REPUBLIQUE DU BENIN

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI
FACULTE DES LETTRES, ARTS ET SCIENCES HUMAINES
ECOLE DOCTORALE PLURIDISCIPLINAIRE «ESPACES, CULTURES ET DEVELOPPEMENT»
LABORATOIRE DE BIOMEMBRANE ET SIGNALISATION CELLULAIRE

Année: 2010-2013

THESE DE DOCTORAT

Discipline: Physiologie
Spécialité: Pharmacologie

Présentée par:
Marcellin Cokou TAKIN

PHARMACODYNAMIE DE LA BIOACTIVITE DE L'EXTRAIT ETHYLIQUE DE *KHAYA SENEGALENSIS* SUR LES FONCTIONS HEPATIQUES ET RENALES CHEZ LE LAPIN (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT UNIQUE DE L'UNIVERSITE

Soutenue publiquement le : 17 Janvier 2014

Directeur de thèse:
Alphonse SEZAN
Maitre de Conférences

Devant le Jury composé de:

Président	**Frédéric LOKO**	**Professeur Titulaire Université d'Abomey-Calavi, Bénin**
Directeur de thèse	**Alphonse SEZAN**	**Maître de Conférences Université d'Abomey-Calavi, Bénin**
Rapporteur	**Lamine Said BABA-MOUSSA**	**Professeur Titulaire Université d'Abomey-Calavi, Bénin**
Rapporteur	**Boy Otchom BRAHIM**	**Maître de Conférences Université de N'Djaména, Tchad**
Rapporteur	**Tchadjobo TCHACONDO**	**Maître de Conférences Université de Lomé, Togo**
Examinateur	**Marcel SENOU**	**Maître de Conférences Université d'Abomey-Calavi, Bénin**

RESUME

Une étude pharmacologique préclinique a été conduite dans le but d'évaluer la bioactivité de l'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis.* Après un screening phytochimique de l'extrait, le flux du glucose hépatique a été évalué en fonction du temps, par spectrophotométrie, dans des fragments (de poids identiques) de foie de rat Wistar soumis respectivement aux concentrations de 0, 2, 5, 10 et 20µg/L de l'extrait. Quelques paramètres biochimiques ont été mesurés dans 7lots de 3lapins ayant reçu respectivement, par administration *per os*, l'extrait aux doses de 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 et 50mg/Kg de poids corporel pendant 30jours ; un groupe contrôle a reçu de l'eau distillée en lieu et place de l'extrait de *Khaya senegalensis*. Des coupes histologiques du foie et du rein ont été réalisées après l'abattage des lapins ; les lots traités aux doses de 0, 10, 25 et 50mg/kg de poids corporel ont été dupliqués en lots de lapins en état de surdosage de glucose. Un essai couplé à l'étude a permis de mesurer, le niveau des transporteurs des lipides (ABC-G5/G8 et NPC1L1) par la méthode de RT-PCR chez la souris soumise à une diète riche en cholestérol.

Le screening phytochimique a révélé la présence de composés polyphénoliques (abondants), de saponines, de dérivés anthracéniques et de stéroïdes dans l'extrait. La libération du glucose hépatique a été freinée par l'extrait. La dose de 50mg/kg de poids corporel a diminué significativement la glycémie après 24heures.chez les lapins en état de surdosage de glucose, et pendant les 15 premiers jours du traitement chez les lapins normo glycémiques. Au bout de 30jours de traitement, il été observé une augmentation de la glycémie chez les lapins traités. Les doses de 1mg/kg et 2.5mg/kg de poids corporel ont provoqué une diminution significative des triglycérides ($p < 0.05$) chez les lapins normo glycémiques traités en comparaison au lot témoin. On note une augmentation significative du cholestérol à la dose de 5mg/kg de poids corporel. Les doses de 1, 2,5, 5, 10, 25 et 50mg/kg de poids corporel de l'extrait ont provoqué une augmentation significative de l'urémie chez les lapins. L'activité des transaminases a augmenté en fonction de la dose de l'extrait; l'activité de la Gama GT a significativement augmenté ($p < 0,05$) dans les lots ayant reçu l'extrait respectivement aux doses de 2.5 et 5mg/kg de poids corporel, comparés au lot témoin. On note une diminution significative de l'activité de la G6PD dans le rein des animaux ayant reçu l'extrait à la dose de 1mg/kg de poids corporel, tout comme dans le foie et le rein des animaux ayant reçu l'extrait à la dose de 5mg/kg de poids corporel en comparaison au lot témoin ; les doses de 10, 25 et 50mg/kg de poids corporel ont engendré des altérations remarquables dans le tissu hépatique et le tissu rénal. La diète riche en cholestérol a augmenté la synthèse des transporteurs lipidiques ABCG5/8 et $NPCl_1$ L.

L'extrait éthylique de *K.S* pourrait réduire une glycémie élevée mais son usage pourrait à long terme compromettre le fonctionnement du rein et du foie malgré son probable effet inducteur sur la synthèse des transporteurs des lipides par les stéroïdes qu'il contient.

Mots clés : *Khaya senegalensis*, lapin, rat Wistar, sourie, transporteurs lipidiques

ABSTRACT

A preclinical pharmacological study was conducted with the aim to evaluate the bioactivity of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* stem bark. After a phytochemical screening of the extract, the flow of hepatic glucose was rated in function of time, by spectrophotometry in fragments (identical weight) Wistar rat liver respectively subjected to concentrations of 0, 2, 5, 10 and 20µg / L of extract. Some biochemical parameters were measured in 7lots of 3rabbits respectively fed 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 and 50mg/kg BW of *Khaya senegalensis* stem bark extract orally for 30 days (a control group received distilled water instead K.S. extract). Histological cuts of liver and kidney were executed after slaughtering the rabbits; rabbit's lots fed 0, 10, 25 and 50mg/kg BW were duplicated in lots of rabbits in glucose overload condition. With a test coupled to the study, the level of lipid carriers (ABC-G5/G8 and NPC1L1) was measured by RT-PCR method in mouse fed a diet rich in cholesterol.

Phytochemical screening revealed presence of poly phenol compounds (abundant), saponins, anthracene derivatives and steroids in the extract. The liberation of hepatic glucose was inhibited by the extract. The dose of 50mg/kg BW of the extract decreased significantly blood glucose level 24hours after the treatment in rabbits glucose overloaded. In rabbits with normal blood glucose level treated the doses of 1mg/kg and 2.5mg/kg BW reduced significantly triglycerides blood level ($p < 0.05$) compared to the control group; there was a significant increase in the cholesterol with the dose of 5mg/kg BW. The extract administrated in doses of 1, 2,5, 5, 10, 25 and 50mg/kg BW has increased significantly the uremia. The activity of the transaminases increased in function of the dose of the extract; the activity of Gama GT significantly augment ($P < 0.05$) in the groups respectively subjected to the extract at 2.5 and 5mg/kg BW, compared to control group; there was a significant decrease in the activity of G6PD in the kidney of animals subjected to the extract at 1mg/kg BW, as in the liver and kidney of animals subjected to the extract at 5mg/kg BW compared to the control group; the doses of 10, 25 and 50mg/kg BW have led to remarkable changes in the hepatic tissue and kidney tissue. High cholesterol diet increased the synthesis of lipid transporters ABCG5 / 8 and $NPCl_1$ L.

The ethanolic extract of stem bark of KS would reduce high blood glucose levels but long-term use could jeopardize kidney and liver functions despite its probable inducing effect on the synthesis of lipid carriers by its steroids contents.

Keywords: *Khaya senegalensis*, rabbit, Wistar rat, mouse, lipid carriers.

DEDICACE

A ma descendance, mes deux raisons de vivre et aux enfants à venir.

Mashella – Simonnette.

Puise dans la science pour aller à l'école de la vie. Ici tu ne finis jamais d'apprendre. Arme-toi de courage pour briller de connaissances et de sagesse. Ta liberté est celle du monde…

REMERCIEMENTS

Nous tenons sincèrement à dire un mot à l'endroit de tous ceux et celles dont l'existence a nourrit la notre et sans qui le bonheur que nous assemblons ne serait à ce point. Nous saluons la mémoire de notre feue sœur Rébecca Adéola TAKIN.

Nombreux êtes-vous à contribuer à mes succès et en particulier à la réussite de cette thèse.

- A notre Directeur de thèse, le Professeur Alphonse SEZAN qui s'investit sans relâche dans notre promotion intellectuelle et scientifique.
- Aux enseignants qui ont fait de nous un adepte de la science notamment les Professeurs, Eugène S. ATTAKPA, Angèle Mélanie AHOKPE, Ganiou YESSOUFOU…
- Aux Professeurs Frédéric LOKO, Marcel SENOU, Lamine Saïd BABA MOUSSA, Tchadjobo TCHACONDO et Boy Otchom BRAHIM qui ont éclairé et amélioré ce travail par leurs analyses, critiques et orientations scientifiques.
- A notre aîné dans la science, le Docteur Sabbas ATTINDEHOU qui nous a guidé et précieusement aidé dans l'accomplissement de notre rêve.
- A nos amis et collègues Jérôme ACAKPO, Essé AGOSSOU, Eudoxie ASSOU et Loîca B. ZOHOUN pour leur solidarité et leur collaboration.
- Aux étudiants en Master et au personnel du Laboratoire de Biomambrane et de Signalisation Cellulaire pour leur contribution.
- Aux familles TAKIN, KONENIN, ABOU ZOUNNON, BIDE, ANAGONOU, SALAMI, FASSINOU et GNANKADJA pour leur appui psychologique et leur soutien.
- Au personnel de la Pharmacie l'ANGELUS pour son soutien.

- A nos confrères, les Docteurs Camille DOMONHEDO, Wilfrid AGBATCHOSSOU, Isaïe MARSHALL et Didier FASSINOU pour leur soutien et leur contribution.
- Aux messieurs Daniel VISSOUKPO, Victor DAMILOHOUN, Mathieu AVLESSI, Juste AKODANDE et Cyrille BADOU pour l'amitié et la solidarité.
- A Madame ABOU ZOUNNON Horératou pour sa détermination, l'orientation et la confiance.
- A nos chers parents Coffi TAKIN, Adjoua TCHALLA, ABALLO Onyonkiton Théophile, Cossiba AYEKONIN, Agathe BIDE et Marcelle ANAGONOU pour le sacrifice consenti et leurs divers soutiens.
- A l'administration rectorale de l'Université d'Abomey-Calavi pour l'appui logistique et financier.
- A l'administration de la Faculté des Lettres, des Arts et des Sciences Humaines et de L'Ecole Doctorale Multidisciplinaire pour leur accompagnement et encadrement.
- A l'administration de la Faculté des Sciences et Techniques pour leur suivi.
- A tous ceux que je ne peux citer… **Sincères remerciements.**

Liste des sigles et abréviations

°C :	Degré celsius
ABCG5/8:	ATP-binding cassette G5/G8
ADP:	Adenosine diphosphate
ALAT:	Alanine amino transférase
APo:	Apolipoprotéine
ASAT:	Aspartate amino transférase
ATP:	Adenosine triphosphate
CO2:	Dioxyde de carbone
CoA:	Coenzyme A
DAP:	Dihydroxy-acétone Phosphate
G6PD:	Glucose 6Phosphate Déshydrogénase
GK:	Glycérol Kinase
GK:	Glycerol Kinese
GPO:	Glycérol Phosphate Oxydase
HMG-COA	(Hydroxymethyl-glutaryl-CoA réductase
ISBA :	Institut des Sciences Biomédicales Appliquées
Kg :	Kilogramme
LDL:	Low density lipids
Mg:	Milligramme
nm:	Nanomètre
NPC1L1:	Nieman Pick C1 Like1 Protein
P.A.S:	Periodic acid Schiff
RE:	Réticulum endoplasmique
TG:	Triglycérique
UAC :	Université d'Abomey-Calavi
µL :	Micro litre

Liste des figures

Figure 1:*Khaya Senegalensis* (Ders) A. Juss 9

Figure 2 : vegetative Organs of *Khaya Senegalensis* (a = flowers, b= fruit, c = stem bark, d= leaf) 10

Figure 3: cartographie de la répartition de *Khaya senegalensis*. Mem. Mus, natl. Hist. net…, paris 19 : 25 (1830) 11

Figure 4 : lapin de garenne 20

Figure 5: Les systèmes endocriniens du pancréas (Nelson D.L., Cox M., 2004**)** 32

Figure 6: Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline (Oberley LW., 1988**)** 33

Figure 7: Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline (Kahn B.B., 1992) 34

Figure 8: Zones agro-écologiques du Bénin (ATTINEHOU S., 2012) 39

Figure 9 : Rat disséqué 45

Figure 10 : Histologie comparée de rein de lapin 105

Figure 11 : Histologie comparée de foie de lapin 107

Liste des tableaux

Tableau I: Appellations locales de *Khaya senegalensis* en Afrique 12

Tableau II: Les triterpenoïdes contenus dans le principe amer de *Khaya senegalensis* 13

Tableau III: Efficacité thérapeutique d'extraits de *Khaya senegalensis* 15

Tableau IV: Normes biologiques chez le lapin 23

Tableau V : Composition du réactifs GOD-PAP® pour dosage enzymatique de glucose 41

Tableau VI : Composition des réactifs utilisés dans le dosage enzymatique des triglycérides et des cholestérols 42

Tableau VII: Réactifs du screening phytochimique 43

Tableau VIII : Méthode de dosage de glucose : mode opératoire 49

Tableau IX : Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur quelques paramètres biochimiques 103

