l'insuline est tout d'abord augmentée pour palier son efficacité et l'hyperinsulinémie permet dans un premier temps de maintenir une glycémie normale **[66]**. Plus la maladie progresse et plus la sensibilité à l'insuline ne baisse **[67]**. L'hypersécrétion d'insuline ne suffit alors plus à compenser l'insulino-résistance ce qui se manifeste à la fois par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie. Peu à peu, les cellules β deviennent moins sensibles au stimulus du glucose. De plus, leur nombre et leur masse diminuent à cause de la toxicité du glucose. La sécrétion d'insuline finit alors par diminuer et les diabétiques de type 2 deviennent à terme, comme les diabétiques de type 1, insulinopénique **[68]**. Avec cette baisse de l'insulino-sécrétion, l'hyperglycémie se fait plus sévère. Ces désordres du métabolisme glucidique sont associés à des troubles importants du métabolisme lipidique aboutissant à une dyslipidémie avec augmentation des triglycérides, acides gras libres, LDL et baisse du HDL cholestérol **[69]**. Les causes initiales de ce diabète sont mal connues et certainement multiples, facteurs génétiques et environnementaux agissant de concert **[70; 66].** L'obésité favorise l'insulino-résistance et ainsi l'apparition du diabète qui est d'ailleurs la complication la plus répondue de l'obésité **[66 ; 71]**. Dans la plupart des pays, l'augmentation du nombre de

personnes diabétiques résulte de changements sociaux, tels la sédentarisation, la baisse d'activité physique, et une alimentation déséquilibrée particulièrement riche en graisses et en sucres raffinés…etc **[72].**

Le traitement du diabète de type 2 (DNID), passe tout d'abord par une réduction de charge pondérale grâce à un régime alimentaire approprié et un exercice physique accru **[72].** Il est également associé à l'ingestion des sulfamides hypoglycémiants, des biguanides, des inhibiteurs de l'α-glucosidase et des thiazolidinediones.

1.1.5.1.3. Régulation de la glycémie

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 **[73]**.

1.1.5.1.4.

1.1.5.1.5. Rôle du pancréas et de 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 duodénale. 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 mm et dont le total ne représente guère que 1% environ de la glande, soit un poids total de 1 à 2 g (figure 4).

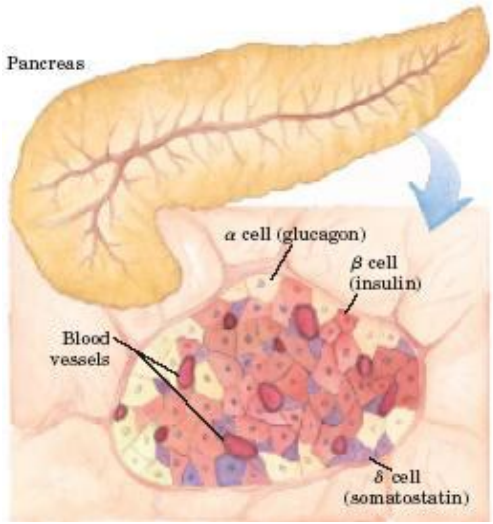


Figure 4: **Les systèmes endocriniens du pancréas** [73].

Les sécrétions de l'insuline rejoignent la circulation sanguine via le foie. Le pancréas sécrète plusieurs hormones dont l'insuline et le glucagon **[73]** ; 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 dans le tissu adipeux **[75]**.

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

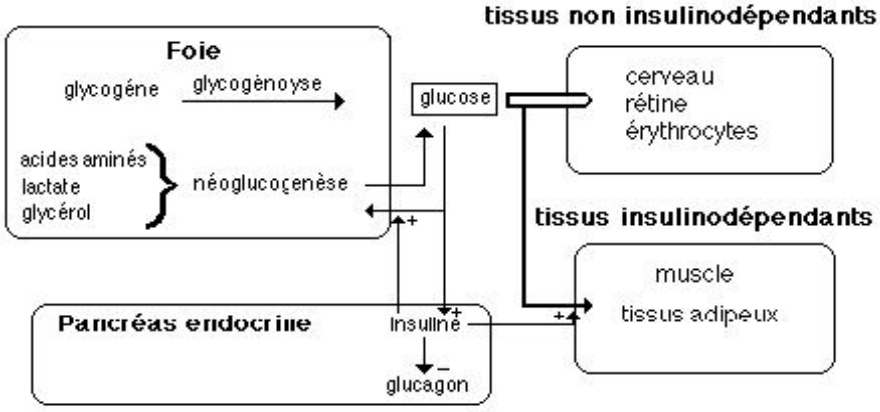


Figure 5: **Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline** [75].

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 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 6.

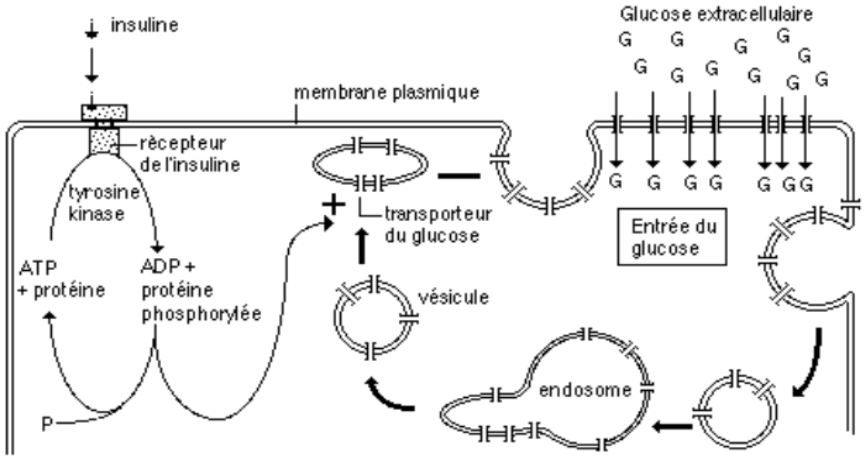


Figure 6: **Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline** [76]**.**

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'insuline stimule l'enrichissement de la membrane plasmique en transporteur GLUT 4, où des vésicules contenant les transporteurs qui fusionnent avec la membrane **[77]**.

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.

1.1.5.2. 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 quotidiennes. 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) **[62]**.

Pour ce faire, le foie régule la production et le stockage du glucose grâce à 3 voies métaboliques :

- La **glycogénogénèse** qui est une voie de synthèse du glycogène permettant le stockage du glucose dans le foie sous forme de glycogène ;

- La **glycogénolyse** qui est une voie d'hydrolyse du glycogène libérant le glucose, sous forme de glucose-6-phosphate, par phosphorylasation du glycogène : c'est ce qu'on appelle le déstockage ;
- La **néoglucogenèse** qui est une voie de synthèse du glucose à partir d'éléments non glucosidiques tels 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.

1.1.5.3. Rôle du rein

Grâce à sa fonction néoglucoformatrice, le rein secrète une hormone : le cortisol, produit par la cortico-surrénale dans le cas d'un stress émotionnel fort. Le cortisol active dans le foie les enzymes de la néoglucogenèse, 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 cétonique, le rein peut secréter du glucose si la glycémie 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.

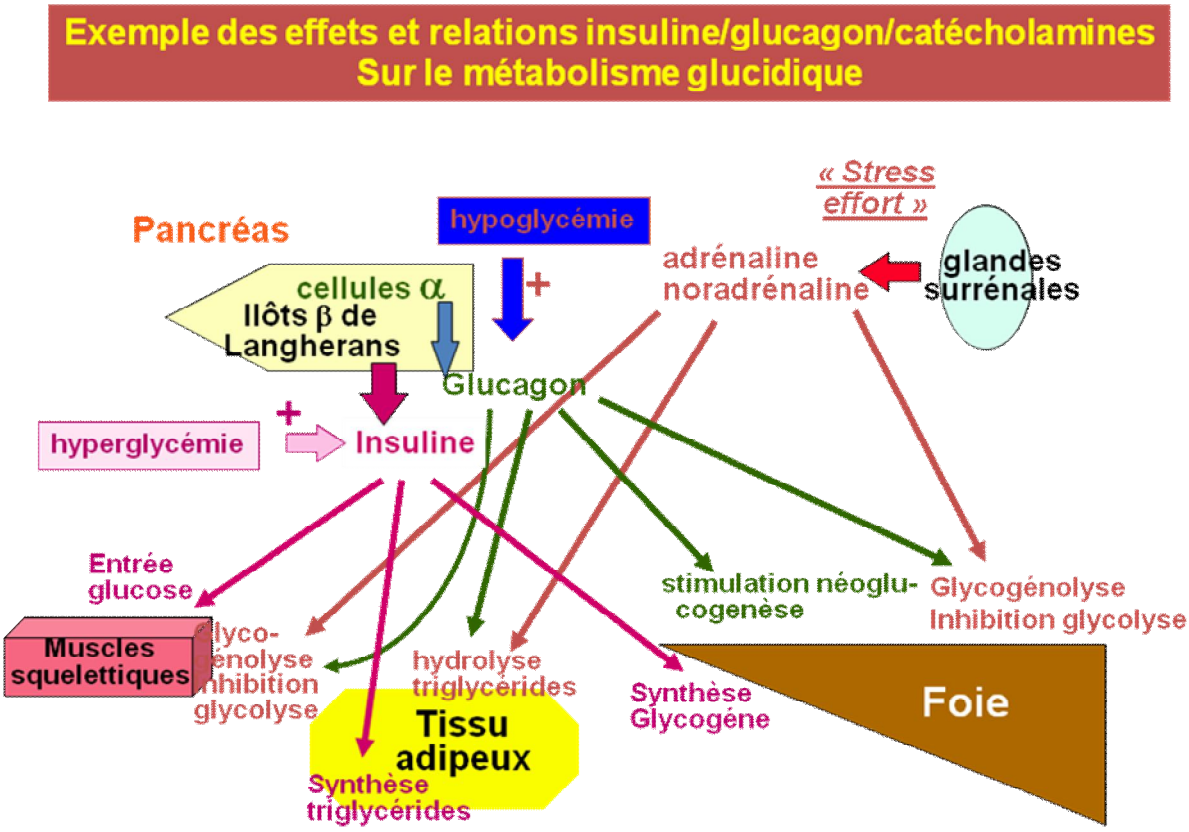


Figure 7: Exemple des effets et relations insuline/glucagon/catécholamines sur le métabolisme glucidique [74]

1.1.6. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité

Généralement, tous les agents antidiabétiques causent différents effets secondaires qui varient selon la classe et la génération du médicament. Précisément, les sulfamides, insulino sécrétagogues, provoquent un état d'hypoglycémie. Cet effet est considéré comme principal à côté de l'hyponatrémie, l'hépatite, les atteintes hématologiques, l'éventuelle réaction dermatologique ainsi qu'un gain de poids dû à l'hyperinsulinémie.

Suite à leurs effets secondaires néfastes, certains Biguanides, inhibiteurs de la néoglucogenèse et l'absorption intestinale du glucose, sont éliminés du marché. La metformine, le biguanide le plus commercialisé dans le monde, n'est disponible qu'aux USA car il provoque une acidose lactique, une fatigue, des nausées et une toxicité rénale.

L'acarbose (C25H43NO18), un médicament de la classe des inhibiteurs des alpha-glucosidases présente divers effets secondaires, comme les gaz, le ballonnement et la diarrhée **[50]**.

La phytothérapie antidiabétique connaît à ce jour un essor important du fait de la découverte de plus en plus croissante d'extraits de plantes efficaces dans le traitement du diabète **[78 ;**

79]. Pour pallier aux effets secondaires des traitements antidiabétiques, les recherches scientifiques portent sur 1123 plantes utilisées traditionnellement contre le diabète **[64]**.

1.1.7. Inventaire des constituants cellulaires

La figure 8 présente les éléments structuraux d'une membrane cellulaire. Elle indique trois domaines : les milieux intra et extracellulaires séparés par la membrane plasmique. Le milieu intracellulaire est constitué de protéines, du cytosquelette et du cholestérol. Le milieu extracellulaire quant à lui, est composé de glycoprotéines, des phospholipides et des glycolipides. La membrane plasmique est surtout constituée de lipides et de protéines.

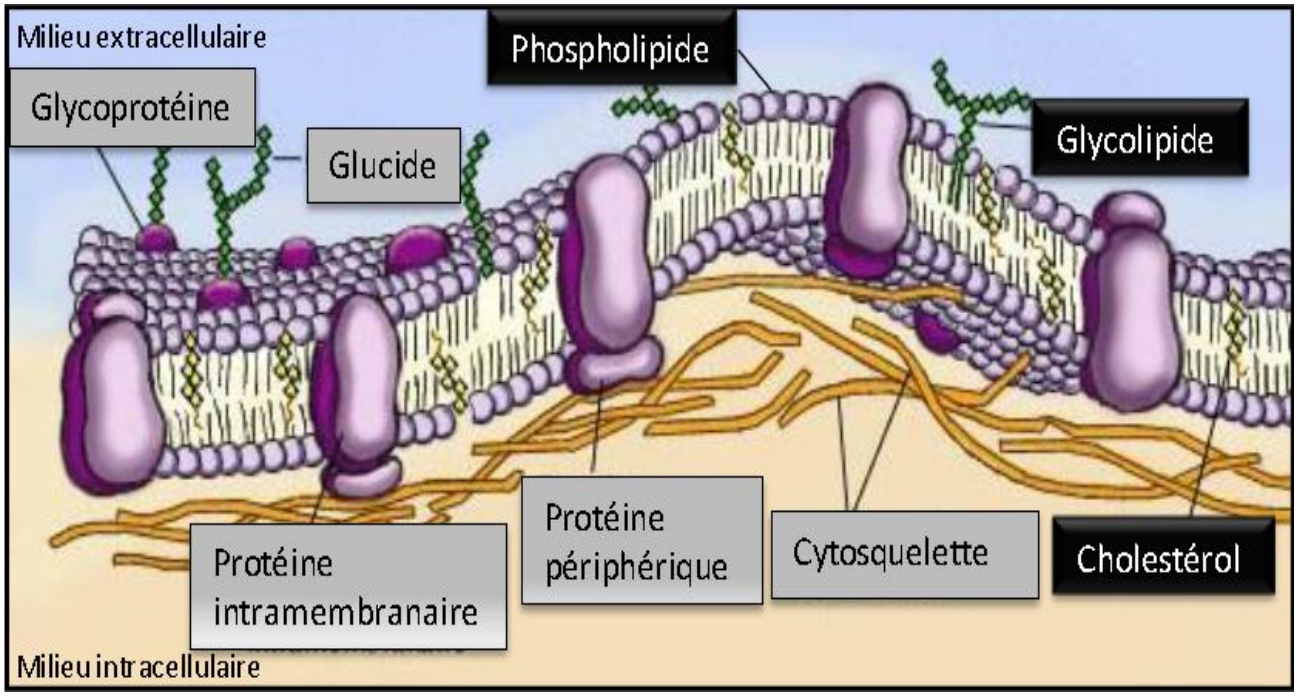


Figure 8: Eléments structuraux d'une membrane cellulaire [16]

1.1.7.1. Diversités des lipides

Les lipides ont des rôles biologiques essentiels : ce sont par excellence des molécules biologiques multifonctionnelles. Les lipides peuvent intervenir aussi bien comme éléments structuraux dans les membranes cellulaires (phospholipides et stérols), que comme connecteurs permettant l'insertion membranaire de certaines protéines ou comme métabolites particulièrement riches en énergie lorsqu'il s'agit des acides gras, par exemple. Ils sont aussi des précurseurs d'un grand nombre de messagers intra- et extracellulaires (eicosanoïdes, diacyglycérol, phosphoinositides, stéroïdes, céramides, …).

En fonction de leur affinité pour certains solvants en chromatographie, les lipides peuvent être subdivisés en deux grandes classes : les lipides réserves (simples et neutres) et les lipides

membranaires (complexes et polaires). A l'exception, les stérols sont considérés comme des lipides simples neutres, mais ils sont localisés dans les membranes cellulaires.

Dans le présent mémoire, nous allons plus nous intéressés aux lipides membranaires.

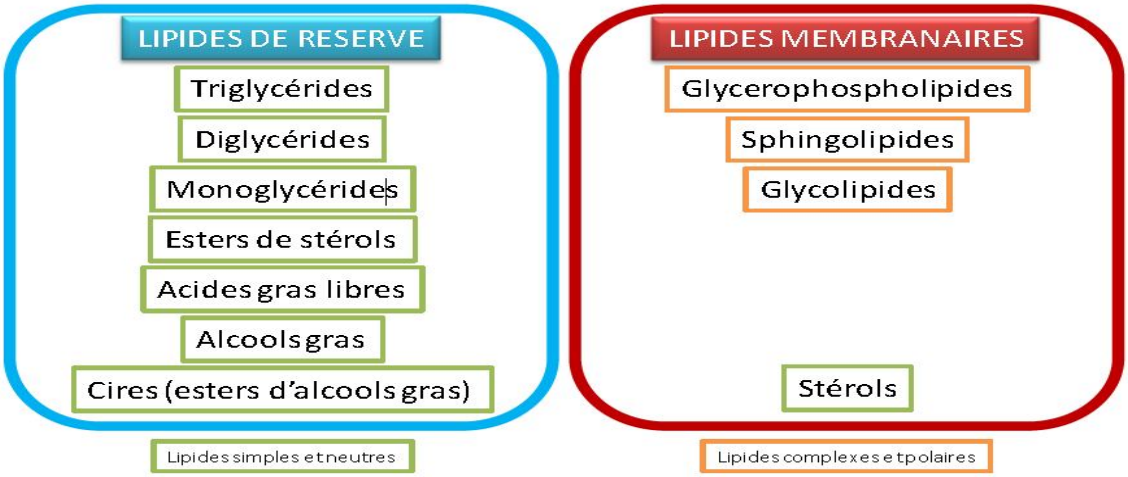


Figure 9: Répartition des principaux types de lipides en deux sous-catégories : les lipides de réserve, composés de lipides simples et neutres, et les lipides membranaires, majoritairement composés de lipides complexes et polaires [16]

Les lipides membranaires sont caractérisés par leur caractère amphiphile. En effet, ils possèdent une tête polaire, relativement importante et qui présente un caractère hydrophile, reliée à des chaînes aliphatiques hydrophobes. De par leur nature amphiphile, ces molécules ont tendance à s'agréger spontanément, de façon à mettre leurs têtes polaires en contact avec l'eau et en isoler leurs chaînes hydrophobes. Cela provoque la formation de micelles ou de « bicouches lipidiques ». Les lipides membranaires, organisés en bicouches lipidiques, représentent les constituants majoritaires, l'ossature, des membranes cellulaires dans lesquelles sont insérées des protéines (Figure 9).

1.1.7.2 Structure des lipides membranaires

Il existe différents types de lipides membranaires : les glycérophospholipides, les sphingolipides, les glycolipides et les stérols. Les glycérophospholipides ainsi que les représentants majoritaires des sphingolipides dans les membranes cellulaires animales. Les sphingophospolipides, sont constitués d'acides gras reliés à une tête polaire formée par un groupement phosphate et sont regroupés sous le terme commun de phospholipides.

1.1.7.2.1. Acides gras

Les acides gras sont généralement constitués par une chaîne hydrocarbonée linéaire, possédant un groupement carboxyle (-COOH). Ils se distinguent par la longueur de leur

chaîne et par le nombre et la position des insaturations présentes. En fonction du nombre d'insaturations qu'ils comportent, les acides gras peuvent être classés en trois catégories (Figure 10):

Acides gras saturés (AGS), comme le 16:0

Acides gras monoinsaturés (AGMI), comme le 18:1n-9

Acides gras polyinsaturés (AGPI), comme le 20:4n-6

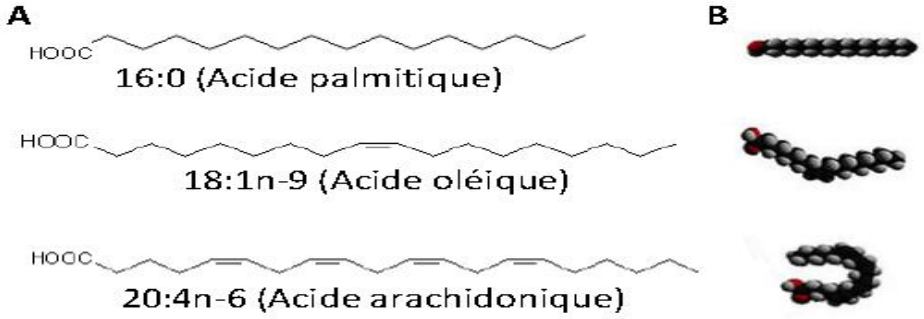


Figure 10: Structure et nomenclature des acides gras. A : Représentation plane. B : Représentation « 3D ». [16]

1.1.7.2.2. Phospholipides

Les phospholipides représentent l'espèce lipidique majoritaire des membranes biologiques. Ce sont eux qui forment la bicouche lipidique de la membrane plasmique et assurent la fluidité membranaire. Ils interviennent dans les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires; ils sont également les précurseurs de nombreux messagers intra-et intercellulaires, impliqués dans des phénomènes aussi différents que la réponse aux stimulations hormonales, l'inflammation et l'agrégation plaquettaire. C'est dans le foie, l'intestin et le plasma que se déroulent les réactions qui assurent le maintien des pools de phospholipides de l'organisme entier **[17]**. L'ensemble des acides gras décrits ci-dessus interviennent rarement sous forme libre et sont en fait constitutifs de molécules plus importantes dans lesquelles ils jouent le rôle de partie hydrophobe. Dans le cas des phospholipides, un ou plusieurs acides gras sont liés :

- dans le cas des glycérophospholipides : par l'intermédiaire d'une liaison ester à un alcool, le glycérol (il existe également des cas ou la liaison est une liaison éther ou vinyl-éther).
- dans le cas des sphingophospholipides : par l'intermédiaire d'une liaison amide à une base azotée à longue chaîne (amine aliphatique ayant deux ou trois groupements hydroxyles), principalement la sphingosine.

Ces composés sont ensuite reliés à une tête polaire, composée d'un groupement phosphate (acide phosphorique) lié ou non à d'autres structures chimiques variées. Ces phospholipides

membranaires se distribuent ainsi en plusieurs classes, à chaque tête polaire correspondant une classe de phospholipides. Les principales classes de glycérophospholipides et de sphingolipides sont représentées dans la Figure 11 **[16 ; 18]**.

Les interactions entre phospholipides et protéines et entre phospholipides et stérols influencent la structure et l'activité de la membrane. Suivant le type de phospholipides, les parties polaires sont chargées différemment, donc la membrane va être plus ou moins chargée suivant sa composition en phospholipides. La choline et l'éthanolamine donnent une charge globale neutre (swittérion), alors que l'acide phosphatidique, le phosphatidyl-glycérol et la phosphatidyl-sérine ont une charge négative (anion). La phosphatidyl-choline est fréquemment le phospholipide le plus abondant. Le phosphatidyl-inositol est un phospholipide essentiel probablement pour son rôle dans la signalisation cellulaire et comme senseur membranaire. Le phosphatidylinositol participe à la synthèse des ancres GPI pour l'ancrage de nombreuses protéines et à la synthèse des sphingolipides. La phosphatidyl-éthanolamine, la phosphatidyl-choline et le phosphatidyl-inositol sont très présents dans la membrane plasmique et dans l'ensemble des membranes subcellulaires. Par contre, la phosphatidyl-éthanolamine et les cardiolipides sont majoritairement présents dans la membrane plasmique et la membrane interne des mitochondries. **[19]**

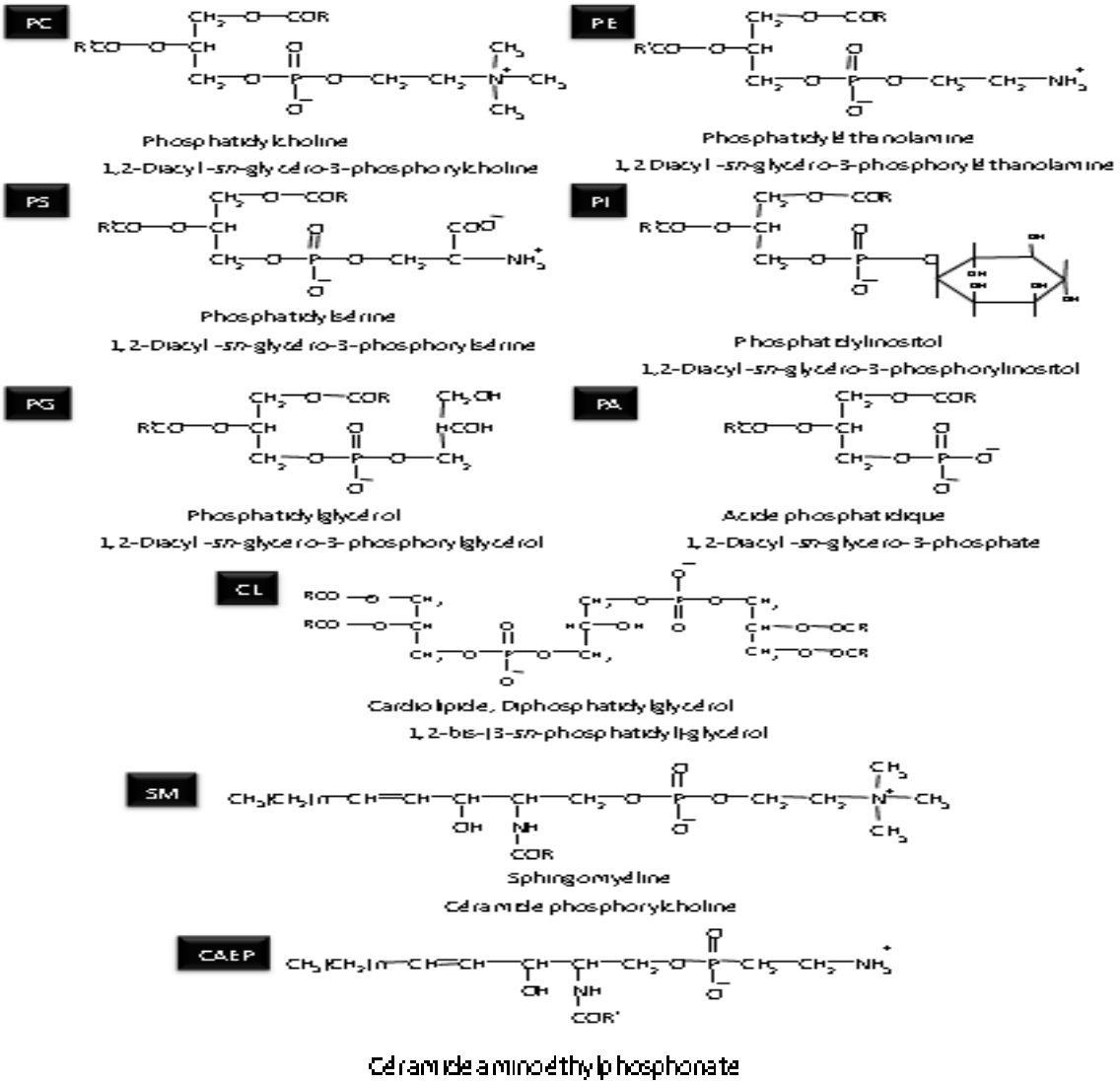


Figure 11: Structure des principaux phospholipides [16]

Les sphingolipides semblent jouer d'abord un rôle structural dans les membranes au même titre que les autres lipides. Ils joueraient aussi un rôle de signal moléculaire en réponse à un choc température. Ils seraient aussi impliqués dans les phénomènes d'endocytose et d'exocytose, de contrôle de la croissance cellulaire, de maintien de l'intégrité cellulaire et de longévité cellulaire. Associés à des stérols, les sphingolipides joueraient un rôle de médiateurs dans la transduction du signal et le bon adressage à la membrane plasmique de certaines protéines (Ex : Gas1p, Pma1p, Nce2p). En effet, les mannoprotéines peuvent être ancrées à la membrane par l'intermédiaire d'une partie lipidique appelée « ancre GPI » **[19].**

1.1.7.2.3. Stérols

Le cholestérol est le stérol le plus courant dans les membranes. Il est un constituant majeur des membranes plasmiques animales et se trouve en moindre quantité dans les membranes des organites subcellulaires. Selon différentes estimations, 80 à 90% du cholestérol cellulaire total seraient présents dans la membrane plasmique alors que le réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales internes en contiennent de très faibles quantités. Bien que les proportions relatives varient selon les espèces et les types cellulaires chez les vertébrés, le cholestérol constituerait 30-40 mol% du total des lipides de la membrane plasmique contre 40-60 mol% pour les glycérophospholipides et 10-20 mol% pour les sphingolipides. Un léger caractère amphiphile est conféré au cholestérol par son groupe hydroxyle alors que sa structure cyclique fusionnée lui confère une rigidité supérieure à celle des autres lipides membranaires **[18]**. Il a donc une incidence importante sur les propriétés des membranes (Voet and Voet, 1998). Les plantes contiennent du ***stigmastérol*** ou du ***sitostérol*** à la place du cholestérol. **[20. 21]**

Le cholestérol agit comme un régulateur de fluidité en s'intercalant entre les phospholipides, c'est un antigel (diminution du degré d'hydratation). Il a une propriété fondamentale dans la membrane, il évite les changements d'état et joue donc un rôle important dans le fonctionnement des membranes. Sans cholestérol, une membrane plasmique ne peut pas être fonctionnelle **[20].**

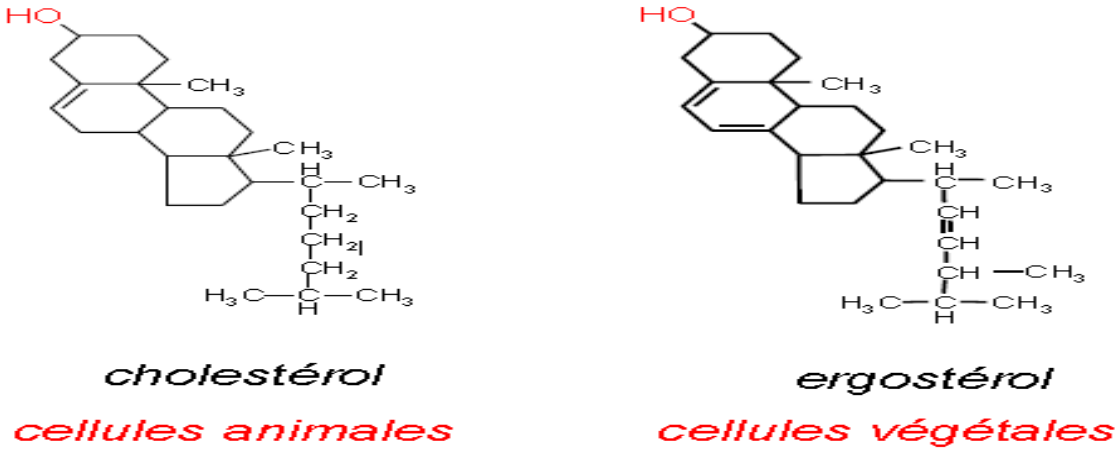


Figure 12: Structure chimique du cholestérol [18 ; 21]

1.1.7.2.4. Glycolipides

Ils représentent une autre classe de composés fortement amphiphiles dérivant du glycérol, estérifié en position 1 et 2 par un acide gras et connecté, par une liaison osidique en position 3, à un oligosaccharide au lieu d'un phosphate. Les glycolipides sont toujours associés au

feuillet membranaire externe et appartiennent à un ensemble nommé le glycocalyx. Le glycocalyx est la zone périphérique cellulaire riche en glucides. Les résidus glucidiques liés aux protéines sont souvent impliqués dans les interactions de la cellule avec son environnement. Il est donc probable que les glycolipides jouent un rôle analogue au rôle joué par les protéines. Les glycolipides sont de deux types, on trouve les **glycéroglycolipides** et les **sphingoglycolipides**. Il est intéressant de préciser que les glycolipides des membranes des érythrocytes (globules-rouges), définissent le groupe sanguin de l'individu. **[20]**

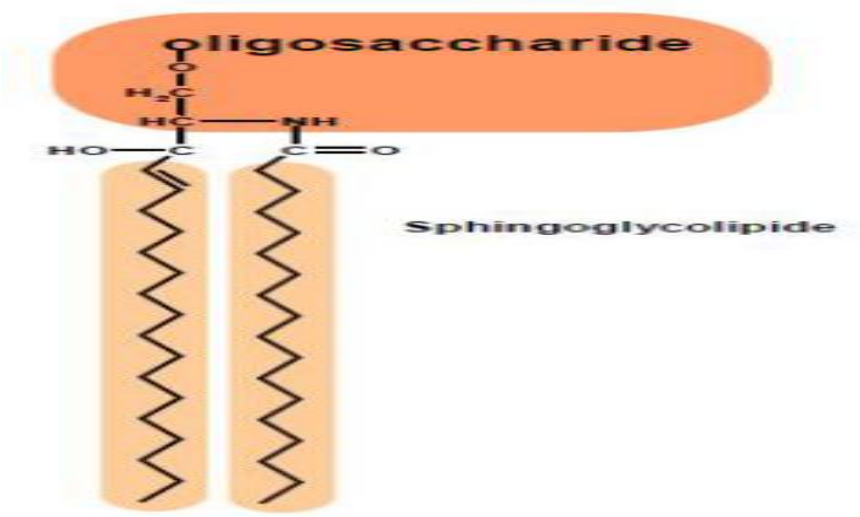


Figure 13: Représentation schématique des sphingoglycolipides [16]

1.1.7.3. Diversité des protéines

Les protéines cellulaires correspondent à l'ensemble des protéines membranaires et cytologiques. Mais nous allons nous intéressés plus aux protéines membranaires.

Les protéines membranaires sont classées en deux grandes catégories : les protéines intrinsèques (intégrales ou transmembranaires) et les protéines extrinsèques (ou périphériques).

1.1.7.3.1. Protéines Intrinsèques

Elles traversent la membrane de part et d'autre. Leurs séquences hydrophobes leur permettent d'être dissoutes au cœur de la bicouche. Elles sont associées à la membrane de façon étroite par un ensemble d'interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Ce sont des protéines transmembranaires dont la chaîne est accessible des deux côtés de la membrane. Leur disposition dans la membrane leur permet de participer à des transformations et des réactions qui s'effectuent de part et d'autre de la membrane. Ce sont ces protéines qui permettent le transport de matière, le couplage énergétique et le transfert d'informations. Elles

peuvent également servir de liens structuraux entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extracellulaire ou de récepteurs recevant et convertissant des signaux chimiques qui proviennent de l'environnement de la cellule **[16].**

1.1.7.3.2. Protéines Périphériques ou Extrinsèques

Elles sont quant à elles associées à la membrane par des interactions électrostatiques faibles (hydrogène ou Van der Waals). Elles peuvent être également associées aux têtes polaires des phospholipides ou aux protéines intrinsèques sur l'une ou l'autre face de la membrane. Leur localisation leur permet de participer à des réactions qui s'effectuent à l'interface entre la membrane et le compartiment aqueux.

1.1.7.3.3. Protéolipides (protéines ancrées dans la membrane par l'intermédiaire d'un lipide)

Ces protéines sont extérieures à la bicouche mais ancrées dans la partie lipidique par l'intermédiaire d'un lipide comme le farnésol, les acides myristique ou palmitique ou encore, dans des cas assez fréquents, par une liaison covalente à une molécule de glycophosphatidylinositol (GPI). En fait, les deux types d'ancrage lipidique se distinguent en fonction de la localisation de la protéine. La fixation au GPI se trouve essentiellement sur la face ***externe*** de la membrane plasmique. L'autre groupe de protéines, associées à des lipides à longue chaîne est localisé sur la face ***interne*** de la membrane plasmique.

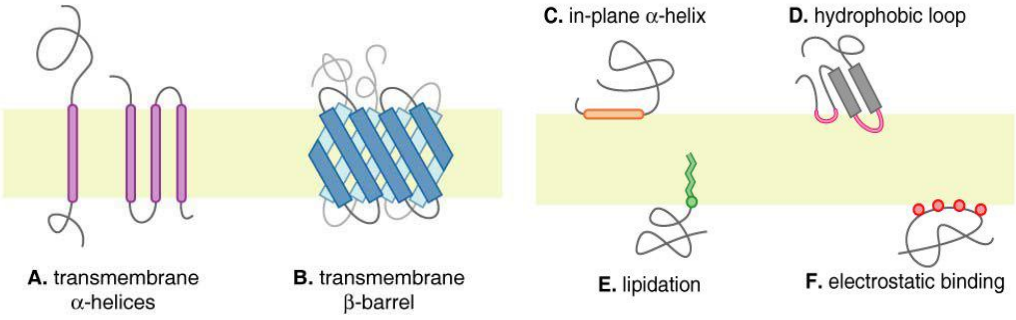


Figure 14: Ancrage des protéines dans les membranes ; polytopiques (A et B) monotopiques (C, D, E et F)

1.1.7.3.4. Glycoprotéines

Elles sont présentes dans la membrane plasmique et leur chaîne oligosaccharidique est orientée vers l'espace extracellulaire. La glycosylation intervient principalement au niveau de l'asparagine (liaison N-glycosidique) ou plus rarement avec le OH de la sérine et de la thréonine (liaison O-glycosidique). La glycosylation se fait souvent sur plusieurs sites de la protéine. Le nombre de résidus glycosidiques est limité (7 à 18 résidus).

1.1.7.3.5 Diversité des glucides

Ce sont des courtes chaînes comptant moins de 15 monomères, qui n'existent pas à l'état libre mais souvent liées covalemment à des protéines (glycoprotéines et protéoglycanes) par des **liaisons O-glycosidiques,** mais contrairement aux glycoprotéines, les protéoglycanes se caractérisent par de longues chaînes glycosidiques (40 à 100 résidus) liés à une protéine par une sérine ou une asparagine ; ou à des lipides (glycolipides) par des **liaisons N-glycosidiques**. Chez les eucaryotes, les chaînes oligosaccharidiques sont uniquement présentes ***sur la face externe*** de la membrane plasmique.

1.1.8. LE FOIE

Le foie est un organe plein situé dans la cavité abdominale. Il est le plus gros des organes humains et une volumineuse glande annexée au tube digestif. Il est entouré par une capsule conjonctive (capsule de Glisson) qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant de déterminer les lobes. Le foie est un organe majeur essentiel à notre survie puisqu'il métabolise les glucides, lipides et protéines et participe ainsi à la régulation de leur concentration dans l'organisme. Il intervient également dans le cycle de l'urée et dans la synthèse de nombreuses protéines plasmatiques (albumine). Il assure également la sécrétion de la bile indispensable à la digestion des lipides **[22]**.

1.1.8.1. Organisation architecturale du foie

1.1.8.1.1 Morphologie du foie

Le foie a la forme d'un demi ovoïde orienté transversalement. La partie droite, la plus volumineuse est arrondie ; et la partie gauche est aplatie et effilée à son extrémité. Il est de couleur rouge brunâtre et de consistance ferme. Il mesure 28cm de diamètre transversal, 15cm de diamètre ventrolatéral, 8cm d'épaisseur et chez l'humain, le foie adulte pèse entre 1400 et 1600 g, soit 1/50 du poids corporel **[23].**

1.1.8.1.2. Anatomie du foie

La figure 15 présente le dessin anatomique du foie. Elle indique que le foie vu de la face supérieure, est constitué de deux lobes (gauche et droit) surmontés du diaphragme et ligament coronaire et séparé par le ligament falciforme. On observe aussi le fond de la vésicule biliaire sous le lobe droit. (Figure 15-a). En considérant la face inférieure , on observe la veine cave inférieure puis celle supérieure, la veine hépatique, le ligament coronaire, la vésicule biliaire , le lobe caudale, le segment strié puis la fissure faite par ce dernier(figure 15-b).….