Table des matières

RESUME…… ii
ABSTRACT…… iii
DEDICACE…… iv
REMERCIEMENTS……. v
Liste des sigles et abréviations…….. vii
Liste des figures……. viii
Liste des tableaux…….. ix
Table des matières……. x
Introduction…….. 1
Objectifs et hypothèse de recherches…….. 4
I. CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE……. 6
I.1.Point sur la bioactivité, l'utilité thérapeutique et les risques toxicologiques des extraits d'organes de *Khaya senegalensis*……. 7
I.1.1.Botanique, description, et distribution de *Khaya senegalensis*……. 7
I.1.2.Composition chimique de *Khaya senegalensis*…….. 12
I.1.3.Rapports sur l'efficacité thérapeutique de *Khaya senegalensis*…….. 14
I.1.4.Effets biochimiques des extraits de *Khaya senegalensis*…… 16
I.1.5.Effets tissulaires ou organiques des extraits de *Khaya senegalensis*……. 17
I.1.6.Risques toxicologiques……. 18
I.2. Généralités sur le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) : constantes physiques et paramètres biochimiques…… 19
I.2.1. Généralités et constantes physiques……. 19
I.2.2. Paramètres biochimiques…… 22
I.3. Les voies métaboliques, le rein, le foie et l'homéostasie du cholestérol…… 23
I.3.1.Métabolisme des lipides et homéostasie du cholestérol……. 24
I.3.2 Régulation de la biosynthèse du cholestérol…….. 26
I.3.2.1 Synthèse du Cholestérol…….. 26
I.3.2.2 Métabolisme du cholestérol…….. 26
I.3.2.3 Régulation de la biosynthèse du cholestérol……. 27
I.3.2.4 Revue de littérature sur l'homéostasie du cholestérol et les transporteurs des lipides…… 29
I.4. Le rein, le foie et l'homéostasie du glucose……. 31
I.4.1 Rôle du pancréas et l'insulino-sécrétion…… 31
I.4.2 Rôle du foie……. 34
I.4.3 Rôle du rein……. 35
II. CHAPITRE II. METHODOLOGIE…….. 38
II.1 Cadre d'étude……. 38
II.2. Matériel et méthodes……. 40
II.2.1. Matériel……. 40

II.2.2. Méthodes…….. 43
II.2.2.1. Préparation de l'extrait des écorces de *Khaya senegalensis*…….. 43
II.2.2.2. Screening phytochimique…….. 44
II.2.2.3. Préparation du matériel biologique…….. 44
II.2.2.4. Préparation de la solution Mack EWEN…….. 45
II.2.2.5. Mise en condition des lapins et préparation des lots expérimentaux…… 46
II.2.2.6 Tests biochimiques……. 47

II.2.2.7. .Quantification des Abcg5 et des NPC1L1 par RT-PCR…… 52
II.2.2.8. Prélèvement d'organes et réalisation de coupes histologiques…….. 52

III CHAPITRE III. RESULTATS……. 58

III.1. Revue de littérature sur *Khaya senegalensis*…….. 58

III.2 Flux du glucose dans le foie sous l'effet de l'extrait des écorces de tronc de *khaya senegalensis*…….. 68

III.3 Modifications histologiques engendrées par l'extrait éthylique de *khaya senegalensis* dans le foie et le rein chez le lapin……. 78

Résumé……. 93

Introduction……. 95

Matériel et méthodes…….. 95

Cadre d'étude…… 95

Résultats…… 103

Discussion……. 108
Conclusion…… 111
Bibliographie…….. 112
III.4 Bioactivité des extraits de *Khaya senegalensise* et la mobilisation des transporteurs lipidiques : ATP-binding cassette G5/G8 (ABCG5/8) et Nieman Pick C1 like 1 Protein (NPC1L1)…… 118
CHAPITRE IV : DISCUSSIONS GENERALES…… 113
IV.1. Rendement de l'extraction ……. 134
IV.2. Composition de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis*…….. 134
IV.3. Influence de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sur la libération hépatique du glucose…….. 136

IV.3.1. Mouvement de glucose à travers la membrane des hépatocytes…… 136

IV.3.2. Effet des extraits totaux de *Khaya senegalensis* sur le taux de glucose…….. 137

IV.3.4. Comparaison de l'effet des extraits totaux de *Khaya senegalensis* à l'effet de

l'insuline…….. 139
IV.4. Effet de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sur quelques paramètres biochimiques et sur l'histologie rénale et hépatique……. 140
IV.4.1. Effet sur les paramètres biochimiques…… 140
CONCLUSIONS GENERALES…….. 145
PERSPECTIVES…….. 146

REFERENCES…… 147

Introduction

La phytothérapie encore largement basée sur des recettes et des exploitations empiriques constitue cependant un moyen de plus en plus utilisé comme alternative à la médication chimique conventionnelle (OMS, 2003 ; Azaizeh et *al.*, 2003 ; Athanasiadou et *al.*, 2007). Le regain d'intérêt est d'autant important dans les zones de faibles revenus d'autant que les controverses au sujet de l'efficacité et du coût des médicaments de spécialités enflent au sein de l'opinion. Cette situation a motivé, au cours de la dernière décennie, un foisonnement de programmes de recherches axées sur la vérification de la bio-activité de nombreuses plantes auxquelles sont prêtées des vertus thérapeutiques. Dans cette lancée, certaines plantes dont *Khaya senegalensis* sont particulièrement indexées par de nombreuses communautés africaines (Le Strange, 1977 ; Nacoulma, 1996). Les extraits d'écorces, de feuilles ou de racines de cette plante seraient efficaces contre plusieurs maladies animales et humaines (Full et *al.*, 1999 ; Arbonnier, 2002 ; Karou et *al.*, 2005 ; Ayo et *al.*, 2007 ; Sale et *al.*, 2008 ; Ibrahim et *al.*, 2008 ; Abubakar et *al.*, 2010). L'intérêt et l'importance sociologique et médicale de cette ressource végétale tropicale ont bien été mis en exergue par la profusion de travaux scientifiques conduits ici et là.

Les organes végétatifs de *Khaya senegalensis* (Ders.) A. Juss. Sont couramment employés dans la pharmacopée africaine. Plusieurs études ont révélé ses propriétés bioactives et donc son efficacité médicale. Les extraits aqueux et alcooliques de l'écorce et des feuilles de cette plante se seraient montrés efficients dans le traitement de nombreuses infections bactériennes. Leurs effets biochimiques largement rapportés, tels que l'inhibition de l'activité de α-amylase, le ralentissement du transit intestinal et la réduction des taux sanguins et sériques des transaminases (Asparate Transférase, Alanine Transférase et Phosphatase Alcaline) justifieraient les indications contre le

diabète, la diarrhée et les troubles hépatiques. On lui connait aussi des propriétés antiparasitaires dirigées contre les helminthes et les coccidies. Cependant, d'après les résultats de différentes études, cette plante présente d'importants risques de toxicité dans les traitements prolongés (plusieurs semaines). Des effets histotoxiques (aux niveaux rénal et hépatique) se traduisant par une augmentation plasmatique des protéines totales, de l'urémie, et de la créatinine sanguines, sont signalés, mais il reste à élucider le mécanisme d'action des substances actives de cette plante.

D'où la pertinence des études décrites dans cette œuvre intitulée : **Pharmacodynamie de la bioactivité de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur les fonctions hépatiques et rénales chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*).**

Le travail effectué a eu pour but de décrire le danger sanitaire lié à l'usage de *Khaya senegalensis* dans la thérapie. Les études ont couvert deux axes de recherche que sont :

- la mise en évidence des différents groupes chimiques présents dans l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis*,
- la prospection du mode d'action des ces différents groupes chimiques sur des fonctions métaboliques du foie et du rein chez le lapin.

  Le premier axe a eu comme objectif général de justifier l'usage de *Khaya senegalensis* comme plante médicinale,

  Le second a eu pour objectif d'expliquer les mécanismes d'action de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* dans ses effets sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, et sur quelques organes vitaux (le foie et le rein) impliquées dans ces fonctions chez le lapin.

  Cette thèse s'articule en quatre chapitres.

Le chapitre premier présente une revue de littérature sur *Khaya senegalensis* et un point des généralités sur le lapin et sur l'homéostasie de quelques paramètres biochimiques notamment le cholestérol.

Le deuxième chapitre décrit le cadre et les méthodes d'étude; les deux derniers présentent successivement les résultats et leurs discussions.

OBJECTIFS ET HYPOTHESE DE RECHERCHES

A travers ce travail nous poursuivons deux objectifs généraux (OG) lesquels se déclinent en six objectifs spécifiques (OS) et huit hypothèses (H).

OG1 : Justifier l'usage thérapeutique de *Khaya senegalensis*

OS1 : Identifier les différents groupes chimiques contenus dans l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis*

H1 : Les principes actifs contenus dans les écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sont extractibles par l'éthanol.

H2 : L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* contient divers composés chimiques bioactifs.

OG2 : Evaluer la bioactivité de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis*.

OS2 : Evaluer l'effet de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sur la libération hépatique du glucose.

H3 : L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya.senegalensis* inhibe la libération du glucose hépatique.

SO3 : Mesurer la variation des paramètres biochimiques du sang induite par l'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis* chez le lapin.

H4 : L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* diminue le Glucose, les triglycérides et le cholestérol total sanguins.

H5**:** L'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis* augmente le niveau sanguin des transaminases, de la gamma glutamyl transpeptidase (Gamma GT) et de l'urée.

OS4: Mesurer la variation de l'activité de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose sous l'effet de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis.*

H6***:*** L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Kkaya senegalensis* baisse l'activité de la Glucose 6 phosphate déshydrogénasse (G6PD) hépatique et rénale,

OS5: Evaluer l'effet de l'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis* sur les transporteurs des lipides : ATP-binding cassette G5/G8 (ABCG5/8) and Nieman Pick C1 like 1 Protein (NPC1L1),

H7 : L'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis* mobilise les transporteurs des lipides : ATP-binding cassette G5/G8 (ABCG5/8) and Nieman Pick C1 like 1 Protein (NPC1L1),

OS6: Evaluer l'effet de l'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis* sur l'histologie du rein et du foie chez le lapin.

H8 : l'extrait éthylique des écorces du tronc de *Khaya senegalensis* induit des modifications histologiques dans le rein et le foie des lapins.

I. CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Point sur la bioactivité, l'utilité thérapeutique et les risques toxicologiques des extraits d'organes de *Khaya senegalensis*.

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

I.1.1.Botanique, description, et distribution de *Khaya senegalensis*

Khaya senegalensis (Ders.) A. Juss (figure 1) est un grand et robuste arbre (jusqu'à 35 m de haut avec un diamètre de 1 à 3 m) de la famille des Méliacées. Encore appelé acajou du Sénégal, il représente une espèce sylvicole très connue et exploitée en Afrique (Belem et *al*., 2008). Il a des feuilles paripennées, glabres constitués de 6 à 12 folioles elliptiques-oblongues alternes ou opposées (figure 2a). A la floraison, les rameaux de *K. senegalensis* portent à leurs extrémités des panicules de petites fleurs blanches composées de verticilles successifs de quatre pièces florales. Les fruits du caïlcédrat sont des capsules à tégument épais et ligneux. Il s'agit de capsules de 4 à 5 cm de largeur, déhiscente et s'ouvrant par 4 valves qui laissent voir les graines plates, étroitement appliqués les unes contre les autres (Fortin et *al*., 1990). L'écorce de cet arbre (figure 2c) est très épaisse, écailleuse et de couleur brunâtre à gris-foncée. A la section elle laisse suinter un exsudat rougeâtre.

Les biotopes favorables à *Khaya senegalensis* sont ceux à sols humides, profonds, les alluvions, le bord des cours d'eau et les bas-fonds non inondés. Il s'accommode aussi bien de stations très sèches ou superficielles ou latéritiques quand les précipitations sont suffisantes c'est-à-dire des pluies réparties entre 650 à 1300 mm sur 4 à 7 mois (Von Maydell, 1983). Il peuple les régions

soudaniennes et guinéo-soudaniennes (Sokpon et Ouinsavi, 2004). Il est abondant dans les savanes boisées de la plupart des pays situés dans le Golfe de Guinée (Cameroun, Gabon, Nigéria, Bénin, Togo, Côte d'Ivoire, Guinée, Guinée Bissau, Gambie et Sénégal) où il est connu sous des appellations locales diverses (tableau 1) et où son exploitation est assez largement rapportée (CAB International, 2000 ; World Agroforestry Centre, 2004 ; Arnold, 2004 ; Adjanohoun et *al.*, 1986) et certains auteurs pensent qu'elle subit une surexploitation (CTFT, 1988; Agbahungba et Sokpon, 1998). Mais sa répartition est bien plus large allant jusqu'aux régions soudano-sahéliennes (Burkina-Faso, Niger, Mali, Tchad). La figure 3 donne une cartographie simplifiée de sa répartition mondiale.



Figure 1: ***Khaya senegalensis*** **(Ders.) A. Juss.**

Photo retrieved from website: http://www.visoflora.com/images/original/photo-n-1-khaya-senegalensis-visoflora-12694.jpg on 2013-04-28

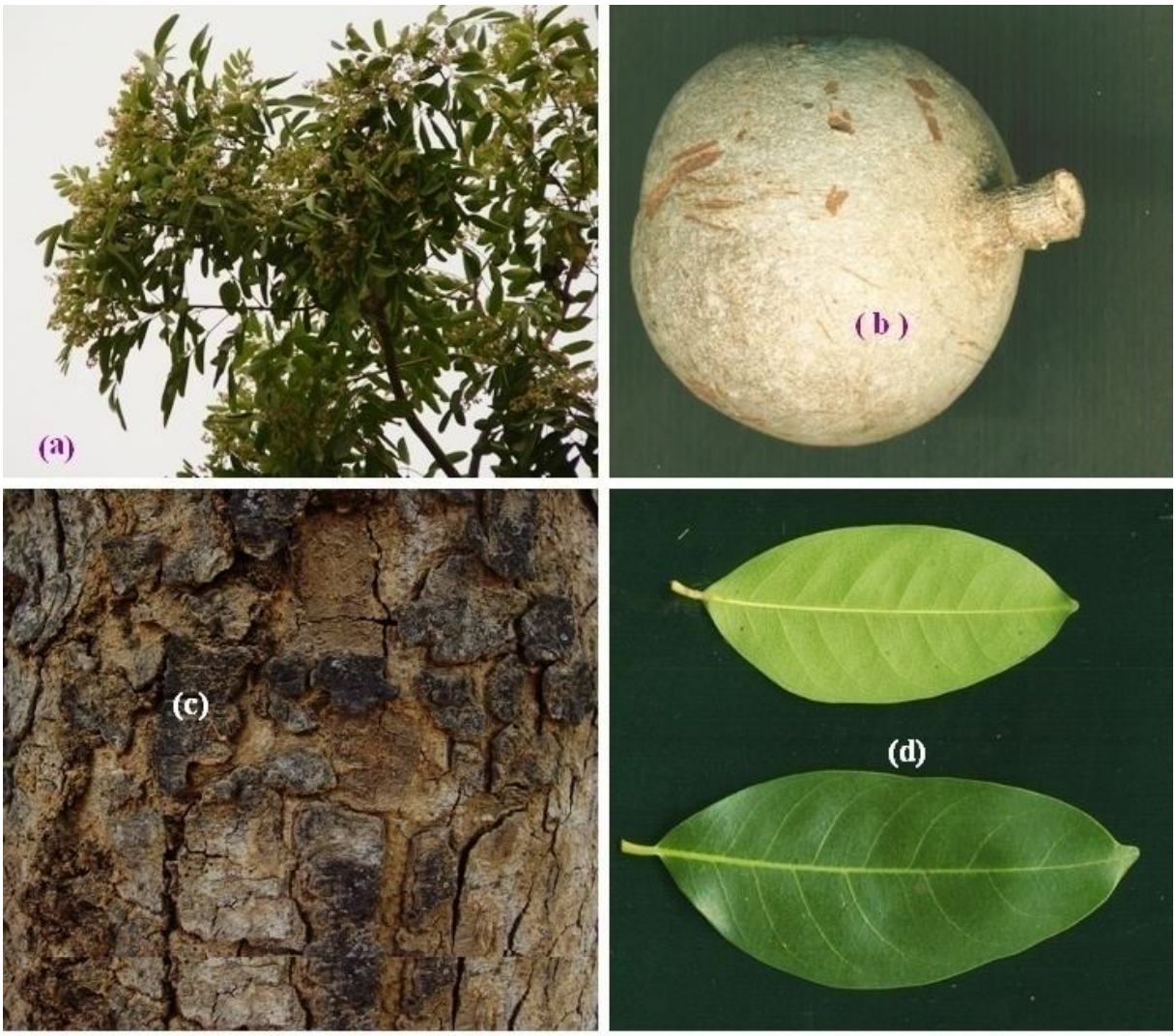


Figure 2: Vegetative Organs of *Khaya senegalensis* (a=flowers, b=fruit, c= stem bark, d=leaf)

Photo PUBW - Retrieved on 2013-04-28 from website:
http://bangr-weoogo.csregistry.org/tiki-browse_gallery.php?galleryId=10



Figure 3. Cartographie de la répartition de *Khaya senegalensis*. Mem. Mus. natl. Hist. nat., Paris 19:25(1830)

Tableau I: 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)

I.1.2.Composition chimique de *Khaya senegalensis*

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 (Caventou, 1849). Un siècle plus tard, Moyse-Mignon (1942) 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.