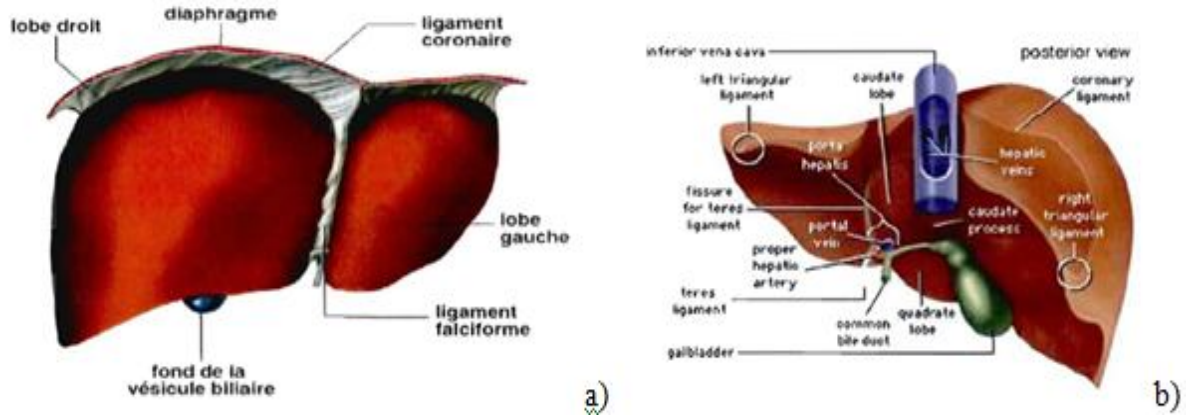


Figure 15: Dessin anatomique du foie : vue de la face supérieure (a) et de la face inférieure (b) [23]

1.1.8.1.3. Segmentation du foie

Le foie est une glande volumineuse qui se situe dans la cavité abdominale. Il est entièrement situé sous les côtes et présente trois faces : une face craniale, une face dorsale et une face caudale. **[22].** La face craniale du foie est couverte dans tous les sens et se moule contre le diaphragme. En considérant la face dorsale du foie, deux gouttières verticales sont notées. La première est formée par la veine cave et la seconde est dite sillon du ligament veineux. La dernière face viscérale du foie est marquée par des reliefs, le sillon ventro dorsal gauche qui est formé par deux éléments : le ligament veineux en arrière et le ligament rond en avant.

1.1.8.1.4. Vascularisation du foie

La particularité du foie est de recevoir un apport qui n'est pas qu'artériel. La figure 16 montre le réseau sanguin alimentant le foie. Elle révèle que :

- Pour les 2/3 de l'apport, c'est du sang veineux en provenance de la **veine porte**. En effet, la veine porte draine le sang chargé de toutes les substances absorbées au niveau de la paroi du tube digestif
- Le 1/3 restant est du sang artériel qui est apporté par l'**artère hépatique**. Cette dernière amène au foie du sang oxygéné de composition stable permettant son bon fonctionnement.

La veine porte et l'artère hépatique se divisent le long des cloisons fibreuses pour devenir des vaisseaux segmentaires qui entrent dans le foie par sa face inférieure : le **hile hépatique [24 ; 25]**.

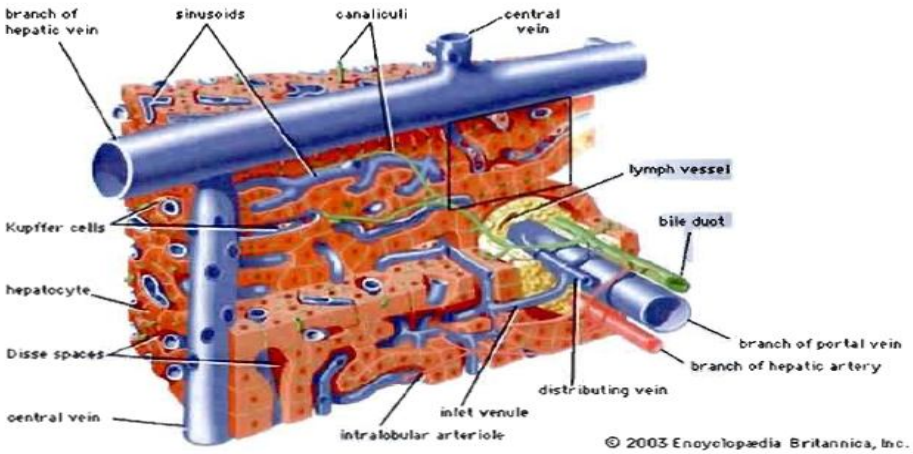


Figure 16: Représentation du réseau sanguin alimentant le foie [23]

Le foie possède une particularité anatomique : sur les huit segments, sept sont drainés directement par les veines sus-hépatiques **[24 ; 25].**

1.1.8.1.5. Voies biliaires attachées au foie

Deux principaux canaux constituent les voies biliaires (figure 17). Ceux-ci ont pour rôle l'évacuation de la bile sécrétée par le foie vers le tube digestif **[24 ; 25].**

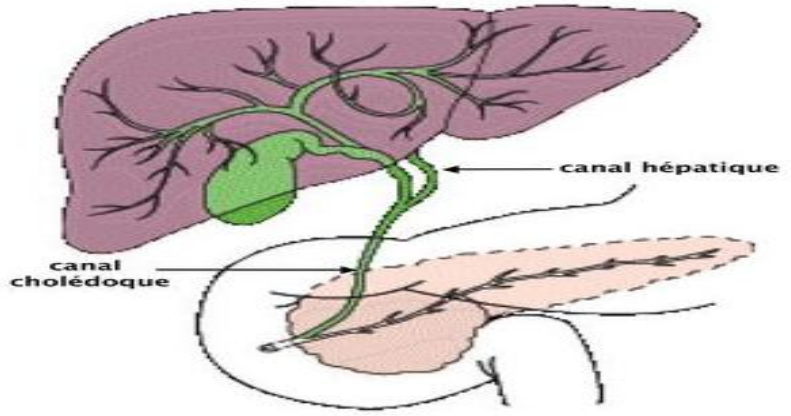


Figure 17 : schéma montrant les voies biliaires, les canaux hépatique et cholédoque

1.1.8.1.6. Innervation du foie

Logiquement, l'innervation du foie est assurée par les fibres nerveuses sympathique et parasympathique. La particularité réside dans le fait qu'elles forment une espèce de plexus commun : il y en a deux (antérieur et postérieur) qui sont formés au niveau du hile : une en avant de la structure vasculaire et une en arrière **[24 ; 25].**

1.1.8.1.7. Structure du foie

Le foie est constitué de 80% de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées et entravées autours des sinusoïdes. Ses échanges avec le reste du corps se font pour la plus part à travers sa double irrigation sanguine, qui se termine par une multitude de capillaires jusqu'à l'intérieur du foie. Les cellules hépatiques sont groupées à l'intérieur du foie en formations spéciales, les lobules hépatiques (unité fonctionnelle du foie) qui sont de forme polyédrique et dont l'agencement est déterminé par la disposition des vaisseaux et des voies biliaires intrahépatiques. Le lobule hépatique est un segment de parenchyme hépatique centré par une veinule sus-hépatique et entouré par six espaces portes. Les lobules hépatiques sont séparés les uns des autres par des travées de tissu conjonctif appelés espace portes ou espace de Kierman où cheminent des vaisseaux ou des canaux biliaires intrahépatiques.

1.1.8.2. Composition cellulaire

Le foie est constitué de deux types cellulaires : les cellules parenchymateuses (hépatocytes) et les cellules non parenchymateuses (cellules sinusoïdales et cellules biliaires).

1.1.8.2.1 Cellules Hépatiques parenchymateuses

L'unité structurale et fonctionnelle du parenchyme hépatique est l'acinus, qui est organisé autour de deux lits vasculaires distincts. Le parenchyme se compose de cellules (les hépatocytes) bordant les deux côtés d'un endothélium sinusoïdal fenêtré **[23].**

Les cellules parenchymateuses hépatiques ou hépatocytes sont les plus nombreuses (environ 65% des cellules) et les plus importantes cellules du foie. Elles sont polyédriques, disposées en travées (travées de Remak) et séparées les unes des autres par des capillaires sinusoïdes **[24 ; 26].** Les hépatocytes sont de grande taille (25 à 30 µm de diamètre, 30µm de long et 20µm de large) au noyau central, rond, volumineux et parfois binucléé ; et au cytoplasme éosinophile granuleux, avec beaucoup de mitochondries **[23 ; 26].** Le cytoplasme est riche en organites intracellulaires et contient d'abondants grains de glycogène. Cette richesse en organites cytoplasmiques témoigne d'une grande activité métabolique **[23].**Les hépatocytes sont polarisés et trois pôles sont définis à leur niveau: le pôle sinusoïdal, le pôle latéral, et le pôle biliaire **[26].**

L'hépatocyte est au carrefour des voies métaboliques. Il possède les enzymes impliquées dans les réactions de biotransformation de la phase l et II. Il s'adapte aux besoins de l'organisme grâce à une infinité de mécanismes de rétrorégulation. Une des particularités de ces cellules est leur double polarité orientée, d'une part, vers le courant sanguin (fonction endocrine -

contact avec le sang, participation à la pinocytose, diffusion, etc.) et d'autre part, vers l'arbre biliaire (fonction exocrine -la bile) **[23].**

Les hépatocytes possèdent aussi une hétérogénéité fonctionnelle. Les cellules sont plus petites dans la zone l, intermédiaire dans la zone 2, et plus grandes dans la zone 3, et il y a des variations de la morphologie des mitochondries, du réticulum endoplasmique, et des granules de glycogène **[23].**

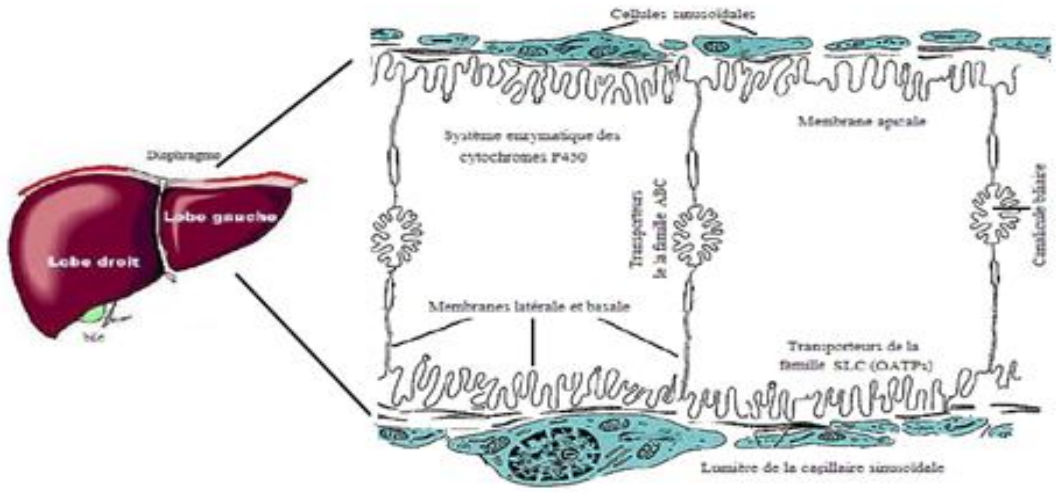


Figure 18 : **Vue antérieure du foie et structure des hépatocytes avec leurs différents domaines** [27]

1.1.8.2.2. Cellules non parenchymateuses

1.1.8.2.2.1. Cellules sinusoïdales

Les sinusoïdes contiennent plusieurs autres types cellulaires (cellules non parenchymateuses) qui représentent 30 à 35% des cellules hépatiques **[23].**

- Cellules endothéliales

Les sinusoïdes hépatiques sont des vaisseaux dont la paroi est constituée uniquement de cellules endothéliales qui forment un tapis discontinu. Elles sont fenêtrées avec présence de paroi de 10nm de diamètre. Elles reposent sur une lame basale discontinue et sont séparées des hépatocytes par l'espace de Disse. Cet espace est donc limité par des microvillosités des hépatocytes et la lame basale des cellules endothéliales ; il renferme des cellules de Ito et de la matrice extracellulaire qui peut être visualisée par une coloration spécifique de la réticuline **[28]**. Les cellules endothéliales représentent environ 17% de la population cellulaire du foie. Leur principale fonction est de former une barrière entre le sang des capillaires et le parenchyme du foie. Elles bloquent aussi le passage des chylomicrons vers le foie. Elles participent également au catabolisme des glycoprotéines, des lipoprotéines, des albumines et

des acides hyaluroniques **[23].** Les cellules endothéliales possèdent une activité endocytotique importante et produisent du thromboxane, des prostaglandines et du monoxyte d'azote (NO) **[29]**.

- Cellules de Küpffer

Environ 80 à 90% des cellules non parenchymateuses sont des macro-phagocytes stellaires appelés également des cellules de Kupffer (variété de globules blancs de volume important) et qui représentent approximativement 10% de la population cellulaire du foie. Ce sont des macrophages résidents (différent des macrophages qui sont dans la circulation sanguine et qui sont transportés entre les différents organes). Leur fonction principale est la phagocytose d'un certain nombre d'agents biologiques qui ont traversé la barrière intestinale : les particules colloïdales, des bactéries, des complexes immunologiques, des cellules tumorales, des liposomes et du fer sanguin contenu dans les capillaires hépatiques **[23;28]**. Elles sont également impliquées dans la dégradation de l'hémoglobine **[28]**.

- Cellules de Ito ou cellules périsinusoïdales

Environ 7% des cellules du foie sont constituées de cellules étoilées (Lipocytes, cellules de Ito). Elles sont localisées dans l'espace compris entre les cellules sinusoïdales et les cellules hépatiques appelé **espaces de Disse**; et leurs fonctions sont multiples : l'entreposage, le métabolisme de la vitamine A (l'ester du rétinyl), la sécrétion des médiateurs, la synthèse de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire et la synthèse du collagène. Elles ont également une fonction physiopathologique. Aussi, elles peuvent se dédifférencier et fabriquer du tissu conjonctif lors de certaines pathologies comme la fibrose suite à l'inflammation chronique et la nécrose **[23; 28 ; 29]**.Sa progression se traduit par une aggravation de maladie du foie où le stade ultime est la **cirrhose** hépatique **[24 ; 25].**

- Cellules à granules

Ce sont de grands lymphocytes granulaires résidents, souvent en contact avec les cellules de Küpffer et les cellules endothéliales. Leur morphologie est identique à celle des « Natural Killer ». Elles manifestent une cytotoxicité spontanée qui leur confère un rôle antimulal et antiviral **[29]**.

1.1.8.2.2.2. Cellules biliaires ou cholangiocytes

Ce sont des cellules épithéliales revêtant les canaux biliaires et la vésicule biliaire. Leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles apparaissent hétérogènes en fonction de

leur localisation sur cet arbre biliaire. Elles jouent un rôle actif dans la formation de la bile **[29].**

1.1.8.3. Fonctions du foie

Les fonctions du foie sont principalement liées au stockage et la conduite des nutriments puis au traitement des déchets.

1.1.8.3.1. Stockage et conduite des nutriments

En effet, les nutriments sont absorbés au niveau de l'intestin grêle et rencontrent comme premier organe le foie après leur passage dans la veine porte**.** Le foie les stockent, éventuellement les transforment avant de les redistribuer dans la circulation générale **[24 ; 25]**. Les principaux nutriments concernent :

- **les glucides:** trois sucres sont absorbés au niveau de l'intestin grêle : le **glucose**, le **fructose** et le **galactose**. Ils ont un devenir assez distinct au niveau du foie ;

  ➢ **le glucose** : il traverse la membrane sinusoïdale par l'intermédiaire d'un transporteur protéique : glut-2. Ce dernier a une affinité faible avec un Km de l'ordre de 20 mM. Le transport est facilité donc le sens dépend du gradient de concentration du glucose entre sa concentration dans le sang sinusoïdal et celle en intracellulaire dans les hépatocytes. On peut décrire deux situations :

  - la post-prandiale :
    - Il y a une augmentation de la concentration de glucose dans le sang sinusoïdal. Le transporteur favorise sa pénétration dans les hépatocytes. Dans les hépatocytes, le devenir du glucose est lié à l'action d'une hexokinase, la **glucokinase**, qui donne du glc-6P ; et aussi du **glycogène synthétase**. La principale voie de métabolisme (glycogénogenèse) est la voie de la synthèse de glycogène qui constitue la forme de mise en réserve du glucose au sein des hépatocytes. C'est la voie privilégiée en post-prandiale car la synthèse de glycogène est stimulée par l'insuline dont la sécrétion augmente en période post-prandiale **[14 ; 29].**
    - Le glc-6P peut être orienté plutôt vers la voie de la **glycolyse** qui a deux objectifs : apporter de l'énergie sous forme d'ATP et de fournir une brique biologique pour la synthèse de lipides car le produit final est le pyruvate. Le glc-6P est transformé en frc-6P. Les enzymes clés de la glycolyse sont les

phosphofructokinases 1 et 2. En post-prandiale, il y a alors augmentation de la synthèse de glycogène et diminution de la production hépatique de glucose : le foie met le glucose en réserve **[24]**.

- les périodes de jeûne :
  - Il y a diminution de la concentration de glucose dans le sang sinusoïdal. Le foie est tourné vers l'augmentation de sa production de glucose, d'où une augmentation de la production hépatique de glucose. La conséquence de la stimulation de la glycogénolyse (dégradation du glycogène pour libérer le glucose) est une augmentation de la concentration intra-hépatocytaire de glucose. les enzymes responsables de cette réaction sont l'amyloglucosidase et le glucose-6-phosphatase. Le glucose peut sortir par l'intermédiaire du transporteur glut-2 dans la sinusoïde.
  - Inhibition de la glycolyse au niveau hépatique.
  - Activation d'une autre voie : la néoglucogenèse qui est la synthèse de novo de glucose à partir de substrat non glucidique notamment à partir de certains acides aminés, de lactate ou encore de glycérol. Les enzymes nécessaires à la néoglucogenèse sont présentes essentiellement dans les hépatocytes péri-portaux situés au début des travées hépatocytaires. Il y a une hétérogénéité métabolique entre les hépatocytes : certains sont spécialisés pour certaines fonctions. On parle de **zonation métabolique [24; 29]**;

- **le fructose** : il est absorbé au niveau de l'intestin grêle, passe par la veine porte puis la sinusoïde dans les hépatocytes. Son transport est facilité et il utilise le transporteur glut-5. A l'intérieur des hépatocytes, le fructose subit une phase sous l'influence d'une **fructokinase** spécifique au foie avec la formation de frc-1P. Le fructose a deux voies métaboliques possibles en fonction de l'homéostasie du glucose :

- La transformation en frc-6P puis en glc-6P. Il rejoint la possibilité d'intégrer la synthèse de glucose ou la glycolyse. Mais cette possibilité est extrêmement faible dans le foie car l'affinité de l'enzyme nécessaire à cette transformation pour le fructose est bien moindre par rapport à l'affinité pour le glucose. Compte tenu des concentrations importantes de glucose, cette voie n'est utilisée qu'en cas de jeûnes prolongés.
- Le frc-1P peut être engagé dans la voie de la glycolyse. Le substrat est plus important que le glucose car il n'est pas soumis à la régulation de la PFK1 étant donné qu'il

rentre dans la glycolyse à une étape ultérieure à l'action de cette enzyme. Tout le fructose fournit de l'énergie **[24; 25]**;

- **le galactose** : il est transporté à travers la membrane par le même transporteur que le glucose : glut-2. Les hépatocytes utilisent le galactose comme les autres cellules pour synthétiser certaines glycoprotéines et aussi des galactolipides. La caractéristique du foie par rapport au galactose est qu'il est le seul à pouvoir cataboliser et métaboliser le galactose. Les enzymes clés de ces réactions sont la **galactokinase** et la **gal-1P/UDP-glc uridyl transférase**. Cette dernière est importante car il existe une maladie caractérisée par la mutation de gènes qui codent pour elle. L'enzyme est alors non fonctionnelle et le foie ne peut plus métaboliser le galactose. Dans l'organisme, l'accumulation du galactose et du gal-1P est potentiellement toxique pour le cerveau, et s'accumule dans le foie et la rate notamment. Cette maladie est potentiellement mortelle si elle n'est pas diagnostiquée très rapidement. Le traitement consiste à exclure le galactose de l'alimentation (produits laitiers) pour éviter l'accumulation de produits toxiques. Lorsqu'il y a une concentration importante de sucres dans les sinusoïdes, notamment de glucose, on observe un rôle important des hormones telles que le **glucagon**, l'**insuline**. Les systèmes nerveux autonomes (SNA) sympathique et para-sympathique peuvent moduler l'utilisation des sucres selon les différentes voies indiquées **[24].**

- **les protéines :** Elles sont apportées par l'alimentation, et vont être dégradées essentiellement en **acides aminés**. Elles vont venir au foie par l'intermédiaire de la **veine porte**. Le foie utilise les acides aminés principalement pour la synthèse protéique ; il existe une très forte capacité de synthèse protéique par les hépatocytes. Les protéines ne sont pas spécifiques au foie mais sont relarguées dans la circulation générale et constituent essentiellement les protéines plasmatiques **[24]** ; les principales protéines sont :

  - l'**albumine** est la protéine quantitativement la plus importante des protéines plasmatiques (60%) et la principale protéine secrétée par les hépatocytes. C'est pratiquement elle qui est responsable de la pression oncotique : elle permet à une certaine quantité de liquide dans le secteur vasculaire d'y rester. Les substances liposolubles peuvent se fixer à l'albumine et être transportées. Lors d'une insuffisance hépatique et d'une hypoalbuminémie, la pression oncotique diminue. L'eau

plasmatique sort plus facilement du secteur vasculaire vers le milieu extracellulaire. On observe des œdèmes, de l'ascite (présence d'eau plasmatique dans la cavité péritonéale) **[24 ; 29]** ;

- **les protéines ou facteurs de coagulation** (I[fibrinogène], III, V, IX, XI: le foie est le plus important organe pour cette activité. Il y a des protéines pro-coagulantes (favorisant la coagulation du sang) et des protéines anti-coagulantes (empêchant la coagulation du sang). Il faut un équilibre entre elles pour éviter que les choses n'aillent dans un sens ou dans l'autre. Le foie synthétise surtout des protéines pro-coagulantes. Lors d'une insuffisance hépatique caractérisée par un déficit en coagulation (cirrhose par exemple), le saignement est facile et beaucoup plus difficile à arrêter **[24 ; 29] ;**
- Il y a d'autres protéines de transport plus spécifiques que l'albumine. La **transferrine** transporte le fer dans le sang. La **céruloplasmine** sert à transporter le cuivre. Elles sont synthétisées par le foie et sont libérées dans le sang où elles vont être utilisées pour transporter ces métaux **[24] ;**
- Le foie sécrète un certain nombre de protéines d'inflammation. Elles stimulent le phénomène d'activation inflammatoire. Une des protéines très couramment dosée est la C-RP (**C-Reactive Protein**). Elle est toujours augmentée dans des situations d'infection ou d'inflammation **[24 ; 29] ;**
- Le foie sécrète de nombreux facteurs de croissance qui vont favoriser la croissance tissulaire, le renouvellement et la différenciation cellulaire. Elles sont extrêmement importantes et donnent la capacité au foie de se régénérer de façon majoritaire **[24]**.

- **les lipides :**

Le cholestérol peut arriver au foie directement après passage dans la circulation générale s'il est absorbé par les chylomicrons (CM). Le foie est le principal organe de contrôle dans l'homéostasie du cholestérol. Le cholestérol est essentiel pour les membranes cellulaires, il est utilisé pour la croissance et le renouvellement cellulaire, la synthèse des hormones stéroïdes ; les lipides sont utilisés pour la synthèse de sels biliaires. Les acides gras sont indispensables au fonctionnement cellulaire mais peuvent être très nocifs s'ils s'accumulent en excès avec des risques d'**athéromes** cellulaires (plaques de cholestérol qui bouchent petit à petit les vaisseaux).

- Le foie est le principal site de synthèse du **cholestérol** dans l'organisme. Le cholestérol est soit stocké tel quel dans les membranes cellulaires, soit il est **estérifié**. Quand il y a trop de cholestérol, il est éliminé directement dans la bile. Le cholestérol peut être incorporé dans les lipoprotéines synthétisées par le foie, formées de protéines et de lipides. Il y a deux variétés : les HDL natifs (high density) et les VLDL (very low). Le foie est le principal organe de récupération et d'élimination du cholestérol par l'intermédiaire d'un certain nombre de récepteurs (**récepteurs aux LDL, récepteurs qui vont fixer les vestiges de chylomicrons, récepteurs aux HDL)** sur la membrane sinusoïdale.
- Le foie a la capacité de synthétiser les protéines indispensables à l'assemblage des lipoprotéines : les **apoprotéines**.
- Les vitamines liposolubles sont absorbées de la même façon que les lipides par l'intestin grêle. Elles sont stockées et transformées dans le foie. Il y en a quatre principales : A, D, E, K. Elles sont stockées dans le foie avant leur redistribution dans les organes qui le nécessitent. La vitamine D est importante pour l'absorption intestinale du Ca^{2+} et sa fixation sur les os. Pour être fonctionnelle, elle subit une activation hépatique sur C25 : la 25-OH vitamine D est sa forme active.

Le foie assure également le stockage d'une multitude de substances, dont la vitamine B12, le fer, le cuivre et le glucose (sous forme de glycogène). Celles-ci sont récupérées lors de la destruction des vieilles hématies **[30]**.

1.1.8.3.2. Traitement des déchets organiques

Un certain nombre de substances qui sont soit endogènes (produits du métabolisme cellulaire) soit exogènes (alimentation ou médicaments) sont des déchets organiques. Ces substances peuvent être potentiellement toxiques pour l'organisme, d'où leur élimination. Les autres substances sont hydrosolubles et liposolubles. Les premières ne constituent pas de problème majeur car sont éliminées dans les urines mais les secondes ont besoin d'être modifiées pour permettre leur élimination. Le foie n'est pas l'organe exclusif mais est essentiel dans le traitement des déchets **[24]**.

- Elimination de l'ammoniaque

L'ammoniaque est le produit final de dégradation des **protéines**. Dans les milieux aqueux, il est sous forme de NH_4OH (ammoniaque) et se dissocie en ion ammonium (NH4+) puis en ion hydroxyle (OH-). L'ion ammonium est potentiellement toxique pour le Système Nerveux Central notamment et doit être éliminé. L'activité de synthèse d'urée et les différentes enzymes sont surtout présentes au niveau des hépatocytes péri-portaux **[29].**

- Métabolisme de la bilirubine

La bilirubine est le principal produit de dégradation de l'**hème** qui est une molécule contenant notamment un atome de fer et est impliquée dans les réactions de transfert d'électrons et d'oxydoréductions. L'hème est essentiellement sous forme d'hémoglobine dans l'organisme, et à environ 80% présente dans les globules rouges. Le reste se trouve dans d'autres protéines comme la myoglobine (au niveau des muscles striés), des cytochromes P450. Au centre, il y a un atome de fer et un noyau : **protoporphyrine**. Le principal site de production de la bilirubine est la **rate**. La plupart des globules rouges vieillissants sont dégradés au niveau de la rate par les macrophages. Il y a une petite production hépatique sous l'action des cellules de Kupffer. La bilirubine non conjuguée est relarguée dans le plasma, elle est insoluble dans l'eau, et se fixe donc à un transporteur qui est l'albumine et le foie s'occupe de son élimination par la canalicule biliaire **[24].**

- Métabolisme des xénobiotiques (biotransformation)

Les enzymes impliquées dans cette réaction sont présentes de façon plus importante dans le foie mais aussi dans d'autres organes tels que le rein, le poumon ou l'intestin. Ce sont des organes qui sont en relation avec l'extérieur soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs sécrétions. Les réactions enzymatiques peuvent être classées en deux grandes catégories : réaction d'oxydoréduction et réaction de conjugaison **[24].**

1.1.8.4. Autres Fonctions

1.1.8.4.1. Production des acides (sels) biliaires

Les sels biliaires sont synthétisés exclusivement dans les hépatocytes à partir d'un acide gras : le cholestérol. A partir du cholestérol, il y a plusieurs étapes enzymatiques. L'étape limitante est celle où l'enzyme **7α-hydroxylase** rajoute un groupement OH sur C7, et la double liaison (C5-C6) disparaît. Les autres étapes raccourcissent la chaîne latérale carbonée.

Les sels biliaires sont des molécules de 24 C. Chez l'homme, il y a deux sels biliaires principaux primaires (dérivés du cholestérol):

- **Acide cholique qui est le** tri-hydroxylé (3, 7, 12)
- **Acide chénodésoxycholique, le** di-hydroxylé (3,7)

Les sels biliaires primaires sont conjugués dans les hépatocytes avec des acides aminés, principalement la **Glycine** ou la **Taurine** pour donner les sels biliaires I conjugués **[24 ; 25].**

Le foie possède aussi une fonction endocrine : il s'agit de contrôler la composition du sang qui provient du tube digestif et qui va être dirigé vers la circulation générale. Il y a des échanges importants au niveau du foie. Cette rubrique de fonction permet de placer les hépatocytes dans la catégorie des cellules amphicrines (c'est-à-dire exocrine et endocrine). Les sécrétions hormonales assurées par le foie sont principalement l'érythropoïétine, la thrombopoïétine et l'Insulin Growth Factor (IGF)**.**

1.1.8.4.2. Pathologies du foie

Les pathologies qui peuvent s'observer au niveau du foie sont:

- Les cancers primitifs du foie: il peut s'agir:
  - du carcinome hépatocellulaire
  - du carcinome fibrolamellaire : rare, atteint plutôt la femme
  - de l'hépatoblastome
  - de l'angisarcome
  - de l'hépatome : aflatoxines
- Les cancers secondaires

  Ce sont des métastases secondaires hépatiques provenant des cancers primitifs
- Les tumeurs hépatiques bénignes et autres : il s'agit de:
  - L'adénome : rare, atteint la femme. Cela est dû aux contraceptifs oraux
  - L'hyperplasie nodulaire focale : rare
  - Cirrhose hépatique
  - Hépatite virale etc...

Le mauvais fonctionnement du foie peut se répercuter sur plusieurs fonctions de l'organisme :

- Au tube digestif par des dyspepsies et des troubles biliaires.

- A l'appareil respiratoire par des crises d'asthme.
- A l'appareil circulatoire par des varices ou des hémorroïdes.
- Au niveau de l'appareil urinaire par des modifications dans le débit et la composition de l'urine.
- A la peau par un teint bilieux, des démangeaisons, de l'urticaire ou de l'eczéma.
- Au système nerveux par des maux de tête ou des névralgies.
- Au système ostéo-musculaire par des troubles arthritiques et rhumatismaux **[22].**

Le foie, comme le cœur et le cerveau, n'existe qu'en un seul exemplaire dans un corps humain. Vue le grand nombre de fonctions dont lui seul en a la charge, il est donc vital de considérer son entretient comme une priorité dans chacune de nos actes quotidiennes (surtout notre alimentation) ; car un mauvais fonctionnement du foie entraine un mauvais fonctionnement de l'organisme entier.

1.2. CADRE D'ETUDE

Les études ont été conduites au Sud-Bénin (Afrique de l'Ouest). Les activités d'élevage, de gavage puis de sacrifice de lapins se sont déroulées à la ferme de la Faculté des Sciences Agronomiques (FSA) de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC). Elle est localisée dans la Commune d'Abomey –Calavi qui fait partie de la zone agroécologique VI du Bénin (figure 19).

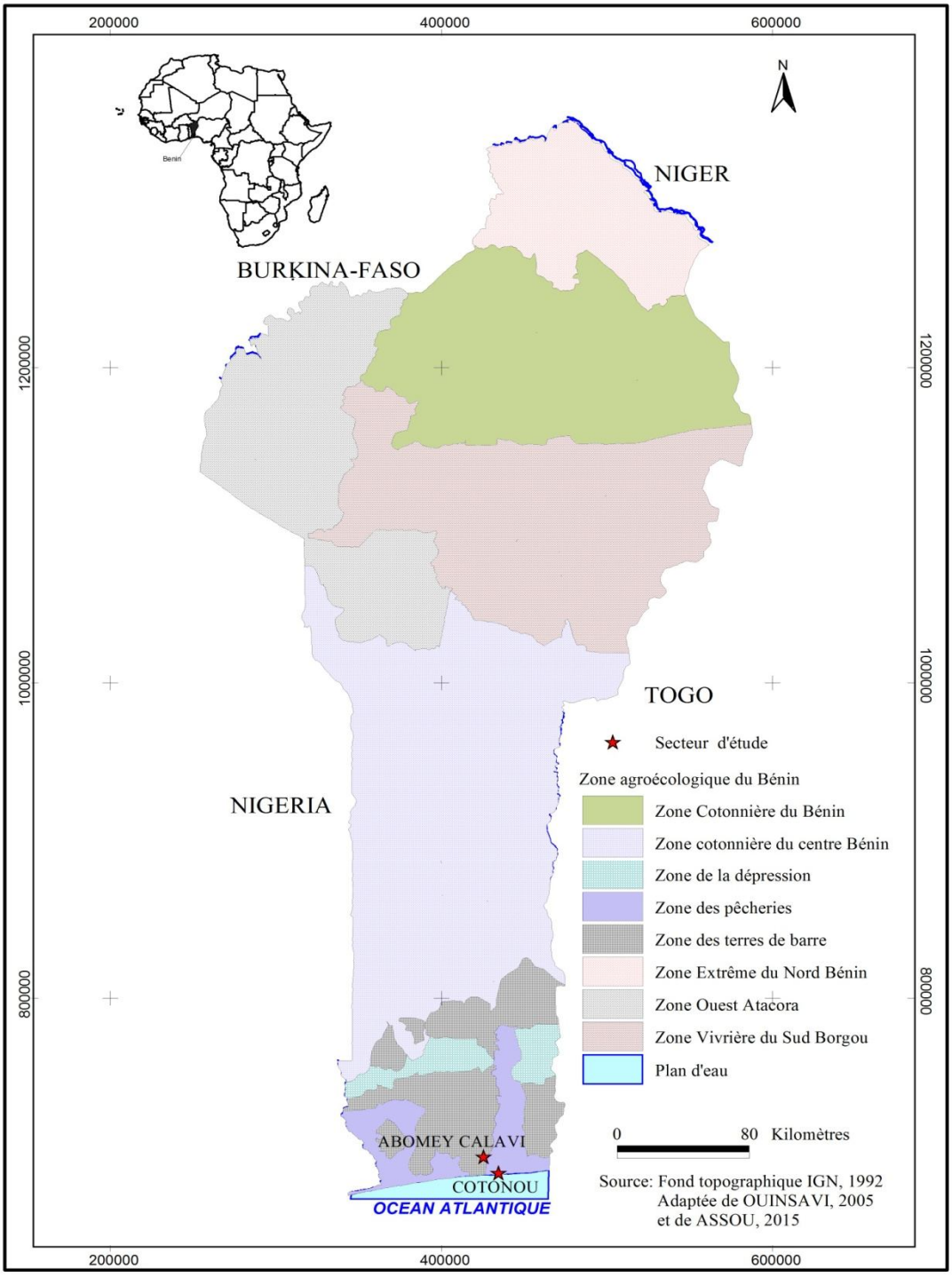


Figure 19: Zones agro-écologiques du Bénin montrant le milieu d'étude

La zone jouit d'un climat de type guinéen avec deux saisons de pluies (avril à juillet, septembre à novembre). La pluviométrie varie de 1000 mm à 1400mm d'eau par an. Le sol de la zone d'étude est majoritairement latéritique avec des parties ferrugineuses et hydromorphes par endroit. En outre d'autres activités ont impliquées des Laboratoires situés dans la

Commune de Cotonou. Il s'agit des Laboratoires de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) puis celui de cytogénétique de la FSS qui ont été sollicités respectivement pour les activités liées à l'obtention des extraits totaux de *Khaya Senegalensis*, le screening phytochimique puis la Chromatographie sur Couche Mince ; et à l'élevage, le gavage puis le sacrifice de rats. L'isolement des hépatocytes a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie (LBTMM) (UAC). Les essais biologiques (dosage des paramètres biochimiques) se sont déroulés au sein du laboratoire de Biomembranes et Signalisation cellulaire à la Faculté des Sciences et Techniques **(**FAST) (UAC)

DEUXIEME PARTIE :

MATERIELS UTILISES ET METHODOLOGIE ADOPTEE

2.1. Matériels utilisés

2.1.1. Réactifs utilisés

Les réactifs utilisés sont de plusieurs ordres.

2.1.1.1. Réactifs de dosage biochimique

Les réactifs de dosage biochimique concernent les coffrets de :

- de GLUCOSE (GODPAP),
- des triglycérides (GPO),
- cholestérol TOTAL (CHOD-PAP),
- cholestérol - HDL (PTA)
- Pour une fiabilité des résultats et l'efficacité des coffrets de dosage il faut :
- Respecter strictement les instructions de chaque coffret
- Conserver les coffrets à la température de réfrigération compris entre 4 et 8°C (car les réactifs sont des solutions calibrées très instables et parfois thermosensibles)
- Homogénéiser correctement les réactifs avant leur utilisation afin de permettre aux éléments qui se sont déposés de se trouver dans la solution lors du pipetage
- Eviter d'utiliser les coffrets au delà de leur date d'expiration et de mélanger les réactifs de différents coffrets (pour ne pas avoir des résultats biaisés)

2.1.1.2. Réactifs utilisés pour la préparation des solutions impliquées dans l'Anatomo-pathologie

Poudre de formaldéhyde 10g
Phosphate monosodique hydraté..... 0, 45g
Phosphatedisodique hydraté..... 0, 80g
Eau distillée qsq 100ml

Préparation à partir d'une solution de formaldéhyde 40%
Formaldéhyde 40%..... 25ml
Phosphate monosodique hydraté..... 0,45g
Phosphate disodique hydraté..... 0,80g
Eau distillée qsq 100ml

Préparation de l'eau gélatineuse
Eau distillée..... 100ml
Poudre de gélatine 0,5%
Faire bouillir et agiter l'ensemble de la solution jusqu'à dissolution complète de la poudre de gélatine, filtrer la solution et s'en servir pour étaler les pièces sur les lames.

Mode opératoire de la coloration au PAS (Acidperiodicschiff)

DEPARAFFINAGE

Bain de xylène ou de toluène..... 3 à 5 minutes

HYDRATATION

Bain d'éthanol à 90° ..... 3 à 5 minutes
Bain d'éthanol à 70° ..... 3 à 5 minutes
Bain d'eau courante..... 3 à 10 minute
Bain d'eau distillée..... Rinçage
Bain d''acide périodique 1%..... 10 à15 minutes
Rinçage à l'eau courante..... 5minutes
Bain du réactif de schiff..... 10 minutes
Bain sulfureuse..... 2 minutes
Bain sulfureuse..... 2 minutes
Bain sulfureuse..... 2 minutes
Rinçage à l''eau courante ..... 7 à 10 minutes
Coloration à l'hématéine de harris ..... 10 minutes
Différenciation à l'alcool acide..... 1à2plongées (20minutes)
Rinçage à l'eau courante..... 10 minutes

DESHYDRATATION

Ethanol 95°..... 30 secondes
Ethanol absolu..... 1 minute

ECLAIRCISSEMENT

Toluène ou xylène ..... 30 secondes
Toluène ou xylène ..... 30 secondes

MONTAGE AU DPX (produit anhydre de montage sans DPB (dibutylpht Alate) qui présente moins de risque en utilisation)

Préparation de la solution des extraits totaux de *Khaya Senegalensis*

La solution d'extrait est préparée avec de l'eau distillée**.**

C= 0 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 pour 1 kilogramme
2,5mg ..... 1 kilo
ME ..... 740 kilo
ME= masse de l'extrait
ME= 1,85 g
C= 60 mg V=100ml
60mg 100ml
1,85g ..... qd
Qd= quantité d'eau distillée
Qd=3,08 ml

On dissout 1,85g d'extrait dans 3,08ml d'eau distillée, homogénéiser et conserver au réfrigérateur

2.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est l'écorce de tronc de *Khaya Senegalensis*. Les écorces ont été récoltées, lavées et séchées à l'air libre à la température du Laboratoire. Elles ont été broyées en poudre fine qui est ensuite conservée dans des bocaux de verres afin d'éviter la contamination.

2.1.3. Matériel animal

Le matériel animal est constitué du foie, des reins de lapins blancs de laboratoire et du foie des rats de type WISTAR, soumis à un gavage sub-chronique (14 jours) et élevés à l'animalerie du laboratoire de Cytogénétique de l'ISBA/FSS/COTONOU. L'élevage est effectué dans une pièce éclairée 12 heures par jour avec une température de 37°C. Les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau.

2.2. Méthodologie

2.2.1. Obtention des extraits totaux des écorces de *Khaya senegalensis*

Ce sont ces extraits qui seront préparés avec de l'eau distillée pour gaver les animaux.

La photo 4 montre les différents produits obtenus avec les écorces de *Khaya Senegalensis.* Après récolte, séchage des écorces de *Khaya Senegalensis*, on le rend en poudre, c'est ce qu'on a en (a). Pour obtenir de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis*, 200 g de cette poudre, pesées à l'aide d'une balance analytique **SARTORIUS®** ont été macérées dans 2000 ml d'éthanol à 90°C sous agitation continue pendant 72 heures(b). Ensuite, le macérât a été filtré au travers du coton fibre hydrophile. Le filtrat obtenu a été évaporé à 40°C à l'aide de l'évaporateur rotatif **ROTAVAPOR®** et la maille est réutilisée pour une seconde macération afin d'augmenter le rendement (c).La pâte déposée au fond du ballon de l'évaporateur a été récupérée dans des bocaux et mise au séchage à l'étuve à 45°C. Après séchage complet, les extraits secs accolés au fond des bocaux ont été raclés à l'aide de la spatule en inox, concassés dans le mortier de porcelaine (d) puis gardés dans des flacons en verre préalablement étiquetés. Enfin, le rendement est calculé. .

$R = Me/ Mp \quad X \ 100$

R= rendement

Me= Masse de l'extrait

Mp= Masse de la poudre



Photos 2 : poudre des écorces de Khaya s. obtenue (a) ; macération sous agitation (b) ; évaporation au ROTAVAPOR (c) ; extrait éthylique obtenu (d). (Photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)

2.2.2. Obtention du matériel animal

Pour obtenir le matériel biologique, le lapin est laissé 24h à jeûn. Après avoir pris son poids, il a été anesthésié avec du chloroforme. Ensuite il a été pesé à nouveau et fixé sur une planche à dissection avant que sa peau ne soit sectionnée au niveau de l'abdomen (photo 4). Après la dépilation, l'animal a été Cathétérisé par l'injection d'1 à 2ml d'eau physiologique puis disséqué. Le foie, le rein, le muscle et les tissus adipeux ont été prélevés et conservés dans un bocal contenant de la solution de formol tamponné à 10%.



Photos 3 : lapin disséqué (photo de K. S.E. ASSOU 2013)

2.2.3. Mesure des paramètres biochimiques

2.2.3.1. Etapes préparatoires

L'expérience est réalisée sur des lapins mâles et femelles d'environ 0,8 kg. Ils proviennent d'éleveurs de la place. Les lapins sont achetés et gardés à l'animalerie de la FSA deux (2) semaines avant le début des tests. Ils sont nourris d'aliments mixtes dont la composition est en annexe IV. Ils sont gavés chaque jour et prélevés chaque deux semaine pendant un mois. Pour le prélèvement les lapins sont soumis à un jeûne d'au moins 16 heures, pour évaluer l'effet hypoglycémiant sur la glycémie de base. Ces lapins sont répartis en deux groupes pour deux essais différents: un groupe pour essai en état normoglycémique et un groupe en hyperglycémie temporaire (en état d'hyperglycémie provoquée par surcharge orale de glucose).

- *Le Prélèvement de sang*

Il se fait par ponction dans la veine marginale de l'oreille tôt le matin à 7h. Après chaque prélèvement sanguin, le sang est centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes puis le sérum ou plasma est récupéré et utilisé pour les dosages biochimiques de la glycémie, le cholestérol total, et les triglycérides .La mesure du poids est effectuée sur des lapins normoglycémiques à jeun, de façon régulière, chaque deux semaine juste avant les prélèvements sanguins.

- *Glycémie de base*

Elle est calculée sur une moyenne de 10 lapins soumis à un jeûne non hydrique.

- *Administration de l'extrait*

Elle se fait par voie orale avec une seringue munie d'une sonde œsophagique. Cela permet d'être certain que le lapin a bien avalé la dose prévue. Il consiste à introduire une seringue derrière les incisives du lapin. Les lapins ont un grand espace sans dents entre les incisives et les prémolaires qui permettent d'introduire, sans brutalité, une seringue sans aiguille.



Photos 4 : Gavage de lapins (photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2013)

- *Essai chez des lapins normoglycémiques*

Les lapins sont répartis en 4 lots de 3 et sont soumis à un jeûne préalable de 16 heures avant l'expérimentation.

Lot 1 : Témoin en état normoglycémique. Ces lapins ne reçoivent que de l'eau distillée ;

Lot 2 : Administration de 10 mg de *Khaya senegalensis*/kg de poids des lapins ;

Lot 3 : Administration de 25 mg de l'extrait de *Khaya senegalensis*/kg de poids des lapins;

Lot 4 : Administration de 50 mg de l'extrait de *Khaya senegalensis* /kg de poids des lapins.

La mesure des paramètres biochimiques est effectuée sur des lapins à jeûn, de façon régulière, chaque deux semaine pendant les trente jours qu'a duré le gavage.

Un premier éssai avait précédemment débuté avec des lapins auxquels nous administrionsles doses : 100 - 200 - 300 mg d'extrait/kg de poids. Mais ces lapins sous traitement sont tous décédés à l'exception du témoin après cinq jours. Alors l'essai a été repris avec 12 autres lapins auxquels nous administrons les doses : 0- 10 -25 - 50 mg/kg de poids des animaux comme décrit plus haut.

- *Essais chez des lapins en hyperglycémie temporaire*

Les lapins ont été répartis en quatre lots de trois après un jeûne de 16 heures avant l'expérimentation.

Lot 1 : Témoin en état d'hyperglycémie provoquée par surcharge orale de glucose.

Lot 2 : Administration de 10 mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*/kg de poids corporel et administration 2 heures après la surcharge de glucose.

Lot 3 : Administration de 25 mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*/kg de poids corporel et administration 2 heures après la surcharge de glucose.

Lot 4 : Administration de 50 mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*/kg de poids corporel et administration deux heures après la surcharge de glucose.

La surcharge de glucose se fait par voie orale avec une seringue munie d'une sonde œsophagique. 2g de glucose/kg de poids d'animal, en solution à 50% P/V dans l'eau distillée. Elle se fait, 120 minutes après administration d'extrait, pour faire coïncider le moment d'activité maximum hyperglycémiant de la surcharge de glucose avec celui d'activité maximum hypoglycémiante de l'extrait.

Au temps T-120minutes (2h avant l'administration du glucose), un prélèvement de sang est effectué. Les lapins sont ensuite gavés avec l'eau distillée ou l'extrait éthylique de *khaya senegalensis* suivant les lots précités. Au temps T0, un prélèvement de sang est effectué, les lapins sont ensuite gavés avec une solution de glucose à 50%, puis d'autres prélèvements sont effectués toutes les 30 minutes pendant 2 heures.

2.2.3.2. Dosage des paramètres biochimiques

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

- *Dosage du glucose*

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

- *Principe*

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

$$\text{Glucose} + ½\ O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\textbf{G.O.D}} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

En présence d'une peroxydase (P.O.D), le peroxyde d'hydrogène réagit avec le chloro-4-phénol et le 4-aminoantipyrine (PAP) qui est incolore à l'état réduit pour former une quinonéimine. La quinonéimine formée présente une coloration rose dont l'intensité est

proportionnelle à la concentration en glucose. Cette intensité est mesurée au spectrophotomètre à 500nm **[70 ; 83]**.

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

- *Mode opératoire*

Amener le réactif (annexe I) à la température du laboratoire ; à l'aide d'une pipette, répartir dans les cuves comme récapitulé dans le tableau 1 ci-dessous ; Bien mélanger et laisser incuber les cuves10min au bain-marie à 37°C ; lire la concentration au spectrophotomètre.

Tableau 1: Dosage du glucose

Mesurer dans des cuves bien identifiées	**Blanc**	**Etalon [1g/ L]**	**Echantillon**
Réactif (A)	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	10µL	_	_
Glucose standard (S)	_	10µL	_
Echantillon	_	_	10µL

- *Dosage des triglycérides*

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

- *Principe*

Le principe repose sur la méthode Fossati et Prencipe couplée à une réaction de Trinder.

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

Triglycerides $\xrightarrow{\textbf{LIPASE}}$ Glycérol + acides gras libres

Glycérol + ATP $\underset{\textbf{GK}}{\rightleftharpoons}$ Glycérol-3-phosphate + ADP

Glycérol-3-phosphate + O_2 $\overset{\textbf{GPO}}{\rightleftharpoons}$ Dihydroxyacétone phosphate + H_2O_2

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

L'absorbance du complexe coloré (quinonéimine), proportionnelle à la concentration en triglycérides dans l'échantillon du sérum est mesuré à 500nm **[69 ; 43]**.

- *Mode opératoire*

Les réactifs (annexe II) et le spécimen sont ramenés à une température ambiante ; à l'aide d'une pipette, répartir dans les cuves comme récapitulé dans le tableau 2 ci-dessous ; bien mélanger et laisser incuber les cuves 5min au bain-marie à 37°C ; Lire la concentration au spectrophotomètre.

Tableau 2: Dosage des triglycérides

Mesurer dans des cuves bien identifiées	**Blanc**	**Etalon [2g/ L]**	**Echantillon**
Réactif	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	10µL	_	_
Etalon	_	10µL	_
Echantillon	_	_	10µL

- *Dosage du cholestérol total*

Pour ce faire le sang est prélevé dans des tubes Vacuum Stérile sans anticoagulant. Le Kit BIOLABO CHOLESTEROL CHOD-PAP du lot 081104A de REF 80106 a été utilisé.

- *Principe*

La cholestérolémie a été déterminée suivant la méthode enzymatique CHOD-PAP décrite par Allain et al.1974

Coffret de cholestérol - HDL (PTA)

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

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

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

La quinonéimine formée présente une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de cholestérol présent dans l'échantillon du sérum **[96]**. Cette intensité est mesurée au spectrophotomètre à 500nm.

- *Mode opératoire*

Les réactifs (annexe II) et le spécimen sont ramenés à une température ambiante ; à l'aide d'une pipette, répartir dans les cuves comme récapitulé dans le tableau 3 ci-dessous ; bien mélanger et laisser incuber les cuves 5min au bain-marie à 37°C ; Lire la concentration au spectrophotomètre.

Tableau 3: Dosage du cholestérol

Mesurer dans des cuves bien identifiées	Blanc	Etalon [2g/ L]	Echantillon
Réactif	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	10µL	_	_
Etalon	_	10µL	_
Echantillon	_	_	10µL

Afin de vérifier si l'administration d'extrait de *Khaya senegalensis* modifiait la morphologie des tissus, l'étude histologique a été réalisée.

2.2.4. Examens histologiques

Les techniques histologiques consistent à conserver les structures tissulaires, à les amincir et à les différencier. Nous avons fait la coloration au PAS (Periodic Acid Schiff).

- **Confection des lames histologiques :**

Après gavage du *Khaya Senegalensis* à différentes doses puis des fibres palmistes à 5% dans la ration des lapins et abattage de ceux-ci, l'échantillon constitué des reins, du foie, des muscles et des tissus adipeux recueilli est transportés dans du formol tamponné à 10% de l'animalerie au laboratoire des examens histologiques.

Les échantillons recueillis sont plongés dans du formol à 45% contenu dans un bocal soigneusement étiqueté, portant la date du prélèvement et le type d'organe. La réalisation des coupes histologiques suit le procédé résumé en six (06) étapes à savoir : La fixation, la circulation, l'enrobage, la microtomie, l'étalement des rubans, la coloration des coupes puis le montage à l'Eukitt **[131].**

- **La fixation des pièces prélevées**

C'est l'étape la plus importante de la manipulation. Elle permet de bien conserver les tissus dans un état proche de la normale. Le formaldéhyde ou formol à 10% est le fixateur utilisé

lors de nos manipulations. De formule chimique (CHOH), le formol est stable et ne durcit pas trop les tissus.

- **La circulation**

C'est une opération qui consiste à faire séjourner dans une série de bain, les pièces de tissus dans le but de leur conférer une rigidité en les transformant en une masse ferme favorisant la coupe au microtome. Elle suit les trois étapes suivantes après la fixation :

- **La déshydratation :**

C'est la première étape de la circulation proprement dite. Elle consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Elle se réalise dans quatre (04) bains d'alcool (éthanol) de degré croissant : 70°, 80°, 90°, et 100° d'une durée de 45minutes chacun.

- **L'éclaircissement :**

Il consiste à remplacer l'éthanol dans le tissu par un solvant de la paraffine. Ici, le solvant utilisé est le xylène. Le tissu, une fois déshydraté, passe successivement dans deux (02) bains de xylène où il devient éclairci.

- **L'imprégnation** :

C'est l'étape terminale de la circulation où la paraffine est incluse dans le tissu. Elle se réalise dans deux (02) bains de paraffine de 45minutes chacun.

- **L'enrobage des pièces :**

Elle suit la circulation. Elle consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc fait du milieu d'inclusion. En technique histologique, ce procédé est utilisé en deux étapes successives : une première au cours de laquelle la paraffine est incluse dans le tissu puis la seconde ou enrobage proprement dit au cours duquel le tissu est inclus dans un bloc.

On appelle bloc, une masse de paraffine contenant la pièce à couper. Un bloc durable fournit un support homogène à la pièce et conduit à des sections du tissu en série sous forme de rubans. Les blocs ont été obtenus suivant le processus ci-après :

La pièce biopsique introduite dans la paraffine est positionnée selon l'architecture structurale que l'on veut observer ultérieurement.

La face sur laquelle nous allons réaliser les coupes est orientée vers le fond de la moule métallique.

La paraffine fondue est coulée sur le tissu ainsi orienté dans le moule servant de support au bloc avant sa solidification.

Le moule métallique est surmonté de la cassette d'inclusion en matière plastique qui est mise en contact avec la paraffine encore liquide par la face postérieure de sa base (la cassette s'adapte au porte bloc du microtome).

La paraffine est solidifiée sur une plaque réfrigérante de 3°C à 4°C pendant quelques minutes.

Après solidification, le moule a été débarrassé du bloc.

Ainsi, nous obtenons un bloc prêt à la coupe **[106]**.

- **La microtomie**

C'est une étape qui consiste à faire des coupes d'une épaisseur de l'ordre de 5µm à l'aide d'un microtome qui possède un porte bloc où l'on place le bloc de paraffine. Ici, le microtome utilisé est le microtec CUT 4060.

Pour obtenir les coupes, nous avons procédé de la façon suivante :

Le bloc a été introduit dans le porte bloc puis immobilisé à l'aide des moletées afin que la surface du bloc soit rigoureusement parallèle au tranchant de la lame du rasoir et que, en même temps, la surface du bloc soit parfaitement verticale.

Ensuite le microtome a été réglé à 10µm dégrossir les blocs, ce qui a permis d'enlever la couche de paraffine qui recouvrait les pièces tissulaires.

Ainsi, dès l'apparition de la pièce, l'échelle a été ajustée de manière à obtenir des coupes plus minces de 5µm d'épaisseur.

- **Etalement des rubans de coupes :**

Il se réalise à l'aide de l'eau distillée que l'on met dans un bain à paraffine et que l'on porte à 55°C, ce qui permet l'adhésion du tissu (ruban) sur la lame porte objet. Cette étape se déroule comme suit :

Une portion de rubans sélectionnés est déposée dans le bain à paraffine.

Une lame porte-objet propre préalablement marquée du numéro d'ordre est introduite verticalement dans le bain à paraffine de manière à ce que le ruban adhère à la lame porte-objet. La lame est ensuite retirée et séchée pendant 30mn (minutes) dans l'étuve dont la température est portée à 55°C pour le pré déparaffinage.

- **La coloration des lames montées :**

Elle comporte quatre (04) étapes qui sont :

Les étapes préparatoires à la coloration au cours desquelles les coupes sont préparées à recevoir les colorants qu'on veut leur faire capter. Elles se subdivisent en deux volets :

Le déparaffinage qui consiste à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Le réactif utilisé est le xylène. L'hydratation qui a pour objet de retirer le xylène du tissu puis de le remplacer par de l'eau. Cette étape est l'inverse de la déshydratation décrite à la circulation. L'agent utilisé est l'éthanol. Les étapes de la circulation proprement dites pendant lesquelles les coupes déparaffinées et hydratées sont colorées.

Les étapes préparatoires au montage : ici, les coupes colorées sont déshydratées, séchées puis éclaircies.

- **Lecture et photographie des lames histologiques :**

Les pièces biopsiques ont été enrobées à la paraffine, débitées en coupes de 5µm (micromètre) sur un microtome rotatif de marque AO Scientific Instruments 820. Elles ont été colorées au PAS (Périodic AcidSchiff).Toutes les lames ainsi obtenues ont été observées sur : Un microscope Léica aux objectifs x50 ; x100 ; x200 et x400 du laboratoire de cytogenèse de l'ISBA).Un microscope photonique de marque Olympus BX-41 muni d'une caméra (JVC, ½ pouce) du laboratoire de cytogenèse de l'ISBA). A partir de ce microscope, les images sont transférées sur un logiciel de traitement d'images (Adobe Photoshop Image).Les résultats recueillis ont été consignés au fur et à mesure de la lecture, dans un fichier conçu à cet effet.

2.2.5. Screening phytochimique

Le Screening (criblage) phytochimique est basé sur les réactions (coloration et précipitation) différentielles des principaux groupes de composés chimiques contenus dans les plantes 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 végétale à 25ml d'acide chlorhydrique dilué à 5 %. Le mélange est macéré pendant 24 heures. On recueille 1ml du filtrat auquel on ajoute 5 gouttes de réactif de MAYER. En cas de présence d'alcaloïdes, on observe un précipité jaune ou louche dans le tube.

- *Extraction des alcaloïdes*

On met 5g de l'extrait végétal dans 5ml d'ammoniaque dilué au demi. A ce mélange, on ajoute 2ml 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 5ml 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, brun-vert ou noire indique la présence des tanins.

- *Recherche des tanins catéchiques*

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

- *Recherche des tanins galliques*

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

- *Recherche de flavonoïdes*

Ce sont des pigments naturels de couleur jaune, généralement polyphénoliques. Ils sont le plus souvent sous forme d'hétérosides appelés flavonosides dont les génines sont des dérivés de la phénylchromone, la chromone étant la benzo-y-pyrone. Les flavonosides sont doués d'activictés diurétiques et vitaminiques P. Ce sont des protecteurs veineux qui diminuent le risque de maladies cardiovasculaires. Sa forte concentration en vitamine P permet de renforcer la résistance des parois des vaisseaux**[82].**

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

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

A 2ml de la deuxième portion, on ajoute 2ml d'alcool chlorhydrique(alcool à 96°=2volumes ;eau=2volumes ; HCl concentré=1volume) et, une pincée de poudre de magnésium: c'est la réaction de la cyanidine. On observe une coloration orange, puis violette, donc la réaction est positive.

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

- *Recherche des anthocyanes*

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

- *Recherche de leuco-anthocyane*

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

- **Recherche des dérivées quinoniques**

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

- **Recherche des saponosides**

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

- **Recherche de triterpénoïdes et de stéroïdes y compris les cardénolides**

Pour cette recherche, nous ajoutons à 1 g de poudre végétale 10ml d'alcool éthylique à 70°C et nous agitons pendant 30 minutes. A ce mélange, nous ajoutons 10 ml d'eau distillée puis 2ml d'acétate de plomb à 10 % à volume égal V/V. Après 15 minutes de repos, nous ajoutons au filtrat 2ml de solution aqueuse de phosphate disodique à 10 %. Après 15 minutes de repos, le filtrat est recueilli dans une ampoule à décanter et extrait à trois reprises avec 5ml de

chloroforme ($CHCl_3$). Les solutions chloroformiques sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre puis divisées en trois portions et évaporées à siccité (bain de sable).

- *Recherche de triterpénoïdes*

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

- *Recherche de stéroïdes*

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

- *Recherche de cardénolides*

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

- **Recherche de dérivés cyanogéniques**

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

- **Recherche des mucilages**

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

- **Recherche de coumarines**

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

- **Recherche des composés réducteurs**

Le décocté à 10 % est obtenu par ébullition modérée pendant 3 minutes d'un mélange de 50ml d'eau distillée et de 5g de poudre végétale. Après refroidissement, le filtrat a été ajusté à 50ml avec de l'eau distillée. 5ml de filtrat sont introduits dans un tube à essai. Après le chauffage au bain-marie à 90 °C pendant quelques minutes, on ajoute 1ml de réactif de Fehling (liqueur de Fehling A + liqueur de Fehling B à volume égal). On réchauffe le filtrat quelques minutes après. L'observation d'un précipité rouge vif indique la présence de composés réducteurs.

- **Recherche des dérivés anthracéniques**

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

- *Anthracéniques libres*

A 1g de poudre, on ajoute 10ml de chloroforme et on chauffe prudemment pendant 3 minutes au bain-marie. Après filtration à chaud, le mélange est complété avec 10ml de chloroforme. A 1ml de l'extrait chloroformique on additionne 1ml d'ammoniaque dilué à 1/2 puis on agite.
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 minutes est ensuite refroidi sous un courant d'eau. L'hydrolysat est obtenu après filtration et ajustement à 10ml. On prélève 5ml de l'hydrolysat qu'on agite avec 5ml de chloroforme. La phase organique soutirée est introduite dans un tube à essai et additionnée de 1ml d'ammoniaque dilué au 1/2 puis agitée (on garde la phase aqueuse). La présence d'anthracénique est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.
Si la réaction est négative ou faiblement positive, on recherche les O-hétérosides à génines réduites. Pour ce faire on prélève 5ml d'hydrolysat qu'on additionne de 3 à 4 gouttes de $FeCl_3$ (chlorure ferrique) à 10 %. Le mélange chauffé au bain-marie pendant 5 minutes est ensuite refroidi sous courant d'eau puis agité avec 5ml de chloroforme. A la phase chloroformique

soutirée et introduite dans un tube à essai, on ajoute 1ml d'ammoniaque au 1/2 puis on agite. Une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence des O-hétérosides à génines réduites.

- *C-hétérosides*

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

- **Extraction 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 10µl 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'anis aldéhyde 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.

2.2.6. Gavage des rats

Dans cette manipulation, il s'agit d'administrer les extraits éthyliques des écorces de *Khaya senegalensis* à des rats Wistar (mâles et femelles) d'environ 200g et ayant la même ration alimentaire, par voie orale et à diverses doses pendant environ deux semaines. Ces animaux ne reçoivent aucun autre traitement médicamenteux dans le temps en dehors de l'extrait.

- Les rats sont répartis au hasard en 08 lots, dont 03 rats (n°1, n°2 et n°3) par lots : Lot 1, Lot 2, Lot 3, Lot 4, Lot 5, Lot 6 Lot 7 Lot 8
- On attribue respectivement aux lots les doses par kg de poids corporel par jour : 0 mg/Kg ; 2,5 mg/kg ; 5 mg/kg ; 10 mg/kg ; 25 mg/kg ; 50 mg/kg ; 100 mg/kg et 200 mg/kg ; et on fixe le volume à administrer à V=01 ml.
- Ensuite, 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.
- Puis on gave quotidiennement et à la même heure les rats pendant 14 jours.

- Le lot 1 est le lot témoin et reçoit par administration orale de l'eau distillée à la place de l'extrait éthylique (0 mg/Kg) de *Khaya senegalensis*, pendant 14 jours ;
- Le lot 2 est traité par administration orale, à la dose de 2,5 mg/Kg de poids corporel et par jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 14 jours ;
- Le lot 3 est traité par administration orale, à la dose de 5 mg/Kg de poids corporel et par jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 14 jours ;
- Le lot 4 est traité par administration orale, à la dose de 10 mg/Kg de poids corporel et par jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 14 jours ;
- Le lot 5 est traité par administration orale, à la dose de 25 mg/Kg depoids corporel et par jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 14 jours ;
- Le lot 6 est traité par administration orale, à la dose de 50 mg/Kg de poids corporel et par jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 14jours ;
- Le lot 7 est traité par administration orale, à la dose de 100 mg/Kg de poids corporel et par jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 14 jours ;
- Le lot 8 est traité par administration orale, à la dose de 200 mg/Kg de poids corporel et par jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 14 jours.

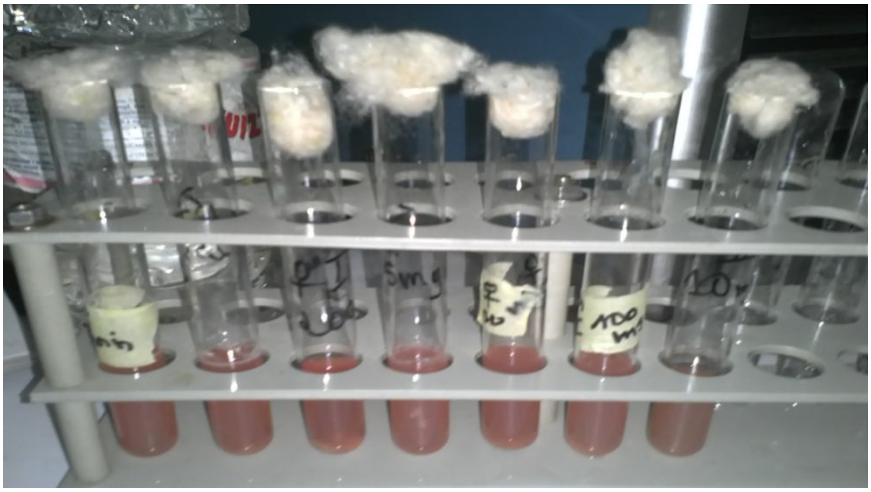
Enfin, on sacrifie les rats 24 heures après le dernier gavage, afin de prélever les foies pour nos diverses manipulations.

2.2.7. Isolement des hépatocytes de rats utilisant la trypsinization à froid

La méthode de Rajesh &Rajesh (2011) a été adoptée pour réaliser la trypsinization. Elle consiste à désagréger les tissus afin d'isoler les cellules en employant la méthode d'exposition à chaud ou à froid. Dû à l'activité tryptique de la trypsine dans la méthode de trypsinization à chaud à 37°C ; le tissu est endommagé et la moisson des cellules après incubation de 30 minutes peut mener à une réagrégation ou endommager les cellules. Ces désagréments peuvent être surmontés en employant une concentration minimum de la trypsine et un long temps d'incubation pour augmenter l'efficacité de séparation de la trypsine. À un plus long

temps d'incubation, l'activité tryptique affecte les cellules et par conséquent la température doit être réduite au minimum pour réduire l'effet tryptique. Une méthode simple pour réduire les dommages aux cellules pendant l'exposition est d'imbiber le tissu avec de la trypsine à 4°C pour 6-18 h afin de permettre la pénétration de l'enzyme avec peu d'activité tryptique suivie d'une exposition de 20 à 30 minutes à 37°C pour la désagrégation. En effet cette méthode a été modifiée pour être adapté aux conditions du laboratoire. Ainsi, nous avons utilisé 10% des quantités utilisées **[32]**, DMEM a été remplacé par RPMI et à la place des *erlenmeyers* nous avons utilisés des tubes *falcon*.

Les rats (250 g) ont été anesthésiés par inhalation du chloroforme et le foie a été isolé par une incision horizontale sur la face ventrale, près du diaphragme de l'animal. Le temps d'isolement du foie ne dure pas plus de 2 à 3 min. Le foie a été maintenu dans la solution tampon de phosphate saline (PBS) à 4°C jusqu'à son usage. L'environnement expérimental a été stérilisé. 0,35 g de foie a été prélevé puis coupé avec la lame chirurgicale en petits morceaux ; ces morceaux ont été lavés avec la solution de PBS, puis transférés dans d'autres boites de pétri et les tissus indésirables comme les tissus adipeux et les tissus nécrotiques ont été enlevés. Les morceaux de foie ont été lavés une fois de plus avec du PBS ; transférés dans un tube *falcon* dans lequel ils sont imbibés de 0,25% de trypsine brute dans du RPMI pour 18 h à 4°C. La trypsine est ajoutée suivant la ration de 10 ml par 1 g de tissus. Après incubation, les morceaux de foie ont été exposés à 37°C pendant 30 minutes dans 1 ml de RPMI chaud par 100 mg de tissus. Afin de disperser complètement les tissus, une pipetage douce est réalisée, puis la solution est filtré sur un tissu muslin stérile pour enlever les morceaux plus grands. Les cellules ont été préservées pour des expériences et stockées en culture courante dans 5% de sulfoxyde diméthylique (DMSO) : utilisé en tant que cryoprotecteur , ajouté à la cellule afin de réduire la formation de glace et de ce fait empêcher la mort des cellules au cours du processus de congélation, et les cellules peuvent être congelées à -80 ° C ou stockés dans de l'azote liquide en toute sécurité).



Photos 5: Incubation des morceaux de foie dans RPMI+Trypsine (photo de K. S .Eudoxie, ASSOU. 2014)

2.2.8. Extraction et Chromatographie sur couche mince des lipides cellulaires

2.2.8.1. Extraction des lipides par méthode de Stephan *et al*. (2004)

La méthode d'extraction des lipides s'inspire de la méthode dite de gradient de solvant utilisée par Stephan *et al.* (2004) pour l'extraction des lipides mycobactériens. Elle a été adaptée pour les hépatocytes. Quatre extractions successives sont réalisées sur le même échantillon de cellules. Le solvant d'extraction est un mélange méthanol/chloroforme de plus en plus enrichi en chloroforme **[19 ; 32].**

- Les lipides cellulaires sont extraits par 4 extractions successives d'une journée, sous agitation à 250 rpm. L'extrait lipidique est récupéré après décantation des cellules; l'addition d'une solution aqueuse de NaCl 0,9% (volume proportionnel au $CHCl_3$) permet d'obtenir les deux phases **[38 ; 39]**; les cellules sont alors prêtes à subir la prochaine extraction.
- La proportion des solvants chloroforme ($CHCl_3$) et méthanol (CH_3OH) sont différentes suivant l'étape d'extraction :

- Première extraction : $CHCl_3$/ CH_3OH (1V:2V)
- Deuxième extraction : $CHCl_3$/ CH_3OH (1V:1V)
- Troisième extraction : $CHCl_3$/ CH_3OH (2V:1V)
- Quatrième extraction : $CHCl_3$/ CH_3OH (2V:1V)

Un volume V =15 ml pour 500 mg de cellules

- Toutes les phases organiques sont mélangées et le solvant est évaporé sous Rotavapor ou sous une hotte.

- l'extrait lipidique est resuspendu dans un volume de chloroforme (1 ml de solvant pour 10 mg de lipides).
- Puis l'extrait lipidique est conservé à -80 °C ou utilisée pour l'analyse.

Remarque : Si l'échantillon a été conservé à - 80°C, il faut l'évaporer sous un courant d'azote, puis resuspendre dans du chloroforme pour connaître avec précision le volume avant l'analyse des lipides **[19]**



Photos 6 : Séparation de la phase (inférieure) choroformique contenant les lipides par décantation

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) DES LIPIDES CELLULAIRES

Il s'agit de la séparation des différentes classes de lipides sur gel de silice par chromatographie sur couche mince. La CCM est basée sur une interaction de type électrostatique / liaison hydrogène. Le principe du "qui se ressemble s'assemble", souvent rencontré en chimie permet encore d'expliquer ici la nature des phénomènes impliqués. Elle repose sur des phénomènes d'adsorption différentielle : une phase mobile constituée de solvant progresse le long d'une phase stationnaire (silice) fixée sur une plaque. La CCM se déroule en trois étapes : préparation de la cuve, préparation de la plaque, et élution. Les différents lipides cellulaires se classent en deux grands groupes : phospholipides et lipides neutres. Ils sont séparés sur deux plaques différentes **[19]**

2.2.8.2. Séparation des lipides neutres par CCM

Comme leur nom l'indique, les lipides neutres ne sont pas des composés chargés. Ils comprennent : les acides gras libres ou estérifiés, les mono-, di- et triglycérides, les stérols libres et estérifiés. Ils sont séparés en utilisant des solvants peu polaires : Hexane, éther éthylique, la séparation des lipides neutres se fait d'abord par une migration dans un solvant hexane: éther éthylique: acide acétique glacial (80:20:2 v/v/v) jusqu'à la moitié de la plaque. La plaque est séchée puis est réalisée une deuxième migration jusqu'à 1 cm du bord supérieur de la plaque avec de l'hexane seul **[19 ; 29].**

- ***Préparation de la cuve (phases mobiles)***

Eluant E1 : elle correspond au mélange M1, des solvants suivants : hexane: éther éthylique: acide acétique glacial (80:20:2 v/v/v)[19 ; 29].

Eluant E2 : il s'agit de l'hexane seul [19]

Les deux éluants sont placés dans deux cuves différentes C1 et C2 à une hauteur d'environ 0,5 cm du fond de la cuve; puis on ferme les cuves afin qu'elles soient saturées en vapeur d'éluant pendant 10 à 15 min.

- ***Préparation de la phase stationnaire***

Sur une plaque de silice (Silica gel 60, Merck, France) de dimensions 10×10 cm, on trace au crayon à papier, un trait à 1 cm environ du bord inférieur et parallèlement à ce dernier ; puis on dépose sur le trait, à l'aide de tubes capillaires et à 0,5 à 1 cm d'intervalle, 10 µL de chaque échantillon de lipides à analyser (témoin, échantillons 1, échantillons 2…) **[19 ; 29].**

- ***Elution ou développement du chromatogramme***
  - On place la plaque en position légèrement oblique dans la cuve C1 puis on ferme. Le solvant qui en recouvre le fond monte le long de la plaque par capillarité.
  - La migration est arrêtée lorsque le front de solvant atteint environ la moitié de la plaque.
  - La plaque est ensuite placée dans la seconde cuve C2 après séchage et la migration est stoppée lorsque le front du solvant atteint environ 1cm de l'extrémité supérieur de la plaque.
  - Le niveau atteint par le solvant (ligne de front) est marqué par un trait fin puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir **[19 ; 29].**



Photos 7:de la deuxième élution dans l'hexane après une première élution dans hexane: éther éthylique: acide acétique glacial (80:20:2 v/v/v) jusqu'à moitié de la plaque (photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)

Les phospholipides sont des molécules polaires séparées en utilisant des combinaisons de solvant très polaires : eau, méthanol, chloroforme…La migration se fait en une seule fois avec un mélange : Chloroforme/Acétone/Méthanol/Acide acétique/H2O (50/15/10/10/4 (v/v) ou Chloroforme/Méthanol/Acide acétique glacial/Eau (25 :15 :4 :2) ou Chloroforme/Méthanol/ Ammoniaque (65 :25 :4). De telles proportions sont à la limite du mélange diphasique. Il faut rester en monophasique **[19;29].**

- ***Préparation de la cuve (phase mobile)***

L'éluant correspond au mélange des solvants suivants: Chloroforme/Acétone/ Méthanol/Acide acétique glacial/H2O (50/15/10/10/4) ou Chloroforme/Méthanol/Acide acétique glacial/Eau (25 :15 :4 :2) ou Chloroforme/Méthanol/Ammoniaque (65 :25 :4). L'éluant est placé dans une cuve C3 à une hauteur d'environ 0,5 cm du fond de la cuve; puis on ferme la cuve afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant pendant 10 à 15 min **[19 ; 29]**

- ***Préparation de la phase stationnaire***

Sur une plaque de silice (Silica gel 60, Merck, France) de dimensions 10×10 cm, on trace au crayon à papier, un trait à 1 cm environ du bord inférieur et parallèlement à ce dernier ; puis on dépose sur le trait, à l'aide d'un tube capillaire et à 0,5 à 1 cm d'intervalle, 10 µL de chaque échantillon de lipides à analyser (témoin, échantillons 1, échantillons 2…)

- ***Elution ou développement du chromatogramme***

-On place la plaque en position légèrement oblique dans la cuve C3 puis on ferme. Le solvant qui en recouvre le fond monte le long de la plaque par capillarité.

- La migration est arrêtée lorsque le front du solvant atteint environ 1 cm de l'extrémité supérieur de la plaque.
- Le niveau atteint par le solvant (ligne de front) est marqué par un trait fin puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir **[19 ; 29]**.

- **Révélation des lipides sur les plaques de CCM**

La révélation se fait par pulvérisation d'une solution de sulfate de cuivre II 10% (10 g de $CuSO_4$, 5H2O dans 100 mL de H_3PO_4 8% (v/v). Une fois la plaque sèche, elle est placée pendant environ 15 min dans un four à 150°C. Pour cette révélation, la saturation des acides gras influe sur la coloration. Elle donne une réponse plus faible avec des acides gras saturés qu'avec des acides gras possédant une ou plusieurs insaturations **[24]**.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats

3.1.1. Principaux constituants chimiques de l'écorce de *Khaya senegalensis*

Le tableau 4 présente les grands groupes chimiques contenus dans l'extrait de l'écorce de *Khaya senegalensis*. Il indique que les composés polyphénoliques et les saponosides constituent les groupes chimiques retrouvés abondamment dans l'extrait de l'écorce de *Khaya senegalensis*. Parmi les premiers groupes, les tanins, les leuco-anthocyanes sont plus prédominants que les anthocyanes. Au nombre des groupes chimiques peu abondants, il existe seulement les dérivés anthracéniques. Les stéroïdes constituent les groupes présents à un taux faible.

Tableau 4: Résultats du screening phytochimique

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

Légende: +++ : Abondant; ++ : Peu abondant; + : Faible

3.1.2. Influence de l'administration d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la croissance générale des lapins

L'administration d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* pendant quatre semaines n'a pas influencée de façon significative la variation de poids corporel par rapport au témoin (voir tableau 4, figure 20). On remarque respectivement par rapport au témoin une augmentation chaque quinzaine de :

1,82% ; 6,55% pour la dose 10mg/kg de poids corporel ;

8,75% ; 17,25% pour la dose 25mg/kg de poids corporel ;

5% ; 7,75% pour la dose 50mg/kg de poids corporel.

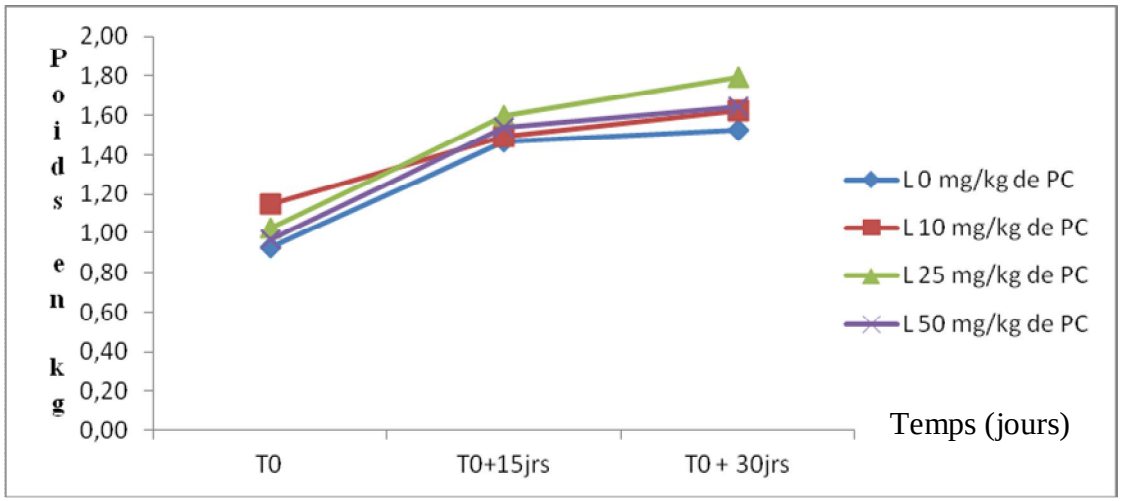


Figure 20: courbe montrant la variation du poids corporel en fonction du temps

3.1.3. Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur les paramètres biochimiques du sang des lapins normoglycémiques.