Tableau II: Les triterpenoïdes contenus dans le principe amer de *Khaya senegalensis*

Organe végétal	Molécules présentes
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 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

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. Adesogan et *al*. (1968) en ont donné une répartition selon l'organe végétal considéré (tableau2).

Plus récemment, le screening phytochimique des écorces de tronc a permis à Lompo (1993) 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.

I.1.3.Rapports sur l'efficacité thérapeutique de *Khaya senegalensis*

Divers extraits de feuilles, d'écorces ou de graines de *K. senegalensis* ont été éprouvés dans des tests d'efficacité. Le tableau 3 donne une synthèse des usages thérapeutiques ainsi que des confirmations d'efficacité.

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

Indications thérapeutiques	Substances médicamenteuses	Rapports d'efficacité	Références
Diarrhée	Extraits aqueux et méthanoïques de feuilles	Ralentissement du transit intestinal = propriété anti diarrhéique	Nwosu et *al.* (2012)
Infections bactériennes	Extraits aqueux de feuilles	Potentiel antioxydant et antibactérien contre *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)

I.1.4.Effets biochimiques des extraits de *Khaya senegalensis*

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

Selon Kolawolé et *al*. (2011), l'extrait aqueux de l'écorce de *K. senegalensis,* aux doses de 100 et 200 $mg.kg^{-1}$ de poids vifs 18 jours durant, provoque une élévation du taux plasmatique des enzymes hépatiques en l'occurrence, l'Asparate Amino-Transférase (AST), l'Alanine Amino-Transférase (ALT) et de l'Alcaline Amino-Phosphatase (ALP). Le même effet a été enregistré par Abubakar et *al*. (2010) avec de bien plus faibles dosages (10–40 $mg.kg^{-1}$ de poids vifs) administrés pendant 28 jours.

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

Cependant, des effets bloqueurs de l'activité de l'Alcaline Amino-Transférase sont révélés par l'administration prolongée d'une dose de $2mg.kg^{-1}$ de poids vif de l'extrait éthylique de *K. senegalensis* (Adébayo et *al*., 2003). Ali et *al*. (2011) ont aussi rapporté une nette diminution de l'activité des enzymes hépatiques (AST, ALT et ASP) chez des rats albinos traités aux doses de 250 $mg.kg^{-1}$ et 500 $mg.kg^{-1}$ de poids vifs pendant 5 jours.

Une augmentation dose-dépendante des taux sanguins de protéines totales, de l'urée, de la globuline et de la créatinine a été rapportée chez le rat par

Kolawolé et *al*. (2011). Lesdits effets se seraient significativement révélés aux doses de 100 et 200 $mg.kg^{-1}$ de poids vif administrées pendant 18 jours. Mais Ali et *al.* (2011) ont signalé, pour des doses plus élevées (250 $mg.kg^{-1}$ et 500 $mg.kg^{-1}$ de poids vif) et pour une plus courte durée de traitement (5 jours) une réduction des concentrations des mêmes paramètres. Cette divergence entre les deux résultats laisse présager de ce qu'un long traitement aux extraits a des effets inverse des effets biochimiques des extraits de *Khaya senegalensis* et sur l'intégrité histologique du foie, des reins, du cœur…

Les extraits de cette plantes auraient également une action élévatrice de la concentration sérique des ions sodium et potassium (Kolawolé et *al*., 2011 ; Adébayo et *al*., 2003).

I.1.5.Effets tissulaires ou organiques des extraits de *Khaya senegalensis*

La réduction du taux sérique de l'Asparate Transaminase (AST), de l'Alanine Transaminase (ALT) et de l'Alcaline Phosphatase (ALP) correspond à des effets hépato protecteurs des extraits de *Khaya senegalensis*. Cette potentialité a été mise en évidence par Ibrahim et *al*. (2004) qui ont enregistré une baisse du taux de transminases chez des rats infectés expérimentalement par *Trypanosoma brucei* , parasite réputé pour être un grand destructeur du parenchyme hépatique (Umar et *al*., 1999) puis traités avec de l'extrait aqueux.

Sule et *al*. (2008) ont évalué cet effet hépato protecteur d'un extrait aqueux d'écorces de *K. senegalensis* administré à des rats dont le foie a été soumis à l'effet toxique du tétrachlorure de carbone (CCl_4). Ces auteurs ont observé qu'avec une dose de 80 mg par kg de poids vif pendant 6 jours le poison a pu induire ces effets toxiques. L'effet protecteur de l'extrait est ainsi mis en exergue par cette étude.

L’élévation de la globuline sanguine traduit quant à elle que l’extrait possède une action renforçatrice du système immunitaire (Puri et *al*., 1993).

D’après Sablassou et *al.* (1998), l'extrait éthanoïque des feuilles sèches de *Khaya senegalensis* a des effets antispasmodiques et spasmolytiques sur l'iléon du cobaye. Ces auteurs ont indiqué qu’à la dose de 1mg.ml^{-1}, l'extrait fait chuter de 100% le plateau de la contracture induite par l’acétylcholine à 0,1p.g.ml^{-1}. Même un enrichissement du milieu en calcium ne permet pas un retour des contractions. Cet extrait végétal agirait comme un bloqueur de canal calcique relaxant du muscle lisse iléal du cobaye. Ceci s’accorde avec le débrayage de la motricité gastro-intestinale obtenu par Nwosu et *al*. (2012) sur des rats traités aux doses de 100 – 300 mg.kg^{-1} de poids vif.

I.1.6.Risques toxicologiques

Nwosu et *al*. (2012) ont révélé que l’extrait aqueux des feuilles de *Khaya senegalensis* n’est pas toxique. En effet à l’issue d’une étude par eux effectuée sur des rats au Nigeria, ces auteurs ont rapporté que la DL50 de l’extrait est supérieure à 3000 mg.kg^{-1} de poids vif. Quoique d’autres études ont stipulé que des traitements prolongés induisent plutôt une augmentation de ces paramètres signant une certaine hépatotoxicité (Williamson et *al*., 1996 ; Adedapo et *al*., 2007 ; Satpal et Punia, 2010 ; Kolawolé et *al*., 2011). Le long traitement provoquerait aussi l’élévation de la créatininémie et de l’urémie (Kolawolé et *al*., 2011) ce qui traduit un dysfonctionnement rénal.

I.2. Généralités sur le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) : constantes physiques et paramètres biochimiques

I.2.1. Généralités et constantes physiques

Classée dans l'ordre des *lagomorphes*, la famille des *léporidés* et le genre *Oryctolagus*, le lapin domestique est exclusivement issu d'une espèce : le Lapin de garenne (*Oryctolagus cuniculus*), lequel est à l'origine des multiples races de lapins domestiques élevées à présent dans le monde entier. Les lapins sont aujourd'hui employés comme modèles dans les laboratoires, et peuvent également devenir des animaux de compagnie, du fait de leur caractère affectueux. Diverses races ont été développées suite à la sélection par l'homme.

L'ordre des lagomorphes comprend le lapin, le lièvre, le lapin de garenne et le pika. Les races actuelles de lapins domestiques, celles qui sont utilisées en recherche, proviennent toutes du lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). Les races les plus fréquemment utilisées en recherche sont celles de Nouvelle-Zélande (albinos et rouge), Hollande, Pologne et Californie. Il y a beaucoup de variations dans la grosseur des races de lapins qui sont souvent classifiées sur la base du poids corporel comme par exemple les races petites (Hollande, pologne) moins de 2 Kilogrammes, moyennes (Nouvelle-Zélande et californie), de2 à 5 Kilogramme, et grosses(Flamande), plus de 5 Kilogramme.

La Nouvelle-Zélande blanche (albinos) est celle qui est la plus utilisée dans les laboratoires au Canada. De poids moyen et très dociles, les lapins de cette race sont très faciles à garder, à manipuler et à contrôler et de plus, la grandeur et l'absence de pigmentation de leurs oreilles facilitent la répétition d'interventions telles les prises de sang et les injections intraveineuses. Les lapins de variétés différentes ont servi à l'établissement de modèles expérimentaux très utiles dans diverses sphères de la recherche biomédicale

(embryologie, toxicologie, virologie, etc…) et ils sont fréquemment utilisés dans des tests de toxicité (pyrogène, tératogénicité, etc…). De plus, ils sont utilisés couramment en sérologie parce qu'ils produisent facilement des anticorps contre une multitude d'antigènes. Cependant, il existe deux inconvénients majeurs à leur utilisation comme animal d'expérimentation : ils réagissent mal à l'anesthésie ;

Ils sont sujets à développer spontanément un très grand nombre de maladie

La température corporelle moyenne se situe à 39,5°C (avec des variations de 38,5° à 40°C) et habituellement elle fluctue beaucoup lors de l'excitement provoqué par les manipulations mêmes si d'autres signes d'inconfort ne sont pas évidents.

Le poids du lapin se situe généralement entre 0,5 et 8 kg. Le pavillon de ses oreilles est bien irrigué par la circulation sanguine.



Figure 4: *Oryctolagus cuniculus* (Lapin de garenne, individu sauvage)
Photo retirée du site web http://fr.wikipedia.org/wiki/Oryctolagus_cuniculus consulté le 28 mars 2013

Le lapin intéresse depuis bien longtemps les scientifiques comme modèle animal. Ainsi, dès le XVII^{e} siècle, des lapins sont utilisés en ophtalmologie, puis comme modèle d'investigation pour les études pharmacologiques de transfert placentaire de médicaments, métabolites et stéroïdes, sa placentation étant similaire à celle de la femme. Cet animal présente notamment les avantages d'être prolifique, de petite taille et de pouvoir être élevé dans des conditions bien maîtrisées, conditions indispensables pour en faire un animal de laboratoire. Sa taille intermédiaire en fait un sujet idéal pour effectuer des manipulations trop délicates sur les souris et les rats (Chantry-Darmon, 2005) Les trois races préférentiellement utilisées par les scientifiques sont le néo-zélandais, le hollandais et le bélier. Du fait de sa bonne réponse immunologique, il peut permettre la production d'anticorps spécifiques. C'est aussi un bon substrat pour la toxicologie, car le lapin a une gestation courte est suffisamment grand pour que les irritations soient bien visibles et que l'on puisse étudier les fœtus. De plus, il est très sensible aux agents tératogènes et a une réponse proche de celle de l'homme. Il est utilisé pour divers tests dermatologiques (Chantry-Darmon, 2005). Il est également utilisé actuellement dans les domaines cardiovasculaires, ostéo-articulaires et respiratoires, ainsi qu'en oncologie et diabétologie. C'est un modèle approprié pour étudier l'hypertension et l'athérosclérose car son métabolisme lipidique est plus proche de celui de l'homme que celui de la souris. Il est adéquat pour étudier l'arthrose et pour valider les nouvelles technologies d'imagerie ostéo-articulaire (Dewre et Drion, 2006). L'étude des papillomavirus s'appuie souvent sur des observations sur les lapins. La lapine a également longtemps été utilisée dans le diagnostic précoce de grossesse chez la femme. En effet, les hormones particulières à la femme enceinte et présente dans ses urines (des dérivés de la progestérone) provoquent la reprise d'activité de l'ovaire de la lapine qui se les voit injecter par intraveineuse (Lissot, 1974).

Un lapin a été pour la première fois cloné à partir de cellules adultes en 2002, performance réitérée à plusieurs reprises. Les diverses mutations que l'on rencontre chez certaines souches offrent des opportunités pour réaliser des études génétiques. Par ailleurs, on considère généralement que le lapin est plus représentatif des mammifères que la souris pour étudier le développement embryonnaire précoce, et notamment la période d'activation transcriptionnelle du génome et la gastrulation. La transgénèse a permis la production de molécules pharmaceutiques complexes dans le lait de lapin. Cet animal, par sa taille intermédiaire, permet la production de protéines recombinantes en quantité raisonnable et à faible coût (Chantry-Darmon, 2005). Enfin, sa domestication tardive en fait une espèce idéale pour étudier le processus de domestication et les processus génétiques associés.

Dans le monde, ce sont environ 1,5 million de lapins qui sont utilisés comme animaux de laboratoire en 1995, ce qui reste une valeur modeste en comparaison de ceux d'autres animaux utilisés pour les mêmes fins. Les pays les plus concernés sont l'Allemagne et les États-Unis qui élèvent chacun 300 000 lapins de laboratoire. On peut d'ailleurs noter qu'aux États-Unis, un élevage à vocation commerciale sur quatre est destiné à la production de lapins pour des laboratoires. Le Japon, et dans une moindre mesure les autres pays d'Europe de l'Ouest, le Canada ainsi que la Chine et la Corée du Sud utilisent également des lapins comme modèles d'expérimentations.