3.1.3.1. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la glycémie (en g/l) des lapins normoglycémiques

Chez les lots de lapins normoglycémiques traités par l'extrait, on a constaté que :

- l'administration quotidienne de 10mg/kg de PC d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin a diminué de 5,75% la glycémie après quinze jours mais, l'a augmenté de 0,95% au trentième jour (tableau 6) ;
- l'administration quotidienne de 25mg/kg de PC d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin a augmenté de 0,88% la glycémie après quinze jours et de 10,96% au trentième jour (voir tableau 6) ;
- l'administration quotidienne de 50mg/kg de PC d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin a diminué de 25% la glycémie après quinze jours mais, l'a augmenté de 15,75% au trentième jour (figure 21).

%de réduction = [VT - VE/VT].100

VT= valeur du témoin

VE= valeur sous la dose d'extrait

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

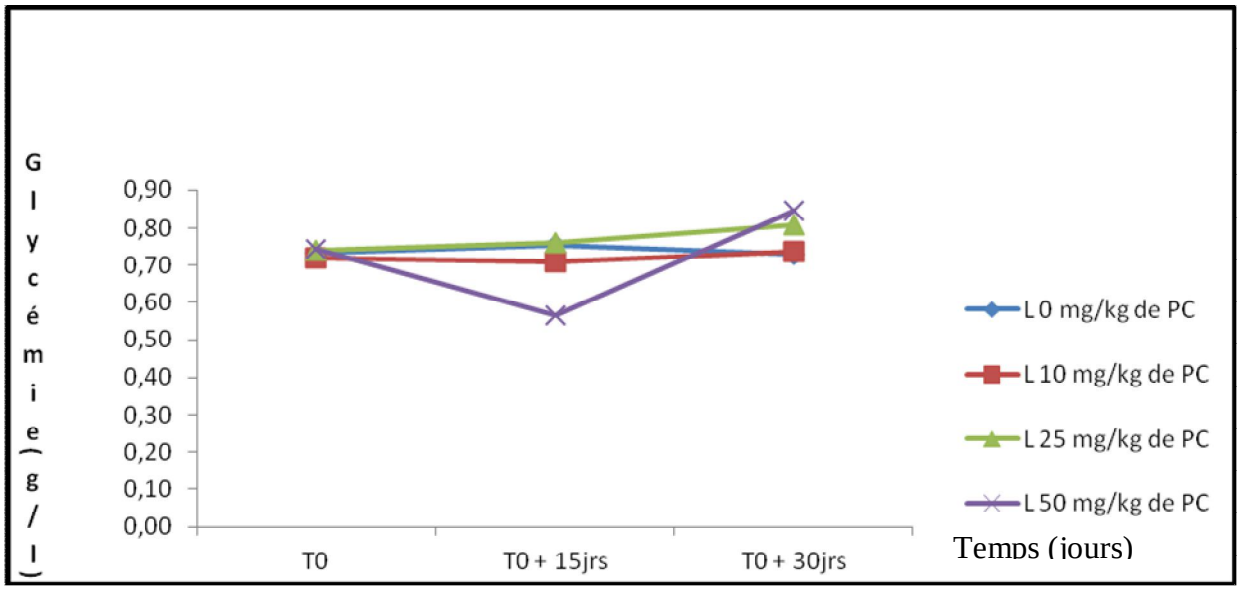


***Figure 21**: courbe montrant la Variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de K.S en fonction du temps*

Ce tableau montre que la glycémie diminue après 15jrs avec les doses de 10 et 50mg/kg de PC. En vue de comprendre le moment d'où la baisse a commencé, des dosages ont été effectué chaque six heures pendant 24H.

L'administration de 10mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* n'entraîne pas de modification significative de la glycémie. Par contre, l'administration de 25mg et 50mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* entraîne respectivement une diminution de 12,66%, 25,30% de la glycémie après 24H (figure 22). Aussi, l'analyse statistique de ces résultats n'a révélée aucune différence significative au seuil de 5% sauf pour la dose 50mg pour laquelle, il existe une différence significative au seuil de 5% entre la glycémie au temps T0+24H.

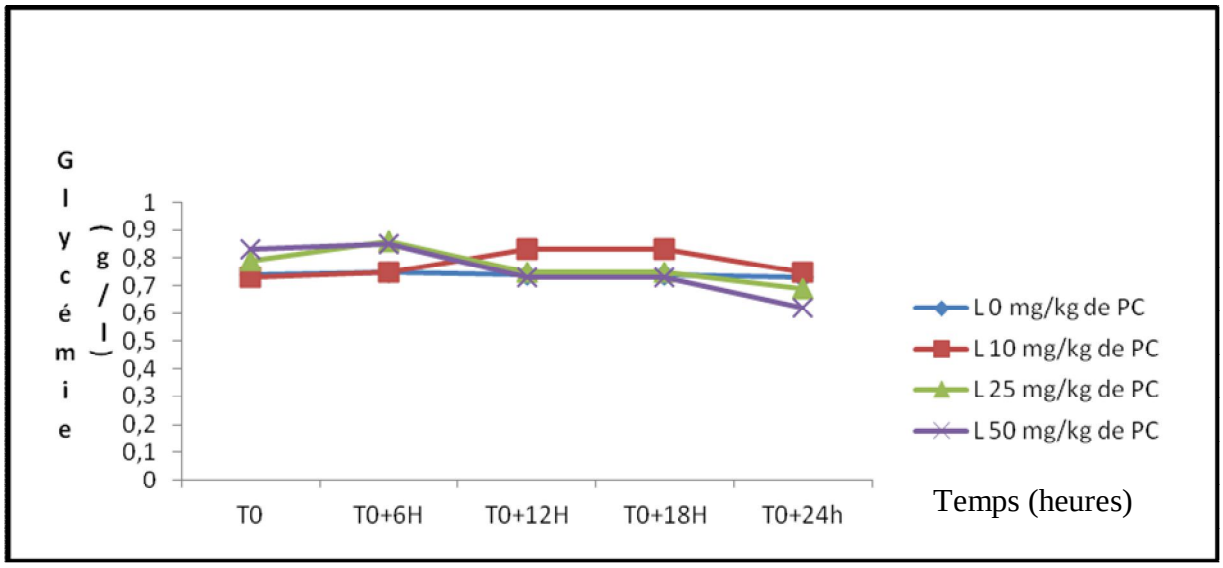


***Figure 22**: courbe montrant la Variation de la glycémie sous l'influence des différentes doses de K.S en 24H*

3.1.3.2. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la Triglycéridémie (en g /l) des lapins normoglycémiques

L'administration de 10mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* entraîne une augmentation de 34,47% de la Triglycéridémie. Par contre, l'administration de 25mg et 50mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* entraîne une diminution respectivement de 42,05% et de 10,23% de la Triglycéridémie 15jrs après le début de l'essai (figure23). L'analyse statistique des résultats n'a révélé aucune différence significative.

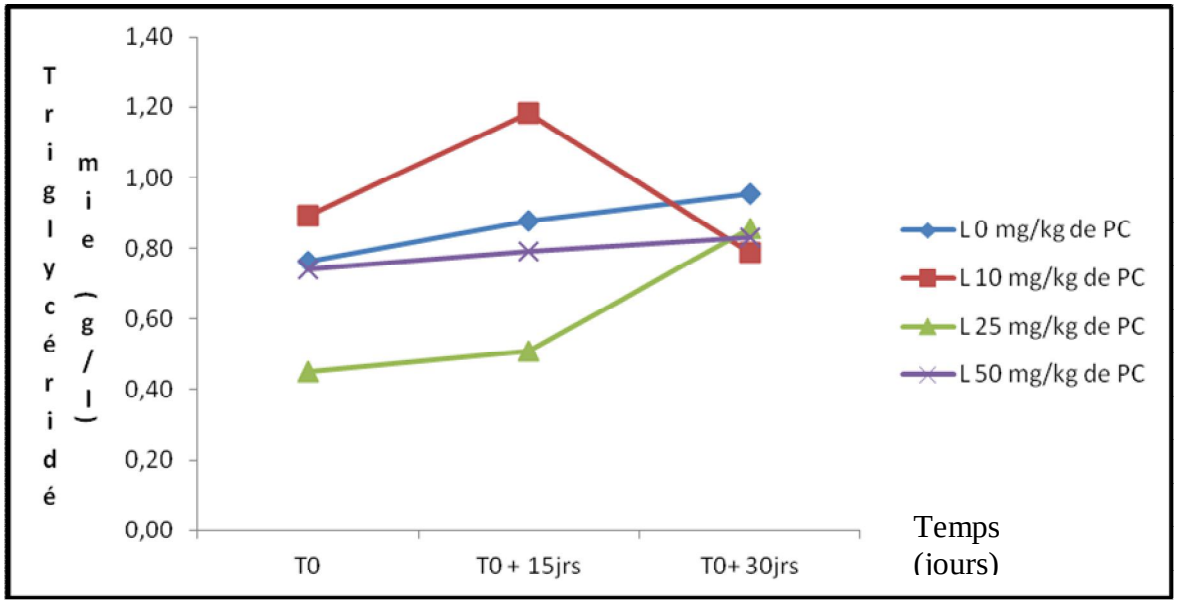


***Figure 23**: courbe montrant la Variation de la Triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de K.S en fonction du temps*

L'administration de différentes doses d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin n'entraîne pas de modification significative de la Triglycéridémie toutes les six heures en 24H ; sauf pour la dose 25mg/kg avec laquelle on observe une augmentation de 48,46% et 52,50% respectivement à T0+12H et T0+18H. Après 24H, elle a diminué respectivement de 21,93% de 2,63% et de 36,84% pour les doses 10mg, 25mg, 50mg (voir figure 24) par rapport au lot témoin.

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

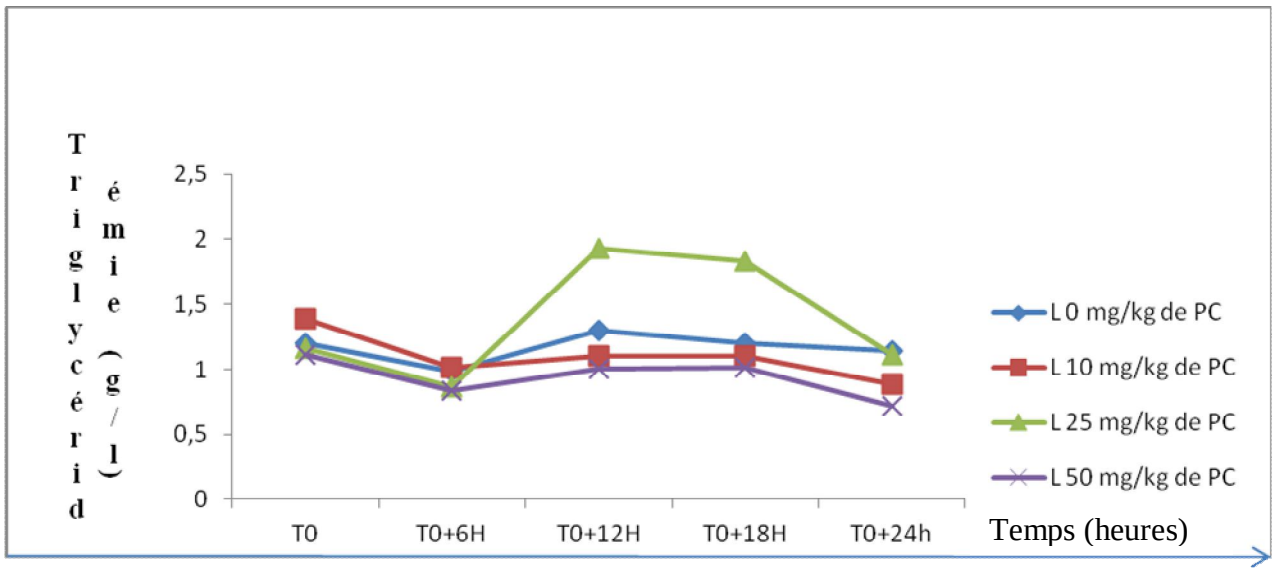


***Figure 24** : courbe montrant la Variation de la Triglycéridémie sous l'influence des différentes doses de K.S en 24H*

3.1.3.3. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la cholestérolémie (en g/l) des lapins normoglycémiques

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

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

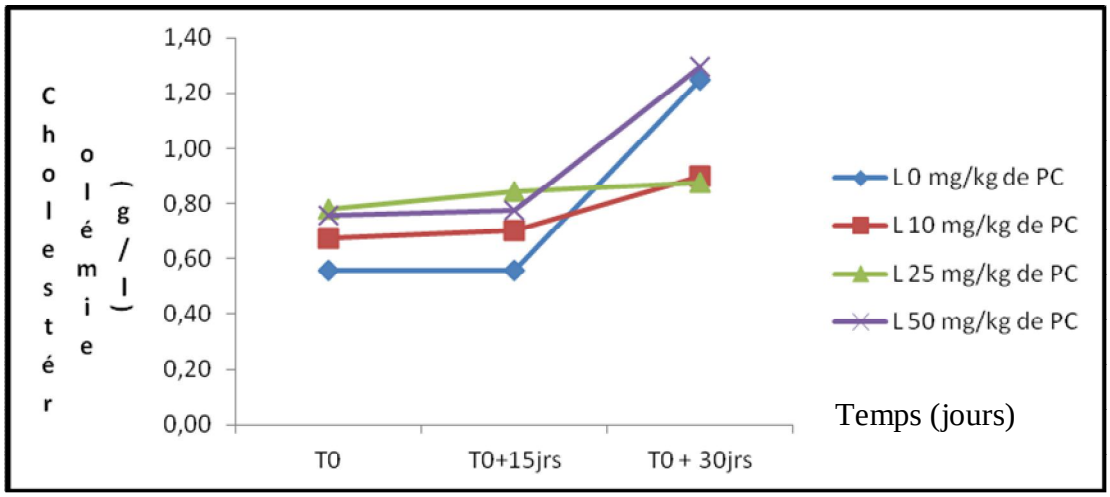


Figure 25: *courbe montrant la Variation de la Cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de K.S en fonction du temps*

La cholestérolémie chez les lapins normoglycémiques après gavage d'eau distillée ou de différentes doses d'extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* en 24H montre qu'à partir de T0+6H la cholestérolémie amorce une baisse, qui s'accentue à T0+12H, puis continue à baisser lentement. A T0+24H, le pourcentage de réduction de la cholestérolémie par rapport au lot témoin est respectivement de 47,22% de 43,06% et de 38,89% pour les doses 10mg, 25mg, 50mg (figure 26)

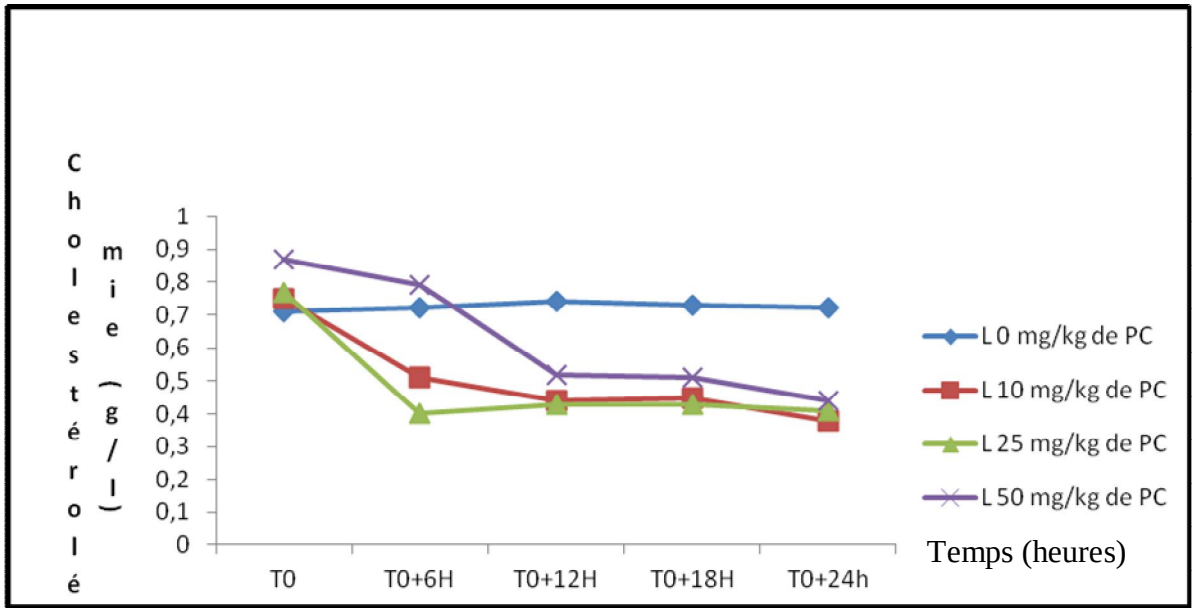


Figure 26 *: courbe montrant la Variation de la Cholestérolémie sous l'influence des différentes doses de K.S en 24H*

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

3.1.4. Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur les paramètres biochimiques du sang des lapins en hyperglycémie temporaire

3.1.4.1. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la glycémie (en g/l) des lapins en hyperglycémie temporaire

L'épreuve de HPVO, entraîne une augmentation significative de la glycémie à partir de 60 minutes, un prétraitement par l'extrait éthylique aux doses 10- 25 et 50mg/kg de PC prévient de façon significative le pic hyperglycémique observé lors de l'HPVO (figure 27)Pour le Lot témoin : Lot 0mg/kg L'administration de 2g de glucose entraîne en 60 minutes une augmentation significative de la glycémie allant jusqu'à 1,71g/l ; à la 120è minute, la glycémie baisse et atteint 1,26g/l soit une baisse de 26,17 % par rapport à la 60è minute. Pour le lot 10mg/kg : 10 mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* abaisse la glycémie de 13,48% par rapport aux lapins soumis uniquement à la surcharge de glucose à la 60è minute. à la 120è minute, la baisse de la glycémie continue et est de 4,76% par rapport au témoin. Pour le lot 25mg/kg : 25 mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* abaisse la glycémie de 12,11% par rapport au témoin à la 60è minute, à la 120ème minute, la glycémie est de 1,12g/l, ce qui équivaut à une diminution de 10,85% par rapport au lot témoin.

Pour le lot 50mg/kg : 50 mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* a baissé considérablement la glycémie de 38,48% par rapport au témoin à la 60è minute, à la 120è minute, la glycémie est de 1,12g/l, ce qui équivaut à une diminution de 23,02% par rapport au lot témoin.

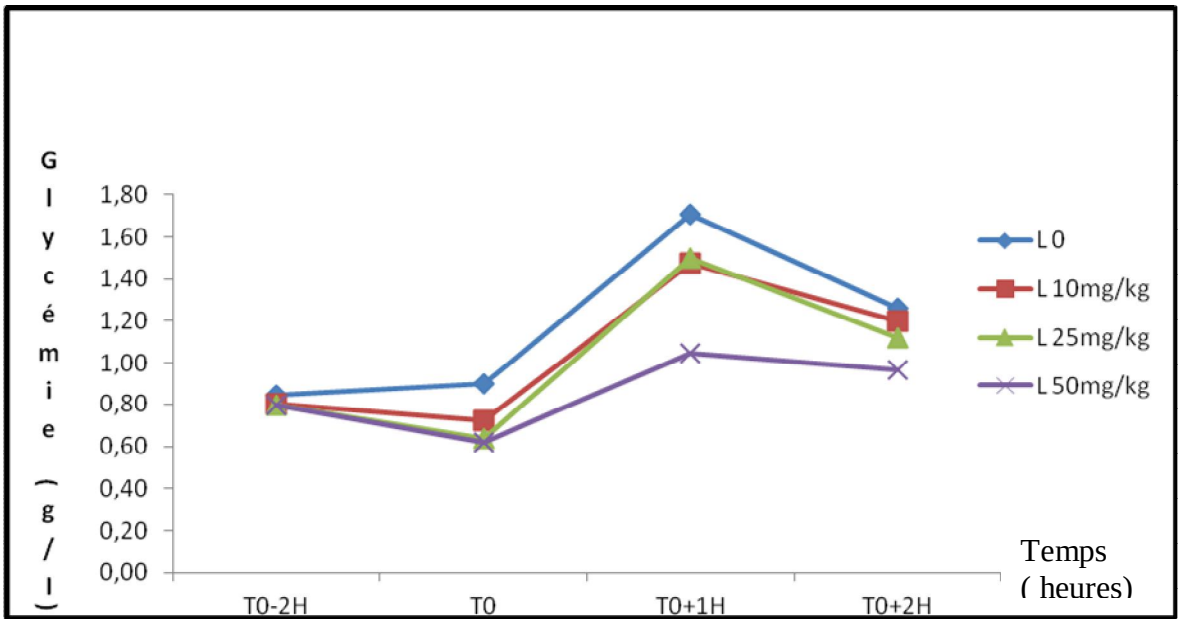


***Figure 27** : Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthylique de Khaya senegalensis sur la glycémie des lapins en hyperglycémie temporaire*

3.1.4.2. Influence de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur la Triglycéridémie (en g/l) des lapins en hyperglycémie temporaire

Les résultats montrent que les concentrations sériques des triglycérides ont été très voisines .chez les quatre lots expérimentaux tout au long de la durée d'expérimentation (figure 28). L'étude statistique de ces résultats n'a révélée aucune différence significative.

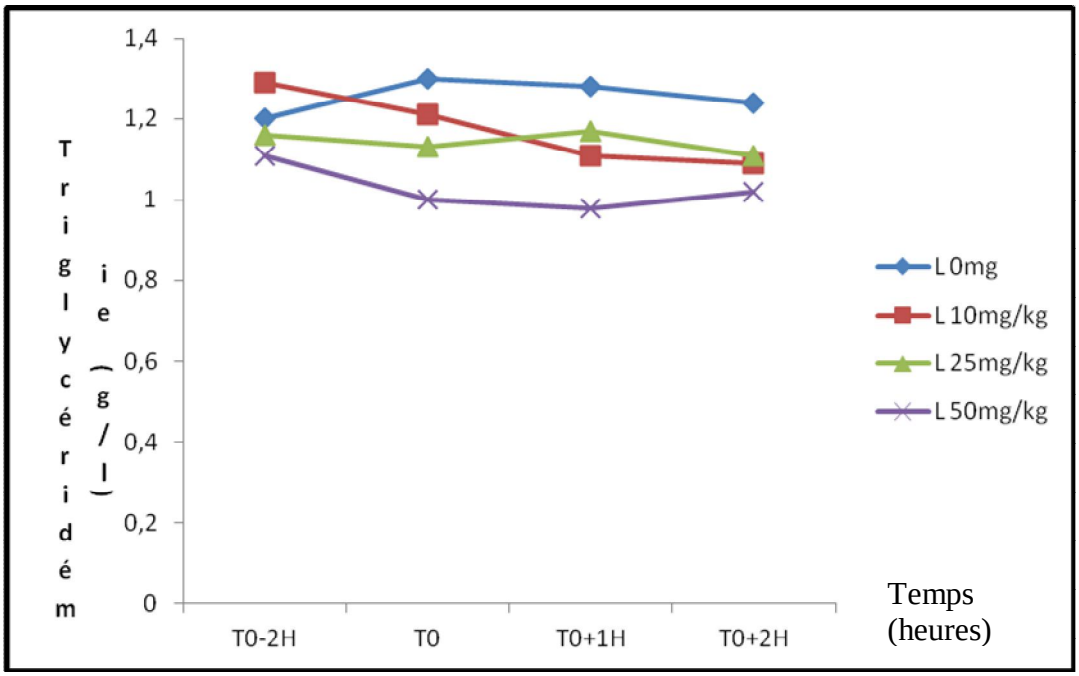


***Figure 28** : Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthylique de Khaya senegalensis sur la Triglycéridémie des lapins en hyperglycémie temporaire*

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

L'administration de différentes doses d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* par rapport au lot témoin n'entraîne pas de modification significative de la cholestérolémie avant la surcharge en glucose. Une heure après cette administration de la surcharge de glucose, la cholestérolémie amorce une baisse. Le pourcentage de réduction de la cholestérolémie par rapport au lot témoin est respectivement de 12,16%, 10,81%, 2,70% à T0+1H et, 12,50%, 18,06%, 6,94% à T0+2H pour les doses 10mg, 25mg, 50mg (figure 29).

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

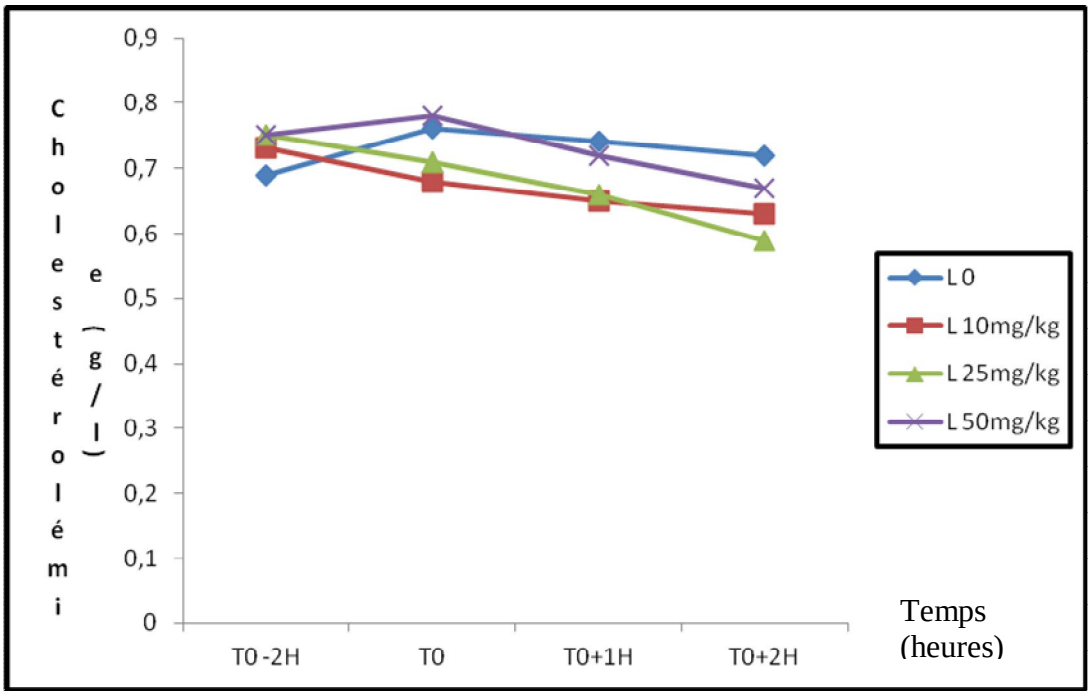


***Figure 29** : Courbe montrant l'Influence de l'administration de l'extrait éthylique de Khaya senegalensis sur la cholestérolémie des lapins en hyperglycémie temporaire*

3.1.5. Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur l'histologie du foie et des reins des lapins

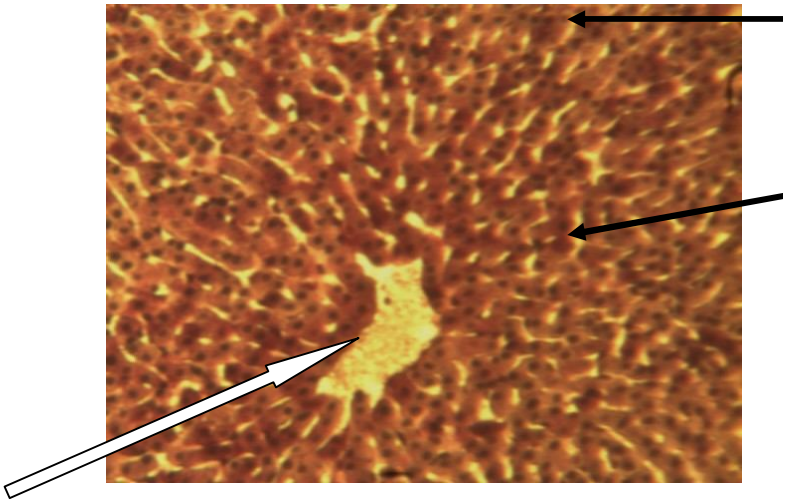


Figure 32: Coupe de foie d'un lapin sans traitement (témoin 0 mg de *K.S*/Kg de PC) **La veine centrolobulaire (flèche non pleine) et les travées hépatiques (flèches) ont un aspect normal. *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)***

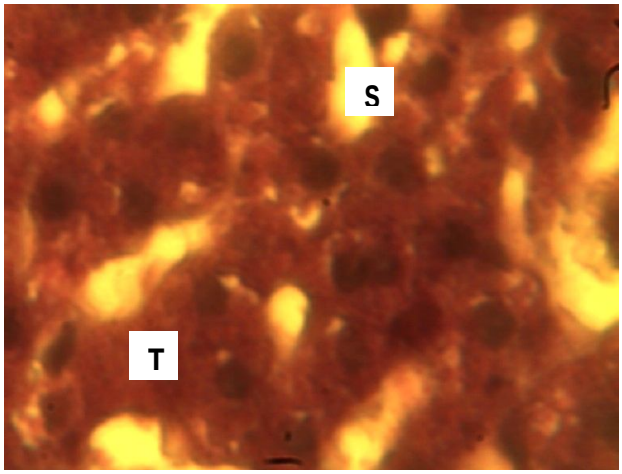


Figure 33: Coupe de foie d'un lapin sans traitement**. Les travées hépatiques (T) et les sinusoïdes veineux (S) sont normaux. *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 200)***

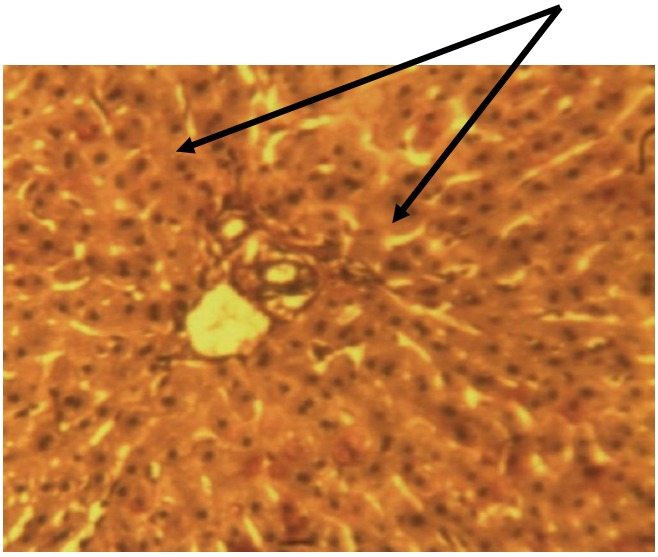


Figure 31: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de *K.S*/Kg de PC
Les hépatocytes (flèches) sont quasi normaux.
L'espace de Disse est normal.
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

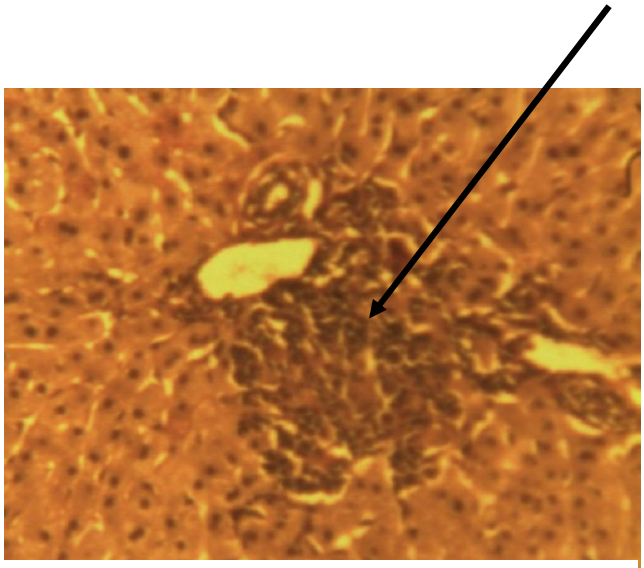


Figure 30: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de *K.S*/Kg de PC
Les hépatocytes (flèches) sont quasi normaux.
L'espace de Disse est normal.
On note parfois la présence de nombreuses cellules dans le tissu conjonctif de la veine centrolobulaire (flèche) *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)*

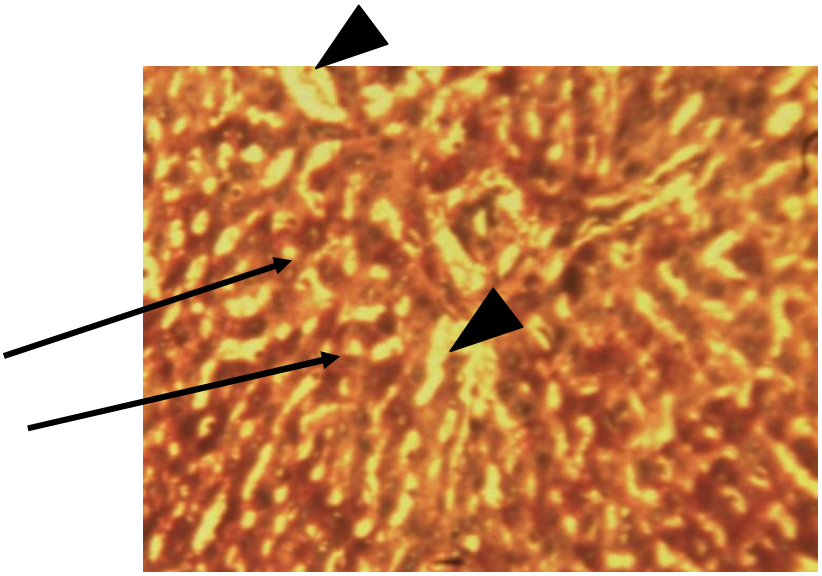


Figure 34: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de *K.S*/Kg de PC
Les hépatocytes (flèches) sont quasi normaux.
L'espace de Disse parait plus dilaté (têtes de flèches).
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

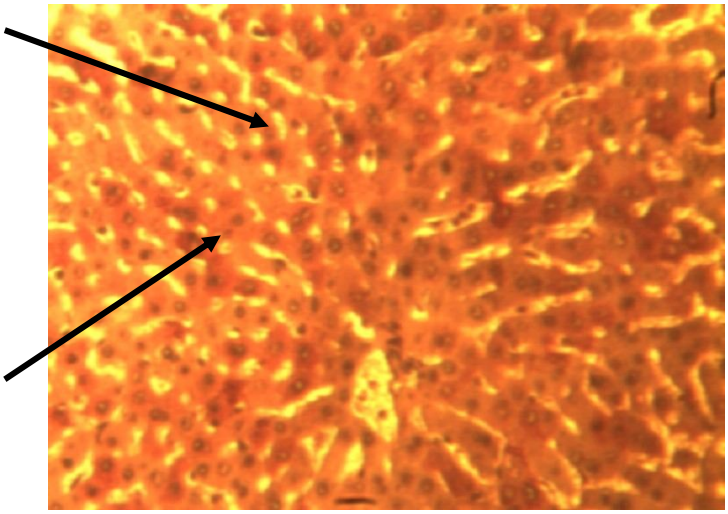


Figure 35 : Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de *K.S*/Kg de PC
Des hépatocytes ont un noyau pycnotique (flèches).
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

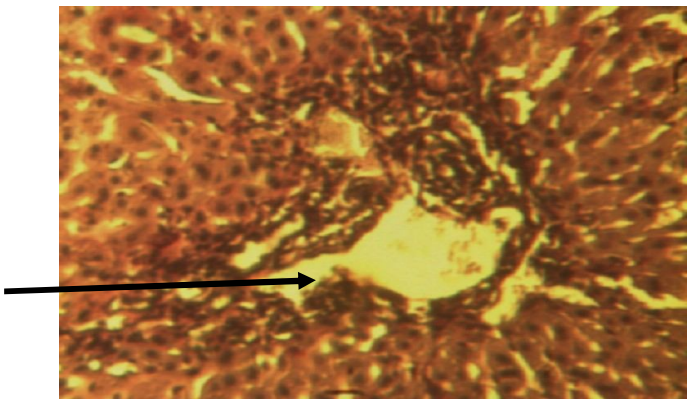


Figure 36: Coupe de foie d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de *K.S*/Kg de PC
Les hépatocytes sont quasi normaux. On note parfois la présence de nombreuses cellules dans le tissu conjonctif de la veine centrolobulaire (flèches)
Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)

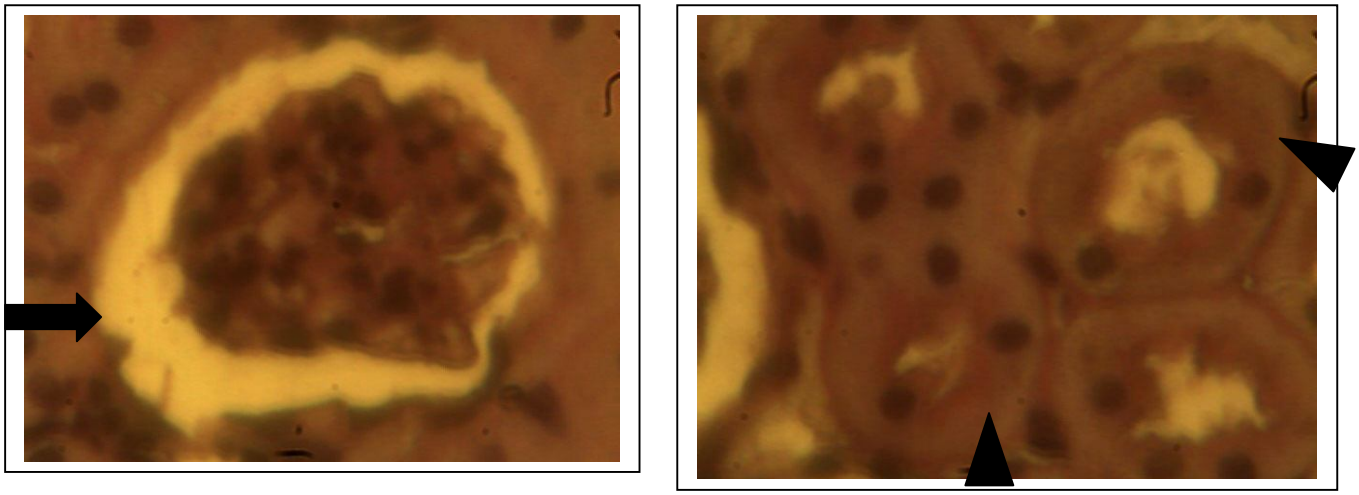


Figure 37 : Coupe de rein d'un lapin sans traitement **montrant un glomérule normal (flèche pleine) et des tubules normaux (têtes de flèches).** ***Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X***

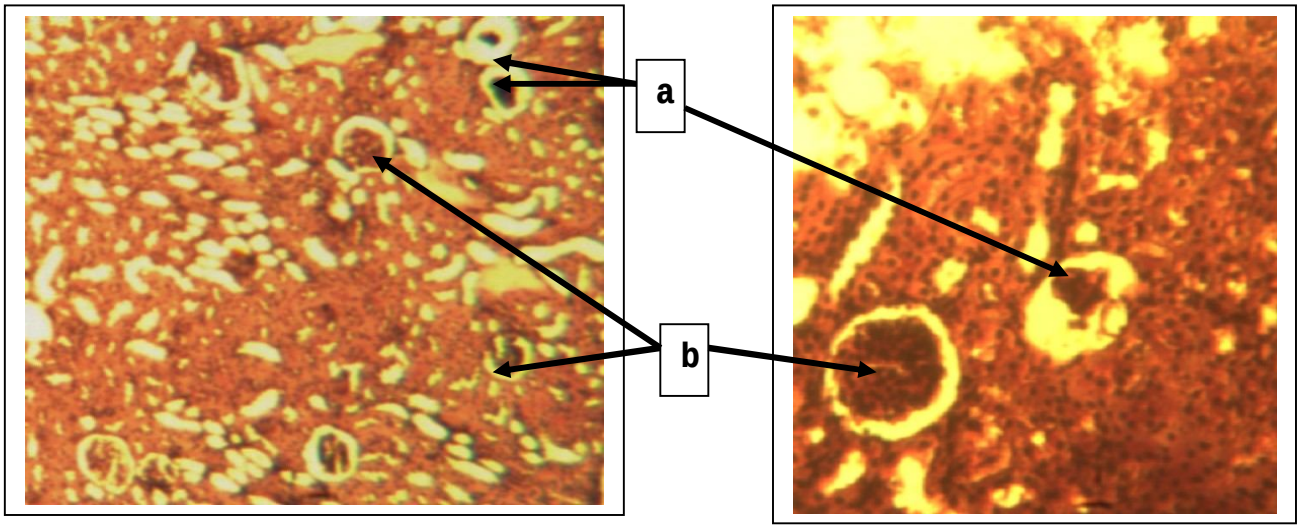


Figure 39 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de *K.S*/Kg de PC
Les glomérules rénaux normaux sont désignés en (a) et les anormaux en (b). *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 40)*