I.2.2. Paramètres biochimiques.

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

Tableau IV: Normes biologiques chez le lapin

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

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

Les voies métaboliques ont comme finalité d'assurer qualitativement et quantitativement les besoins indispensables à la vie de l'organisme.

Ces besoins sont de 4 ordres : ils permettent l'élaboration ou le renouvellement des structures micro ou macroscopiques ; Ils participent au maintien des grands

équilibres qu'ils soient de l'ordre osmotique, ionique, etc. ; Ils sont nécessaires au bon fonctionnement de toutes grandes fonctions de l'organisme. D'une façon plus générale, ils sont nécessaires à la couverture des besoins énergétiques, laquelle provient du catabolisme des 3 principaux nutriments: glucides, protides, lipides.

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

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

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

I.3.1.Métabolisme des lipides et homéostasie du cholestérol.

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

- ***Au niveau de l'intestin*** **:** il se réalise l'entrée des nutriments (apport exogène par l'alimentation de lipides, protéines et glucides)**.**Les macromolécules lipidiques sont dégradées puis absorbées sous forme de chylomicrons. Les lipides du chyme sont hydrolysés dans le duodénum par les enzymes pancréatiques : lipase, phospholipase, cholestérol estérase. L'hydrolyse des lipides nécessite une émulsification en gouttelettes grâce aux sels biliaires. Les sels biliaires sont indispensables à l'action de la lipase pancréatique ainsi qu'un cofacteur protéique, la colipase.

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

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

- ***Au niveau du tissu adipeux*** : les lipides alimentaires sont pour plus de 90% des triglycérides.les quels sont à 75% captés et dégradés par le tissu adipeux. Le tissu adipeux met en réserve de l'énergie (besoins 24H/24)
- ***Au niveau du*** foie : les 25% restants des triglycérides vont dans le foie pour donner du glycérol et des acides gras libres par la TG lipase thermosensible (régulée par l'insuline, donc par la glycémie) Les acides gras libres sont ensuite stockés. Le foie fournit les lipides en fonction des niveaux de régulation fine (apport endogène). Les triglycérides formés ne seront pas stockés dans cet organe mais transformés en acides gras libres. Les acides gras libres donnent de l'énergie par la β–oxydation avec libération de CO_2, permettent la formation de corps cétoniques et la synthèse de cholestérol pour la formation des sels biliaires.
- ***Au niveau du tissu extra hépatique :*** le cholestérol peut s'associer aux triglycérides pour former les VLDL qui vont se diriger vers le tissu extra hépatique (comme le tissu musculaire). Ce tissu consomme d'énergie. Les muscles tirent 60% de leur énergie à partir de lipides. Les VLDL transportent des triglycérides du foie vers le tissu extra hépatique ; les LDL (issues des

VLDL) apportent le cholestérol. Les triglycérides sont donneurs de CO_2 via la β–oxydation.

- ***Au niveau du sang :*** les échanges entre les différents organes sont assurées.

I.3.2 Régulation de la biosynthèse du cholestérol

Le cholestérol a plusieurs fonctions **:**

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

Il est d'origine **:**

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

Environ 70% du cholestérol circule lié aux LDL.

La cholestérolémie dépend de la concentration plasmatique en LDL.

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

I.3.2.1 Synthèse du Cholestérol

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

La synthèse du cholestérol est cytoplasmique.

Tous les carbone du cholestérol proviennent de l'acétate qui provident lui même de l'acétyl CoA du métabolisme glucidique.

I.3.2.2 Métabolisme du cholestérol

Le foie est le lieu exclusif de transformation du cholestérol en acides biliaires.

Le foie est aussi un lieu important de synthèse de cholestérol.

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

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

Les IDL seront métabolisés de deux façons :

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

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

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

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

I.3.2.3 Régulation de la biosynthèse du cholestérol :

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

- **A court terme dans le foie :**

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

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

- ✓ Le glucagon va diminuer l'activité de l'HMG-CoA réductase et donc la synthèse de cholestérol.
- ✓ L'insuline va au contraire favoriser la synthèse de cholestérol.

- **A long terme dans les tissus périphériques :**

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

Apport du cholestérol:

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

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

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

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

I.3.2.4 Revue de littérature sur l'homéostasie du cholestérol et les transporteurs des lipides

L'homéostasie du cholestérol dans l'organisme est contrôlé principalement par synthèse endogène, l'absorption intestinale et de l'excrétion hépatique. Cette homéostasie déploie des mécanismes de régulation complexes qui impliquent à la fois l'absorption et la synthèse du cholestérol, donc des facteurs physiologiques, génétiques et nutritionnels. On sait que le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires sont liés. Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol. Après cet examen, environ 98 % des acides biliaires synthétisés sont conjugués à la glycine ou la taurine et excrétés dans la bile. La bile est stockée dans la vésicule biliaire jusqu'à ce qu'elle soit libérée dans le duodénum au cours de la prise alimentaire. Le transport des acides biliaires conjugués dans les principaux organes nécessite plusieurs transporteurs.

La modulation de l'excrétion de ces transporteurs peut être responsable de l'excrétion des acides biliaires à travers l'élimination du cholestérol. Le cholestérol transporté dans des LDL est principalement tirée de la synthèse de novo et l'absorption de l'alimentation (Turley et Dietschy, 1988). Dans la population, il existe une corrélation significative et positive entre le niveau de plasma de cholestérol LDL et l'efficacité de l'absorption intestinale du cholestérol (Kes, Niemi et Miettinen, 1987). Par conséquent, la compréhension de la régulation génétique de l'absorption du cholestérol peut conduire à de nouvelles approches pour le traitement des maladies cardiovasculaires qui touchent des millions de personnes dans les sociétés. Ainsi, de grands efforts ont été faits pour rechercher des déterminants moléculaires, génétiques, biochimiques et physico-chimiques de l'absorption intestinale du cholestérol (Lammert et Wang, 2005). Des études récentes montrent que les ATP-binding cassette (ABC), transporteurs ABCG5 et ABCG8 peuvent travailler ensemble comme une pompe apicale exportatrice de stérol en promouvant un efflux actif

de retour de cholestérol et de stérols végétaux depuis les entérocytes vers la lumière intestinale pour leur excrétion (Plosch, Bloks, Terasawa et *al*, 2004; Wang et *al*., 2005; Yu et *al*, 2003).

En outre, la protéine de Niemann -Pick C1 - like 1 (NPC1L1) nouvellement identifiée pourrait jouer un rôle critique dans la voie de l'absorption du cholestérol ézétimibe - sensible et pourrait induire l'afflux actif de cholestérol depuis la lumière intestinale vers les entérocytes (Altmann, Davis, Zhu et *al*., 2004 ; Davis, Zhu, Hoos et *al*., 2004).

Elle fonctionne comme un transporteur de stérols pour moduler l'absorption intestinale du cholestérol et contrebalancer l'excrétion de cholestérol hépatobiliaire. Cette notion de cholestérol hépatobiliaire appuie fortement l'idée selon laquelle l'absorption du cholestérol est un processus en plusieurs étapes qui est réglementé par de multiples gènes au niveau des entérocytes (Lammert et Wang, 2005; Wang et *al*., 2001) . Par conséquent, il est impératif d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents du rapport étape/facteur limitant la vitesse qui domine dans l'absorption du cholestérol. En effet les changements dans l'absorption du cholestérol et de son excrétion hépatique ont été reflétés par des changements dans les principaux transporteurs: ATP-binding cassette G5/G8 (Abcg5 / 8) et Nieman Pick C1 like 1 Protein (NPC1L1). Altmann et al. (2004) ont identifié une protéine transmembranaire polytopique nommée Niemann-Pick C1 -like 1 (NPC1L1), qui est localisée dans la membrane de la bordure en brosse de l'intestin grêle et qui régule l'absorption intestinale d cholestérol.

. Dans le foie, l'hétéro- dimère formé par la G5 ATP-binding cassette et G8 (Abcg5/g8) sécrète des taux de cholestérol dans la bile. Les deux ATP-binding cassette (ABC) demi- transporteurs , g5 et g8 , résident dans la membrane canaliculaire des hépatocytes et la membrane apicale des entérocytes absorbants où ils fonctionnent comme des hétéro dimères pour le transport de cholestérol et

des stérols non cholestérol dans le canalicule biliaire et la lumière intestinale pour leur excrétion fécale (Yu, Li- Hawkins et *al*., 2002; . Yu, Hammer et *al*., 2002; Graf, Li et *a.l*, 2002; Graf, Yu, Li et *al*., 2003). Au niveau de l'iléon, la protéine Nieman C1 like1 Protein (NPC1L1) pourrait permettre la capture intestinale du cholestérol biliaire et de l'alimentation.

I.4. Le rein, le foie et l'homéostasie du glucose.

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

I.4.1 Rôle du pancréas et l'insulino-sécrétion

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

Le pancréas est une glande double, à la fois exocrine et endocrine, située dans une anse du duodénum. La glande endocrine est représentée par de petits îlots cellulaires disséminés dans le parenchyme exocrine, les îlots de Langerhans, dont le diamètre varie de 100 à 300 mm et dont le total ne représente guère que 1% environ de la glande, soit un poids total de 1 à 2 g (figure 5).

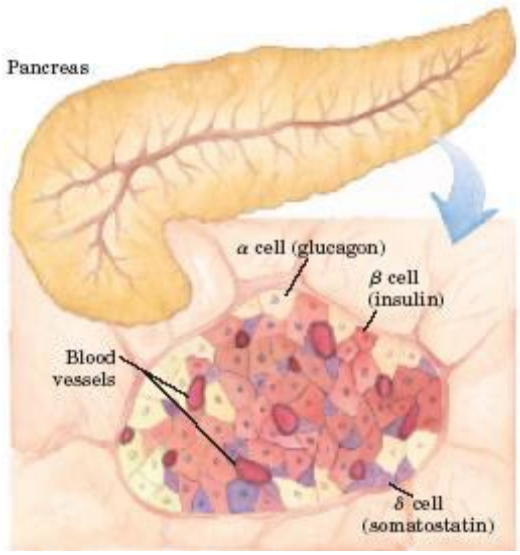


Figure 5: Les systèmes endocriniens du pancréas (Nelson D.L., Cox M., 2004**)**

Les sécrétions de l'insuline rejoignent la circulation sanguine via le foie. Le pancréas sécrète plusieurs hormones dont l'insuline et le glucagon (Nelson D.L., Cox M., 2004);

L'insuline est une hormone peptidique synthétisée dans les glandulaires des îlots de Langerhans ou cellules Bêta. L'incapacité de ces cellules à produire suffisamment l'insuline, entraîne un diabète. Elle stimule l'absorption du glucose sanguin par les tissus dits insulino-dépendants (foie, muscles squelettiques et tissu adipeux) et son stockage sous forme de glycogène. De plus, elle inhibe les voies de production hépatique de glucose (néoglucogenèse et glycogénolyse). Elle intervient enfin dans la régulation du métabolisme lipidique en inhibant la lipolyse des triglycérides adipocytaires et en facilitant leur synthèse, ainsi que celle de protéines dans le foie et le tissu adipeux (Capeau et al., 1996)

L'action de l'insuline est représentée sur la figure suivante (figure 6):

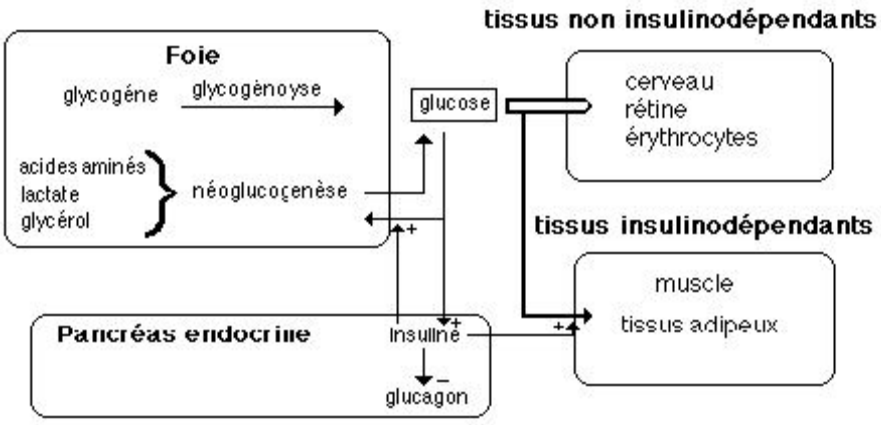


Figure 6: Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline (Oberley LW., 1988**)**

Au niveau des cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans les cellules en augmentant la perméabilité de leur membrane via des récepteurs au glucose (exemple : les GLUT 4). Au niveau du foie, elle stimule la glycogénogenèse. En fait, l'insuline abaisse le taux de glucose dans le sang en activant son utilisation dans l'organisme ; au niveau de tous les tissus, le glucose étant le « carburant » de choix de l'organisme. A cet endroit, la molécule du glucose entre dans les cellules et est utilisé 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 7.

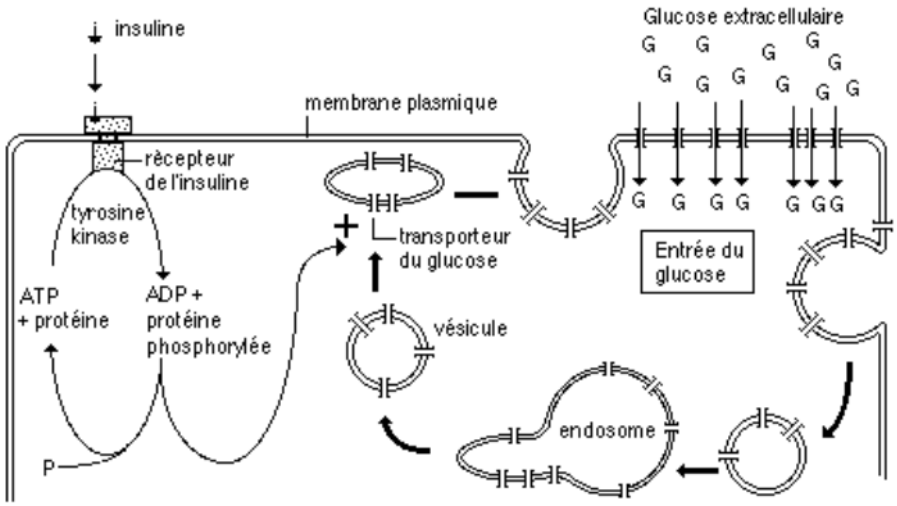


Figure 7: Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline (Kahn B.B., 1992)

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'insuline stimule l'enrichissement de la membrane plasmique en transporteurs GLUT 4, où des vésicules contenant les transporteurs fusionnent avec la membrane (Wang Y et *al.*, 1997).

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.

I.4.2 Rôle du foie

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

normale (entre 3.9 et 6.1 mmol/L ; soit entre 0.8 et 1 g/L) (Fusi et Bandera, 1998)

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

- La glycogénogénèse qui est une voie de synthèse du glycogène qui permet le stockage du glucose dans le foie sous forme de glycogène ;
- La glycogénolyse qui est une voie d'hydrolyse du glycogène (Jubinville, 1980) qui libère le glucose, sous forme de glucose-6-phosphate, par phosphorolyse 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 tel que l'oxaloacétate. Elle produit du glucose ou, en dernier recours, d'acides aminés. Elle est déclenchée par une baisse de la glycémie en dessous de sa valeur normale associée à un épuisement des réserves de glycogène et est nécessaire au bon fonctionnement du cerveau.

I.4.3 Rôle du rein

Grâce à sa fonction néo glucoformatrice, le rein secrète une hormone : le cortisol, produit par la glande corticosurrénale dans le cas d'un stress émotionnel fort. Le cortisol active dans le foie les enzymes de la 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 cétoniques. Le rein peut secréter du glucose si sa concentration circulante est très élevée (diabète sucré), ce qui ne se produit pas

chez un sujet sain; la glycosurie normale est nulle. Le glucose produit dans l'urine primitive est réabsorbé activement vers le sang au niveau du tubule proximal, pour maintenir une glycémie constante.

II. CHAPITRE II. METHODOLOGIE

II. **CHAPITRE II. METHODOLOGIE**

II.1 Cadre d'étude

L'étude a été réalisée entre les mois de juillet 2011 et mars 2012 dans la commune d'Abomey -Calavi, zone agro écologique VI, au sud du Bénin (Figure 8). Cette zone a un climat de type Guinéen avec deux saisons de pluies (avril à juillet, septembre à novembre) ; la pluviométrie varie de 1000 à 1400mm et son sol est latéritique, ferrugineux ou hydromorphe.

Les écorces de *Khaya senegalensis* ont été récoltées en juillet 2011. Elles ont été séchées à l'ombre dans un local aéré après identification suivant les clés de reconnaissance de la flore analytique du Bénin**.**

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

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

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



Figure 8: Zones agro-écologiques du Bénin (Attindéhou, 2013)

Il s'agit d'une étude préclinique où il a été utilisé deux modèles animaux (lapins de race zélandaise, sourie) et un modèle cellulaire (hépatocytes de rat Wistar).

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Matériel

Le matériel végétal est constitué d'écorces de tronc de *Khaya senegalensis* récoltées dans la commune d'Abomey Calavi, zone agro écologique VI, au sud du Bénin.

Le matériel animal est constitué d'une part de 24 lapins (*Oryctolagus cuniculus*) de poids corporel compris entre 1,155 et 1,370 kg, fournis par l'animalerie du département de zootechnie de l'université d'Abomey Calavi. D'autre part, 30 souris C57BL/6J mâles de 08 semaines d'âge ont été utilisées dans un test complémentaire.

Le matériel biologique est constitué de foie (lapin, rat, souris) et de rein (lapin).

Le matériel de laboratoire est composé de broyeur électrique pour pulvériser le matériel végétal séché, de balance analytique de marque **SARTORIUS®**, pour réaliser les différentes pesées, d'évaporateur **ROTAVAPOR®**pour concentrer l'extrait liquide en pâte**,** d'étuve pour sécher l'extrait pâteux , de microtome (de marque AO Scientific Instruments 820) pour réaliser les coupes histologiques, de microscope photonique binoculaire (de marque Olympus-41muni d'une camera JVC, ½ pouce) pour la lecture et la photographie des coupes histologiques, de logiciel de traitement d'images (Adobe Photoshop), de trousses chirurgicales pour disséquer les lapins et prélever les organes d'intérêt, de centrifugeuse (de marque SIGMA 204, Allemagne) pour séparer le plasma ou le sérum du culot ou caillot de sang, de spectrophotomètre (de marque KENZA MAX, Biolabo ; France) pour le dosage des différents paramètres biochimiques, de hotte de protection contre les vapeurs des réactifs, des récipients en verre ou en porcelaine (bocaux, boîtes, éprouvettes, beacher, erlenmeyer, capsule en porcelaine…), des accessoires

(coton fibre hydrophile, des pipettes, des micropipettes EPPENDORF®, des potence et anneau, spatule en inox, baguettes de trituration, lames porte-objets, lamelles, tubes à essais sous vide, aiguilles de prélèvement de calibre G21, cassettes tissue-tek III…), des solvants (éthanol 96%, méthanol, éther, eau distillée) des solutions (Mack Ewen, Sérum physiologique, Actrapid NOVO NORDISK (insuline à 100UI /ml) et des réactifs : réactif GOD-PAP®Biolabo : lot : 021101A / 2013/02 IVD (tableau V) pour déterminer la glycémie , le Kit BIOLABO TRIGLYCERIDES méthode GPO du lot 071106B de REF. 80019 (tableau V) pour déterminer le taux sanguin de triglycérides, le Kit BIOLABO S.A France CHOLESTEROL CHOD-PAP, du lot 081104A de REF. 80106 (tableau VI) pour déterminer les cholestérols, des réactifs du screening phytochimique (tableau VII), des réactifs pour réaliser les coupes histologiques (Xylène, réactif de Schiff, acide périodique, formol à 10%, paraffine), des réactifs de RT-PCR pour réaliser la détermination des Abcg5 et des NPC1L1 : Trizol (Invitrogen Life Technologies, Groningen, the Nederland), amorces et sondes (tableau VIII)

Tableau V : Composition du réactifs GOD-PAP® pour dosage enzymatique de glucose

Coffret de réactif GOD-PAP®	
Tampon phosphate	150mmol/L
Glucose oxydase (GOD)	20000UI/L
Peroxydase (POD)	1000UI/L
4-AMINO-antipyrine(PAP)	0,8mmol/L
Chloro-4-phénol	2mmol/L
Solution de glucose	1g/L (5,55mmol/L)

Tableau VI : Composition des réactifs utilisés dans le dosage enzymatique des triglycérides et des cholestérols

Coffrets de réactifs	Triglycéride	LDL-Cholestérol	Cholestérol Total	Cholestérol HDL
Flacon Contenant	Lipase : 1500 U/L POD : 1800 U/L Glycérol 3 phosphate oxydase : 4000U/L Glycérol kinase : 1000U/ L 4 aminoantipyrine :0.3mmol/L Adénosine triphosphate Na : 1.723mmol/L	Tampon Acide Morpholino-éthane-Sulfonique (MES) ph 6,3 4-Amino-antipyrine Acide ascorbique Peroxydase, Cholestérol oxydase, Cholestérol estérase, Détergent1	Cholestérol estérase :170 U/L Cholestérol oxydase : 100U/L POD :1200U/L Sodium cholate : 2mmol/L 4 aminontipyrine : 0.3mmol/L	Acide phosphotungstique : 13.9mmol/L Chlorure de magnésium : 570mmol/L

Tableau VII : Réactifs du screening phytochimique

Réactifs	Groupes chimiques caractérisés
Réactif de Stiasny	tanins catéchiques tanins galliques
Acétate de sodium	tanins catéchiques tanins galliques
Chlorure ferrique	tanins galliques
Anhydride acétique	stérols polyterpènes
Acide sulfurique concentré	Stérols Polyterpènes
Alcool chlorhydrique dilué 2 fois	Flavonoïdes
Copeaux de magnésium	Flavonoïdes
Alcool isoamylique	Flavonoïdes
Solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 %	Polyphénols
Réactif de Bornstraëgen	substances quinoniques
Chloroforme	substances quinoniques
Ammoniaque dilué 2 fois et l'acide chlorhydrique	substances quinoniques
Ethanol 60°	Alcaloïdes
Réactif de Burchard (réactif iodo-ioduré)	Alcaloïdes
Dragendorff (réactif à l'iodobismuthate de potassium).	Alcaloïdes

II.2.2. Méthodes

II.2.2.1. Préparation de l'extrait des écorces de *Khaya senegalensis*

Les écorces séchées de *Khaya senegalensis* ont été réduites en menus morceaux et ensuite broyées dans le moulin à couteaux. 100g de la poudre obtenue, pesés à l'aide d'une balance analytique **SARTORIUS®** et déposés dans un bocal de 750ml de capacité, ont été macérés dans 500ml d'éthanol 96%

pendant 72heures. 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 **ROTAVAPOR®**. 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 puis gardés dans des bocaux secs de 100ml de capacité préalablement étiquetés. Le rendement de l'extraction a été calculé selon la formule suivante :

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

Le principe est le suivant : l'extraction solide-liquide utilisée et l'état physique de la plante, réduite en poudre, à permis au solvant, méthanol pure de franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif a l'intérieur du solide (matière végétale) et ressortir le soluté (Maroua FERHAT, 2009)

II.2.2.2. Screening phytochimique.

Il est basé sur les réactions (coloration et précipitation) différentielles des principaux groupes de composés chimiques contenus dans les plantes selon la méthode de HOUGHTON et RAMAN A (1998) expliquée par Koffi en 2009, revue et adaptée aux conditions du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de l'ISBA.

II.2.2.3. Préparation du matériel biologique

Les étapes de la préparation du matériel biologique :

- disséquer un rat,
- prélever le foie du rat,

- conserver l'organe prélevé dans un bocal contenant de la solution réactionnelle.

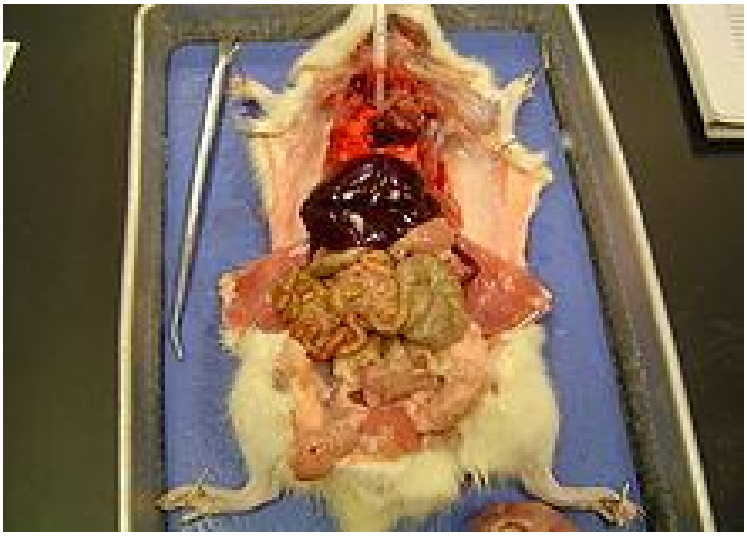


Figure 9 : Rat disséqué

II.2.2.4. Préparation de la solution Mack EWEN

Les réactifs utilisés sont :

- le chlorure de sodium (NaCl) de concentration 100 mM,
- le chlorure de potassium (KCl) de concentration 7 mM,
- le dichlorure de calcium ($CaCl_2$) de concentration 1,2 mM,
- le sodium dihydrogène phosphate(NaH_2PO_4) de concentration 25 mM,
- le di sodium d'hydrogène phosphate(Na_2HPO_4) de concentration 10 mM,
- le BSA (protéine) de concentration 1%.

Calcul des masses des différents réactifs utilisés

$$m = cvM$$

Avec

m = masse des réactifs

v = volume du solvant

c = concentration du produit

M = masse molaire moléculaire du réactif

M (NaCl) = (23+35, 5) g M (NaCl) = 58,5g

M (KCL) = (40+35, 5) g M (NaCl) = 75,5g

M ($CaCl_2$) = (35,5+35,5+39) g 2 M ($CaCL_2$) = 110g

M (NaH_2PO_4) = (23+2+ (16)4+31) g M (NaH_2PO_4) = 120g

M (Na_2HPO_4) = (23+23+1+31+ (16)4) g M (Na_2HPO_4) = 142g

V = volume du solvant v= 250 mL

m (NaCl) = 1,46g

m (KCl) = 0,13g

m ($CaCL_2$) = 0,033g

m (NaH_2PO_4) = 0,75g

m (NA_2HPO_4) = 0,35g

BSA 1%

1g ⟶ 100mL X= 2,5g

X ⟶ 250mL X= masse du BSA

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

II.2.2.5. Mise en condition des lapins et préparation des lots expérimentaux

Ces animaux ont été nourris exclusivement de fourrages et abreuvés d'eau; ils n'ont reçu aucun autre traitement médicamenteux dans le temps en dehors de l'extrait. Ils ont été répartis au hasard en huit lots de 3 lapins traités comme suit :

- le lot 1 (L_1) a été le lot témoin, recevant par administration orale, de l'eau distillée à la place de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*,

- le lot 2 (L_2) a été le lot traité par administration orale, à la dose de 0.5mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 15 jours.
- le lot 3 (L_3) a été le lot traité par administration orale, à la dose de 1mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 15 jours.
- le lot 4 (L_4) a été le lot traité par administration orale, à la dose de 2.5mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 15 jours.
- le lot 5 (L_5) a été le lot traité par administration orale, à la dose de 5mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 15 jours.
- le lot 6 (L_6) a été le lot traité par administration orale, à la dose de 10mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 15 jours.
- le lot 7 (L_7) a été le lot traité par administration orale, à la dose de 25mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 15 jours.
- le lot 8 (L_8) a été le lot traité par administration orale, à la dose de 50mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30 jours.

II.2.2.6 Tests biochimiques.

Afin de doser la glycémie, les triglycérides, les cholestérols, l'urée et des enzymes hépatiques telles que l'alanine amino transférase (ALAT), l'aspartate amino transférase (ASAT) et la gamma glutamyl transpeptidase (Gamma GT) chez les lapins, nous avons prélevé sous vide, du sang de ces animaux, à partir de la veine marginale de l'oreille ; le sang est recueilli dans des tubes à essais secs (pour les triglycérides, les cholestérols, ….) et avec anticoagulant (l'EDTA,

pour la glycémie), et ensuite est centrifugé à 3000 tours/minute pendant 5 minutes ; le sérum et le plasma surnageant ont été décantés et gardés pour le dosage de ces paramètres.