Figure 38: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 10 mg de *K.S*/Kg de PC
Les glomérules rénaux normaux sont désignés en (a) et les anormaux en (b). *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)*

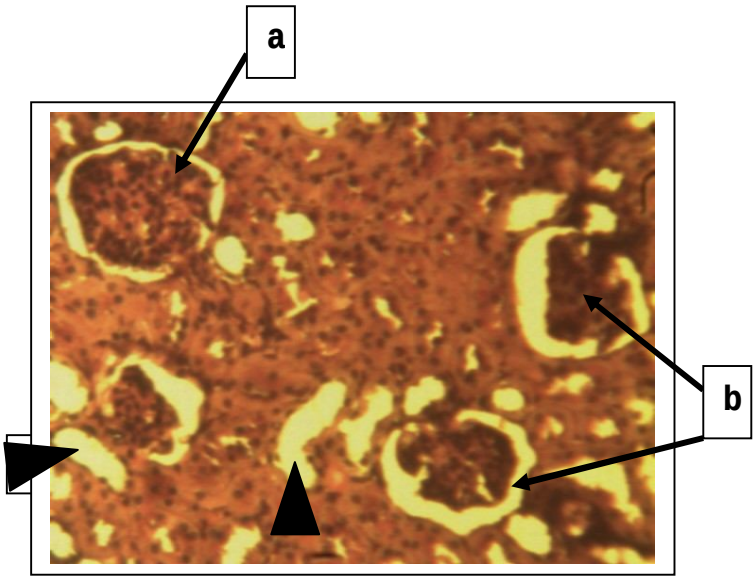


Figure 40: Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 25 mg de *K.S*/Kg de PC
Le glomérule rénal normal est désigné en (a) et les quasi normaux en (b).
Les tubes rénaux paraissent dilatés par endroit (têtes de flèches). *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)*

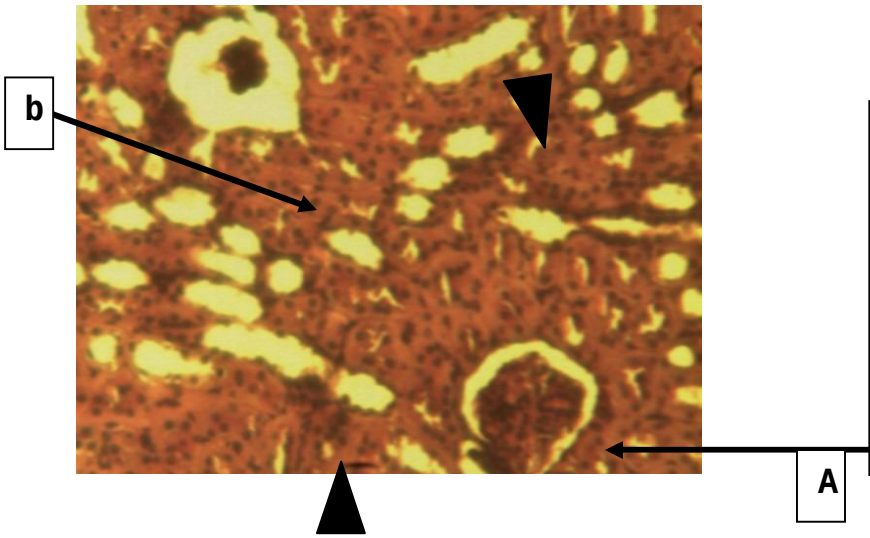


Figure 41 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçu la dose de 50 mg de *K.S*/Kg de PC
Le glomérule rénal normal est désigné en (a) et l'anormal en (b)
Les tubes rénaux paraissent dilatés par endroit (têtes de flèches). *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)*

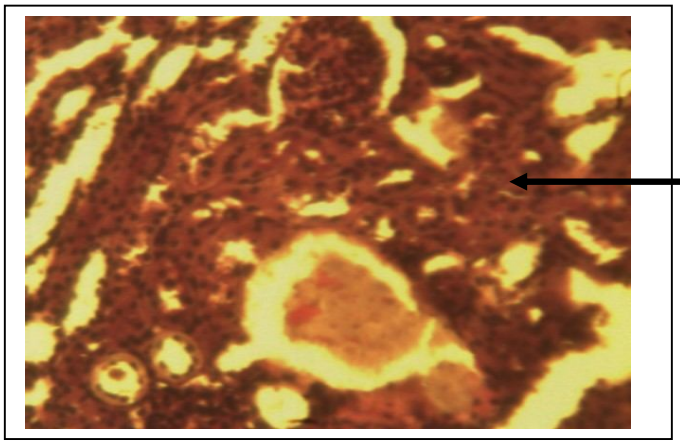
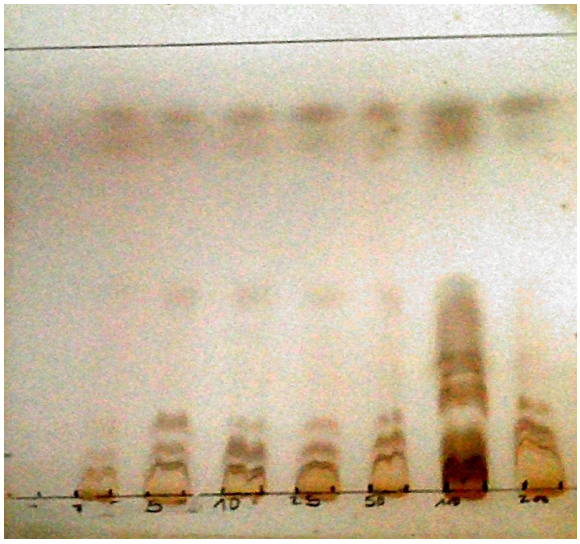


Figure 42 : Coupe de rein d'un lapin ayant reçula dose de 50 mg de *K.S*/Kg de PC
Montrant un glomérule rénal en voie de destruction (flèche) *Coloration au P.A.S. ; Grossissement (X 100)*

3.1.6. Action de l'extrait éthylique des écorces de *K. senegalensis* sur le profil des lipides neutres des hépatocytes de rats

La figure 8 présente la CCM des lipides neutres après administration des extraits aux animaux.



Photos 8 de la plaque obtenue après une première migration avec un mélange hexane/éther éthylique/acide acétique glacial (40 :10 :1 v/v/v) jusqu'à la moitié de la plaque, puis une deuxième migration avec de l'hexane seul jusqu'à 1 cm du bord de la plaque. Ceci permet de séparer les différents lipides neutres. Le premier dépôt correspond au témoin négatif et les autres sont respectivement les doses de 5mg/Kg, 10mg/Kg, 25mg/Kg et 50mg/Kg 100mg/Kg et 200mg/Kg d'extrait éthylique des écorces de *K. senegalensis* en partant de la gauche vers la droite (Photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)

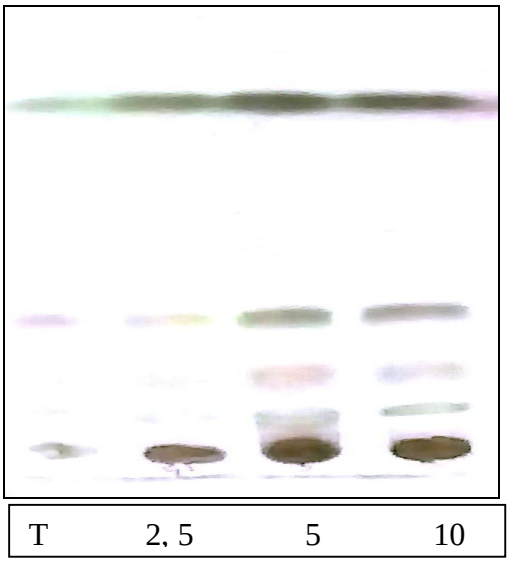
Elle indique que :

- quatre (04) spots correspondants à quatre lipides neutres pour le témoin (0mg/kg d'extrait);
- cinq (05) spots pour les doses de 5mg/Kg et 10mg/Kg administrées;
- six (06) spots pour les doses de 25mg/Kg et 50mg/Kg ;
- sept (07) pour 100mg/Kg et 200mg/Kg.

Le coefficient de corrélation de Pearson calculé (r = 0,82) révèle une relation d'intensité très forte entre la dose d'extrait de *Khaya senegalensis* administrée et le nombre de spots (correspondant à la quantité de lipide sortie). Autrement dit, au fur et à mesure que la dose administrée augmente, la quantité de lipide sortie est élevée.

En outre, on remarque qu'au niveau de chaque dépôt il y a plus de lipides lourds (spots d'en bas) que de lipides légers (spots d'en haut).

La figure 9 présente la CCM des lipides neutres après administration des extraits aux animaux.

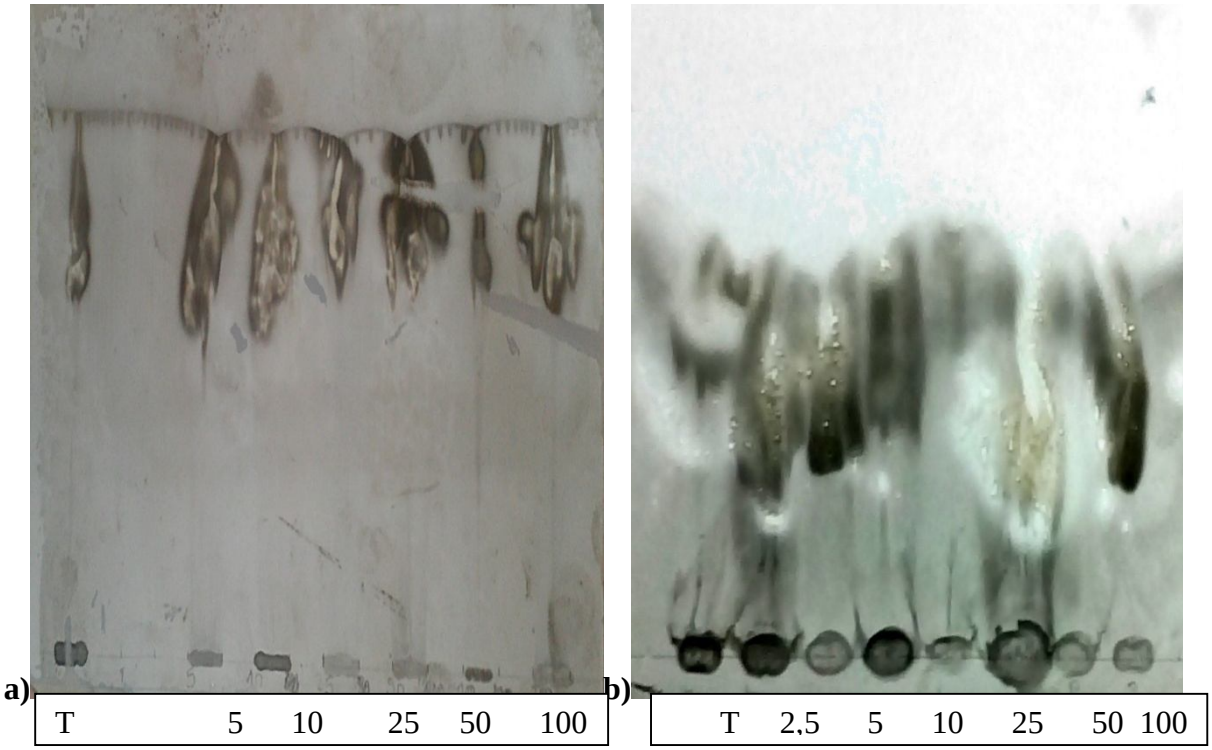


Photos 9: de la plaque obtenue après une première migration avec un mélange hexane/éther éthylique/acide acétique glacial (40 :10 :1 v/v/v) jusqu'à la moitié de la plaque, puis une deuxième migration avec de l'hexane seul jusqu'à 1 cm du bord de la plaque. Ceci permet de séparer les différents lipides neutres. Le premier dépôt correspond au témoin négatif et les autres sont respectivement les doses de 2,5mg/Kg ; 5mg/Kg ; 10mg/Kg, d'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis* (Photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)

Elle indique qu'en incluant la dose de 2,5mg/Kg d'extrait, on constate que le profil lipidique correspondant à cette dose est semblable à celui du témoin négatif. En effet, au niveau du témoin comme au niveau de la dose 2,5mg/Kg on a deux spots faibles, donc présence de deux lipides neutres en faible quantité. Quant au niveau des doses de 5mg/Kg et 10mg/Kg on a quatre spots bien visibles, donc présence de quatre lipides en grande quantité par rapport au témoin et 2,5mg/Kg.

3.1.7. Action de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis* sur le profil des phospholipides des hépatocytes de rats

La figure 10 présente la CCM des phospholipides des hépatocytes de rats après administration des extraits *K. Senegalensis* aux rats



Photos 10: plaques obtenues après migration avec un mélange

(a)chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique glacial/eau (50 :15 : 10 :10 :5 v/v) ; (b) chloroforme /méthanol/acide acétique glacial/eau (25 :15 :4 :2) jusqu'à 1 cm du bord de la plaque. Ceci permet de séparer les différents phospholipides. Le premier dépôt correspond au témoin négatif et les autres sont respectivement les doses de 2,5mg/Kg, 5mg/Kg, 10mg/Kg, 25mg/Kg et 50mg/Kg 100mg/Kg et 200mg/Kg d'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis* ou Chloroforme/Méthanol/Ammoniaque (65 :25 :4)(Photo de K. S. Eudoxie ASSOU, 2014)

L'administration quotidienne des différentes doses de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis* chez les lots de rats traités par l'extrait par rapport au lot témoin pendant 14 jours a influencé les phospholipides dans les cellules. En effet, les différents éluants utilisés ne permettent pas de voir la séparation des différents groupes de phospholipides ; mais on constate que selon l'éluant, les phospholipides forment un amas de spots qui migre d'une part jusqu'au front du solvant **(a)** et d'autres part font des trainés **(b).**

En Outre, on remarque que ces amas de spots sont plus grands au niveau des doses 5mg/Kg, 10mg/Kg, 25mg/Kg ,50mg/Kg, 100mg/Kg et 200mg/Kg par rapport au témoin négatif et la dose 2,5mg/Kg qui sont plus petit. Donc les phospholipides sont en faibles quantité au niveau du témoin négatif et la do.se 2,5mg/Kg alors qu'ils sont en quantité importante au niveau des doses 5mg/Kg, 10mg/Kg, 25mg/Kg, 50mg/Kg ,100mg/Kg et 200mg/Kg.

DISCUSSION

L'un des objectifs de cette étude est de rechercher l'efficacité de *Khaya senegalensis* dans le traitement du diabète. Les résultats obtenus montrent que les différentes doses d'extrait de la plante ont modifié les paramètres biochimiques.

Considérant le glucose, l'administration de 10 mg, 25mg et 50mg d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* entraîne respectivement une diminution de 12,66%, 25,30% et 38,48% de la glycémie après 24H. *Khaya senegalensis* est donc une plante antihyperglycémiante. Ceci corrobore les travaux de Monteomo *et al*. (2014) qui ont révélé une diminution de 20% de la glycémie seulement 02 heures après l'administration d'extrait aqueux de la plante. De plus, Zohoun (2010) a prouvé par des études expérimentales l'effet antihyperglycémique des extraits totaux de *Khaya senegalensis* qui ont baissé le taux de glucose dans le milieu expérimental, surtout à faibles concentrations. Cet auteur attribuait ce fait à un blocage de la glycogénolyse et une entrée de glucose dans le foie pour son stockage en glycogène : le mode d'action des extraits totaux de *Khaya senegalensis* serait comparable à celui de l'insuline humaine **[87]**.L'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* peut avoir une action extra pancréatique en influençant ainsi l'absorption de glucose et son utilisation par les différents tissus. Un autre mécanisme possible pour l'action de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* peut être par le biais du foie, en influant la gluconéogenèse, la glycogénogenèse ou la glycogénolyse. Certaines flavonoïdes, qui ont été isolées des plantes, inhibent les transporteurs du glucose dans les intestins, diminuent l'expression des gènes qui contrôlent la néoglucogenèse, augmentent le stockage du glucose dans le foie et réduisent la dégradation du glycogène **[88]**. Par exemple, la catéchine qui est un tanin inhibe l'absorption intestinale du glucose ainsi que l'epicatéchine gallate augmente la synthèse hépatique du glycogène et la quercétine augmente la synthèse de l'insuline. Cette activité révélée serait liée à la présence de ces composés dans la plante. Un grand nombre de travaux de recherche ont montré l'effet antihyperglycémique de plusieurs plantes contenant des composés polyphénoliques ainsi que plusieurs autres composés selon plusieurs mécanismes [3, 7,42].

Concernant le profil lipidique, les différentes doses d'extraits éthyliques de *Khaya senegalensis* n'ont pas modifié de façon progressive les taux de triglycérides et de cholestérol des lapins. L'absence d'augmentation de ces taux indique que *Khaya senegalensis* possède une activité antidiabétique.

La conjugaison des effets antyherglycémiant et de la non augmentation des taux des composés lipidiques prouve que l'extrait de *Khaya senegalensis* est efficace dans le traitement du diabète. Ceci explique son utilisation potentielle en pharmacopée traditionnelle au Bénin.

La diffusion de ces résultats nécessite la connaissance de la dose optimale efficace. L'extrait éthylique d'écorces de *Khaya senegalensis* a une incidence sur le foie et les reins des lapins normoglycémiques gavés pendant un mois. Au niveau du foie, les hépatocytes sont quasi normaux. Mais, on note la présence de nombreuses cellules dans le tissu conjonctif de la veine centrolobulaire et une dilatation de l'espace de Disse. Cela signifierait que l'extrait éthylique d'écorces de *Khaya senegalensis* aurait induit une prolifération des cellules hépatiques qui ont entraîné une dilatation de l'espace de Disse. Aussi, note-t-on avec la dose 50mg/kg de PC des hépatocytes à noyaux pycnotiques. Par rapport aux reins, on note qu'il existe des glomérules rénaux anormaux. Les tubes rénaux paraissent dilatés par endroit puis, il existe des glomérules rénaux en voie de destruction. L'étude histologique révèle que l'extrait éthylique d'écorces de *Khaya senegalensis* a des incidences néfastes graves sur le foie et les reins des lapins normaux quelques soit la dose (10-25-50mg/kg de PC). Il pourrait entraîner utilisé longtemps l'hépatite et à plus long terme le cancer du foie et l'insuffisance rénale d'une part. De plus, les phospholipides étant des molécules spécifiquement membranaires, leur présence dans les lysats sous l'action de *K. senegalensis* par rapport au témoin négatif pourrait s'expliquer par le fait qu'avant même la lyse des cellules par les solvants d'extraction *K. senegalensis* avait déjà agit, c'est à dire qu'il avait déjà lysé une partie des membranes ; et cette action de *K. senegalensis* n'est rien d'autre que la nécrose. Ce résultat nous permet de comprendre que la dégradation des lipides membranaires invoquée plus haut est en fait la conséquence de la nécrose.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de nos travaux a permis de souligner les effets bénéfiques de l'administration de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* dans la baisse de la glycémie et les effets néfastes de l'administration de cet extrait selon la dose au niveau des reins. Ce travail a confirmé l'effet antihyperglycémique de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*. Les résultats indiquent que chez les lapins normoglycémiques en 24H la dose 50mg/kg de PC de l'extrait présente une activité antihyperglycémiante. Cette même dose administrée 2 H avant l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale a entraîné, une réduction significative du pic hyperglycémique chez des lapins rendus temporairement hyperglycémiques par surcharge de glucose en diminuant d'une manière significative la concentration du glucose. Par contre, l'extrait n'a aucun effet significatif sur la concentration sérique des triglycérides et du cholestérol total.

A l'issu de cette étude, il ressort que sous de fortes doses : 5mg/Kg ; 10mg/Kg ; 25mg/Kg ; 50mg/Kg ; 100mg/Kg et 200mg/Kg de *K. senegalensis* entraine une nécrose des hépatocytes et une destruction des glomérules rénaux. Certaines doses de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* ont donc une incidence néfaste sur le foie et les reins. En ce qui concerne le foie, on note la présence de nombreuses cellules dans le tissu conjonctif de la veine centrolobulaire et une dilatation de l'espace de Disse. Cela signifierait que l'extrait éthylique d'écorces de *Khaya senegalensis* a induit une prolifération des cellules hépatiques qui ont entraîné une dilatation de l'espace de Disse. Aussi, note-t-on avec la dose 50mg/kg de PC des hépatocytes à noyaux pycnotiques. Il pourrait entraîner utilisé longtemps l'hépatite et à plus long terme le cancer du foie …

Ces résultats laissent un grand espoir pour l'avenir car ils permettront de conseiller les tradi-praticiens par rapport aux doses et à la durée d'administration de *Khaya senegalensis* pour le traitement des patients et à éviter l'apparition d'affection rénale. En effet, il ressort du présent travail que *Khaya senegalensis* est un produit fort intéressant dans le traitement du diabète sous la dose 2,5mg/Kg.

Nous suggérons :

- **A l'endroit de la Faculté des Sciences et Techniques**

Que des études complémentaires soient effectuées sur des lapins diabétiques afin de prouver l'effet anti- hyperglycémique de l'extrait éthylique d'écorces de *Khaya senegalensis ;* Que d'autres études soient entreprises afin d'identifier clairement les molécules impliquées dans l'effet anti- hyperglycémique de *Khaya senegalensis* et d'avancer vers une meilleure connaissance du (des) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans les effets pharmacologiques observés ;Reprendre d'autres études et attendre 48H, 72H, une semaine et deux semaines après gavage avant sacrifice des lapins pour, voir si on observerait des lésions inquiétantes au niveau du foie, ou si les détérioration au niveau des reins seraient corriger.

- **A l'endroit du ministère de la santé :**

- Une étroite collaboration avec les spécialistes médicaux pour une meilleure exploitation de la médecine traditionnelle et des plantes médicinales ;
- Une campagne continuelle d'information, d'éducation et de sensibilisation de la population pour une utilisation rationnelle des plantes médicinales ;
- La nécessité de financer des études de ce genre sur d'autres plantes afin de permettre au Bénin de pouvoir disposer davantage de médicaments traditionnels améliorés ;
- Des études complémentaires soient effectuées afin d'évaluer l'action de l'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis* sur les protéines des hépatocytes de rats ;
- La promotion des travaux de ce genre sur d'autres plantes soit réalisée afin de permettre au Bénin de pouvoir disposer davantage de médicaments traditionnels améliorés à toxicité contrôlé ; que la recherche sur la valorisation de nos plantes traditionnelles soient faites ;
- Des moyens adéquats soient mis à la disposition des structures de recherches pour l'étude approfondie de nos plantes médicinales.
- Une campagne continuelle d'information, d'éducation et de sensibilisation de la population pour une utilisation rationnelle des plantes médicinales;
- Une étroite collaboration avec les spécialistes médicaux pour une meilleure exploitation de la médecine traditionnelle et des plantes médicinales.

BIBLIOGRAPHIE

[1]. ADJOTIN P. (1996). Médecines traditionnelles et médecine moderne au Bénin. Collaborations ou conflits ?- (Mémoire de DES).- Genève : IUED.- 57p.

[2].ARBONNIER M. (2009). Arbres, Arbustes et Lianes des Zones Sèches d'Afrique de l'Ouest (3è edn). Ed. Quae, MNHN. Imp. Louis Jean Imprimeur: Paris ; 355.

[3]. JACQUEMINET S., GRIMALDI A. (2005), Guide pratique du diabète, Elsevier Masson, 271 p.

[4]. CTFT *Khaya semgalensis* (Desr.) A. Juss. (Bois et Forêts des Tropiques, no218, 4è trimestre 1988 ; 43-55).

[5].LOMPO M. (1999). *Activité Anti-Inflammatoire Des Extraits D'écorces de Tronc De Khaya Senegalensis A. Juss (Meliaceae): Mise Au Point D'une Forme Galénique Topique (Phase 1)*. Thèse de Doctorat soutenue le 04 Juin 1999 ; première partie, PP16-30. Université de Ouagadougou.

[6]. SOKPON N., OUINSAVI C. (2004). *Gestion des plantations de khaya senegalensis au Bénin.* Bois et Forêts des Tropiques ; N°279 (1) ; Dossier 37.

[7]. LOMPO M., OUEDRAOGO S., SOURABI S., GUISSOU I.P. (1998). *Valorisation d'une plante médicinale anti-inflammatoire*. Pharm. MM. Trad. Afr. 1998, Vol.l0, pp.68-79. Université de Ouagadougou.

[8].SABLASSOU K., AKLIKOKOU A. K., GBEASSOR M. (1998). *Activité anti-contracturante de l'extrait de khaya senegalensis sur l'iléon de cobaye.*Pharm. Méd. Trad. Afr. Vol. 10, pp.3-15. Université du Bénin.

[9]. TAKIN M. C. (2014). Pharmacodynamie De La Bioactivité De L'extrait Ethylique De *Khaya Senegalensis* Sur Les Fonctions Hepatiques Et Renales Chez Le Lapin (*Orytholagus Cuniculus)*

[10]. YCUTT A. A., NARAYAN K. M. (2001). Thèse de Doctorat soutenue le 17 Janvier 2014 ; chapitre I, PP 7-13

[11]. NIKIEMA A., PASTERNAK. D. (2008). *Khaya senegalensis* (Desr.) A.Juss. [Internet] Fiche de PROTA4U. Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. <http://www.prota4u.org/search.asp>.

[12]. JOSEPH O. ADEBAYO, YAKUBU M. T., EGWIM EVANS C., OWOYELE V. B., ENAIBE B. U. (2003). *Effect of ethanolic extract of Khaya senegalensis on some*

biochemical parameters of rat kidney. Journal of Ethnopharmacology 88. 69–72. University of Ilorin,Nigeria.

[13]. TAKIN M., AHOKPE M., ZOHOUN L., ASSOU E., AIVODJI N., AGOSSOU E., SEZAN A. (2013). *Effect of total Khaya senegalensis (Meliaceae) barks extracts on hepatic liberation of glucose*. 10.5455/NJPPP.2014.4.290920133. University of Abomey Calavi, Cotonou, Republic of Benin.

[14]. LE GRAND F. (2010). Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires: Cas des hémocytes de bivalves atteints de néoplasie disséminée. Thèse de Doctorat soutenue le 14 mai 2010. Université De Bretagne Occidentale.

[15]. HUONG T.T.M. (2010). Modification De La Composition Lipidique Membranaire Chez Les Bactéries Lactiques En Conditions De Stress. Etude Du Rôle Physiologique Des Acides Gras Cycliques Chez Deux Modèles : *Oenococcus Oeni* ATCC-BAA1163 Et *Lactococcus Lactis* MG1363. Thèse de Doctorat Soutenue Le 17 Décembre 2010. Université De Bourgogne, Institut Université De La Vigne Et Du Vin

[16]. CASTAGNE D. (2010). Etude Des Interactions Entre Les Cyclodextrines Et Les Membranes Liposomales Ou Biologiques. Thèse de Doctorat soutenue en 2009-2010 Constituants cellulaires

[17]. COT. M. (2006). Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. **Thèse** de Doctorat soutenue le 10 novembre 2006 à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. PP 81-83

[18]. BEREZIAT G., CHAMBAZ J., COLARD O., WOLF C. (1988). Les Multiples Fonctions Des Phospholipides Cellulaires. Médecine/ sciences ; 4 : 8-15Cnrs, UA 524-, laboratoire de biochimie, CHU St-Antoine, 27, rue Chaligny, 7501 2 Paris, France.

[19]. MATTHIEU S. Fondateur et rédacteur principal de Cours-Pharmacie

[20]. LE VEE M. (2006). Protéines de transport membranaire de xénobiotiques : optimisation des modèles d'études *in vitro* et étude des mécanismes de régulation de leur expression. Thèse de Doctorat soutenue 26 septembre ; PP 4-9

[21]. GRONDIN M. (2008). Les Protéines de blé d'hiver : Nouveaux agents cryoprotecteurs pour les hépatocytes de rat. Université de Québec à Montréal Thèse de Doctorat soutenue en Juillet ; Chapitre II, PP 8-18.

[22]. Dr NATAF S. Histologie : le-foie-et-les-voies-biliaires.htm. Université de Lyon/Hospices Civils de Lyon

[23]. AHOKPE M. Cours d'endocrinologie

[24]. Histologie : Organes, Systèmes et Appareilles, chapitre1 : l'appareille digestif, le foie et les voies biliaires. Faculté de Médecine Pierre & Marie-Curie, Niveau PCEM2-DCEM1

[25]. Cours de Médecine - Anatomie, PCEM1, Ostéopathie - Partie 6 : Le foie.

[26]. SEYDOU S. F. (2010). Modelisation du mécanisme de diffusion d'une série de statines à travers la membrane cellulaire : approche biochromatographique et thermodynamique. Thèse de Doctorat soutenue le 30 Juin ; Université de Franche-Comté. PP 35 ;

[26]. CATALA M., ANDRE J-M., KATSANIS G., POIRIER J. (2007). Histologie : organes, systèmes et appareils. Cours de PCEM2 - DCEM1 ; Service d'Histologie – Embryologie ; Université Pierre et Marie Curie.

[27]. KOUKOUI A.S.I. O. (2005). 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 soutenue le 22 Novembre ; Université de Paris XI ORSAY PP 1-16.

[28]. PRAJAPATI R.; PATEL R. (2011). Isolation Of Rat Hepatocyte Using Cold Trypsinization Method And Total Rna Isolation Using Hot Sds/Phenol Extraction Method**.** International Journal of Current Pharmaceutical Research. Vol 3, Issue 1.

[29]. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory Manual. Chapitre III: méthodes expérimentaes.l Cold Spring Harbor Laboratory press, N.Y.

[30]DR. MEDRAOUI L. Techniques De Separation Et D'analyse Des Acides Nucléiques: Adn, Arn & Plasmides.Td N°1- Biologie Moleculaire, Module M21- Elément E2. Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire/ Faculté des Science des Rabat/ Université Mohamined V-Agdal

[31]. STREIT F. (2008). *Influence Des Conditions De Recolte Et De Concentration Sur L'etat Physiologique Et La Cryotolerance De Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus Cfl*1. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). THESE de Doctorat soutenue le 18 juin. PP 95

[32]. CLEMENT B., SEGUI-REAL B., SAVAGNER P., KLEINMAN H. K. ; YAMADA Y. (1990). *Hepatocyte Attachment Of Laminin Is Mediated Through Multiple Receptors.* Laboratory of Developmental Biology and Anomalies, National Institute Of Dental Research, National Institute Of Health, Bethesda, Maryland 20892. Published January 1,

[33]. DO CARMO S. (2009). Étude Fonctionnelle De L'apolipoprotéine D Humaine En Situations De Stress. UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL. THESE de Doctorat soutenue en Janvier. PP 38

[34]. RATTRAY J. B. M. **(1988)** Yeasts In *Microbial Lipids* ed. Ratledge, C. and Wilkinson, S.G. PP. 555-698. Harcourt Brace Jovanovich

[35]. SANDRA &CARMAUX. (2008). Caracterisation De La Mort Des Cellules Animales Cultivees En Bioreacteur ; Thèse de Doctorat soutenue le 06 Juin ; Université Henri Poincare – NancyI

[36]. WEABER G., (2007). Diabétologie expérimentale. *Revue médicale de la Suisse Romande*. 120: 907-913

[37]. SHARMA B., VISWANATH G., SALUNKE R., ROY P., (2008). Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice**.** *FoodChemistry* 110: 697–705.

[38]. SINGH J., KAKKAR P., (2009). Antihyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic lapins. J. *Ethnopharmacol.* doi:10.1016/j.jep.02.038.

[39]. ZHOU I., ZHOU S., TANG J., ZHANG K., GUANG L., HUANG Y., XU Y., YING Y., ZHANG L., LI D., (2009). Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic lapins. *European Journal of Pharmacology* 606: 262–268

[40]-KING H., AUBERT R. E. HERMAN W. H. (1998)

Global burden of diabetes 1995-2025 prevalence, numeral estimates and projections**.** *Diabetes care*; 21; 1414-1431

[41]-BOYLE J. P., HONEYCUTT A. A., NARAYAN K. M. (2001)

Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and desease in the US. *Diadetes care*; 24; 1936-1940

[42]. McCORD J.M., KEELE Jr.B.B, FRIDOVICH I., (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* 68: 1024–1027.

[43]. JOHNSON I.S. (1983). Human insulin from recombinant DNA technology. American Association for the Advancement of Science. *Science, Vol 219*, Issue 4585: 632-637.

[44]. GUERMAZ R., ZEKRI S., HATRI A., KESSAL F., BROURI M., (2008). Le diabète de type 2 en Algérie : poids actuel et à venir. *La Revue de Médecine Interne ;* Volume 29, Supplement 1 : S49-S50

[45]. MAROUF A., JOËL R., (2007). La botanique de A à Z. Edition Dunod, Paris, p.66-82

[46]. MARLES R.J., FARNSWORTH, N.R., (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 137–189.

[47]. MALGRAS D, (1992). Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes. Ed.Karthala et ACCT, PP 478.

[48]. Ministère de la santé publique du Bénin (2010). Annuaire des statistiques sanitaires de 2010 en République du Bénin. *PP.73-105*

[49]. RODIER M., (2001). Définition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique,* vol.25 - n°2 : 5-18.

[50]. MARLES R.J., FARNSWORTH N.R., (1994). Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ MedPlant Res.*; 6:149-187.

[51]. DEY LUCEY M .D., ANOJA S., ATTELE D .D .S., CHUN-SU YUAN M .D., (2002). Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review.* 7(1): 45-58.

[52]. NISSEN S.E., WOLSKI K., (2007). Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes, *N. Engl. J. Med*.

[53]. BAGCHI D, GARG A, KROHN R, BAGCHI M, TRAN M, STOHS S., (1997). Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol;* 95:179 – 90.

[54]. KIM Y.Y., KANG H.J., KO S.K., CHUNG S.H., (2002). Sopungsungi-won (SP) prevents the onset of hyperglycemia and hyperlipidemia in Zucker diabetic fatty lapins. *Arch.Pharm. Res.* 25: 923–931.

[55]. JIN L., XUE H.Y., JIN, L.J., LI S.Y., XU Y.P., (2008). Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on lapins with streptozotocin-induced diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 582:162– 167.

[56]. CALOP J., LIMAT S., FERNANDEZ C., (2008). Pharmacie clinique et thérapeutique. 3ème Ed. Masson, *Elsevier Masson,* Paris. pp.417-427.

[57]. GRIMALDI A. (2001). Guide pratique du diabète, édition Masson. Paris, 1 - 415.

[58]. FUSI M.G. ; BANDERA M.T.. Guide de l'alimentation du diabétique. *Éditions de VECCHI S.A.* PP 17-18-20

[59]. BUYSSCHAERT M., VANDELEENE B., PARUS I., HERMANS M .P., (1999). Le diabète sucré d'une réalité d'aujourd'hui à un défi de demain. *Louvain Med.*118: S189-S195.

[60]. RACCAH D., (2004). Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*. 1(1): 29-42.

[61]. DAGOGO-JACK S, SANTIAGO J .V, (1997). Physiopathology of type 2 diabetes and modes of action of therapeutic interventions. *Arch intern med,* **157**:1802 - 1817.

[62]. FERY F., PAQUOT, (2003). Etiopathogénie et physiopathologie du diabète de type 2. *La revue de médecine interne,* **24** : 730 - 737.

[63]. FERRANNINI E, GASTALDELLI A, MIYAZAKI Y., (2005). Betacell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to over diabetes: a new analysis. *J ClinEndocrinol Metab*, **90:** 493 - 500.

[64]. WAUTIER J .L, GUILLAUSSEAU P .J. (2001). Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab (Paris*), **27:** 535 – 542

[65]. FOSSATI P., PRENCIPE L., (1982). Serum triglyceride determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxyde. *Clin Chem,* 28: 2077-80.

[66]. FARRANCE I., (1987).*Clinical, Biochemcal. Reviews,* PP.55 - 68

[67]. SAMAAN C., KLIP A., (2008). L'obésité, l'insulinorésistance et le diabète de type 2 : l'interaction entre les cellules adipeuses et les cellules musculaires. *Endocrinologie*, **8:** 7 - 13.

[68]. PETER-RIESCH B., PHILIPPE J., STALDER H., (2002). Découverte d'un diabète sucré. *Primary Care,* **2** : 284 - 290. 7 - 13.

[69]. NELSON D.L., COX M., (2004). Lehninger Principles of Biochemistry. *Ed. W H Freeman and Co. Ltd, 4 Theditions, Newyork.* PP. 881-901.

[70]. 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. Apllication à la physiologie et à la phathologie. *Nutr. Clin. Métabol,* **10**; 231 - 242.

[71]. OBERLEY LW. (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med,* 5: 113-124.

[72]. KAHN B.B., (1992). Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest.*, 89: 1367-71.

[73]. WANG Y., KOLE H .K., MONTROSE-RAFIZADEH C., PERFETTI R. BERNIER M., EGAN JM. *(*1997). Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol*. Dec; 19 (3): 241-8

[74]. Antihyperglycaemic effect of Aporosa Lindleyana in normal and alloxan induced diabetic lapins. *Journal of Ethnopharmacology*; 84 (2-3), 247-249

[75]. Hypoglycaemic activity of scoparia dulcis L. Extractin in alloxan induced hyperglycaemic lapins *Phytpther.Res.; 16 (7)*; 662-664

[76]. MARIE Borrel. Ces plantes qui nous veulent du bien. *Édition Hachette* PP 72-76

[77]. TRINDER P. (1969), *Ann. Clin. Biochem.*, 6, PP.24-27

[78].HOULD R. Techniques d'histolopathologie et de cytopathologie *Décarie éditeur, Montréal Maloine éditeur Paris pp : 20-183*

[79]. JUBINVILLE F. (1980).*Notes de cours d'Histologie II*, Cégep de Saint-Jean-sur-Richelieu.

[80]. RAVI K., RAJASEKARAN S., SUBRAMANIAN S., (2005). Antihyperlipidemic effect of Eugenia jambolana seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and ChemicalToxicology,* **43** : 1433 - 1439.

[81]. ZOHOUN L., (2011). Contribution à l'étude hypoglycémiante des extraits de *Khaya senegalensis* (étude in vitro sur le foie du rat blanc de laboratoire) PP. 42. Mémoire de Master, FAST/UAC/Bénin 2011

[82]. WALTNER-LAW M.E., WANG X.L., LAW B.K., HALL R.K., NAWANO M., GRANNER D.K., (2002). Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucoseproduction. *J Biol Chem,* 277: 34933 - 34940.

[83]. VERGES B. (2007). Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2. *Nutrition clinique et métabolisme,* **21** : 9-16.

[84]. JAFFIOL C. (2011). Le diabète sucré en Afrique : un enjeu de santé publique. Bull. Acad. Natle Méd., 2011, 195, n°6,, 1239-1254

[85].ALLAIN C.C. **(1974).** Influence d'une eau thermale sulfatée calcique magnésienne sur le métabolisme des lipoprotéines chez le rat .Clin chem 20 PP .470-475.

[86]. American optical corporation, Effective use and proper care of the microtome, 5ème edition, A.O.C Buffalo, 1975; 40p.

[87]. **BOULLARD B. (2001)**. Dictionnaire plantes médicinales du monde, réalité et croyance. Ed ESTEM 7, rue Jacquemont 75017 paris ; 636p.

[88].YARO B. (1992). Contribution à l'étude du traitement traditionnel du diabète au Mali. Thèse de pharmacie. ; 133p.