- **Glycémie.**

Nous avons dosé la glycémie par la méthode enzymatique avec le réactif GOD-PAP®Bio labo : lot : 021101A / 2013/02 IVDSA France (tableau 8), aux temps T_0, T_0+6heures, T_0+12heures et T_0+18heures, T_0+24heures, T_0+7jours et T_0+15jours, T_0 correspondant au temps de prélèvement au terme des 12heures de jeûne, avant l'administration de l'eau distillée et de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis.*

Le principe du dosage 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.

$$\text{Glucose} + \tfrac{1}{2}\, O_2 + 2H_2O \longrightarrow \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

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 **(**Farrance**,** 1987 **;** Trinder**,** 1969).

Tableau VIII: Méthode de dosage de glucose : mode opératoire

Tube	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif	1mL	1mL	1Ml
Eau distillée	10µl	-	-
Etalon	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10µl

Bien mélangé pendant 10minuit à 37°c ou 20minuites à température ambiante.

NB : la coloration est stable 15à 20minuites puis décolore lentement.

- **Triglycérides**

Le Kit BIOLABO TRIGLYCERIDES méthode GPO du lot 071106B de ref 80019 SA France est utilisé pour déterminer le taux sanguin de trigycérides. Pour le dosage nous avons prélevé 10 µl de sérum dans les tubes de dosage puis nous y avons ajouté 1 ml de réactif. Le mélange est porté à température ambiante pendant 10 min. La lecture de la densité optique (DO) s'est faite dans le spectrophotomètre à 540 nm conformément au principe de dosage.

Le principe de dosage est basé 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 $\xrightarrow{\text{LIPASE}}$ Glycérol + acides gras libres

Glycérol + ATP $\xrightarrow[\leftarrow]{\text{GK}}$ Glycérol-3-phosphate + ADP

Glycérol-3-phosphate + $O_2 \xrightarrow[\leftarrow]{\text{GPO}}$ Dihydroxyacétone phosphate + H_2O_2

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

L'absorbance du complexe coloré (quinonéimine), proportionnelle à la concentration en triglycérides dans l'échantillon du sérum est mesuré à 500nm (Trinder**,** 1969 ; Fossati et Prencipe**,** 1982**)**.

H_2O_2+ chloro-4-phénol + 4-aminoantipyrine $\longrightarrow$ quinonéimine + $4H_2O$

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en triglycérides dans le spécimen.
Le résultat est déterminé d'après la formule ci-après.

$$\textbf{\textit{Résultat}}\ (g/L) = \frac{\textit{Abs (Echantillon)}}{\textit{Abs (Etalon)}} \textit{X Concentration Etalon}$$

- **Cholestérol total.**

Le Kit BIOLABO CHOLESTEROL CHOD-PAP du lot 081104A de REF 80106SA France a été utilisé.

Le principe du dosage est le suivant : la cholestérolémie a été déterminé suivant la méthode enzymatique CHOD-PAP décrite par Allain et al., selon le schéma suivant :

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 (Allain et al, 1974). Cette intensité est mesurée au spectrophotomètre à 500nm.

Le résultat est donné par la formule suivante.

$$\textbf{\textit{Résultat } (g/L)} = \frac{\textbf{\textit{DO (Echantillon)}}}{\textbf{\textit{DO (Etalon)}}} \textbf{\textit{X Concentration Etalon}}$$

- **Urémie.**

  L'urée a été dosée par la méthode décrite par Toro et Ackermann en 1975.

- **Transaminases (ASAT, ALAT)**

Les tests ont été réalisés suivant la cinétique enzymatique IFCC comme l'ont exposé Attakpa et al en 2012. Le principe est base sur la détermination de l'activité de GOT ou de GPT selon les réactions suivantes :

ASAT

L-aspartate + 2-Oxoglutarate → oxaloacétate + Lglutamate oxaloacétate + NADH + H+ → NAD+ + Lmalate

ALAT

alanine + glutamate de l'acide alpha-céto pyruvique + glutamate → Acide pyruvique + NADH + H+ → NAD+ + lactate

La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH à NAD+ et proportionnelle à l'activité de GOT (ou GTP) a été mesurée par spectrophotométrie à 340 nm.

- **Gamma GT.**

- **Glucose 6 phosphates déshydrogénasse (G6PD) hépatique et rénale**.

II.2.2.7. Quantification des ABCG5 et des NPC1L1 par RT-PCR.

II.2.2.8. Prélèvement d'organes et réalisation de coupes histologiques

Les 24 lapins ont été anesthésiés à l'éther puis sacrifiés, 24 heures après la fin du traitement. Le foie et le rein prélevés ont été immergés dans de la solution physiologique et transportée dans la demi-heure qui suivait au laboratoire.

Ensuite les fragments de foie et de rein ont été immédiatement fixés dans du formol à 10%.puis passés successivement aux autres étapes du processus d'étude histologique citées ci-après.

La Fixation. Elle a été faite par immersion dans le formol. On immerge le tissu dans un volume adéquat de liquide fixateur. Il est important de ne jamais verser le liquide sur le tissu (ce qui peut causer des déplacements de substances), mais plutôt de plonger le tissu dans une quantité de liquide déjà préparé. Le formol est utilisé en solution aqueuse à 10%(4% de formaldéhyde).

La Circulation. Elle suit trois étapes pendant lesquelles, les tissus sont contenus dans des cassettes tissue-tek III.

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

L'éthanol présente une grande miscibilité à l'eau et provoque une forte réaction et un durcissement assez important du tissu. Cette étape consiste au

passage des tissu dans huit bains d'éthanol de degré croissant : 70° ; 80° ; 90° ; et cinq bains de 100° d'une durée de quarante cinq minutes. Pour que la déshydratation soit la plus complète possible, il faut que les derniers bains contiennent l'éthanol à l'état pur. Il faut procéder graduellement et avec prudence car, si l'on transfère le tissu directement du formol à un bain d'éthanol absolu, la rétraction survient trop rapidement et entraîne une certaine distorsion des structures. L'éthanol n'étant pas miscible avec la paraffine il est utile d'utiliser un liquide intermédiaire miscible avec la paraffine: le xylène, c'est l'éclaircissement.

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

L'imprégnation Elle est l'étape terminale de la circulation ; en fait, les deux autres étapes n'existent que dans la mesure où elles préparent le tissu à subir l'imprégnation. L'agent le plus fréquemment utilisé pour ce faire est la paraffine. Elle consiste au passage successif des tissus dans trois bains de paraffine de 45min.

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

solidifiée sur une plaque réfrigérante de 3°C à 4°C pendant quelques minutes. Après solidification, le moule a été débarrassé du bloc. Ainsi, nous obtenons un bloc prêt à la coupe**.**

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

Confection de rubans grâce au Microtome. C'est une étape qui consiste à faire des coupes d'une épaisseur de l'ordre de 5 micromètres (µm) à l'aide d'un microtome qui possède un porte bloc où place le bloc de paraffine. Ici le microtome utilisé est le « 820 »Spencer microtome.

Le bloc ou son support est introduit dans la pince à objet et immobilisé grâce à la vice de blocage, qui ne doit pas être serrée trop fortement.

Le tissu étant toujours recouvert d'une mince couche de paraffine il faut avant d'obtenir des coupes utiles l'enlever grâce à l'opération appelée rabotage. Pour le faire le microtome a été réglé à 5µm.

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

Etalement des rubans de coupes. On utilise une plaque chauffante (chauffée à 55°C) sur laquelle on dépose les lames préalablement marquée que l'on recouvre d'eau gélatineuse qui est ici le liquide d'étalement. On y place les coupes, puis on les étale. A la fin de l'opération, on absorbe l'excès de liquide avec un papier buvard. Puis, les lames sont séchées à l'étuve dont la température est portée à 55°C pendant 30minutes (min) **(**Jubinville, 1980 ; Hould,…)

Coloration des lames. Le procédé de coloration des coupes à la paraffine comporte deux temps. Il y a:

- ✓ d'abord les étapes préparatoires à la coloration subdivisée en deux volets : le déparaffinage et l'hydratation ;

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Il consiste à passer les coupes dans deux bains de xylène, pendant 5 minutes chaque fois.

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

- ✓ Puis, celles de la coloration proprement dite grâce à la méthode à l'Acide Périodique-Schiff (APS) aussi appelée réaction de Hotchkiss-McManus,

La méthode à l'acide periodique-Schiff est basée sur deux découvertes différentes :

- la réaction de Malaprade (1928), où on utilise l'oxydation par l'acide periodique pour transformer des groupes glycol en aldéhydes ;
- la leucofuchsine de Schiff (1966), solution de fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux, qui réagit avec les aldéhydes libres pour produire une coloration rouge **(Hould,…)**

- ➢ ***Mode Opératoire***

Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet (10minutes) ;
Rincer à l'eau distillée ;
Oxyder avec l'acide périodique à 1% (15minutes) ;
Laver à l'eau courante (10minutes);
Rincer à l'eau distillée;

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

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

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

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

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

Déshydrater, éclaircir et monter à l'Eukitt **(Hould,…)**

Résultats

- Substances positives à l'APS : rose à rouge-pourpre
- Noyau : bleu
- Fond : teinte vert pâle

✓ Et, enfin, les étapes préparatoires au montage : déshydratation, éclaircissement.

Le montage. Il se fait grâce à l'Eukitt.

Lecture des lames. Elle s'est faite au microscope photonique de marque Olympus-41 muni d'une camera (JVC, ½ pouce) aux grossissements 100 et 400 reliée à un ordinateur doté un logiciel de traitement d'images (Adobe Photoshop) où celle-ci sont transférées.

Valeurs référentielles : 0,7 à 1,1 g/l

III CHAPITRE III. RESULTATS

III CHAPITRE III. RESULTATS

III.1. **Revue de littérature sur *Khaya senegalensis.***

Cette revue de littérature contemple tous les aspects sur *Khaya senegalensis* à savoir: la botanique, la description, la distribution, les effets biochimiques, l'utilité thérapeutique, la composition chimique, les effets tissulaires ou organiques des extraits et les risques toxicologiques. Ce travail a donné lieu à une publication : **Marcellin Cokou TAKIN[1],** Sabbas ATTINDEHOU[2*], Alphonse SEZAN[1], Sèlidji Eugène ATTAKPA[1] and Lamine BABA-MOUSSA[3], **2013**. **Bioactivity, therapeutic utility and toxicological risks of *Khaya senegalensis*. Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, 2013; 1(4):122-129.**

PUBLICATION N°1

Références : **Marcellin Cokou TAKIN[1],** Sabbas ATTINDEHOU[2*], Alphonse SEZAN[1], Sèlidji Eugène ATTAKPA[1] and Lamine BABA-MOUSSA[3], **2013**. **Bioactivity, therapeutic utility and toxicological risks of *Khaya senegalensis*. Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, 2013;1(4):122-129**.

Indian J.Pharm.Biol.Res. 2013;1(4):122-129

CODEN (USA): IJPB07 ISSN: 2320-9267

Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research (IJPBR)

Journal homepage: www.ijpbr.in

Review Article

Bioactivity, therapeutic utility and toxicological risks of *Khaya senegalensis*

Marcellin Cokou TAKIN[1], Sabbas ATTINDEHOU[2*], Alphonse SEZAN[1], Sèlidji Eugène ATTAKPA[1] and Lamine BABA-MOUSSA[3].

[1]*Laboratoire de Biomembrane et de signalisation Cellulaire. Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin.*
[2]*Laboratoire de Recherches en Biologie Appliquée. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin.*
[3]*Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie. Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin.*

ARTICLE INFO:

Article history:
Received: 31 October 2013
Received in revised form:
12 November 2013
Accepted: 22 November 2013
Available online7 December 2013

Keywords:
Khaya senegalensis,
West Africa,
Pharmacopoeia,
Bioactivity,
Efficacy, Toxicity.

ABSTRACT

Vegetative organs of *Khaya senegalensis* (Ders.) A. Juss. are widely used in African pharmacopoeia. A review of pharmacological studies, focused on this plant, was carried out, using the available scientific literature. Several studies have revealed its bioactive properties and therefore its medical efficacy. Aqueous and alcoholic extracts of the stem bark and leaves of this plant have shown efficient in the treatment of some bacterial infections. Their widely reported biochemical effects, such as α-amylase activity inhibition, decreasing in bowel motility and in some blood and serum enzyme (Aspartate transferase, Alanine transferase and Alkaline phosphatase) justify indications against diabetes, diarrhea and liver disorders. Antiparasitic properties directed against helminths and coccidian are also attributed to these herbal medicines. However, according to some results recorded in various studies, this plant has a high risk of toxicity in chronic treatment (several weeks). Histotoxic effects (in liver and kidney) resulting in increased of plasma total protein, blood urea and creatinine are reported.

1. Introduction

However, herbal medicine still largely based on recipes and empirical operations, it's increasingly used as the main alternative to conventional chemical medication [1-3]. Its renewed interest grows continuously in low-income areas as much as people worry about the controversy on the effectiveness and the cost of drugs. This motivated, in the past decade, a plethora of programs focused on the verification of the bioactivity of many plants supposed to have therapeutic virtues. In this path, some plants including *Khaya senegalensis* are particularly indexed by many African communities [3-5]. Leaves and stem bark extracts of *Khaya senegalensis* are effective against several human and animal diseases [6-12]. The great advantage and the real sociological and medical importance of this component of the tropical flora are well reflected in the profusion of scientific work carried out around the world.

1.1 *Botany, description, and distribution of Khaya senegalensis*

Khaya senegalensis (Ders.) A. Juss (Figure 1) is a large and sturdy tree (up to 35m high with a diameter of 1 to 3m) of Meliaceae family. Also named Senegal mahogany, it is a forestry species well known and exploited by Africans [13]. It has pinnate leaves, glabrous with 6 to 12 alternate or opposite elliptical-oblong leaflets. At the flowering, *K. senegalensis* twigs carry at

Corresponding Author: Sabbas Attindehou, Université d'Agriculture de Kétou, UFR des Sciences et techniques de Production Animale. BP :43 Kétou, Bénin. **E-Mail:** sabbastino@yahoo.fr

their ends panicles of small white flowers consisting of successive whorls of four floral parts. Its fruits are capsules with thick and woody seed coat. These capsules are dehiscent and have four valves that allow to see the flat seeds closely applied against each other [14]. The bark of this tree is very thick, scaly and dark brownish-gray colour (Figure 2). In section it oozes reddish exudates.

Khaya senegalensis favourable habitats are those in wet soils, deep; alluvial; the edge of streams and non-flooded lowlands. It also accommodates dry or superficial or lateritic stations when rainfall is between 650-1300 mm during 4-7 months [15]. It inhabits Sudanese and Sudanese-Guinean regions [16]. It is abundant in the woodlands of most countries in the Guinea Gulf (Cameroon, Gabon, Nigeria, Benin, Togo, Ivory Coast, Guinea, Guinea Bissau, Gambia and Senegal) where it is known under various local names (Table 1) and where its usefulness is widely reported [17-20]. But its distribution is much wider, ranging up Sudano-Sahel (Burkina Faso, Niger, Mali, Chad).

1.2 *Chemical composition of Khaya senegalensis*

The determination of the chemical composition of *Khaya senegalensis* has a long history that began on 19th century with Caventou [21] who revealed in a macerated bark, non-nitrogenous piero-resin which he called caïlcedrin, some colouring substances, sulphate of lime, chloride of lime, phosphate of lime, gum, starch, wax and a very small amount of fuel (. A century later, Moyse-Mignon [22] found in the leaves of *K. senegalensis*, 2% sucrose, saponin and bitter principle obtained with varying yields 0.90% in the bark of the trunk. The caïlcedrin could be a mixture of two unsaturated compounds containing a phenolic oxydryle, a methoxy group and lactose functions. More advanced work revealed the presence of triterpenoids with lactose or epoxy function and furan ring, which may exist in different forms in the plant organs. Adesogan et al. [23] listed these components according to the plant organs (Table 2). Phytochemical screening of trunk bark allowed Lompo [24] to highlight the main chemical groups in *K. Senegalensis*: fatty acids, carotenoids, coumarins, emodols, tannins, compounds reducers, anthracenosides, steroidal glycosides, flavonosides, carbohydrates, saponins, sterols and triterpenes, anthocyanins. Recently, Yuan et al. [25] and Bickii *et al.* [26] reported the isolation of some limonoids named Khayalenoids from the stem and bark. Yuan et al. [25] well elucidated the structures of those molecules based on spectroscopicanalysis.



Figure 1: ***Khaya senegalensis*** **(Desr.) A. Juss.**

Photo retrieved from website: http://www.visoflora.com/images/original/photo-n-1-khaya-senegalensis-visoflora-12694.jpg on 2013-04-28

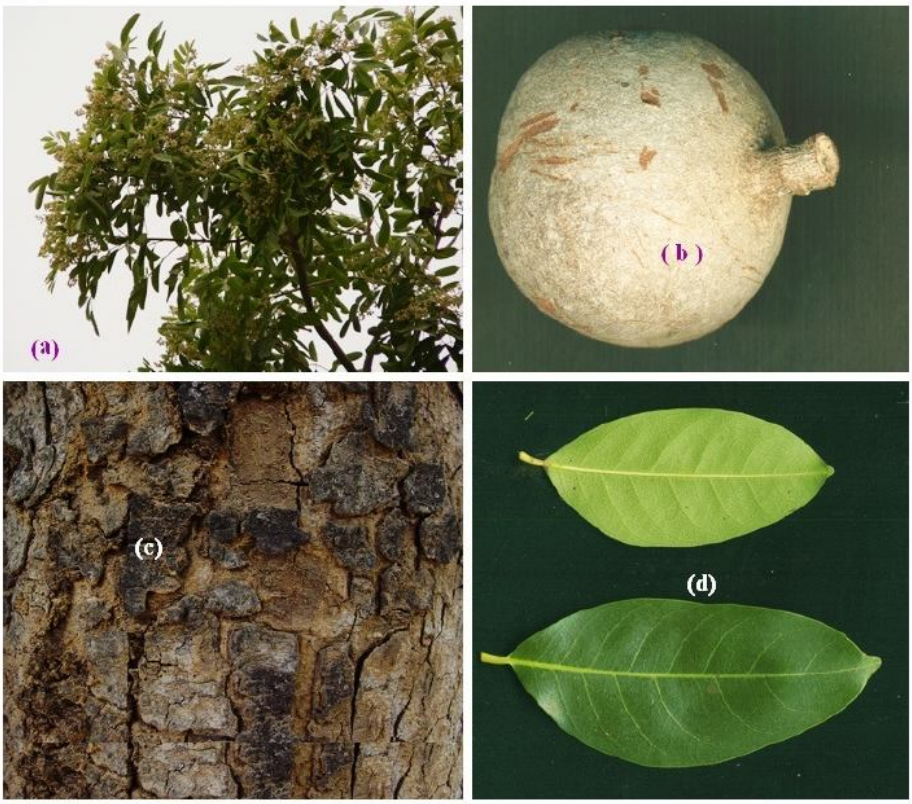


Figure 2: Vegetative Organs of *Khaya senegalensis* (a=flowers, b=fruit, c= stem bark, d=leaf)

Photo PUBW - Retrieved on 2013-04-28 from website: http://bangr-weoogo.csregistry.org/tiki-browse_gallery.php?galleryId=10

Country	Local name	Language	Reference
Senegal	*Hay*	Wolof	Ndiaye [27]
Niger	*Madotchi* *Farrey*	Haoussa Djerma	
Nigeria	*Aganwo* *Madaci* *Ono*	Yoruba Haoussa Igbo	Abubakar et *al.* [12]
Cameroun	*Jala*	Bambara	
Togo	*Mahogen*	Ewé	
Burkina Faso	*Kuka*	Mossi	Daniel-Yves [28]

Table 1: Local names of *Khaya senegalensis* in Africa

Plant organ	Compounds
Stem bark	7-Diacetyl-7- oxogedunine ; Methyl -angolensate; Methyl-6-hydroxyangolensate; 3-destigloyl-dioxy-3B, 12B –diacetoxyswietenine;
Wood	Mexicanolide ; Khayasine ; 3-deisobutyryl-3B tigloyl-oxy- Khayasine ; 3-deisobutyryl-313 benzoylo-oxykhayasine ; Methyl -angolensate; 7-diacetyl-7-oxogedunine 3-destigloyl-6-dioxy-3B ; 213 – diacetoxyswietenine ; senegalensate of methyl
Seed	Khivorine ; 3-diacetylkhivorine ; 7-diacetyl-7-oxokhivorine 3, 7-diacetyl-7-Oxokhivorine ; 3-destigloyl-6-dioxy-swietenine ; 3-B-acetoxy-swietenine.
Roots	Khayasine
Root bark	Methyl-6 hydroxyangolensate

Table 2: Overview of triterpenoids contained in *Khaya senegalensis*

Indications	Herbal medicine	Efficiency report	References
Diarrhoea	Aqueous and methanolic extracts of leaves	Bowel activity reduction = anti diarrhoea properties	Nwosu et al. [29]
Bacterial Infections	Aqueous extracts of leaves	Antioxidant and antibacterial potency against *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*	Konaté et al. [30]
Cancer	Bark or stem bark methanolic extract	Anti-proliferative and anti-inflammatory effect Pro-apoptotic effect on HT-29, HCT-15 and HCA-7 cells.	Zhang et al. [31]; Androulakis et al. [32]
Helminthosis	Bark extracts	Effectiveness against some genera of parasites: *Haemonchus, Cooperia, Oesophagostomum* and *Trichostrongylus*	Chiezey et al., [33] Okpara et al., [34]
Trypanosomosis	Bark aqueous extract	Significative decreasing in blood *parasite burden* with 60 – 100 $mg.kg^{-1}$ bw within 6 days (experimental infection with *Trypanosoma brucei* in rats) anti -*Trypanosoma evansi* activity	Ibrahim et al. [11] Umar et al. [35] Shaba et al. [36]
Diabetes	Stem bark aqueous extract Leaves aqueous extract	Anti hyperglycaemic effect in rats Inhibition at 45 – 75% of α-amylase activity	Kolawole et al. [37] Funke and Melzig [38]

Table 3: Efficiency of *Khaya senegalensis* extracts

1.3 Reports on the therapeutic efficacy of *Khaya senegalensis*

Various extracts of leaves, bark or seeds of *K. senegalensis* were reported to have cure properties against several human diseases and have been tested in efficacy trials. Limonoids isolated from other one species of *Khaya* (*Khaya grandifoliola*) is declared highly effective against the causative agent of malaria, *Plasmodium falciparum* [26]. Table 3 provides a summary of therapeutic uses and efficiency confirmations.

1.4 Biochemical and tissue effects of *Khaya senegalensis* extracts

Studies from various backgrounds have shown that organs extracts of *Khaya senegalensis* induce significant changes in blood biochemical parameters. Ayo et al. [9], after a physicochemical study, indicated that the extracted oil from the seeds of this plant is rich in bioactive substances that induce prophylactic and therapeutic effects.

1.5 *Effects on blood biochemical and haematological compounds*

According to Kolawole *et al.* [37], the aqueous extract of the bark of *K. senegalensis*, at 100 and 200 mg.kg^{-1} body weights during 18 days, increases plasma levels of liver enzymes namely, Aspartate Amino-Transferase (AST), Alanine Amino-Transferase (ALT) and Alkaline Amino-Phosphatase (ALP) in rats. The same effect was recorded by Abubakar *et al.* [12] with much lower doses (10-40 mg.kg^{-1} BW) administered for 28 days to albinos rats. Yakubu *et al.* [39] also reported that the daily administration of the ethanolic extract of the bark of *K. senegalensis* (2 mg.kg-1 BW for 18 days) in rats resulting increased the concentration and activity of liver enzymes (ALP, AST and ALT). Then, these authors concluded to a cytolytic effect of the extract on the liver.

However, reducing effects of the activity of ALT are revealed by the prolonged administration of a dose of 2mg.kg-1 BW of the ethanol extract of *K. senegalensis* [40]. Ali *et al.* [41] also reported a significant decrease in the activity of liver enzymes (AST, ALT and ASP) in albino rats at doses of 250 mg.kg^{-1} and 500 mg.kg^{-1} of BW for 5 days.

On the other hand, some reports evoke the reduction effect of serum AST, ALT and ALP. This potential, synonymous of hepatoprotective properties of *K. Senegalensis*, was highlighted by Ibrahim *et al.* [11] which reported a lower rate of transaminases in experimentally trypanosomosis due to *Trypanosoma brucei*, a great destroyer of liver parenchyma [42]. Sule et al. [43] also evaluated the hepatoprotective effect of an aqueous bark extract administered to rats whose liver was subjected to the toxic effect of tetrachloride (CCl_4). These authors observed with a dose of 80 mg per kg of body weight for 6 days no signal of toxicity. The protective effect of the extract is then well highlighted.

A nephroprotective effect of *Khaya senegalensis* aqueous extract was also reported. Wistar rats with renal dysfunction caused by Gentamycin administration (100 mg.kg^{-1} BW), when they were treated with aqueous extract of *K. senegalensis* at 500 and 250 mg.kg^{-1} BW showed a significant improvement of their renal

function with ameliorated concentrations of serum urea, creatinine, total protein and albumin and similarly repair of damage in the kidney tubules [44].

A dose-dependent increase in blood levels of total protein, urea, globulin and creatinine have been reported in rats by Kolawole *et al.* [37]. These effects were registered at doses of 100 and 200 mg.kg^{-1} BW administered for 18 days. But Ali et al. [41] reported, for higher doses (250 mg.kg^{-1} and 500 mg.kg^{-1} BW) and shorter duration of treatment (5 days), reduced concentrations of the same parameters. This discrepancy between the two observations suggests that a long treatment reverse the biochemical effects of *Khaya senegalensis* extracts and inducing histological damages of the liver, kidney, heart...The extracts were also reported to have elevating action of serum concentration of sodium and potassium ions [37, 40].

According to Kolawole *et al.* [37] works, the aqueous extract of the stem bark of the plant induces decrease in Red Blood Cells, Packed Cell Volume, and Haemoglobin level. Puri et al. [45] reported the elevation of blood globulin indicating a reinforcing action of the immune system.

1.6 *General and physiological and tissue effects*

Lompo et al. [46] reported a hypothermisting effect of aqueous extract of the stem barks on mice. These authors obtained fall in temperature about 4 to 9 points with 750 to 1500 mg.kg BW treatment.

According to Sablassou *et al.* [47], ethanolic extract of dried leaves of *Khaya senegalensis* has antispasmodic and spasmolytic effects on the guinea pig ileum. These authors indicated that at the dose of 1 mg.ml^{-1}, the extract abolishes the contraction induced by acetylcholine 0.1 p.g.ml^{-1}. Since calcium enriched environment does not allow return of contractions the observed effect is lasting. This plant extract act as a calcium blocker relaxing the smooth muscle of guinea pig ileum. This result is in accordance with the release of gastrointestinal motility obtained by Nwosu *et al.* [29] on rats at doses of 100-300 mg.kg^{-1} BW. Similar observation was also notified by Elisha *et al.* [48] whom evaluated *in vivo* the effects of stem bark aqueous and ethanolic extracts on the digestive transit and faeces wetness in albino rats. They induced, experimentally, diarrhoea in these animals using castor oil before treated them with the herbal extracts. The authors observed then dose-dependently a decreasing of the diarrhoea without significant decrease in bowel transit. They attributed the antidiarrheal activity of *K. senegalensis* to the flavonoid and tannin compounds of the extracts.

Androulakis et al. [32] used Promega's CellTiter 96 ® AQueous One Solution Assay (Madison, WI, USA) to determine the viability of the colon cancer cells. They plated the cells (HCT-15, HT-29, HCA-7) at 10,000 cells per well in a 96-well plate. The cells were treated with a series of concentrations of *K. Senegalensis* bark extract for 3, 6 and 24 h. The controls included medium only, medium plus vehicle (<0.05% DMSO), as well as

medium plus the extract at the various concentration used. At the end of each treatment time, 20 µl of One Assay Solution was added to each well, followed by incubation at 37°C for 1 h, and analysis at 490 nm with 650 nm reference wavelengths was carried out on a Beckman Coulter DU 640 spectrophotometer (Carlsbad, CA, USA). The data-points of absorbance were converted to percent of control and were plotted on a percent *versus* concentration graph, from which the 20% and 50% inhibitory concentrations were determined. The reported result of this study is that *K. Senegalensis* bark extract displays anti-proliferative, anti-inflammatory and pro-apoptotic effects on HT-29, HCT-15 and HCA-7 cells.