[89].BLOOMAND F. P., BANCROFT J. D., STEVENS A. (1991). A text book of histology. 11ième édition. Theory and practice of histological techniques, Londres, E. S. Livingstone, 1077, 436p.

[90]. **BESSESEN D.H.(2001).** The role of carbohydrates in Insulin resistance. Journal of Nutrition 131:2782S-2786S.

[91]. **CHEEKE P.R. (1987).** Rabbit feeding and nutrition. Academic Press Inc.orlando, 376P.

[92]. **CHANG L. W.; CHARLES C. T. (1979).** A Color Atlas and Manual for Applied Histo chemistry, Springfield, 115 pages

[93].DJAGO A.Y., KPODEKON M. (2000). Le guide pratique de l'éleveur de lapins en Afrique de l'ouest. CECURI, Louvain Développement et FAO éditeurs, 106 P

[94].DESLAURIER. P.- A.(1976). la préparation microscopique tissulaire dans la routine du laboratoire d'histologie, 2ième édition, Rimuski, Imprimerie Gilbert, 282 P.

[95]. **DJODJOUWIN L. (1990).** Etude des techniques de régénération du caîlcédrat(*Khaya senegalensis* Juss.) et de l'acajou à grandes feuilles (*Khaya grandifoliola* D.C.) dans les forêts dégradés de la région de Bassila (République su Bénin). Thèse d'ingénieur agronome. FSA ; 169p.

[96].FRAGA M.J., BARRENO C., CARABANO R., MENDEZ, T., DE BLAS J.C. (1984). Effect of amonts of fibre and protein in the diet on growth and digestive traits of rabbits.Ann.Inst.Noc.Invest.Agrar, Ganadera.21, 91-110.

[97].GIDENNE T., SCALABRANI F., MARCHAIS C., (1991). Adaptation digestive du lapin à la teneur en constituants pariétaux du régime. Ann. Zootech, 40, 73-84.

[98].GUYTON A. C. Tratato de FisiologiaMédica, Tomo II. Spécimaedicion PP 804-805

[99].OYENIRAN C.(2004). Contribution à l'étude des propriétés hypoglycémiantes de l'huile essentielle d'Eucalyptus canaldulensis. Mémoire de Maîtrise en physiologie. Cotonou - Bénin ; PP 33-45.

[100].GILMAN. A. (1994). Les bases farmacologicas de la terapeutica, Tomo III; PP 1459-1470

[101]. **GRIMALDI A. P. C., MASSEBOEUF N. , POPELIER M., SACHONS C.(1998).** Guide pratique du diabète. Editions médicales spécialisées. Directeur éditions et multimédia : José Vieira; 376p

[102].GANTER, P. ; JOLLES G. . (1969). Histochimie normale et pathologique, tomes I et II, Paris, Gauthier- Villars, 1904 p.

[103]. HAWLEY, GESSNER G., THE CONDENSED CHEMICAL DICTIONARY. (1971). 8ième édition, New- York, Van Nostrand Reinhold Company, 971 p.

[104]. **INRA. (1989).** Alimentation des animaux monogastriques : Porc, Lapin, Volailles etc.éd.., Paris3, PP 127-132.

[105].JUNQUEIRA C. L., CARNEIRO J., KELLY R. O. (1995): Basic histology. Appleton et lange 7ième Edition, 460 p.

[106]. **KRUH J. (1983) :** Biochimie, Tome II : Métabolismes. Hermann, Paris; 249p.

[107]. **LEHNINGER A. L. (1970).** Biochemistry NewYork worth Publishers, 833 p.

[108]. **LEBAS, LAPLACE J.P.(1977).** Growth and digestive transit in the rabbits. Variation determined by physical form, composition and crude fiber content of the feed.Ann.biol.Biochem.Biophys.17, 535-535.

[109]. **LUPTON, J. R., TURNER, N. D. (2OO3).** Dietary fibre and coronary Disease, Does the evidence support an AssciationcurentArtherosclerosis. Reports 5 ; 500-505.

[110]. **MOUMOUNI, A. M. (1980)**. Les travaux des recherches forestières et les essais d'éclaircies dans les plantations de teck de Djigbé, d'Agriculture de Toffo. Mémoire de fin d'étude CPU; 99 p.

[111]. **MARRIEB E. (1999).** Anatomie et physiologie humaines. De Boeck Université; 1194 pages

[112]. **MATTEWS J. L, MARTIN J. H., FEBIGER L.(1971)**: Atlas of human histologie and ultrastructure. Philadelphia, PP 170- 171

[113].MARIEB N. E (2001). Physiologie humaine. De Boeck Université, 2ième édition; 542 p.

[114]. **N.BILLOTTE, A.M.RISTERUCCI, E.BARCELOS, J.L. NOYER, P.AMBLARD, AND F.C. BAURENS. (2001).**Developement, charatérisation and across-taxa utility of oil palm (Elaeis guineensisJacq.) microsatellite markers. Génome 44 :413-425.

[115]. **OUINSAVI C.** Contribution à la conservation du *Khaya Senegalensis*(DESR). A. JUSS : Importance socio-économique, structure et dynamiques des peuplements naturels et productivités des plantations d'essais au Bénin

[116]. **PORTER K.R., BONNEVILLE M. A. (1971).** Structure fine des cellules et des Tissus. Edisciences, Paris ; PP 84-94.

[117]. **STEVENS A., LOWE J. (1977)** : Histologie Humaine. De Boeck Université. 2ième Edition; 408 p.

[118]. **WHEATER P. R., BURKITT H. G, DANIELS V. G. (1988)** : histologie fonctionnelle. 2ième édition ; PP 263-265.

[119]. Joint Working Group of Refinement of the BVA/ FRAME/ RSPCA/ UFAW. 1993: Removal of Blood from Laboratory Mammals and Birds. Laboratory Animals 27: 1-22

[120]. MONTEOMO G. (2014). Comparative of the antihyperglycemic activity of Sclerocarya birrea, *Khaya senegalensis*, Heliotropium indicum and ocimum gratissimum to rats wistar. American Journal of Bioscience 2 (2): 60-63

[121]. DASSOU H. G., OGNI C.A., YEDOMONHAN H., ADOMOU A.C., TOSSOU M., DOUGNON J.T., AKOEGNINOU A. (2014). Diversités, usages vétérinaires et vulnérabilités des plantes médicinales au Nord- Bénin. International Journal of Biological and Chemical Sciences. 189-210

WEBOGRAPHIE

http://www. FAO.org visité le 25/09/2011

http://www. Cuniculture. Info/Docs/Elevage/figure-Tropic/chapitre3/Plantes-00-composition.html visité le 28/09/2011

http://www.planteoléagineuse.com./archive.rg/details/lesplantesoléagioobo visité le 08/10/2011

http:// www.inra.fr/ productions-animales/an 2003/tap visité le12/10/2011

www. Pharmacorama. Com/ ezine/ leucmies-ligne-électrique.php visité le 10/12/2010

www. Doctissimo.fr

www. diabètenet. com / diabète- glucose- et- insuline. htm#

www.doctissimo.fr

www.diabete.com/diabte-glucose-et-insuline

www.pharmacorama.com/ezine/leucemies_ligne-electrique.php

www.who.int. /OMS diabète

ANNEXE

ANNEXE I : composition des réactifs du glucose

- FLACON R1 REACTIF (A)

Tampon phosphate 150mmol/l;
Glucose oxydase (GOD) ≥ 20000 UI/l;
Péroxydase (POD) ≥ 1000 UI/ l;
4-amino-antipyrine (PAP) 0,8mmol/l ;
chloro-4-phénol 2 mmol/l

- FLACON R2 ETALON

Glucose standard(S) 1g/l (5,55 mmol/l)

ANNEXE II : composition des réactifs des Triglycérides

- FLACON R1 TAMPON

PIPES 100 mmol/l
Chlorure de magnésium 9,8 mmol/l
Chloro-4-phénol 3,5 mmol/l
Conservateur

- FLACON R2 ENZYMES

Lipase ≥ 1000 UI/l
Péroxydase (POD) ≥1700 UI/l
Glycérol 3 phosphate oxydase (GPO) ≥ 3000 UI/l
Glycérol Kinase (GK) ≥ 660 UI/l
4-Amino-antipyrine (PAP) 0,5 mmol/l
Adénosine triphosphate Na (ATP) 1,3 mmol/l

FLACON R3 ETALON

Glycérol 2,28 mmol/l
qsp trioléine ou triglycérides 2 g/l (2,28 mmol/l)

ANNEXE III : composition des réactifs du cholestérol

- FLACON R1 TAMPON

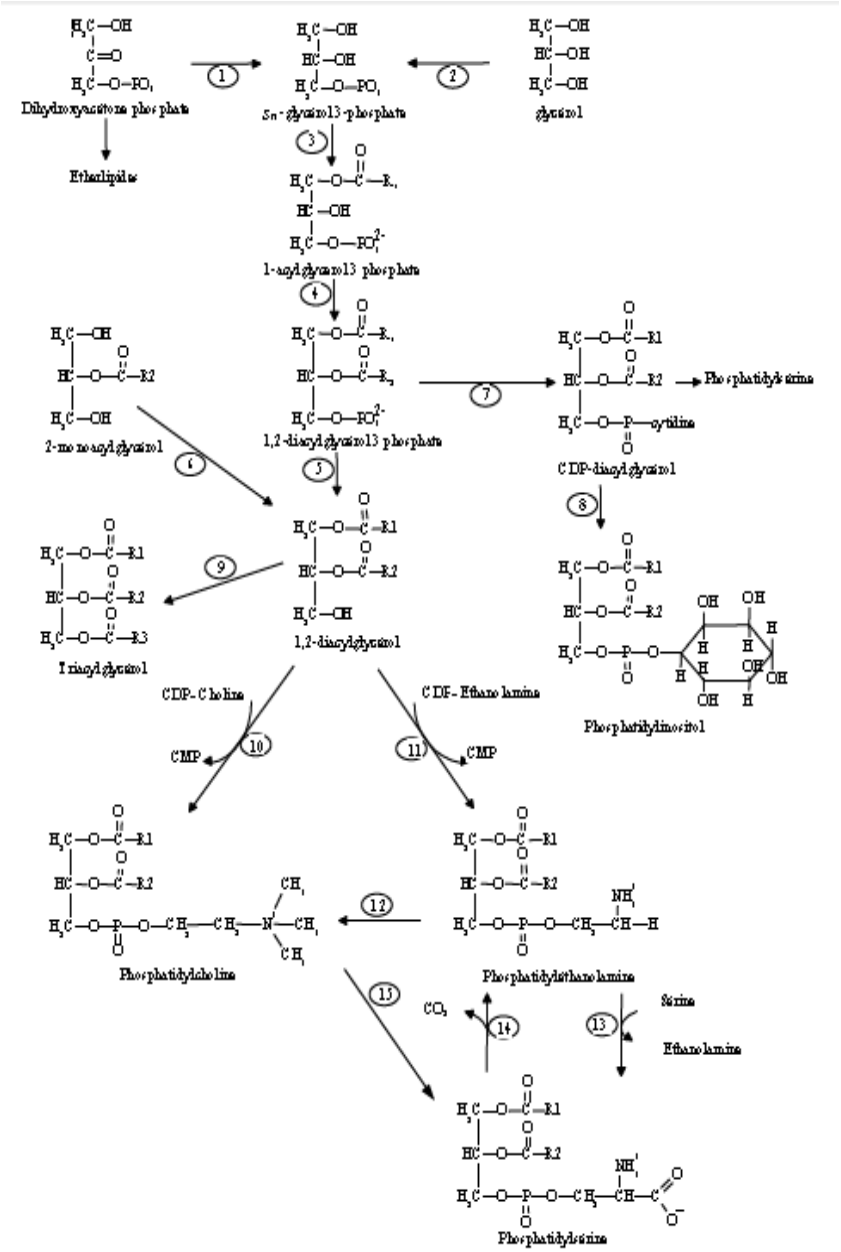
Tampon phosphate 100 mmol/l
Chloro-4-phénol 5mmol/l
Sodium cholate 2,3 mmol/l
Triton x100 1,5 ml/l
Conservateur

- FLACON R2 ENZYMES

Cholestérol oxydase (CO) ≥ 100 UI/L
Cholestérol estérase(CE) ≥ 170 UI/L
Peroxydase (POD) ≥ 1200 UI/L
4-Amino-antipyrine (PAP) 0,25 mmol/l
PEG 6000 167 µmol/l

- FLACON R3 ETALON Cholestérol 2 g /l (5, 17 mmol/l)

ANNEXEIV : Biosynthèse des phospholipides



1: glycérol 3-phosphate déhydrogénase
2: glycérokinase
3: glycérol 3-phosphate acyltransférase
4: 1-acylglycérol 3-phosphate acyltranférase
5: phosphatidate phosphohydrolase
6: monoacylglycérol acyltransférase
7: CTP-phosphatidate cytidyl transférase
8: CDP-diacylglycérol inositol transférase
9: diacylglycéro acyltransférase
10 : phosphocholine diacylglycérol transférase
11 : phosphoéthanolamine diacylglycérol transférase
12 : transméthylation
13 : réaction directe entre PE et sérine : phosphosérine synthase II
14 : décarboxylase
15 : réaction directe entre

ANNEXEV : Composition (pour 25kg) d'aliment mixte des lapins

Aliments	En kg
Maïs	5,5
Son de blé	7,25
Tourteau de sodja	2,25
Tourteau de coton	1,75
Tourteau palmiste	7,5
Coquille d'huitre	0,43
Méthionine	0,025
Lysine	0,025
Phosphate	0,25
Sel	0,075
Prémix	0,05
Sulfate de fer(atténue l'effet toxique du tourteau de coton)	0,01

Annexe VI : Principales différences entre apoptose et nécrose

Nécrose	*Apoptose*
Mort anormale des cellules	Mort cellulaire programmée
Spontanée, ne nécessite pas d'énergie	Controlée, requiert de l'énergie (ATP)
Bourgeonnement cellulaire	Rétrécissement des cellules, sans inflammation
Fragments ADN de taille aléatoire	Fragmentation de l'ADN : taille multiple de 185 bp
Perte de l'intégrité membranaire du fait de la lyse	Membrane plasmique bourgeonne mais reste intacte
Contenu cellulaire libéré dans l'environnement cellulaire : inflammation	Bourgeonnement des corps apoptotiques (contenu cellulaire encapsulé) (*cf. Figure 3*)
Phagocytose des débris cellulaires par les macrophages chez les organismes multicellulaires	Phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages chez les organismes multicellulaires *[Arden et al. 2006]*

Université d'Abomey-Calavi
==========
Faculté des Sciences et Techniques
==========
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE
==========
LABORATOIRE DE BOTANIQUE ET ECOLOGIE VEGETALE
==========
HERBIER NATIONAL DU BENIN

CERTIFICAT D'IDENTIFICATION

Le Directeur de l'Herbier National du Bénin, soussigné, certifie que la plante récoltée par Mlles ASSOU K. Sidoine-Eudoxie et AGOSSOU A. Essé, dans le cadre de leurs travaux de recherche au Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire (FAST/UAC), est identifiée sous :

N° Identification	Nom scientifique	Famille
AA 6492/HNB	*Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss.	Meliaceae

En foi de quoi, le présent certificat leur est délivré pour servir et valoir ce que de droit.

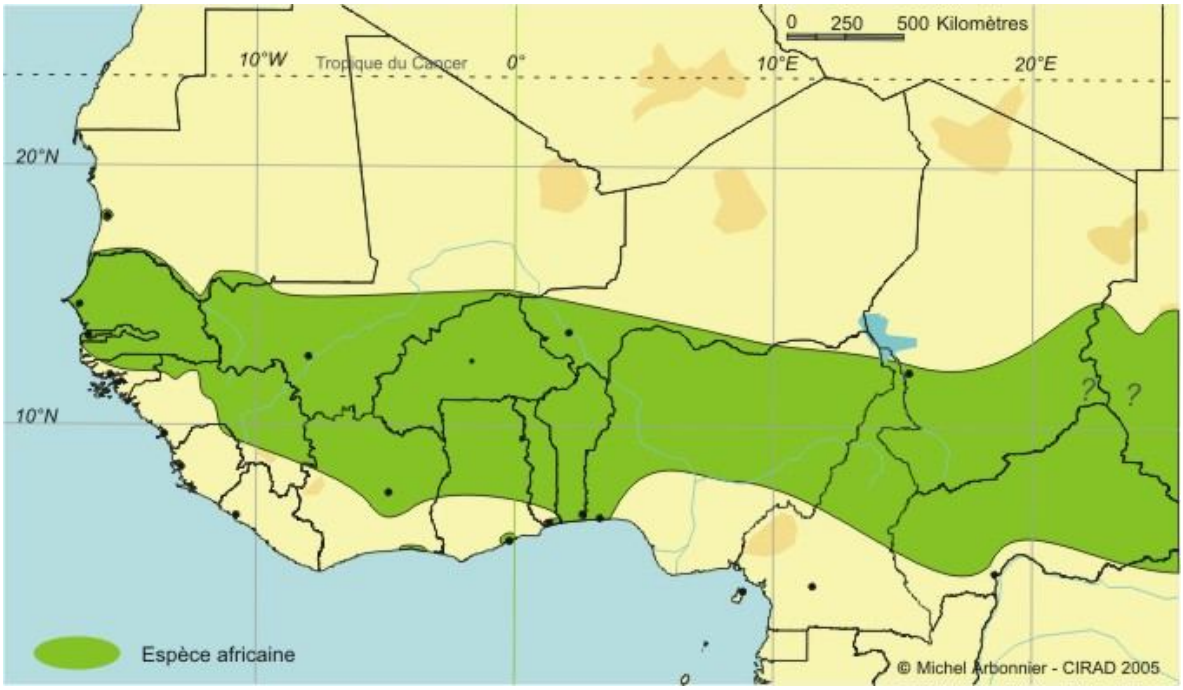
Abomey-Calavi, le 14 Avril 2014

Le Directeur,

Herbier National du Bénin
Le Directeur
FAST/UAC

Professeur Akpovi AKOEGNINOU.-

Campus Universitaire d'Abomey-Calavi, 01 BP : 4521 Cotonou. Tél : 93 02 38 75 / 95 56 40 54



Cartographie de la répartition de *Khaya senegalensis*

Tableau 5: Appellations locales de *Khaya senegalensis* en Afrique

Pays	Nom local	Langue	Référence
Sénégal	Hay	Wolof	Ndiaye (2013)
Niger	Madotchi	Haoussa	CEIBN (2008)
	Farrey	Djerma	
Bénin	Zouzatin	Fon	
	Aganwo	Yoruba	
Nigeria	Aganwo	Yoruba	Abubakar et al. (2010)
	Madaci	Haoussa	
	Ono	Igbo	
Cameroun	Jala	Bambara	
Togo	Mahogen	Ewé	
Burkina Faso	Kuka	Mossi	Daniel-Yves (2000)

Tableau 6 : Les triterpenoïdes contenu dans le principe amer de Khaya senegalensis

Organe végétal	Molécules presentes
Ecorce de tige	7-déacétyl-7- oxogédunine ; Angolensate de méthyle; méthyl-6-ydroxyangolensate; 3-destigloyl-déoxy-3B, 12B –diacétoxyswieténine
Cœur du bois	Mexicanolide ; Khayasine ; 3-déisobutyryl-3B tigloyl-oxy- Khayasine ; 3-déisobutyryl-313 benzoylo-oxykhayasine ; Angolensate de Méthyle; 7-déacétyl-7-oxogédunine 3-destigloyl-6-déoxy-3B ; 213 – diacétoxyswieténine ; senegalensate de methyl
Graine	Khivorine ; 3-déacétylkhivorine ; 7-déacétyl-7-oxokhivorine 3, 7-didéacetyl-7-Oxokhivorine ; 3-destigloyl-6-déoxy-swietenine ; 3-B-acetoxy-swietenine.
Racine	Khayasine
Ecorce de racine	Méthyl-6 hydroxyangolensate



Photos 11: une hotte chimique



Photos 12: Organes dans du formol



Photos 14: circulateur



Photos 13: une étuve



Photos 16: distributeur de paraffine



Photos 15: coupes histologiques



Photos 18: Un peson



Photos 17: Une micro- onde



Photos 20 : Coupes d'organes dans des cassettes



Photos 19: des organes dans les cassettes en paraffine



Photos 21: un microtome



Photos 22: Prise de Parafine sur les organes

Matière première	F0	F5	F10	F15

DONNEES A COLLECTER ET QUELQUES PARAMETRES A CALCULER PAR VOLET

VOLET	Biochimie
PARAMETRES	- Taux de glucose au début - Taux de glucose in vivo par semaine/quinzaine/mois - Taux de glucose à intervalle régulier **???** dans l'intestin grêle des carcasses - Taux de cholestérol in vivo par semaine/quinzaine/mois - Taux de AGL dans sang - Triglycérides dans sang - Activité enzymatique (foie) **Dispositif échantillonnage** **- 5 lapins mâles + 5 lapins femelles par traitement ;** **Soient 10 échantillons.**

Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types pour trois lapins dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 3. L'analyse statistique a été effectuée. Le niveau de significativité a été évaluée selon le test *t* –Student avec un risque d'erreur *p* tel que P=0,05.

	(kg Brute)	(kg de MS)	(kg Brute)	(kg Brute)
Maïs	**22**	**31**	**31**	**34**
Cossette manioc				
Son de blé	**29**	**15**	**10**	**3**
Drèche				
Tourteau soja	**9**	**12**	**14**	**17**
Tourteau cotton	**7**	**7**	**7**	**7**
Tourteau palmist	**30**	**27**	**25**	**21**
Tourteau arachide				
Farine de poisson				
Huile rouge				
Coquille d'huître	**1,7**	**1,7**	**1,7**	**1,7**
Lysine	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,1**
Méthionine	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,1**
Phosphate bicalcique	**1**	**1**	**1**	**1**
Nacl	**0,3**	**0,3**	**0,3**	**0,3**
Prémix (CMV)	**0,2**	**0,2**	**0,2**	**0,2**
Sulfate de Fer	**0,02**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
Concentré ponte GVS				
concentré chair GVS				
Soja graine				
Son maïs				
Son riz				
Feuille manioc				
Coquille d'escargot				
Fibre d'huile de palm	**0**	**5**	**10**	**15**
0				
0				
0				
TOTAL APPORTS	100	100	100	100

Tableau 7 : Formule de la Provende

Composition nutritionnelle ET Prix

		F0	F5
MS	%	H	88,5
CB	%	9,34	9,79
MG	%	-	-
EM	Kcal/kg	1878	2009
ED	Kcal/kg	2665	2667
PB	%	17,62	17,4
LYS	%	0,82	0,83
MET	%	0,38	0,38
AAS	%	0,71	0,70
Ca	%	1,01	1,00
P	%	0,94	0,79
Na	%	0,15	0,14
Ca/P		1,07	1,27
Prix	FCFA	190,03	192,73
CB Aliment		9,34	7,97
CB Fibre palme		0	1,82

Tableau 8 : montrant les résultats de l'analyse de variance. Elle stipule que la dose a une influence significative (p = 0,02) sur le nombre de spot au seuil de 5%. Sortie des résultats de l'analyse de variance

Coefficients:	**Estimate**	**Std. Error**	**t value**	**Pr (>|t|)**
Intercept)	249.23	97.00	2.569	0.0501
Nombre de spots	53.37	16.71	3.194	**0.0241***

Légende :'' significatif au seuil de 0.05*
Residual standard error: 45.53 on 5 degrees of freedom; Multiple R-squared: 0.6711, Adjusted R-squared: 0.6054; F-statistic: 10.2 on 1 and 5 DF, p-value: 0.02414



Photos 24 : Contenu du coffret de cholestérol HDL



Photos 23: Spectrophotomètre allumé



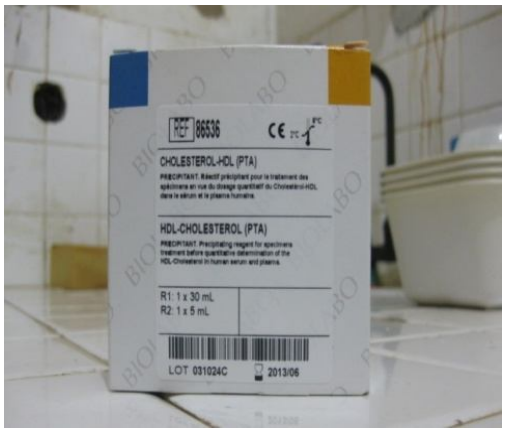
Photos 27: Centrifugeuse montrant la plaque et les godets dans lesquels on envoie les tubes contenant les échantillons



Photos 26: Une centrifugeuse ouverte



Photos 29: Centrifugeuse fermée



Photos 25 : coffret de cholestérol HDL

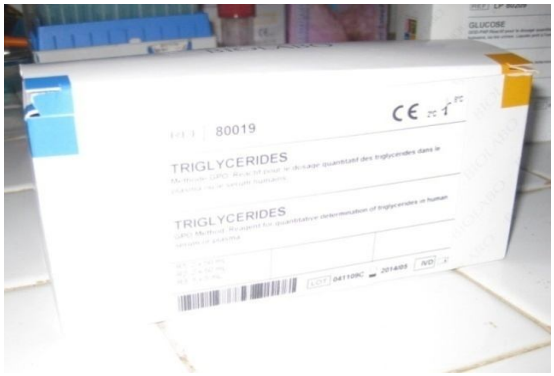
~ m ~



Photos 29: Des lapins en cage



Photos 33: Spectrophotomètre non allumé



Photos 32: Coffret de triglycéride (matériel de dosage)



Photos 31: Spectrophotomètre montrant le flux lumineux



Photos 30: Contenu du coffret de triglycéride



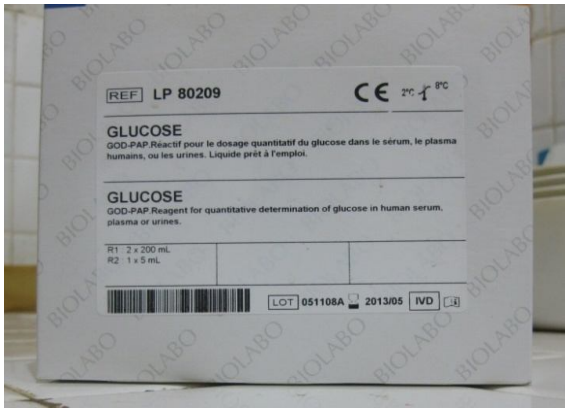
Photos 37: Photo du coffret de cholestérol total (matériel de dosage)



Photos 36: Photo du contenu du coffret de cholestérol total



Photos 35: Contenu du coffret de glucose



Photos 34 Coffret de glucose (matériel de dosage)



Cartographie de la répartition de *Khaya Senegalensis*. Mem. Mus. Natl. Hist. Nat., Paris 19 :25 (1830)

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 *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*	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 *Haemonchus, Cooperia, Oesophagostomum et Trichostrongylus*	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 *Trypanosoma brucei* sur des rats	Ibrahim et al. (2008)
		Activité anti -*Trypanosoma evansi* mais persistance de l'anémie	Umar et al. (2010)
Diabète	Extraits de feuilles	Inhibition de 45 – 75% de l'activité de α-amylase	Funke et Melzig (2006)

Tableau 9: Efficacité thérapeutique d'extraits de *Khaya senegalensis*

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



AMERICAN JOURNAL OF PHARMTECH RESEARCH

Journal home page: http://www.ajptr.com/

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

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

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

ABSTRACT

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

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

*Corresponding Author Email: sezan@live.fr

Received 04 November 2014, Accepted 02 December 2014

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

INTRODUCTION

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

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

MATERIALS AND METHODS

Materials

Plant material

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

Animal

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

Methods

Preparation of extract from the bark of Khayasenegalensis

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

Feeding rats

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

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

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

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

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

Extraction and thin layer chromatography of cellular lipids

Lipid extraction

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

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

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

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

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

A volume V = 15 mg per 500 ml of cells

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

Note: If the sample was stored at - 80 ° C, it must be evaporated under a stream of nitrogen and then resuspend in chloroform to know the precise volume before lipid analysis [14].

Thin layer chromatography (TLC) of cellular lipids

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

Separation of neutral lipids by TLC

As their name suggests, the neutral lipids are not charged compounds. They include: the free or esterified fatty acids, mono-, di- and triglycerides, free sterols and esterified. They are separated using low-polar solvents: hexane, ethyl ether.The separation of neutral lipids is first by migration in a hexane solvent: diethyl ether: glacial acetic acid (80: 20: 2 v / v / v) up to half of the plate. The plate is then dried a second migration is performed until 1 cm from the upper edge of the plate with hexane alone [12, 13].

Preparation of the vessel (mobile phase)

Eluent E1: it corresponds to the M1 mixture of the following solvents: hexane: ethyl ether: glacial acetic acid (80: 20: 2 v / v / v) [12, 13].

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

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

Preparation of stationary phase

On a silica plate (Silica gel 60, Merck, France) with dimensions of 10 × 10 cm, draw a pencil, a line about 1 cm from the bottom edge and parallel to it; is then deposited on the line, using capillary tubes and 0.5 to 1 cm apart, 10 mL of each sample to be analyzed lipids (control, sample 1, sample 2 ...) [12, 13].

Elution or development of the chromatogram

The plate is placed in a slightly oblique position in the cell C1 is then closed. The solvent which covers the bottom rises along the plate by capillary action. Migration is terminated when the solvent front reaches about half of the plate. The plate is then placed in the second tank C2 and migration after drying is stopped when the solvent front reaches the top of about 1cm from the plate. The level reached by the solvent (front line) is indicated by a thin line and the plate is dried in the open air or using a drier [12, 13].

Separation of phospholipids by TLC

Phospholipids are polar molecules separated using combinations of highly polar solvent: water, methanol, chloroform .... Migration was once with a mixture: chloroform / acetone / methanol / acetic acid / H2O (50/15/10 / 10/4 (v / v) or chloroform / methanol / glacial acetic acid / water (25: 15: 4: 2) or chloroform / methanol / ammonia (65: 25: 4). these proportions are on the verge of . two-phase mixture must remain monophasic [12, 13].

Preparation of the vessel (mobile phase)

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

Preparation of stationary phase

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

Elution or development of the chromatogram

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

Revelation of lipids on TLC plates

Revelation is made by spraying a solution of copper II sulfate 10% (10 g in 100 mL of $CuSO_4$, $5H_2O$ H_3PO_4 8% (v / v)). Once the dry plate, it is placed for about 15 min in an oven at 150 ° C min. The presence of spots indicates the presence of lipids in question [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction yield

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

Table 1: Table showing the yield obtained after extraction

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

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

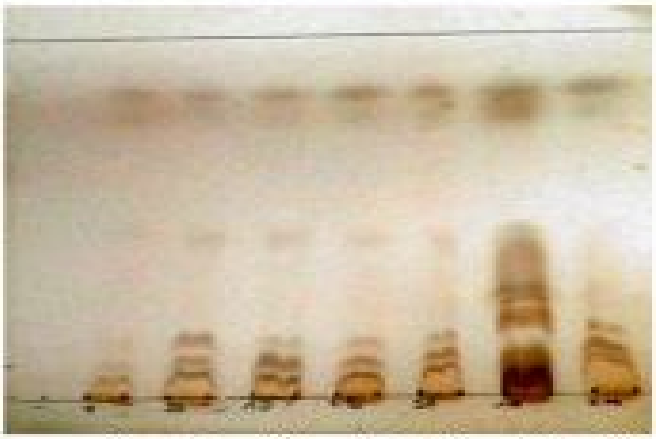


Figure 1: Photo of the plate obtained after migration of different neutral lipids

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

For the control there are four spots about four neutral lipids

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

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

Considering each lipid, we note that:

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

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

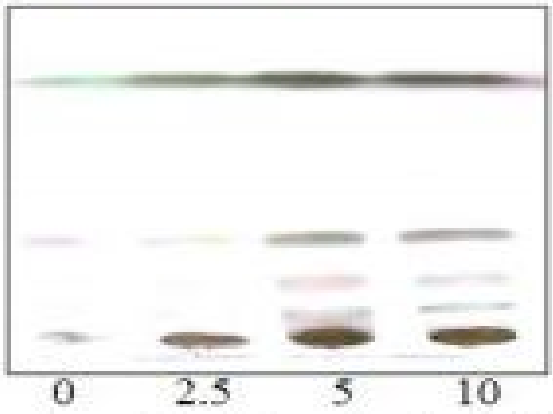


Figure 2:Photo of the plate obtained after migration of different neutral lipids.

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

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

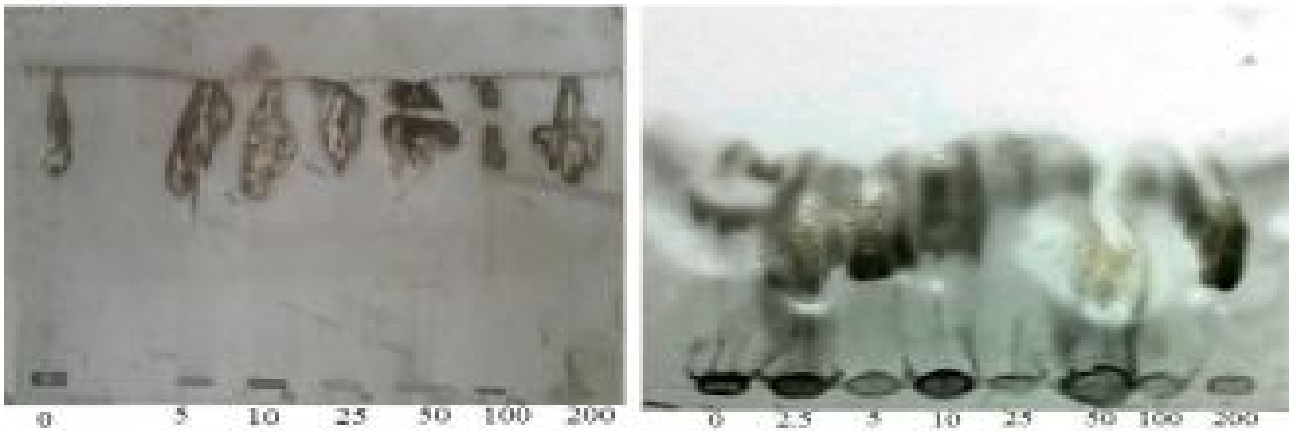


Figure 3: Photograph of the plates obtained after migration of different phospholipids with a mixture (a) chloroform / acetone / methanol / glacial acetic acid / water (50: 15: 10: 10: 5 v / v); (b) chloroform / methanol / glacial acetic acid / water (25: 15: 4: 2)

Daily administration of different doses of the extract of the bark of ethyl Khayasenegalensis in groups of rats treated with the extract relative to the control group during 14 days influenced phospholipids in cells. Figure 2 shows the plates obtained after migration with a mixture (a) chloroform / acetone / methanol / glacial acetic acid / water (50: 15: 10: 10: 5 v / v); (b) chloroform / methanol / glacial acetic acid / water (25: 15: 4: 2) to 1 cm from the edge of the plate; This allows to separate the various phospholipids. The first deposit corresponds to the negative control and the others are respectively doses 2.5 mg / kg, 5mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg 100mg / kg and 200mg / kg of ethyl extract of the bark of Khayasenegalensis. Indeed, different eluent used do not allow to see the separation of different groups of phospholipids; but it is noted that according to the eluent, phospholipids form a cluster of spots on the one hand, which migrates to the solvent front (a) and are on the other hand dragged (b). In addition, we note that these clusters are larger spots at doses 5mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg 100mg / kg and 200mg / kg compared to the negative control and the 2.5 mg / Kg dose which are smaller. Phospholipids are therefore low in quantity at the negative control and 2.5 mg / kg dose when they are in large quantity at doses 5 mg / kg, 10mg / kg, 25mg / kg and 50mg / kg 100mg / Kg and 200mg / Kg. The barks of Khayasenegalensis used are those collected by the team in 2011 and used by TAKIN et al. The yield of 16.68% obtained after extraction is low compared to that of TAKIN et al (22.62%). This could be explained by the conditions and shelf life of bark on the one hand; and the concentration of ethanol was used as the other. The administration of ethyl extract of Khayasenegalensis bark at various doses: 5-200mg / Kg Figure 1 shows the picture that there is an increase in neutral lipids in cells that have undergone the action of K. senegalensis that in negative control cells; and this increase is proportional to the dose administered K. senegalensis. So we can infer that K. senegalensis is stimulates the process of biosynthesis of neutral lipids or be neutral lipids are derived from the degradation of membrane phospholipids. The process of each neutral lipid biosynthesis highlights stimulating several voice signaling, the synthesis of several enzymes and thus the transcription of several genes. The idea that the molecule can K. senegalensis has itself initiated this whole process seems unlikely. But these processes could be triggered by the presence of lesions in the membrane to compensate for losses of phospholipids. In the process of biosynthesis of phospholipids, neutral lipids (mono, di and tri glycerides) serve as precursors [16,14]. Inversely in the case of phospholipid degradation it would release neutral lipids. Thus, the increase of neutral lipids by the action of Khayasenegalensis come from the degradation of membrane phospholipids. In addition, administration of the extract ethyl bark of Khayasenegalensis the dose 2.5mg / kg 20 shows the picture that there is no significant change in the profile of neutral lipids

by negative control report. So in the 2.5mg / kg dose there may be degradation of phospholipids. Figure 3 shows the action of ethyl extract of Khayasenegalensis bark at various doses: 2.5; 5-200mg / Kg on phospholipids. It is noted that there yardstick increased phospholipids in doses 5-200mg / kg compared to the negative control, while in the 2.5mg / kg dose there is no significant change compared to the negative control. Phospholipids are molecules specifically membrane, their strong presence in lysates under the action of K. senegalensis compared to the negative control could be explained by the fact that even before cell lysis by extraction solvents the K. senegalensis extract had induced the lysis of the plasma membrane; lysis and this is nothing other than the result of necrosis. This result allows us to understand that the degradation of membrane lipids cited above is actually the result of necrosis. Our results are consistent with the results of Adébayo et al (2003) showed in their study on some biochemical parameters of rat kidneys, the administration of the extract ethyl Khayasenegalensis (2 mg / kg body weight) for 18 days causing hypernatremia due to the diffusion of Na + from the pool in the environment and also a decrease in alkaline phosphatase (ALP), an enzyme "label" is often used to assess the integrity of the plasma membrane and endoplasmic reticulum. According to these authors attributed this reduction would be the loss of membrane components (including the alkaline phosphatase) or in extracellular fluids is to inhibition of the enzyme or its inactivation by the in situ sample; therefore there would be necrosis of tissue from the body is that the contact with foreign substances including the extract [17]. Similarly, our results are consistent with those of UN et al (2013) have shown in their research on the effect of aqueous extract of the bark of Khayasenegalensis on some biochemical and hematological parameters and histopathological rats that following administration of doses of 400, 800, 1200, 1600 and 2000 mg / kg of extract for 28 days, they also observed a significant increase in biochemical and hematological parameters Na +, K +, creatinine, ALT, AST, ALP and a significant reduction in the total protein concentration. These authors conclude that have hypernatremia and hypercalcemia are due to a failure or renal dysfunction, resulting in poor control of the balance of electrolytes by the kidneys. The significant increase of aminotransferases shows lysis of hepatocytes and that of the enzyme "marker" ALP confirms the disruption of the plasma membrane of the liver (necrosis). As regards the total protein, it is said that in case of very extensive damage in the liver, their concentration is reduced entirely. [14]In addition, our results allow us to confirm the renal or muscle cell damage particularly in the liver, heart., suspected by Takin et al (2013) after dosing kidney and liver enzymes ALT, AST, GGT and G6PDH on the one hand and histological studies of the liver and kidneys on the other hand. Indeed these authors have shown that following administration of the extract of Khayasenegalensis ethyl was a significant

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

CONCLUSIONS

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

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

REFERENCES

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

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

AJPTR is
- Peer-reviewed
- Monthly
- Rapid publication

Submit your manuscript at: editor@ajptr.com



RESEARCH ARTICLE

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

Background: Increasing the use of traditional therapy is an obvious reality in some country. The bark of *Khaya senegalensis* is suspected to treat diabetes. That is what this type of work is started.

Aims & Objectives: The aim of this work is to test the effect of total *Khaya senegalensis* barks extracts on the hepatic liberation of glucose in vitro.

Materials and Methods: The dried extracts obtained from barks powder had been prepared at concentrations of 0 ,2 ,5 ,10 and 20 µg/L and applied on fragments of male Wistar isolated liver kept in Mock –Swan solution. After incubation at 37°C in oven, glucose level in the solutions had been measured by spectrophotometer, using GOD–PAP® reagent. For each extracts concentration at the times T=0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes.

Results: Glucose level in the solution had varied in time function from one extracts concentration to another. *Khaya senegalensis* barks total extracts had reduced hepatic liberation of glucose. This effect had been comparable to the effect of insulin 25/10 solution used like reference substance in this experimentation. The total extracts of *Khaya senegalensis* barks could actuate an enzymes implicated in the metabolism of intrahepatocytary glucose.

Conclusion: This investigation had been coupled to phytochimic analyses that showed the presence of saponosides, anthracinic derivates and steroids in *Khaya senegalensis* barks.

Key Words: Insulin; Glucose; Liver Fragments; *Khaya Senegalensis*; Hepatic Liberation Of Glucose; Mice Wistar

Talkie M, Akoubou M, Zoubirou L, Aoussou E, Alivodji N, Agossou E, Sanni A

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

Correspondence to: Sanni A (alphonse.sanni@fast.uac.bj)

Received Date: 25.09.2013
Accepted Date: 29.09.2013

DOI: 10.5455/njppp.2014.4.290920133

INTRODUCTION

Metabolic diseases such as diabetes pose an enormous challenge today in global populations. Diabetes is a malfunction of the control system of blood glucose resulting from genetic and / or environmental. This condition is caused by either a deficiency in the association of insulin, or misuse of the said hormone in the body where the classification of diabetes into two specific groups: Less "insulin dependent diabetes" or diabetes or Type I met young patients and characterized by insulin deficiency, "the non-insulin dependent diabetes" or type II diabetes or fatty, mainly subjects 40 years especially, but also increasingly in the young and obese subjects, characterized by misuse of insulin by the body tissues.[1-3]

Forecasts announced for 2030 a figure of 366 million diabetics in the world.[4] This increase is expected to increase, aging, obesity, too unhealthy diets and lifestyles sedentary. Diabetes is a chronic disease with a mortality rate of 2%. Modern drugs used in hospitals are too expensive for an African population with more than half live below the poverty line and poverty is considered a risk of developing chronic diseases, the continent black not been spared.[5] Indeed, diabetes is a real health problem affecting all countries, whether developed or developing, for example France has more than 3 million patients in the United States had 12 million in 1998.[6] Benin has more than 200 000 patients with diabetes according to a WHO estimate, giving a prevalence that exceeds 2% of the population. Of these patients, 90% are being treated for diabetes mellitus type II and 10% for diabetes mellitus type I. (According to WHO).[7,8] Without proper treatment, diabetes can cause heart disease, blindness, impotence and even amputation above the foot. In Benin, diabetes is the second leading cause of hospitalization after HIV and AIDS accounts for a over 9.5% of consultations in internal medicine, all specialities. (According to the WHO estimate) Also, according to the World Health Organization (WHO), about 80% of the population living in the African region make use of traditional medicine for their health care needs.[9,10] Much of the Benin's population is consulted by healers, as they offer herbal extracts and cost effective.

Given the expansion of these diseases whose support is high, the WHO in its resolution AFR/RC50/R3 of 1 August 2000, encouraged African countries to develop regional strategies on traditional medicine to undertake research on medicinal plants and promote their optimum use in the delivery systems of health care.[11]

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

MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

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

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

- Sodium chloride (NaCl) concentration of 100 mM,
- Potassium chloride (KCl) concentration of 7 mM,
- Calcium dichloride (CaCl2) concentration of 1.2 mM,
- Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) concentration of 2.5 mM,
- Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) in 10 mM concentration,
- BSA (protein) concentration of 1%.



Figure-1: Candled *K senegalensis*



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



Figure-3: Solids *K senegalensis*

Table-1: Assay procedure of inhibitors by the DNS-PAR method

tube	white	Saion	Dosage
reagent	1mL	1ML	1mL
distilled water	10µl	-	-
saion	-	10µl	-
sample	-	-	10µl

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

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

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

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

RESULTS

Extraction Efficience: The mass of solids is obtained 2252 g, corresponding to a yield,
R= (22.52 g /100 g) X 100 = 22.52 %

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

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

Table- 2: Results of phytochemical analysis

Chemical Group	Subgroup	Observation
Polyphenolic Compounds	Tannins	+++
	Gallic deputy tannins	+++
	Anthocyanidins 2	++
	Leucoanthocyanidins	+++
Saponins	Sanicles (Oxidosqualene)	+++
Steroids	Steroids	+
Anthracenic Derivatives	O-glycosides with reduced aglucones	++

+++ : abundantly ++ : little + : low

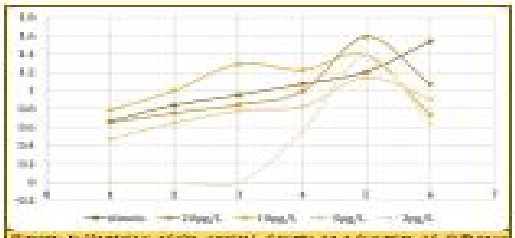


Figure-4: Variation of the optical density as a function of different concentrations of total extracts of *Khaya senegalensis*



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

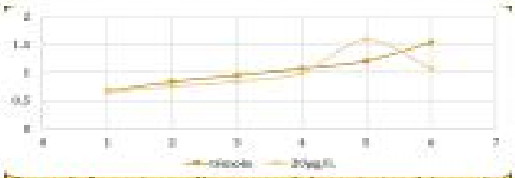


Figure-6: Comparison of the curves of the variation of the optical density of the White extracts concentration of 20 µg/ L

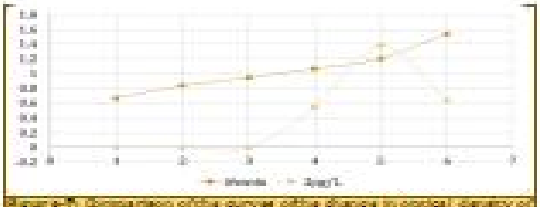


Figure 6: Comparison of the curves of the change in optical density of the control and the extract at the concentration of 2 µg/L.

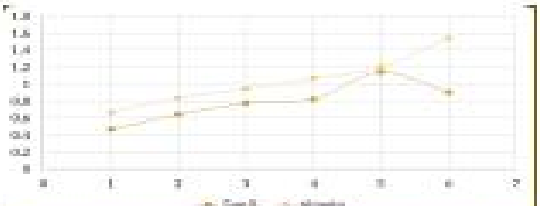


Figure 7: Comparison of the curves of variation of optical density of the control and that of the extract at the concentration 2 µg/L.

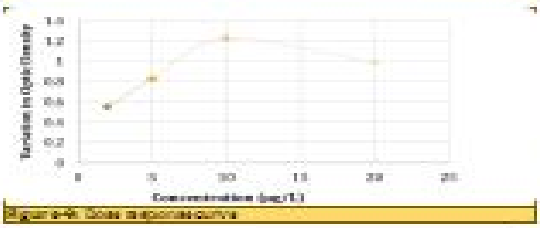


Figure 8: Dose response curve

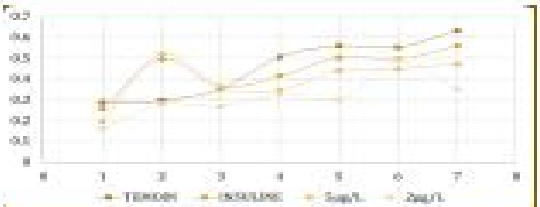


Figure 9: Changes in optical density due to the solution of 2.5 IU insulin and extracted 2 µg/L and 5 µg/L.

The values of the variation of the optical density recorded at time T = 0 ,10, 20, 30 ,40, 50 minutes and under the effect of the extracts concentration 10 µg/L were higher than the control. At time t = 60 minutes the change of the optical density of the current is below that of the control (Figure 5).

The figure 6 shows the comparison between the curves of variation of the optical density of the control and the optical density of the extract at 20 µg/L. The values of the variation in optical density recorded under the effect of the extracts at concentration 20 micrograms / L as a whole are lower than the control at times T= 0 ,T = 10, T =20, T=30, 4 T= 0, T =60 (minutes). Driven extracts the concentration of20 micrograms /L, a value of the change is it higher t han the control at time t =50 min optical density is observed.

The figure 7 shows the comparison between the curves of variation of the optical density of the control and the optical density of the extract at 2 µg/L. The values of the variation in optical density recorded under the effect of the extracts to 2 µg/L as a whole are lower than the control at times T = 0 ,T = 10, T = 20 ,T = 30, T 4 = 0, T = 60 (minutes). Driven extracts the concentration of 2 µg/L, a value of the change in higher than the control at time t = 50 min optical density is observed.

The figure 8 shows the comparison between the curves of variation of the optical density of the control and the extract at a concentration of 5 µg/L a variation value of higher than the control at the time T = 50 mn optical density. The values of the variation in optical density recorded under the effect of the extracts at concentration 5 µg/L is lower than the control at different times. The following figure shows the dose response effect of the extract.

The curve the figure 9 takes the form of a graph expressing the causal relationship between the concentration (dose) of a drug and the magnitude of the response produced. The aqueous extracts of *Khaya senegalensis* to concentrations 2 µg/L and 5 µg/L recorded the lowest values of the change in optical density. The change in optical density appears to increase gradually as we increase the concentration of the extract to a peak OD = 1.2 with the extract concentration to 10 µg/L. At concentrations greater than 10 µg/L extract appears to reduce the value of the optical density without reaching the values of the optical density recorded for the extract concentration to 2 µg/L and 5 µg/L.

Comparison with insulin (changes in optical density due to the solution of 2..5 IU insulin and extracted 2 µg/L and 5 µg/L): Changes in optical density obtained with insulin concentration 2.5 IU as those obtained with total extracts of *Khaya senegalensis* concentrations 2 micrograms / L and 5 g/L. T = 0 ,T = 10, T = 20, T =30, T

RESEARCH ARTICLE SEZAN Alphonse, *Int.J.A.PS.BMS , Jul-Sep.2013, Vol.2.(3) ,182-188* ISSN-2277-9280

PSYCHOPHYSIOLOGICAL IMPACTS ON STROKE HEALTHCARE WORKER OF HEALTH STRUCTURES IN BENIN

Coovi Chekete Lucien Euloge, Ahokpe Mélanie, Assou Eudoxie, *SEZAN Alphonse

Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale,
Université d'Abomey Calavi BENIN

ABSTRACT

This study of stroke, was to assess the psychophysiological impact of stroke on the staff. In fact, our main objective was to contribute to a better understanding of the corollaries of stroke on caregivers, because very few studies have focused on this aspect of the consequences of stroke. Thus, we conducted this study with the following methodology: a literature review and a field survey following a questionnaire and sampling targets, during the period from November 2012 to April 2013. The survey was conducted on a population of 237 people, including 71 doctors, 97 nurses and 69 orderlies, all services stationed in taking charge of the stroke victims to CNHU HKM (Centre National University Hospital, koutoukou Hubert Maga), Cotonou (Benin). After analyzing the results of the survey, the trend étatit to confirm the thesis of psychophysiological disease caregivers, by stroke cases. Is a tendency to feel fear and disappointment is noticed in all types of caregivers. These feelings lead to most cases to affect the physical health of carers and also to psychopathologies such as depression.

Keywords: psychophysiological effects, stroke, caregivers, psychopathology, Felt

INTRODUCTION

In Benin, there is a serious breach of the stroke population. This condition is rather that terrifies seen as a supernatural illness, bad luck or even the work of witchcraft. Therefore, a person who shows signs of stroke in Benin, is not always immediately taken to a health facility while it is a disease for which we must act quickly because every minute passing worse. The time taken before going to care that the Beninese caregivers often have in front of them of stroke cases where violations are well advanced. In fact , the damage is to measure the time taken before seeing the neurologist. As proof, in recent years, the CNHU Cotonou , studies have shown that stroke is 48.3 % of disease neurologiques[1] and stroke deaths accounted for 57.2 % of deaths from diseases neurologiques[2] . Moreover, it was shown that in 78% of cases, lead to a stroke fonctionnel[3] disability. However, the caregiver, be of emotion is often psychologically affected by the sometimes critical condition of the patient he sees coming , as well as complications , no less rare , which may occur during the evolution of a stroke . Moreover , given the gravity of the effects of a stroke , caregivers can not help but think of the suffering of the survivors and his entourage . Care is therefore beyond mere technical and require special attention from caregivers towards patients. During our investigations, we had the opportunity to surprise the teacher in charge of a service CNHU , arriving one morning at the hospital, entrust his sentence to one of his friends in the following terms : "I do not know how now we announce that I have lost patients between yesterday night and this morning! This is information that I dread every morning because it bores me and beat me . "

But often , we tend to forget the feelings of caregivers , as expressed by the teacher, and the implications that may arise . In this study, we aim to contribute to this issue by reflecting on the psychophysiological impact of stroke on the nursing staff CNHU Cotonou .

Materials and Methods

- Our work methodology covers the following points:
- We conduct a literature search:

~ jj ~

- From the literature , we have been equipped to focus our research questions in order to proceed with the development of our survey questionnaires .
- Prior to the actual survey , we conducted six in-depth interviews , with two doctors (one male and one female) , with two nurses (one male and one female) and two with caregivers (a man and a woman) . This allowed us to refine the development of the general problem of research as well as the issues addressed in the survey.
- We went then to the phase of the investigation itself , from November 2012 to April 2013 . It is made of 237 people , 71 doctors, 97 nurses (age) s and 69 caregivers (s)

Sampling rate:

The sampling technique used is the same for all three groups of caregivers. We posted within each service, a document stating the research theme and a blank schedule to allow interested persons to register. However, we have taken care to make a campaign for caregivers to increase the number of participants. Thus, the interviews were conducted within the hours of work of staff and took place in a room away from disturbances. Also , given the sensitivity of the subject , we found it easier for caregivers to engage anonymously. The duration of the interview between 10 and 25 minutes depending on each caregiver .

Inclusion criteria:

• Make from nursing staff CNHU Cotonou ;

• Belonging during the maintenance of the services involved in the management of stroke ;

• Consent to provide us with real information.

non-inclusion criteria :

• Any member of the nursing staff did not meet the inclusion criteria.

Finally, we conducted the recount of survey forms and got the following results:

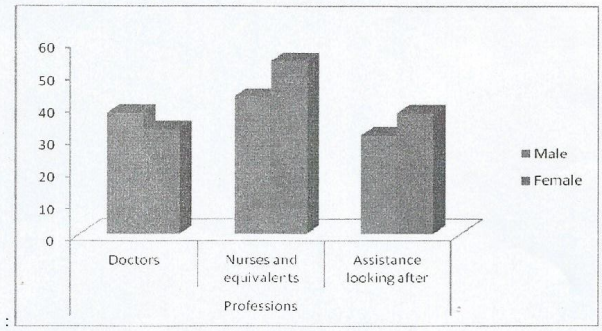


Figure 1: Distribution of the settlement of looking after surveyed according to the category and the sex

Results

The results we obtained are shown in the following tables

Table I : Various complaints raised near looking after

On the psychological level	On the physical level	On the behavioral level
- Fear - Anxiety - Sadness and cry - Anger - Jumps of mood - Guilt feeling - Feeling of uselessness - Disappointment - Stress - Distress - Irritability - Fate	- Headaches or migraines - Stiffness with the neck and the nape of the neck - General tiredness - Muscular pains - Lumbago - Reduction in the libido - Constipation - Insomnia - Agitation - Tremor - Excessive sudation - Increase or loss of weight - Frequent colds - Respiratory difficulties	- Difficulties of concentrating - Difficulties of accepting the responsibilities - Difficulties of respecting the commitments entered into - Absenteeism - Idleness - Insulation - Indifference towards the others - Inappétence - Trouble - consumption of the psychotropic ones - Frequent lapses of memory - Loss of interest to take care of oneself - Mistrust - Introverted life

Felt	71 Doctrors				97 Nurses				69 Assistance-looking after				Possible psy-chopatho-logies
	Numbers			%	Numbers			%	Numbers			%	
	Men	Women	total		Men	Women	total		Men	Women	total		
Disapoint-ment	32	35	67	94,37	43	44	87	89,69	27	31	58	84,06	Depression
Culpabili-ty	9	3	12	16,90	9	16	25	25,77	8	12	20	28,99	Depression
Fate	24	18	42	59,15	26	31	57	58,76	17	18	35	50,72	Depression
Anxiety	11	11	22	30,99	16	20	36	37,11	8	12	20	28,99	Depression/ Neurosis
Sadness	23	23	46	64,79	24	34	58	59,79	19	20	39	56,52	Depression
Distress	13	15	28	39,44	13	23	36	37,11	12	21	33	47,83	Depression
Anger	6	1	7	9,86	1	7	8	8,25	6	14	20	28,99	Depression/ Borderline
Failure	22	17	39	54,93	23	28	51	52,58	21	16	37	53,62	Depression
Fear	30	25	55	77,46	30	39	69	71,13	27	27	54	78,26	Neurosis
Discoura-gement	20	17	37	52,11	30	28	58	59,79	10	27	37	53,62	Depression
Introver-ted life	26	17	43	60,56	24	23	47	48,45	23	8	31	44,93	Depression

Table II : Psychopathologies due to the AVC noted on looking-after personnel

The analysis in Table II indicates that all staff (doctors , nurses and health care aides) to activate the turn of stroke victims is psychologically affected. However, the feelings of their products do not have the same impact. Considering the magnitude of the impact occurs, we generally recognize three groups experienced :

The group felt that appear on more than one in four . These are the feelings encountered a few times.

The group felt that we see the manifestation of one to three people at most four : it is felt often encountered.

The group felt that we see the manifestation of more than three out of four people : these are the feelings very often encountered.

In the category of doctors, felt sometimes encountered are : anger (9.85 %) and guilt (16.90 %) and those often encountered are: the feeling of inevitability (59.15%) , the anxiety (30.98%) , sadness (64.78 %) , anxiety (39.43 %) the feeling of failure (54.93 %) , discouragement (52.11 %) and life introverted (60.56 %). The feelings that affect more than three out of four people : disappointment (94.36 %) and fear (77.46 %).

In the category of nursing (CE) s and the like, there is only one felt in the group of those found only sometimes : anger (8, 24%). The renssentis that are often encountered are: guilt (25.77%) the sense of fatalism (58.71 %) , anxiety (37.11%) , sadness (59.79%) anxiety (37.11%) , the feeling of failure (52.57%) , fear (71.13 %) discouragement (59, 79 %) and introverted life (48.45%) . The only feeling that concerns more than three out of four people is disappointment (89.69 %).

In the category of aides, we find two groups of feelings. There are those often encountered : guilt (28.98%), the sense of fatalism (50.72%) , anxiety (28.98%) , sadness (56.52 %) , the anxiety (47.82 %) , anger (28.98%) , the feeling of failure (53.62 %) , discouragement (53.62 %) and introverted life (44.92 %). The feelings that affect more than three out of four people : disappointment (84.05 %) and fear (78.26) .

DISCUSSION

We will discuss the results obtained by two interests: the dominant feelings among caregivers psychologically affected by the stroke and the ensuing psychopathology .

The dominant feelings among caregivers

Our studies have shown that there are two feelings that dominate among caregivers in all categories : disappointment and fear. The disappointment is present in 94.36 % of physicians, 89 nurses 69% and 84.05 % for caregivers ; about fear, it is 77.46 % for doctors, 71 13% of nurses and 78.26 % among caregivers .

In the international literature we prepared, we have not noticed any specific studies on the impact of stroke on the staff. However , disappointment and fear are felt most present in our studies caregivers clashed with stroke are studied in other contexts , and that can inform our discussion .

In HATCHET encyclopedic dictionary , disappointment is defined as the feeling of a person deceived in his hopes . This corresponds to what might feel caregivers who put their art and all their zeal to save a life and who, despite their good intentions have their patient morbide[4] survive in a state of serious sequelae and with [3] , where it does not die [4]. In some other studies, the disappointment is related to emotional anticipées [5 , 6] subjective response . Other studies show that the product of the psychological consequences disappointment on those who experienced it , and that, depending on the individual , some people recover quickly while others tend to turn to frustration , blame (to others or to oneself) or become depressed see dépressifs[7 , 8] . If according to these studies , some of those who have experienced disappointments saw to depression or even depression , if caregivers faced with stroke is different. They have not experienced a situation of disappointment, but an endless situations disappointment. Thus, they did not manage to finish the first situation that others have already arrived . They are then under the pressure of disappointment , which could eventually paralyze their minds " and " make permanent depression .

As for fear, even encyclopedic dictionary defines it as HATCHET violent fear experienced in the presence of a real or imagined danger . But stroke is always a vitale[9] urgency where the victim , especially in the acute phase is in great danger. For encyclopedia Wikipedia, Fear is an emotion usually felt in the presence or in the context of a danger or threat . In other words , fear is the ability to recognize danger and to flee or fight , also known as the " fight or flight response ." And fear, taken in terms of the ability to recognize the danger and fight corresponds to the experience of caregivers faced with stroke . They are facing a matter of urgency vitale[9] associated with the importance of the timeliness of care to avoid death [4] to the victim on the one hand , and other parts, where the victim survives, to prevent sequelae and disabilities are too heavy and serious [3] to plunge in extreme morbidity.

Studies have shown that the amygdala is a key brain structure in the neurobiology of fear as in that of other negative emotions such as anger , for example. Researchers observed a hyperactivity of the amygdala in patients who showed a menacing face or face scary situations . Patients with more severe social phobia showed a correlation with a more attenuated response of amygdales[10] . Studies have also shown that subjects exposed to images of facial fear , or the face of people of different races , attenuated amygdala activity , whereas the lesion of the tonsils or calcification makes the person incapable of achieving this lesion recognize expressions of fear as she can discern other émotions[11] . As usual manner fear causes hyperactivity of the amygdala , the pressure of fear among caregivers face stroke maintain their tonsils permanently overactive with ensuing consequences . Other studies could focus on this specific aspect . Anyway , apart from neurobiological disturbances caused by fear among caregivers , there has many physiological disturbances . Studies have shown that adrenaline is the main hormone of fear and its secretion may occur in humans by tremors, increased heart rate,

~ nn ~

a écarquillement eyes and disruption respiratoire[12] pace. Some caregivers surveyed acknowledged having known to some cases of stroke , panic fears accompanied by profuse sweating , discharge of urine or even fecal bowl . Others also believe that the origin of their high blood pressure is related to their stressful because of the permanence of emergency professional life. Some others think that all felt they are under constant would become the cause of recurring complaints from several of them such as: headaches or migraines, stiff neck and neck , fatigue almost universal , decreased libido, insomnia, sweating , decreased or loss of weight, loss of appetite, to name a few.

Psychopathology associated with presence felt in

Among the feelings involved, we disappointment, guilt , fate , anxiety , sadness , anxiety, anger, feelings of failure , discouragement and introverted life that evoke psychopathology that is depression. Thus , symptoms of depression are present in 86.18 % of doctors, nurses et85 87.03 % , 94% of caregivers .

Moreover, the feelings of fear and anxiety psychopathology evoke what neurosis. Thus, the symptoms of neurosis are present in 19.35% of doctors, nurses and 19.74% 19.27% of caregivers .

On the other hand again, the anger felt as psychopathology evokes what the limit (borderline) condition . Thus, the symptoms of the condition limits are present in 0.02% of doctors, 1.50% and 5.21% of nursing aides .

Depression is the dominant psychopathology among caregivers faced stroke. All categories, more than 86 % of caregivers are of depression. This is not surprising if you know that over 89 % of them live in disappointment , it being understood that with successive and endless disappointments in the care of stroke cases , we find ourselves well in case where disappointment turns to depression [6] (Loomes , Graham, 1988, Ma, Lybi , 29 March 2004). In addition, a remarkable proportion of caregivers regularly consume psychotropic drugs.

We also find that all categories of health care providers, nurses are more depressed (87.03 %). They exceed the doctors (86.18 %) and caregivers (85.94 %). This is explained by the fact that nurses are more in contact with patients than other caregivers, and they suffer more than any injuries caused by the condition of the patients .

CONCLUSION

We find that the stroke produce psychophysiological impact on caregivers of health facilities. Psychologically, the major felt that one finds in them are disappointment and fear. In addition, all psychological disturbances which are subject caregivers of our health facilities involved in the care of stroke leads to develop psychopathologies such as depression, neurosis and limit state. But depression is the most dominant with 86.18% among doctors, 87.03% of nurses and 85.94% among caregivers. In addition, a remarkable proportion of caregivers surveyed, all categories regularly consume psychotropic drugs.

REFERENCES

1. Avodé D, Djrolo F, Attolou V, Avimandjè M, Houngbe F, Addra B, et al. Distribution of principals affections neurologics observed in CNHU of Cotonou in Benin. The Medical Benin 1997 ; N°6
2. Avodé D, Djrolo F, Houngbe F, Attolou V, Avimandjè M, Addra B, et al. Death by Neurologic Affection in CNHU of Cotonou in Benin. Black Africa Medecins 1998 ; 45 (3)
3. Kpadonou G, Houinato D, Alagnidé E, Adjein C, Avodé D. Disability at the hemiplegic vascular ones with the CNHU of Cotonou-Benin: measure and determining factors.The Medical Benin 2002 ; 20. pp. 36–40.
4. Pellerin C, Mauget Y, Bouju A, Rouanet F, Petitjean Mr. E, Dabadie P. Cerebral Vascular Accident. Emergency Medicine 2003; pp.107-117
5. Bell, David E. Putting a premium on regret. january 1985; vol. 31, , 117–20 p. (JSTOR 2631680)
6. Craib, Ian. The Importance of Disappointment. Routledge 22 september 1994; 216 p. (ISBNo-415-09383-X)

7. Loomes, Graham. Further Evidence of the Impact of Regret and Disappointment in Choice under Uncertainty. february 1988; vol. 55, 47–62 p. (JSTOR 2554246)
8. Ma, Lybi. Down But Not Out [archive]. Publié dans PsychologyToday. With the permission of medicinenet.com.29 march 2004;(Consulted on February 22, 2008).
9. Jean-Yves Nau. The cerebral vascular accident:a vital urgency.Rev Med Switzerland 2012;8:102ã-1027a
10. Monash University. Studying Brain Activity Could Aid Diagnosis Of Social Phobia (études des activitéscérébrales). Monash University. /archive/. 2006; *(Consulted the* january 21 2009)
11. Feinstein JS, Adolphs R, Damasio A, Tranel D. *The human amygdala and the induction and experience of fear.* Current Biology 2011; 21 : 34-8, vol. 21, p. 34-38
12. Robert Dantzer.Psychology of the fear.Communication 1993, Volume 57 Number 57, pp. 25-34

Annonamuricata reduced proliferation caused by *Cycasrevoluta*in Wistar rats

Natacha AIVODJI, Eudoxie K. ASSOU, Essé A. AGOSSOU, Alphonse SEZAN*

Laboratory of Biomembranes and signalling Cell
University of Abomey Calavi/Benin

***Corresponding author: Professor SEZAN Alphonse Adress: 06 B.P. 3041 CotonouBénin Phone 00 229 96 81 79 14 , Email: sezco@live.fr**

ABSTRACT

This work is to determine the phytochemic composition of the ethyl extracts of the sheets of *Annonamuricata*, in order to check of them the antineoplasm effects (anti-cancer) on cancer of the liver in Benin.For this fact, an ethyl extraction using powder ofdried sheets of *Annonamuricata* and ethanol 90° was carried out. The screening phytochimic of the sheets of the plant was carried out by the method of Hougton and Raman. And finally the antineoplasm activity (anti-cancer) was evaluated by dosage of the parameters ALAT, ASAT and proteins total on grundings livers of Wistars rats. The cancer of the liver was induced by exposure to the powder of *Cycasrevoluta* through a diet composed to 5% of this powder and a drink water containing an amount de10mg/kg powder of *Cycasrevoluta*.

The results of the screening revealed the presence of several chemical compounds with various properties. The identified chemical compounds are: reducing compounds, leuco-anthocyanes, tanins, flavonoïdes, coumarins, mucilages and triterpenes. The antineoplasm activity (anti-cancer) was effective by administration of an amount of 100 mg/kg of ethyl extracts of the sheets of *Annonamuricata*. This activity showed a variation of intensity according to the mode and the duration of administration of the extracts.
Key words:Annonamuricata, Cycasrevoluta, cancer of the liver, antineoplasm, Benin

INTRODUCTION

The data collected over several years reinforces the idea that cancer is a major concern in developing countries (DCs), as in the rest of the world in the coming years. (1) According to the World Health Organization (WHO), the incidence of cancer is increasing worldwide. In 2000, 5.3 million men and 4.7 million women around the world have developed cancer and 6.2 million people died. Cancer was, at that date, responsible for 12.5% of adult deaths worldwide, more than the proportion of deaths from HIV, tuberculosis and malaria combined. According to the World Cancer Report, published in 2003 by the IARC (International agency for research on cancer), cancer incidence could rise by 50% in the next twenty years, with 20 million new cases per year of 2020 and 10 million dead in the absence of a global mobilization. (1)

In fact, cancer is a group of diseases characterized by increased, uncontrolled and abnormal proliferation of cells in the body. (2) The disruption of the cell operation, which is the origin of cancer, is due to the intervention of exogenous factors. Thus, according to WHO, among the factors that can promote the occurrence of cancer are: low consumption of fruits and vegetables, alcohol and tobacco and also chronic viral infections. Note that there are several types of cancer, one of the most frequent in Africa is liver cancer. This cancer usually occurs as a result of liver disease. (3) According to the WHO 70 percent of all liver cancer deaths occurred in developing countries that focus mainly in Africa. (4)

Africa, has always made use of plants in almost all areas. Indeed, human life on earth is closely related to the operation of the plants. These have the capacity to produce wide range of natural substances. Besides the primary metabolites, they often accumulate so-called secondary metabolites that are an important source of molecules used by man in particular in the pharmacological field. The plants are recognized as a wonderful source of drugs. (5,6) It is thus that the drug management of chronic conditions say (such as liver cancer) is largely ensured by the use of medicinal and food plants. Hence the importance of herbal medicine for African people with very low income. (4.7) It is in this context that the extracts of AnnonaMuricata, commonly called soursop are used by traditional healers in the West African region, particularly in Benin in the treatment of liver cancer.

Indeed soursop, Annonamuricata is a small tree of the family Annonaceae, native to northern South America, it is cultivated in tropical regions (8); particularly in West Africa (Ivory Coast, Senegal, Benin, Togo) for its edible fruit, and its use as antimicrobial painkillers in joint diseases and cancer. In Benin it is commonly called "Chaps-Chaps".So our work is the study of AnnonaMuricata, which is a plant widely used in cancer pharmacopoeia in Benin. Its almost systematic use by herbalists in treatments of liver cancer, so have pushed us to understand the mechanisms of action both pharmacological phytochemical plan. Thus, we can confirm or refute the traditional uses of AnnonaMuricata in liver cancer treatment and contribute to development and local production of traditional medicines defined toxicity and effectiveness and low cost.I-3 Conventional treatment of liver cancer and insufficiencyTraditional treatment of liver cancer that are chemotherapy, radiation and surgery are not always effective. (9) Partial hepatectomy is reserved for tumors less than 5 cm in diameter in patients with cirrhosis ‟Child A″. Alcohol injection, intratumoral injection of acetic acid or destruction by the radio frequency in these small tumors produce equivalentsresults. Indeed, recurrence is common because of intrahepatic metastasis unknown or new cancer foci. Liver transplantation, only truly curative treatment is only useful for very small tumors (risk of recurrence in the other cases). Medical means are palliative. Chemoembolization can sometimes cause a partial or complete tumor necrosis, but its benefit in terms of

survival is not demonstrated. There is no general chemotherapy or hormone useful. Moreover, these treatments cause unbearable side effects and are virtually inaccessible to people for many reasons, and here are a few:

-The Technical facilities and health facilities are inadequate. Health workers often lack of competence, either in terms of diagnosis or patient care.

- The high cost of cancer.

-And Finally unavailability, lack of insurance financial access to medicines by social security is a serious handicap in Africa.Thus, in developing countries, more than half of the population living in rural areas and uses a lot of medicinal plants that offer their traditional healers for the treatment of liver cancer. Among these plants used in the traditional treatment of liver cancer was the Annonamuricata, which is the object of our study.

General information on Annonamuricata

a.)



b.)



c.)



Figure 5 : Photos of the leaves, flowers, fruit and the tree of Annonamuricata

(*Photo AÏVODJI Natasha. 2014*)

To mitigate the side effects of cancer treatment, scientists research in several plants such as Annonamuricata, used in traditional African pharmacopoeia, (10) including Benin. Soursop is exclusively native to the tropical forests: Caribbean, Central and South America. It is also common in other parts of the world with a tropical climate, such as sub-Saharan Africa, including Benin. Many industries mainly exploit its fruit but also other parts of the plants. In traditional medicine Benin decoctions of the leaves of Annonamuricata are commonly used as a sedative, diuretic, and to treat influenza and dysentery. Furthermore it used as anti hypertensive, anti-inflammatory, anticancer, and as insect repellent.

Systematic position of Annonamuricata

Kingdom:Plantae
Subkingdom:Tracheobionta
Class:Magnoliopsida
Subclass:Magnoliidae
Order: Magnoliales
Family: Annonaceae
Division:Magnoliophyta

Genus: Annona L.
Binomial name: Annonamuricata

Biology of Annonamuricata

Soursop (Annonamuricata) is a shrub or small tree from March to October m high. (8) leaves, bright green, are oblong-lanceolate, 10-17 x 2-7 cm, young ferruginous pubescence below. Flowers appear on large pedicels (15-20 mm long) opposite to the leaves. 6 petals are yellow, fleshy and thick. The three outer petals are broadly ovate, close to edges without overlapping. It blooms all year. It tolerates poor soils but does not support the low temperatures

The very large fruit is formed by the meeting of the carpel (a syncarpous). It is 15 to 20 cm long, even up to 30 cm long. Dark green, it is covered with a soft curved areolas outgrowth. The white pulp is edible and contains black seeds flattened. In Benin soursop typically found in the south, is a fruiting tree, domesticated, it is often grown in urban (Cotonou, Porto-Novo), in the courtyards of houses. However it is also found in the northern savannas.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The plant material of our study is made of the leaves of Annonamuricata and Cycasrevoluta.

Biological Materials

The biological material consists of liver Wistar rats.

Laboratory equipment

Extraction

- The plant material consists of the fresh leaves of Annonamuricata
- Distilled water,Tooth grinder, 90 ° ethanol, Device ROTA VAPOR, incubator Analytical Balance Sartorius

II-3-2- Phytochemical Screening Hydrochloric acid, Mayer Reagent, Ether chloroform, Anhydrous disodium sulphate, Distilled water, Chloroform, Reagent Stiasny, Acetate disodium, Ferric Chloride, Magnesium powder, Ammonia, Reagent Shinoda, Acid dinitobenzoique, Sodium hydroxide

- Alcoholic solution 1% dinitrobenzene
- Acetic acid
- Acetic sulfuric acid Anhydrous

II-3-3- searches anticancer effects of the extracts

ethyl leaves of Annonamuricata

➢ Reagents

Normal Saline, Acid-washed sand (beach sand washed in 35% sulfuric acid)

BIOLABO kits (ALT, AST, and total protein)Sterile distilled water

➢Equipments

Dissection kit, Probe, Eppendorf tubes, Mortar, Centrifuge, glass, Spectrophotometer, Micropipettes, Blades, Balance

METHODS

Extraction

Dryings leaves

Fresh leaves of Annonamuricata were harvested in May and in September 2013 as a family plot in the city of Cotonou (district Akpakpa). They were identified by botanists experts from the National Herbarium of the University of Abomey Calavi (Appendix 1) and dried in the shade on a bench of Biomembranes Laboratory, Cell Signaling and size at the Faculty of Sciences and Technology (FAST), University of Abomey Calavi (UAC) for four weeks for the leaves picked in May and in the oven at 55 ° C LBTMM (Laboratory of Microbiology and Molecular Typing) size also FAST UAC; for leaves picked in September. After drying Dried leaves are ground and made into powder using a brand RETSCH knife mill and stored in glass jars to prevent the installation of microorganisms pollutants.





Figure 6: Powder of dried leaves of Annonamuricata (Photo Natacha AIVODJI. 2014)

Preparation of total extracts from the leaves of Annonamuricata

Extraction themselves, was done in the laboratory of Pharmacognosy and essential oils to the size ISBA (Cotonou).

We took so 100g powder leaves picked in September after grinding have seen these leaves that we provided more powder; that was macerated in 1 liter of ethanol for 72 hours with stirring. After maceration evaporated ethanol at 40 ° C using the evaporator, rotary evaporator. The recovered extracts were placed in an oven at 45 ° C for drying. Then the dried extracts were scraped. The dried extracts were weighed and calculated efficiency.

The extract solution which has served for the following experiments was prepared with distilled water. The extract thus obtained in the form of a powder, was used for the various studies conducted.



b)



a)



c)



d)

Figure 7 : Extraction Process on leaves of Annonamuricata (a: Weight of the powder of the leaves; b: powder mixed in ethanol 90 ° with stirring; d: filtrate mixture leaf powder / ethanol 90 ° evaporation the ROTA VAPOR d: extracts from the leaves of Annonamuricata dried and crushed) (Photo Natacha AIVODJI 2014).

III-2 Screening Phytochemical

The Phytochemical Screening is based on the reactions (color and precipitation) differential of the main groups of chemical compounds in the plants according to the method of HOUGHTON PJ and A. RAMAN (1998) reviewed and adapted to the conditions of Pharmacognosy Laboratory and Essential Oils .

III-3 Research anticancer effects of ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata

We used 15 adult Wistar rats of both sexes, which we divided into 5 lots of 3 rats.

III-3-1-Checking liver cancer induction powder cycas

Cycasrevoluta is an ornamental plant of the family of cycads, which some studies have carcinogenic effects.

Thus in order to use the powder of the leaves to induce liver cancer necessary for our study, we verified the alleged carcinogenic effects. We therefore initially, worked with two groups of rats on 5 lots planned for our study. One office had witnesses and received only simple distilled along with a diet comprising granules water and tap water for 15 days; while the second batch it was receiving a supply of compound granules and 5% of powder of Cycasrevoluta and 10mg / kg of powder diluted cycads in drinking water.

At the end of 15 days the rats were sacrificed by chloroform anesthesia and dissected.

After dissection, the livers of the rats were collected, crushed; and this ground has been the measurement of parameters such as: ALT, AST and total protein.

➢ **Determination of parameters: ALT, AST, and total protein**

To assay the various parameters that are ALT, AST and total protein, liver tissue samples and weighing 0.5 g, previously rinsed in saline; were crushed in a mortar with 5 ml of a normal saline solution and the washing acid sand for 10 minutes at room temperature. Then crushed livers were centrifuged for 5 minutes at 6000 rpm. The recovered supernatant served in the spectrophotometric assay of the activity of ALT, AST and total protein.

Pharmacological Activities of ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata

After verification of the carcinogenic activity of the powder leaves of Cycasrevoluta, we took the last 3 groups of rats, which are numbered from 1 to 3. It was therefore respectively Lot 1 witnesses rats not taking as distilled water for the entire duration of the experiment, then the batch 2 which rats were fed with diet containing pellets and 5% of powder of Cycasrevoluta and 10mg / kg diluted in cycads powder drinking water, accompanied by a gavage of 100mg / kg weight ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata and this during the five weeks of experimentation, and finally the lot 3, the rats had during the first 2 weeks testing the compounds diet pellets and 5% of powder of Cycasrevoluta and 10mg / kg diluted cycads powder in the drinking water. Then in the last 3 weeks they were force-fed with a solution of 100mg / kg weight ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata dissolved in distilled water together with a diet without powder Cycasrevoluta . Note that the rats received daily at 1 ml of the extract solution; administered using an esophageal probe.

After 5 weeks of experiment, the rats were sacrificed and then dissected. After dissection, the livers of the rats were collected, crushed; and this ground has been the measurement of parameters such as: ALT, AST and total protein.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Extraction efficience

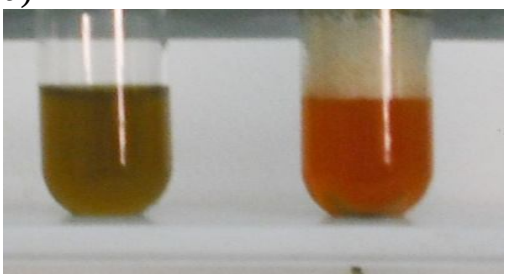
Soit R le rendement de l'extrait,

$$R = \left(\frac{Masseof\ extract}{Mass\ of\ powder\ of\ seeds}\right) \times 100$$

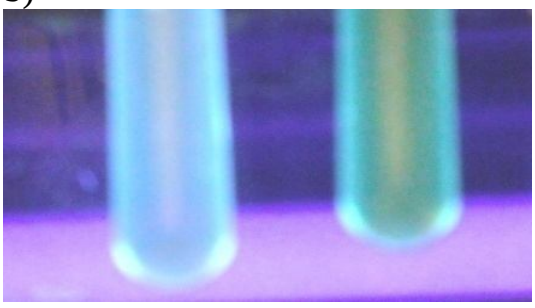
$$R = \left(\frac{5,1}{50}\right) \times 100$$

$$R = 10,2\%$$

a)



b)



c)

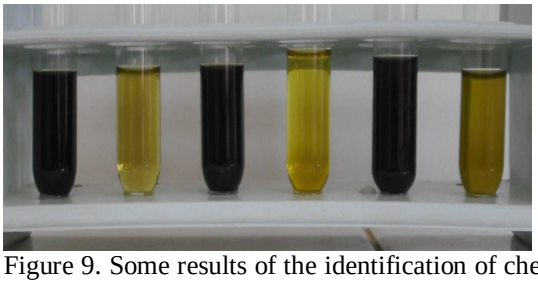


Figure 9. Some results of the identification of chemical compounds (a: test flavonoids; b: test coumarins; c: test tannins; TT: Tube witness TP: Test positif

- Absent

+Slightly Abundant

++ Abundant

We have abundant reducing compounds.

We also tannins, catechin tannins, gallic tannins, leuco anthocyanin whose chemical group of polyphenolic compounds that are moderately abundant in the extract of Annonamuricata.

We also find in our extracts compounds such as mucilage, flavonoids, triterpenoids and also the coumarins in our extracts.

Table IV: Results of phytochemical screening

Checking the carcinogenic effect of the powder Cycas

The administration of powder Cycasrevoluta for 2 weeks, or 15 days significantly influenced the change in parameters ALT, AST, and total protein.

Indeed, it is observed compared to control rats that received during the experiment as distilled together with a single diet water comprising pellets and tap water; ASAT growth rate and total protein; and a decrease in the rate of ALT in rats given a diet with 5% powdered Cycasrevoluta in food (pellets) rats and 10mg powder Cycasrevoluta per kg body weight of rats in water beverage

Phytochemical Compounds	**Presence**
Mucilages	+
Compoundsreducers	++
Derivatives cyanogenic	-
Tannins	+
Cate classy tannins	+
Gallic tannins	+
Flavonoids	+ (flavones)
Anthocyannes	-
Leuco-anthocyanin	+
Alkaloids	-
Quinone derivatives	-
Sanosides	-
Triterpenoids	+
Steroids	-
Cardenolides	-
Coumarin	+
Free Anthracene	-
O-heterosides	-
C-heterosides	-

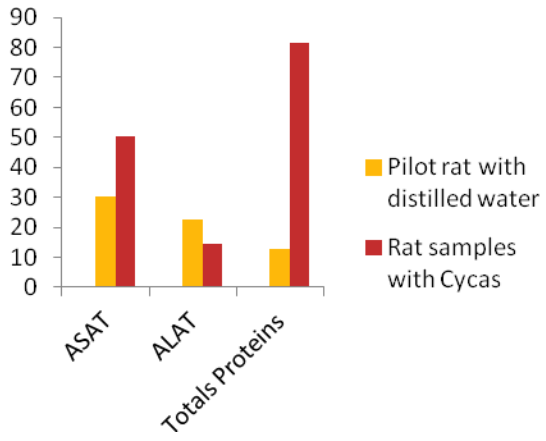


Figure 10. Histogram showing the variation parameters of ALT, AST, and total protein in a diet containing or not containing the powder Cycasrevolute

Checking the antiproliferative activity of the extractsethyl leaves of Annonamuricata.

The results of the comparison of parameters ALT levels, AST and total protein by the type of treatment received by the rats show a fairly significant influence in the administration of ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata.Indeed, it is observed that the administration of powder Cycasrevoluta rats batch ps (ps: stimulated proliferation) after the first experimental phase evokes abnormal hepatocyte proliferation of these rats through a growth rate ASAT and total protein, with a decrease in ALT levels in these rats.

Then it is observed compared to the batch ps, rats that received Lot 2 as a treatment for 5 weeks experimental diet containing the powder cycads at doses described above and a daily gavage using our extracts at a dose of 100mg / kg body weight of rats; we experienced a decline in their rate of AST and total protein and an increase in ALT levels.Finally, we observe that compared to batch ps, the rats of Lot 3 as receiving treatment during the

first 2 weeks of experimental diet containing the powder cycads at doses described above then daily gavage using our extracts at a dose of 100mg / kg body weight of rats during the last 3 weeks together with a diet without powder Cycasrevoluta; we experienced a decline in their rate of AST and total protein and increased ALT levels more significantly than observed in rats of lot 2.

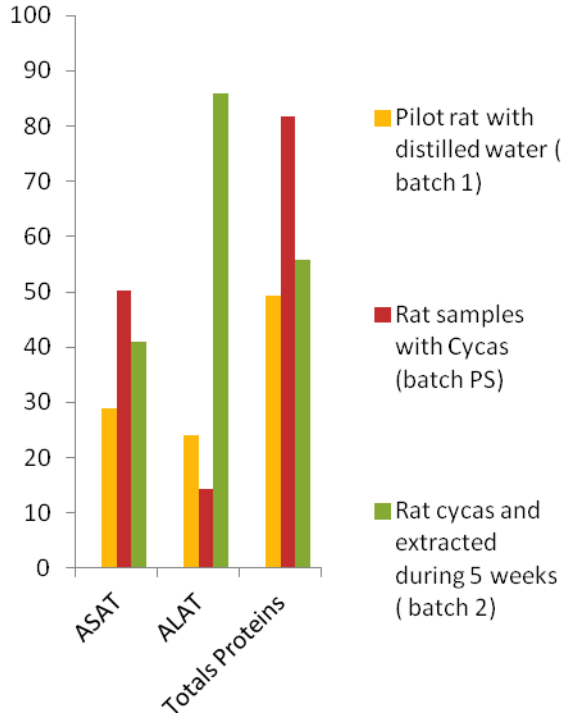


Figure 11. *Histogram showing the variations parameters of ALT, AST, and total protein in a diet containing or not containing the powder Cycasrevoluta and administration of ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata*

Cancer is a group of diseases characterized by increased and uncontrolled and abnormal proliferation of cells in the body. (2)

This is one of the main causes of death. Also the number of people with continued growth in cancer. (11) In fact every year 2 or 3% of all deaths worldwide result from the different types of cancers. (12)

The high cost of conventional treatment methods available including surgery, chemotherapy, and radiation therapy (9); and the lack of effective drugs to treat tumors encourage populations in different countries, especially in sub-Saharan Africa, where one of the most common cancers are liver cancer; to rely more on traditional medicine, which is based on the use of medicinal plants. (13)

These plants have an almost unlimited ability to produce substances of interest to the researchers involved in the fight against cancer through the development of new anti-cancer treatments. In an extensive study, the anti-cancer properties of 187 plant species were evaluated (14) including Annonamuricata.

Annonamuricata (Annonaceae) commonly known as "Chap-chap" is widely used in traditional medicine in Benin to treat liver cancer. Studies in Nigeria NgoziOkolie by P. et al. have shown an anti-cancer effect of ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata in colorectal cancer induced by Cycascircinalis is a plant of the same family as Cycasrevoluta.

Indeed, this study conducted in Nigeria has shown that a dose of 100 mg / kg body weight of rats of ethyl

extracts from the leaves of Annonamuricata, for 3 weeks, preceded by a cancer induction consumption compound feed 5% of the powder Cycascircinalis; induce a decrease of cell proliferation. It would attribute this anti-proliferative activity in the acetogenins which are compounds in Annonamuricata. The acetogenins destroy cancer cells by the complex lock-CoQoxidoreductaseNadh (complex 1), which provides them ATP. The acetogenins also will possess effective anti oxidant properties. (11)

From these data, we set out to assess the antiproliferative activity of ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata.So we conducted an ethyl extraction using the powder of the leaves of Annonamuricata and ethanol 90 °. We after this extraction obtained a 10.2% yield, we deem means compared to the yield obtained by EkaPrasati et al. (2012), which is 14.86%. This difference is explained by the difference in degree of Ethanol which is 70 ° to them.

We then made a phytochemical screening with the method of Houghton and Raman (1998), which allowed us to detect the following compounds: gearboxes, tannin compounds, catechin tannins, gallic tannins, leuco anthocyanin whose group chemical polyphenolic compounds, mucilage, flavonoids, and triterpenoids. These results are partially in compliance with those of Vijayameena C. et al. (2013) have identified two other groups of compounds that are more alkaloids and saponins and using the method described by Harborne et al. (1973). (15) This difference is explained by the difference method and also the origin of the plant used to make the extract.

Cycasrevoluta contains cycasin (methyl azoxymethanolaglycone), which is known to induce liver cancer and many others 28. After ingestion of a meal containing powder Cycas, intestinal bacteria hydrolyze the glucoside link cycasin to release the aglycone methyl azoxymethanol. (11)

Since researchers have realized effective carcinogenic methyl azoxymethanol, these agents have been used to create reliable cancer animal models (to induce cancers). (16) With this in mind, we have also used the powder of the leaves of Cycasrevoluta, a plant of the same family as Cycascircinalis found in Benin, to induce cancer in our study.

So we have to do this, first check in the carcinogenicity of powdered leaves of Cycasrevoluta. So we took 6 Wistar rats divided into 2 groups of 3 rats each. One office had witnesses and received only simple distilled along with a diet comprising granules water and tap water for 15 days; while the second batch it was receiving a supply of compound granules and 5% of powder of Cycasrevoluta and 10mg / kg of powder diluted cycads in drinking water.

At the end of 15 days the rats were sacrificed by chloroform anesthesia and dissected. After dissection, the livers of the rats were collected, crushed; and this ground has been the measurement of parameters such as: ALT, AST and total protein. It must be stressed that the parameters that are to be assayed ALT and AST were chosen because as cytosolic enzymes hepatocytes, the variation in the rate in the outcome of a liver homogenate piece may reflect an increase in the number of cells, thus cell proliferation. Regarding total proteins, which are the result of the transcription of certain genes, their sudden increase may reflect an abundant and abnormal transcription and carcinogenesis could be characterized by the body concerned (the liver).

We obtained the result of this experiment, as compared to control rats that received during the experiment as distilled water accompanied by a single diet comprising pellets and tap water; ASAT growth rate and total

protein; and a decrease in the rate of ALT in rats given a diet with 5% powdered Cycasrevoluta in food (pellets) rats and 10mg powder Cycasrevoluta per kg body weight of rats in water beverage. This is consistent with the results of NgoziOkolie P. et al. (2013).

This increase in the rate parameters AST and total protein in rats that consumed the powder of Cycasrevoluta be explained by a greater production of succinate end of the Krebs cycle that is the logical continuation of glycolysis and is in addition known as intermediate between mitochondrial dysfunction seen in cancer cells and oncogenesis via the HIF-α factor. It augur abnormal liver hepatocyte proliferation of these rats; This allows us to test the hypothesis of the carcinogenicity of the powder leaves of Cycasrevoluta.

After this verification we searched the antiproliferative activity of ethyl leaf extracts Annonamuricata. For this we took the three groups of rats, which were numbered from 1 to 3. So we had lot 1 respectively witnesses rats took only distilled water along with a diet without powder Cycasrevoluta, throughout the duration of the experiment, then the batch 2 which rats were fed a diet consisting of granules and 5% of powder of Cycasrevoluta and 10mg / kg diluted cycads powder in water beverage together with a gavage of 100mg / kg of weight of ethyl extract of the leaves of Annonamuricata and during the 5 week experiment, and finally the batch 3, the rats were during the first 2 weeks of the experiment the compounds of pellet diet and 5% of powder of Cycasrevoluta and 10mg / kg of powder diluted cycads in drinking water. Then in the last 3 weeks they were force-fed with a solution of 100mg / kg weight ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata dissolved in distilled water together with a diet without powder Cycasrevoluta .

The results showed that the administration of powder Cycasrevoluta rats batch ps (ps: stimulated proliferation) after the first experimental phase evokes abnormal hepatocyte proliferation of these rats through a growth rate ASAT and total protein, with a decrease in ALT levels in these rats.

Then it was observed that compared to batch ps, rats that received Lot 2 as a treatment for 5 weeks experimental diet containing the powder cycads at doses described above and a daily gavage using our extracts in a dose of 100mg / kg body weight of rats; experienced a decrease in their rate of AST and total protein and an increase in ALT levels.

Finally, it has been found that compared to the batch ps, the rats of Lot 3 as receiving treatment during the first 2 weeks of experimental diet containing the powder cycads at doses described above then daily gavage using our extracts at a dose of 100mg / kg body weight of rats during the last 3 weeks together with a diet without powder Cycasrevoluta; experienced a decrease in their rate of AST and total protein and increased ALT levels much more significant than observed in rats of lot 2.

This decrease in AST levels and total protein, accompanied by the growth of ALT levels in rats treated simultaneously Lot 2 to the powder Cycas and our extracts, and lot 3 treated powder Cycas and our extracts allowed us to say that the administration of ethyl extracts from the leaves of Annonamuricata reduced the abnormal proliferation of hepatocytes induced by powdered leaves of Cycasrevoluta with our rats, and is in agreement with the results of OkolieN'Gozi P . et al. (2013). Hence the hypothesis of an antiproliferative activity of the extracts from the leaves of Annonamuricata is confirmed.

Finally, unlike the effects of leaf extracts of Annonamuricata as they were administered simultaneously with or after powder CycasCycas powder could be explained by the fact that the acetogenins would anticancer active compounds of our extracts mode of action to eliminate cancer cells already induced. (24)

And the extracts are more effective when administered after the induction of proliferation by the powder of

Cycas.

This low efficiency in the case of the simultaneous administration of our extracts with the powder of Cycas could also be explained by the fact that the active compounds in these plants might have the same receptors on cells, but would trigger channels contrary signs. Thus simultaneity in the administration of the two plants could induce competition, where would this low conspicuity of the effect of our extracts in this case.

1- Laurine Lavergne (2008). L'accès aux médicaments anticancéreux dans les pays en développement d'Afrique subsaharienne : l'exemple de Madagascar, RESEAU MEDICAMENTS & DEVELOPPEMENT (ReMeD) N°38

2- Karp G. (1999). *Cell and Molecular Biology* (second edition), Wiley, USA

3- Wang Y, Xu K, Lin L, Pan Y, Zheng X. (2007). Geranyl flavonoids from the leaves of Artocarpusaltilis. Phytochem. 68: 1300-1306.

4- Abiodun, Falodun, BjamesOsakue, DuzoekweAnayo Stephen et Ciu Sheng-Xiang (2011). Phytochemical And Anticancer Studies On Ten Medicinal Plants Used In Nigeria, Bayero Journal Of Pure And Applied Sciences, 4(1): 36 – 39

5- Bénédicte Akakpo (2012). Action d'extraits éthyliques de Khaya senegalensis sur quelques paramètres biochimiques chez le lapin. Incidence sur l'histologie du foie et des reins des lapins, p1

6- ZOHOUN Loïca, (2011). Contribution à l'étude hypoglycémiante des extraits de Khaya senegalensis (étude in vitro sur le foie du rat blanc de laboratoire) p. 2

7- Geoffrey, C., Kirby, M. (1996). Medicinal plants and the Control of Protozoa disease with reference to Malaria. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,London, vol 3. Pp 605-609.

8- Jacques Fournet (2002). *Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique*, Gondwana editions, Cirad, (ISBN 2-87614-489-1 (Cirad, Tome 1). - 2-87614-492-1 (Cirad, Tome 2).)

9- Tannock, F. (1998). Conventional cancer therapy: promise broken or promise delayed?.*Lancet*, 352, 9-16.

10- Anil Kumar. *(*2012). A Review On Hepatoprotective Herbal Drugs, International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry, Ijrpc, 2(1)

11- WamidhHadiTalib. (2011). Anticancer and Antimicrobial Potential of Plant-Derived Natural Products, Phytochemicals – Bioactivities and Impact on Health

12- Madhuri, S., & Pandey, G. (2009). some anticancer medicinal plants of foreign origin. *Current Science*, 96 (6), 779-782.

13- Wood-Sheldon, J., Balick, M. & Laird, S. (1997). *Medicinal Plants: Can Utilization andConservation Coexist*?. The New York Botanical Garden. USA.

14- Kintzios, E. (2006). Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critical Reviews in Plant Science*, 25, 79–113. *International Journal of Applied Science and Technology Vol. 2 No. 1; January 2012* 157

15- C. Vijayameena, G. Subhashini, M. Loganayagi and B. Ramesh. (2013). Phytochemical screening and assessment of antibacterial activity for the bioactive compounds in *Annonamuricata. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*2(1): 1-8

16- Laqueur G.L. (1965). The induction of intestinal neoplasmin rats with cycasin and its aglycone. Virchows Arch Ab A PatholAnat; 340: 151-153

International Research Journal of Biological Sciences ISSN 2278-3202
Vol. 2(7), 1-6, July (2013) Int. Res. J. Biological Sci.

Normal values of thyroid ultrasound volume of School children in non-iodine deficiency area Abomey Calavi in Benin

Gbaguidi Bertin, Abokpe Mélanie, Attakpa Eugène, Ategbo J. Marc, ASSOU Eudoxie, Alvodji Natacha[1], Amoussou-Guenou Marcelin and Sezan Alphonse[2]

laboratoire de Biomembranes et de Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey- Calavi, Cotonou, REPUBLIQUE DU BENIN

Available online at: www.isca.in

Received 16th May 2013, revised 5th June 2013, accepted 4th July 2013

Abstract

Introduction: According to WHO, the school-age children are more vulnerable to disorders caused by iodine deficiency (IDD). The prevalence of goiter in this age is an indicator of the severity of these disorders in a population. Assessing the prevalence in a moderately iodine-deficient area is more reliable by measurement of thyroid ultrasound volume (TUV) than palpation method. This study aims to define the upper limits of normal TUV which can be referenced in school children aged 06 to 12 years of Abomey-Calavi. A coastal city apparently without iodine deficiency and the most populous of Atlantic Department in southern Benin. Population and Methods: Inclusion criteria were formulated. Children were selected at random in a cluster of 09 schools. For each of them, urinary iodine was measured, anthropometric parameters (age, sex, height, weight) were recorded and ultrasound explorations were performed to calculate TUV. The normal upper limits are the 97th percentiles of TUV calculated firstly according to age and sex and the other based on sex and body surface area (BSA). Results: Study population includes 134 schoolchildren, 68 girls (50.70%) and 66 males (49.3%). The urinary iodine was between 100 µg / l and 300µg / l in 93.3% of children and 300 and 400 µg / l for others. In girls, 97th percentiles of TUV were respectively by age categories (06 to 12) years: 1.99 ml; 2.71 ml; 2.06 ml; 2.54 ml; 4.70 ml; 3.81 ml; 5.22 ml. For boys, respectively: 1.82 ml; 2.11 ml; 2.19 ml; 2.80 ml; 3.06 ml; 4.6 ml; 3.9 ml. TUV were normal in 91.04% of children. According to BSA, 97th percentiles of TUV for girls were: 2.04 ml; 3.86 ml; 2.05 ml; 3.63 ml, 4.7 ml, 5.25 ml, 3.88 ml, 4.38 ml, in boys nc; nc; 1.19 ml; 2.89 ml; 3.52 ml; 3.93 ml; 4.22 ml; 4.83 ml; nc (nc = not considered). The TUV were normal in 88.06% of schoolchildren. Conclusion: Upper limits of normal TUV values obtained wee fairly consistent and could serve as references for the interpretation of survey and monitoring data obtained by ultrasound in school children.

Keywords: Normal values, thyroid ultrasound volume, iodine deficiency, schoolchildren, abomey-Calavi

Introduction

According to WHO, the schoolchildren are more vulnerable to iodine deficiency disorders (IDD). Thus, the prevalence of goiter in this age is a fairly reliable indicator of the severity of these disorders in a population[1]. Assessing the prevalence in a moderately iodine-deficient area is more reliable by measurement of thyroid ultrasound volume (TUV) than palpation method[2,3]. In such areas, palpation method has a very low sensitivity and specificity[4]. Palpation increases the risk of overestimating goiter prevalence and interobserver variability is high[5].

However, the application of the ultrasound method requires some precautions. Indeed, in the context of epidemiological investigation, detecting and monitoring IDD requires referential TUV data unfortunately vary from one country to another[6,7,8]. Each country must therefore, establish its own referential standards of TUV to better assess IDD in the population. Our study aim to determine the upper limits of normal TUV basis on sex, age and body surface area among schoolchildren in Abomey-Calavi, a coastal city apparently without iodine deficiency and the most populous of Atlantic Department in southern Benin.

Material and Methods

Our study population includes children of both sexes aged 06 to 12 years selected at random in a cluster of 09 primary schools in Abomey-Calavi. For each of them, urinary iodine was measured, anthropometric parameters (age, sex, height, weight) were recorded and ultrasound explorations were performed to calculate TUV.

Determination of urinary iodine: Urine samples were taken in the morning at 08 o'clock. The iodine concentration was measured at the Research Unit Ecotoxicology and Quality Study (UREQ) at Polytechnic School of Abomey-calavi through Sandell-Kolthoff method [10]. This assay was used to verify the iodine status of our population in order to certify its non-iodine deficiency.

Anthropometric data: Age and Sex: Age was determined by year from the birth certificate or school record. Sex was recorded on the survey sheet for each child.

Weight: schoolchildren were weighed using a mechanical scale brand CAMRY ao 9001:2008 with limit of detection ranging between 0 and 120kg. Before any measurement, each child had discarded his shoes and any compromising object and dressed in an eligible weight jacket.

Size: The size (ft cm) was taken in a static position in the same terms as weight, using a tape stuck against a vertical board.

Body surface area (BSA) in m^2: DUBOIS formula was used to estimation BSA.

$$BSA = W^{0,425} \times S^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$$

W=Weight; S=Size

Ultrasound data: The thyroid ultrasound was performed in real time in schools. A portable ultrasound SIEMENS with a 7.5 MHz linear probe was used. All measurements were performed by one and only one investigator, specialist in thyroid ultrasound. To measure thyroid volume, longitudinal and transversal sections had been made to determine the thickness (t) in centimeters, the breadth (b) and length (L) of each thyroid lobe. Thyroid lobe volume (VL) in cm^3 was calculated from the formula: $VL = t \times b \times L \times (0.479)^{-1}$.

Isthmus volume had been neglected. TUV was therefore the total obtained by adding the volume of two lobes. TUV were calculated firstly according to age and sex, on the other based on sex and BSA. The normal upper limits used are 97th percentiles of TUV as recommended by WHO and ICCIDD (1997) adapted by ZIMMERMANN and als (2001)[5,6].

Statistical Analysis: EpiInfo 3.53 French and Microsoft Excel 2007 [16,17] were used for Data Processing. Statistics related to the mean, median, standard deviation, the minimale, maximum and 97th percentile were used to analyze the dimensions.

Results and Discussion

134 schoolchildren aged 06 to 12 years, 68 girls (50.70%) and 66 males (49.3%) were included in this study. The sex ratio was 1.03. The youngest was a girl while the oldest was a boy. Table 1 shows the frequency distribution of urinary iodine concentrations. Almost all schoolchildren (93.30%) had a urinary iodine levels between 100 and 200µg/l, while the other (6.70%) have a rate between 300 and 400 µg/l, indicating an excess of iodine.

Table-1
Distribution of schoolchildren according to the urinary iodine levels

Urinary iodine (µg/l)	Number	Frequency
100-200	62	46,30
200-300	63	47,00
300-400	9	6,70
Total	134	100

Tables 2 and 3 present respectively, comparisons of normal upper limits of TUV in terms of age, sex with international standards. Abomey is not a known endemic goiter area. The median urinary iodine 210µg/l confirms that the area is not iodine deficiency. However, the prevalence of goiter detected, is respectively 89.6% and 11.94%, by age and sex, sex and body surface area. In the group of girls, the 97th percentile of TUV by age varies from 1.99 to 5.22 ml (table 2); in males from 1.82 to 4.01ml (table 3). Based on body surface, TUV varies in girls group from 2.04 to 4.38 ml (table 4); in boys due to low staffing problem, we considered BSA between 0.8 and 1.3 m^2. Therefore in this part of BSA, the 97th percentile of TUV varies from 1.19 to 4.83 ml (table 5).

Table-2
Comparison of upper limits of normal (T function age) girls with international standards

Age	P[th] ZIMMERMANN [5]	P[th] ThyroMobil west Africa [10]	P[th] current study	P[th] ZIMMERMANN [5]	P[th] ThyroMobil west Africa [10]	P[th] current study
6 ans	1,57	1,9	1,44	3,84	3,4	1,99
7 ans	1,81	2,2	2,09	3,26	3,5	2,71
8 ans	2,08	2,2	1,82	3,76	3,6	2,06
9 ans	2,40	2,3	1,56	4,32	3,6	2,54
10 ans	2,76	2,4	2,94	4,98	3,7	4,70
11 ans	3,17	3,2	3,24	5,73	4,5	3,81
12 ans	3,65	3,3	3,49	6,59	7,6	5,22

Table-3
Comparison of normal upper limits of MET (age based) boys with international standards

Age	P97 ZIMMERMANN (WHO) [22]	P97 ThyroMobil West Africa [23]	P97 current study	P97 ZIMMERMANN (WHO) [22]	P97 ThyroMobil West Africa [23]	P97 current study.
6ans	1,60	2,0	1,21	2,91	3,1	1,82
7ans	1,80	2,1	2,03	3,09	3,1	2,11
8ans	2,03	2,4	1,08	3,71	3,4	2,19
9ans	2,30	2,5	1,81	4,19	3,5	2,80
10ans	2,59	2,6	2,27	4,73	4,3	3,09
11ans	2,92	3,1	2,78	5,34	4,7	4,89
12ans	3,30	3,8	2,67	6,03	6,6	4,01

Table-4
Comparison of upper limits of normal (TLTV function BSA) girls with international standards

BSA	P97 ZIMMERMANN (WHO) [22]	P97 current study	P97 ZIMMERMANN (WHO) [22]	P97 current study
0,7m²	1,46	1,81	2,56	2,04
0,8m²	1,67	2,16	2,91	2,86
0,9m²	1,9	1,76	3,32	2,05
1,0m²	2,17	2,06	3,79	3,63
1,1m²	2,47	3,19	4,32	4,70
1,2m²	2,82	3,16	4,92	5,24
1,3m²	3,21	3,05	5,61	2,88
1,4m²	3,66	4,08	6,40	4,28

Table-5
Comparison of upper limits of normal (TLTV function BSA) boys with international standards

BSA	P97 ZIMMERMANN (WHO) [22]	P97 current study	P97 ZIMMERMANN (WHO) [22]	P97 current study
0,7m²	1,47	-	2,62	-
0,8m²	1,66	1,42	2,95	1,19
0,9m²	1,86	2,05	3,32	2,89
1,0m²	2,10	2,61	3,73	3,62
1,1m²	2,36	2,53	4,2	3,93
1,2m²	2,65	3,14	4,73	4,21
1,3m²	2,99	4,01	5,32	4,83
1,4m²	3,36	-	5,98	-

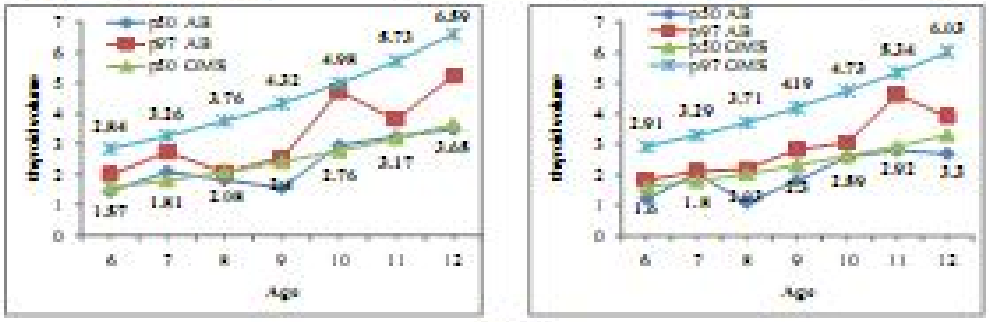


Figure-1
Comparison of TLTV schoolchildren calculated according to age with the 2004 WHO reference (a: Male b: Girls)

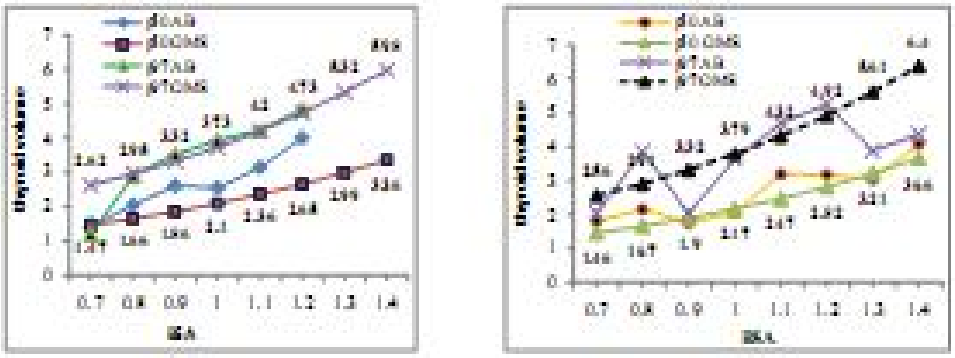


Figure-2
Comparison of TUV schoolchildren calculated based on body surface with the WHO 2004 reference (a: Male b: Girls)

Discussion: This study has verified the iodine status and determined normal values of TUV in schoolchildren. The different data are used to assess locally, the effectiveness of battle against IDD throughuniversal salt iodization strategy and extension of the consumption of iodized salt initiated by the government and its partners at household level (SNU Benin, 2002)[17].

The urinary iodine reflects the consumption standby of iodide level. Thus, the severity of IDD is evaluated based on the median of urinary iodine[8]. The median urinary iodine level in our samples 210µg/l and any child has a lower rate to 100 µg/l. This shows that the schoolchildren of this community do not suffer from a dietary iodide deficiency. However, a total of nine (09) schoolchildren (6.7%) had a urinary iodine levels above 200 mg/l, which reflects an excess of iodide consumption whose consequence is the effect of Wolff –Chaikoff [19]. The prevalence of goiter sonographically determined by the two sets of thresholds (age, sex) and (SC, sex) are 8.96% and 11.94% respectively. These different rates of persistence quite surprising goiters direct us to several tracks.

First, we suspect that due to the mobility of schoolchildren, some of them may immigrate an endemic area to recover sharply in Abomey-Calavi.

Now a day, Abomey-Calavi is as we know the new dorm cited which receives every year many transferred children to other schools for various reasons.

Under these conditions, the daily iodine intake in the new locality (Abomey-Calavi) will quickly improve urinary iodine levels but have a fairly significant effect on the thyroid volume. This confirms published results in 2001 by WHO and UNICEF indicated the normalization of TUV may be several years after the correction of dietary iodine deficiency[1].

Then, we must also fear the adverse effects of goitrogenic foods on the incorporation of iodine in thyroid gland. An investigation is needed to assess the toxicity of the foods consumed by our schoolchildren. There are foods that contain substances that prevent use of iodine in the body. These substances are divided into three groups: the flavonoids in soybeans decreased intestinal absorption of thyroxin; thioglucosides contained in cruciferous (cabbage, turnip) and cyanoglucosides whose main source is cassava. The cyanoglucosides contain cyanide which is converted in gastrointestinal tract into thiocyanate, a potent inhibitor of the uptake of iodine in the thyroid gland.

The link of TUV in relation to sex parameter shows that girls the thyroid volume is comparable to girls than boys (p = 0.095). These results confirm those found by other authors who have worked in areas where iodine intake is adequate [8, 20, 21]. Our 50 th and 97 th percentiles of TUV were compared with WHO references (2004) adapted by ZIMMERMANN [22] and Thyromobil coastal cities, Cotonou (Benin) and Lomé (Togo)[23]. Depending on age, our data are slightly lower than international standards both sexes. We must recognize that international standards were published in 2004, in the final phase of the battle against IDD in different countries explored. We can therefore assume that, almost ten years after the flight, TUV had time to undergo regression was significant.

The reconciliation of TUV in relation to gender parameter shows that the thyroid volume is comparable to girls than boys (p=0.095). These results confirm those found by other authors who have worked in areas where iodine intake is adequate[8,20,21]. Our 50 th and 97 th percentiles of TUV were compared with the 2004 WHO references adapted by ZIMMERMANN[22] and Thyromobil coastal cities Cotonou (Benin) and Lomé (Togo)[23]. Depending on age, our data are slightly lower than international standards data for both sexes. We must recognize that international standards data were published in 2004, during the final phase of the flight against IDD in different countries

optional. We can therefore assume that, almost ten years after this fight, thyroid volume had time to undergo a significant regression.

Conclusion

The fight against disorders caused by iodine deficiency requires a permanent and increased surveillance. Under base conditions, studies from community will be of precarious utility. Indeed, the normal upper limits of the VBT obtained values are fairly consistent and can serve as references for the interpretation of survey and monitoring data obtained by ultrasound in schoolchildren. This study should therefore be generalized to all of our schoolchildren in order to lead to the establishment of national standards of TUV depending on the recommendations of the WHO and UNICEF.

References

1. WHO, UNICEF, ICCIDD, Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A guide for programme managers. Geneva, WHO/NHD/01.1, 107 (2001)
2. WHO, UNICEF, ICCIDD, Indicators for assessing iodine deficiency disorders and their control through salt iodization. Geneva: WHO, (WHO/NUT/94.6) (1994)
3. Tapsoba T.L., Ouédraogo T.D., Nacro B., O Diallo O. and Nikiema M., Mesure échographique du volume de la thyroïde chez des enfants de 6 à 15 ans de la ville de Ouagadougou, Med. Nucl., 33(1), 373-379 (2009)
4. Marwaha R.K., Tandon N., Ashraf G.M., Ganguly S.R., Bansa A., Aggarwal R., Kalaivani Mani, and Singh S., Ultrasound evaluation of thyroid size: A large nationwide study of schoolchildren in India, Nat. Med. J. India, 21, 65-70 (2008)
5. Zimmermann M.B., Hess S.Y., Molinari L., De Benoist B., Delange F., Braverman L.E., Rohner F., Diop Y., Jooma R.L., Moosa K., Pearce E.N., Pandav C.S., Pandit S.A. and Shakhtshneider E., New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report, Am. J. Clin. Nutr., 79, 231-7 (2004)
6. Zimmermann M.B., Saad A., Hess S.Y., Torresani T. and Chaouki N., Thyroid ultrasound compared with world health organization 1960 and 1994 palpation criteria for determination of goiter prevalence in regions of mild and severe iodine deficiency, Eur. J. Endocrinol., 148, 737-41 (2003)
7. Berghout A., Boumbou P., Drenska M., Hennart P. and Smeets A., Inter-observer variation in the assessment of thyroid enlargement: a pitfall in surveys of the prevalence of endemic goiter, Food Nutr. Bull. 16, 64-70 (1994)
8. Xu F., Sullivan K., Houston R., Zhao J., May W. and Maberly G., Thyroid volumes in US and Bangladeshi schoolchildren: comparison with European schoolchildren, Eur. J. Endocrinol., 144, 405-410 (2001)
9. Sabri S. and Tagi I., Determination of Thyroid Volume and its Relation with Isthmus Thickness, Eur J Gen Med, 7(1), 015-019 (2010)
10. Dunn J.T., Crutchfield H.E., Gutekunst R. and Dunn A.D., Methods for Measuring Iodine in Urine, International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders, (1993)
11. Bobade B. and Bobade R.P., Clinical sclerometry, Tank paper, A formula or estimate for approximate surface area if height and weight be known, Archives of International Medicine, 17, 863-871 (1916)
12. Brenn J., Block U., Ruf G., Bai I., Kranes W.R. and Serika P.C., Volumetric analysis of thyroid lobes by real-time ultrasound, Deutsche Medizinische Wochenschrift, (106- 41), 1338-1340 (1981)
13. WHO, ICCIDD, Recommended normative values for thyroid volume in children aged 6-15 years, Bull. WHO, 75, 97-107 (1997)
14. Zimmermann M.B., Molinari L., Staubli M., Wedlinger-Toth J., Bürkle J., Haas K., Delange F., Towards a consensus on reference values of thyroid volume in iodine replete schoolchildren: results of workshop on landmarker and transducer variation in sonographic measurement of thyroid volume, Euro. J. Endo. 144, 213-20 (2001)
15. Assalia T., Radiologie épidémiologie, 3e édition, Parlier Médecine, 200 (2004)
16. Schwartz D., Radiologie médicale sémiologie, 3e édition, Parlier Flammarion, 115 (1984)
17. Bot Berlin, Bilan Commune des Pays Système des Nations Unies au Bénin, (2002)
18. OMS, Série sur les médicaments: Indicateurs d'évaluation des activités axé à la demande en accès de la liste axée des modèles par l'édition du ed. Genève, WHO/MLTS (94.4), 80 (1994)
19. Bati S., Degli Esperti E., Iodine excess and hyperthyroidism, Thyroid, 11(5), 493-500 (2001)
20. Aghini-Lombardi F., Antonangeli L., Pinchera A., Leoli F., Rago T. and Benedetti A., Effect of added salt on thyroid volume of children living in an area previously characterized by moderate iodine deficiency, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82, 1136-1 (1997)
21. Hanson S.A., Pearce P.R. and Erikson U.B., Thyroid gland volume as measured by ultrasonography in healthy children and adolescents: a normative database area, Acta Paediatrica Scandinavica, 80, 834-41 (1991)
22. Zimmermann M.B., Hess S.Y., Molinari L., de Benoist B., Delange F. and Braverman L.E., New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report, Am. J. Clin. Nutr., 79, 231-7 (2004)
23. Ntambwabantu T., Assigbe A., Ouédraogo A. and Salami M., Evaluation rapide des troubles dus à la carence en iode: typologie thyroïdienne de pays d'Afrique de l'Ouest, Nutrition Third World Brussels, 5, 1-62 (2004)

Publications n'entrant pas dans cette thèse :

- Coovi Chekete L. E., Ahokpe M., **Assou E.**, Sezan A. Psychophysiological impacts on strong health care worker of health structures in Benin. Int.J.A.PS.BMS., Jul-Sep. 2013, Vol.2. (3), 182-188.

- NATACHA AIVODJI, **EUDOXIE ASSOU**, ESSE A. AGOSSOU, Alphonse S. Annona muricata recuced Proliferation cause by cycas revolute in Wistar rats .Global Journal for Reseach Analysis. (Soumi pour publication Décembre 2014).

- Gbaguidi Bertin,Ahokpe Mélanie, Attakpa Eugène, Ategbo J. Marc, **ASSOU Eudoxie,** AïvodjiNatacha, Amoussou-Guenou Marcelin and Sezan Alphonse.Normal values of thyroid ultrasound volume of School children in non-iodine deficiency area Abomey Calavi in Benin. *International Research Journal of Biological Sciences* .ISSN 2278-3202 Vol. **2(7),** 1-6, July **(2013)** *Int. Res. J. Biological Sci.*