2. Toxicological risks

According to Nwosu *et al.* [29] the aqueous extract of leaves of *Khaya senegalensis* is not toxic. Indeed at the end of a study conducted by them on rats in Nigeria, these authors reported that the LD_{50} of the extract is greater than 3000 $mg.kg^{-1}$ body weight.

Although other studies revealed that chronic treatment rather induces an increase of these parameters signing some hepatotoxicity [37, 49, 50]. Long treatments also cause elevation of serum creatinine and blood urea [37] which reflects renal dysfunction.

A risk of acute ecotoxicities of aqueous and ethanolic extracts of leaves of *Khaya senegalensis* have been suspected by Adakole and Balogun [51]. These authors assessed the sensitivity of Chironomid larvae to aqueous and ethanolic extracts of the plant in aquatic environment. The result indicated LC_{50} of aqueous and ethanolic extracts were 1.39g/l and 1.20g/l respectively and a deformity of mouthparts, change in body coloration, packing of certain body segments with black particles. It's clear the extract disrupts these invertebrates ecology.

3. Conclusion

The bioactivity of *Khaya senegalensis* is widely proven by scientific studies. Its influence on biochemical parameters is particularly documented and one can conclude that the immediate effect is rather protective for vital organs such as the liver and kidney. The effectiveness of different types of extract, aqueous or alcoholic, against some diseases (pest, infections, cancer, and diabetes) has been reported by several authors. However chronic administration involves tissue toxicity risks.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Reference

1. Azaizeh, H., Fulder, S., Khalil, K. and Said, O. Ethnomedicinal knowledge of local Arab practitioners in the Middle East region. *Fitoterapia*, 2003; 74: 98-108.
2. Athanasiadou, S., Githiori, J. and Kyriazakis, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal*, 2007; 1(9): 1392-1400.
3. Tchacondo, T., Karou, S.D., Batawila, K., Agban, A., Ouro-Bang'na, K., Anani, K.T., Gbeassor, M. and de Souza, C. Herbal remedies and their adverse effects in tem tribe traditional medicine in Togo. *AJTCAM,* 2011; 8(1): 45-60.
4. Le Strange, J.N. 1977. The Useful Plants of West Tropical Africa. The Crown Agents, London, p. 325.
5. Nacoulma, O.G. 1996. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. Ph.D. Thesis, University of Ouagadougou, pp: 328.
6. Full, A.B., Vanhaelen-Faster, R., Vanhaelen, M., Lo, L., Toppet, M., Ferter, A. and Fondu, P. *In vitro* antisickling activity of a rearranged limonoid isolated from *Khaya senegalensis. Plant Med*., 1999; 63(3): 209-212.
7. Arbonnier, M. 2002. Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. The Netherlands: Cirad Margraf Publishers, pp. 189- 426.
8. Karou, D., Dicko, M.H., Simpore, J. and Traore, A.S. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr. J. Biotechnol*., 2005; 4: 823-828.
9. Ayo, R.G., Audu, O.T. and Amupitan, J.O. Physicochemical characterization and cytotoxicity studies of seed extracts of *Khaya senegalensis* (Desr.). *Afri. J. Biotechnol.*, 2007; 6(7): 894-896.
10. Sale, M., De, N., Doughari, J.H. and Pukuma, M.S. In vitro assessment of antibacterial activity of bark extracts of *Khaya senegalensis. Afr. J. Biotechnol.*, 2008; 7: 3443-3446.
11. Ibrahim, M.A., Njoku, G.C. and Sallau, A.B. *In vivo* activity of stem barks aqueous extract of *Khaya senegalensis* against *Trypanosoma brucei. Afr. J. Biotechnol*., 2008; 7: 661- 663.
12. Abubakar, M.G., Lawal, A. and Usman, M.R. Hepatotoxicity studies of sub-chronic administration of aqueous stem bark of *Khaya senegalensis* in Albino rats. *Bajopas*, 2009; 3(1): 26-28.
13. Belem, B., Olsen, C.S., Theilade, I., Bellefontaine, R., Guinko, S., Lyk, A.M., Diallo, A. and Boussim, J.I. Identification des arbres hors forêt préférés des populations du Sanmatenga (Burkina Faso). *Bois et forêts des tropiques*, 2008; 298 (4): 53-64.
14. Fortin, D., Lo, M., Maynart, G. Plantes médicinales du SahelCECI (Montreal) et ENDA (Dakar). *Série Etude et Rech.*, 1990; 174-176.
15. Von Maydell, H.J. 1983. Arbres et Arbustes du Sahel. Leurs caractéristiques et leurs utilisations. G.T.Z. ESCHBORN, 283-284.
16. Sokpon, N. and Ouinsavi, C. Utilisations du *Khaya senegalensis* en médecine traditionnelle au Bénin. *Rev. Méd. Pharmaco. Afric*., 2002; 16: 9-19.
17. Adjanohoun, E.J., Ahyi, M.R.A. and Ake Assi, L. Contribution aux études ethnobotaniques floristiques au Togo. *ACCT*, 1996; 389-392.

18. CAB International. 2000. Forestry Compendium – a silvicultural reference. Global Module. Wallingford, UK: CAB International.

19. World Agroforestry Center, 2004.

20. Djoueche, C.M., Azebaze, A.B. and Dongmo, A.B. Investigation of plants used for control of gastrointestinal parasites in Cameroon. *Tropicultura*, 2011; 29(4): 205-211.

21. Caventou, E. Recherches chimiques sur l'écorce du Caïlcédrat. *Pharm. Chim.*, 1849; 16: 355-362

22. Moyse-Mignon, H. 1942. Recherches sur quelques Méliacées africaines et sur leurs principes amers. University of Paris. France. Thesis, 112p.

23. Adesogan, E.K. The chemical constituents of *Khaya senegalensis*. Symposium: Traditional pharmacopoeia and African Medicinal Plants, Dakar, Senegal, March 1968.

24. Lompo, M. 1993. Etude phamaco-toxicologique chez la souris et le rat de*Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss (Melliaceae) utilisé en tradithérapeutique au Burkina Faso. Mémoire de D.E.A. Physiol. Anim. Appl. Université de Ouagadougou.

25. Yuan, T., Zhang, C-R., Yang, S.P. and Yue, J-M. Limonoids and Triterpenoids from *Khaya senegalensis*. *J. Nat. Prod.*, 2010; 73 : 669–674.

26. Bickii, J., Njifutie, N., Foyere, J.A., Basco, L.K. and Ringwald, P. In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 2000; 69: 27–33.

27. Ndiaye, S.S. 2013. *Khaya senegalensis* ou hay en wolof. Retrieval on 2013/04/28 at http://sambamara.com/

28. Daniel-Yves, A. 2002. Initiation à l'agroforesterie en zone sahélienne: les arbres des champs du Plateau Central au Burkina Faso. KARTHALA Editions. Paris France. 220 p.

29. Nwosu, C.U., Hassan, S.W., Abubakar, M.G. and Ebbo, A.A. Anti-diarrhoeal and toxicological studies of leaf extracts of *Khaya senegalensis*. *J. Pharm. Toxicol.*, 2012; 7(1): 1-10.

30. Konaté, K., Kiendrébéogo, M., Ouattara, M.B., Souza, A., Lamien-Meda, A., Nongasida, Y., Barro, N., Millogo-Rasolodimby, J. and Nacoulma, O.G. Antibacterial potential of aqueous acetone extracts from five medicinal plants used traditionally to treat Infectious Diseases in Burkina Faso. *Curr. Res. J.Biol. Sci.*, 2011; 3(5): 435 – 442.

31. Zhang, H., Wang, X., Chen, F., Androulakis, X.M. and Wargovich, M.J. Anticancer activity of Limonoids from *Khaya senegalensis*. *Phytoter. Res.*, 2007; 21: 731-734.

32. Androulakis, X.M., Muga, S.J., Chen, F., Koïta, Y., Touré, B. and Wargovich, M.J. Chemopreventive Effects of *Khaya senegalensis* Bark Extract on Human Colorectal Cancer. *Anticancer Res.*, 2006; 26: 2397-2406.

33. Chiezey, N.P., Gefu, J.O., Jagun, A.G., Abdu, P.A., Alawa, C.B.I., Magaji, S.O., Adeyinka, I.A., Eduvie, L.O. 2000. Evaluation of some Nigerian plants for anthelmintic activity in young cattle. Proceedings of the International Workshop on Ethnoveterinary Practices, 14-18 August, Kaduna, Nigeria.

34. Okpara, J.O., Anagor, P.O., Okpalia, E.J., Abdullahi, A. and Ahmed, M.S. 2004. The anthelmintic efficacy of medicinal herb extracts against gastrointestinal helminths of sheep. Rapport de la 9th Annual Conference of Animal Science Association of Nigeria (ASAN), 13–16 Sept. 2004. Ebonyi State University, Nigeria.

35. Umar, I.A., Ibrahim, M.A., Fari, N.A., Isah, S. and Balogun, D.A. *In-vitro* and *-vivo* anti-*Trypanosoma evansi* activities of extracts from different parts of *Khaya senegalensis*. *J. Cell Ani. Bio.*, 2010; 4(6): 91-95.

36. Shaba, P., Pandey, N.N., Sharma, O.P., Rao, J.R., Mishra, A.K. and Singh, R.K. Antitrypanosomal activity of methanolic extract of Khaya Senegalensis tree bark against *Trypanosoma evansi*. *Int. J. of Food, Agri. and Vet. Sc.*, 2011; 1(1) : 21-26.

37. Kolawole, O.T., Kolawole, S.O., Ayankunle, A.A. and Olaniran, O.I. Anti-hyperglycemic Effect of *Khaya senegalensis* Stem Bark Aqueous Extract in Wistar Rats. *European J. of Medicinal Plants*, 2012; 2(1): 66-73.

38. Funke, I. and Melzig, M.F. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of a-amylase activity. *Braz. J. Pharmacogn.*, 2006; 16(1): 1-5.

39. Yakubu, M.T., Adebayo, O.J., Egwim, E.C. and Owoyele, V.B. Increased liver alkaline phosphatase and aminotransferase activities following administration of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* stem bark to rats. *Biokemistri*, 2005; 17(1): 27-32.

40. Adebayo, J.O., Yakubu, M.T., Egwim, E.C., Owoyele, V.B. and Enaibe, B.U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *J. Ethnopharmacol.*, 2003; 88: 69-72.

41. Ali, S.A.M., Elbadwi, S.M.A., Idris, T.M. and Osman, K.M. Hepatoprotective activity of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark in rats. *J. Med. Plants Res.*, 2011; 5(24): 5863-5866.

42. Umar, I.A., Wurochekke, A.U., Gidado, A. and Igbokwe, I.O. Effects of combined parenteral Vitamins C and E administration on the severity of anaemia, hepatic and renal damage in *Trypanosoma brucei* brucei. *Vet. Parasitol.*, 1999; 85: 43-47.

43. Sule, M.S., Abdulraheem, R.B. and Aminu, B.M. Potency of aqueous stem bark extract of *Khaya senegalensis* against liver diseases in rats. *Bajopas*, 2008; 1(1): 29-31.

44. El Badwi, S.M.A., Bakhiet, A.O. and Abdel Gadir, E.H. Haemato-biochemical Effects of aqueous extract of *Khaya senegalensis* stem bark on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats. *J. Biol. Sci*, 2012; 12: 361-366.

45. Puri, A., Saxena, R., Saxena, R.P., Saxena, K.C., Strivastav, V. and Tandon, J.S. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod.*, 1993; 58: 995-999.

46. Lompo, M., Guissou, I.P., Kabore, I.Z. and Sawadogo, M. Effet hypothermisant et toxicité générale aigue chez les souris des écorces de tronc de Kase. *Pharm. Méd. trad. afro*, 1995; 73-80.

47. Sablassou, K., Aklikokou, A.K. and Gbeassor, M. Activité anti-contracturante de l'extrait de *Khaya senegalensis* sur l'iléon de cobaye. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 1998; 10: 3-15.

48. Elisha, I.L., Makoshi, M.S., Makama, S., Dawurung, C.J., Offiah, N.V., Gotep, J.G., Oladipo, O.O. and Shamaki, D. Antidiarrheal evaluation of aqueous and ethanolic stem bark extracts of *Khaya senegalensis* A. Juss (Meliaceae) in albino rats. *Pak. Vet. J.*, 2013; 33(1): 32-36.

49. Williamson, J.A., Bosher, J.M., Skinner, A., Sheer, D., Williams, T. and Hurst, H.C. .Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors. *Genomics*, 1996; 35: 262-264.

50. Satpal, S.K.J. and Punia, J.S. Studies on biochemical change in subacute thiodicarb toxicity in rats. *Toxicol. Int.*, 2010; 17: 30-32.

51. Adakole, J.A. and Balogun, J.B. Acute ecotoxicity of aqueous and ethanolic extract of leaves of *Khaya senegalensis* on chironomid larvae. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 2011; 15(2): 41-45.

Cite this article as: Marcellin Cokou TAKIN, Sabbas ATTINDEHOU, Alphonse SEZAN, Sèlidji Eugène ATTAKPA and Lamine BABA-MOUSSA. Bioactivity, therapeutic utility and toxicological risks of *Khaya senegalensis* **Indian J. Pharm. Biol. Res.2013;1(4):122-129.**

All © 2013 are reserved by Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research

Après cette revue de littérature sur *Khaya senegalensis,* nous avons étudié in vitro le mouvement du glucose à travers la membrane hépatocytaire sous l'effet de l'extrait.

III.2. Flux du glucose dans le foie sous l'effet de l'extrait des écorces de tronc de *khaya senegalensis.*

Le transport du glucose à travers les membranes biologiques se fait par une diffusion facilitée appelée encore transport passif avec perméase (ne nécessite pas d'énergie mais d'une glycoprotéine transmembranaire : le transporteur passif, principalement les GLUT). Ce transport se déroule dans les deux sens selon le potentiel électrique établi à travers la membrane par les molécules polaires chargées tel que le glucose. Comme le milieu extracellulaire est plus concentré que le milieu intracellulaire cette diffusion facilitée va donc créer un flux continu de glucose vers le milieu intracellulaire, sous la commande de l'insuline. Ce glucose disparaît vite car il est métabolisé rapidement. Ainsi la concentration intra n'augmente pas et on a une arrivée permanente de glucose dans la cellule. Dans les hépatocytes une partie du glucose est stockée sous forme de réserve : le glycogène. Quand le niveau sanguin du glucose baisse, le glycogène se dédouble, sous la commande du glucagon, à travers une cascade de réactions biochimiques, en glucose, lequel diffuse à travers la membrane hépatocytaire vers le sang.

L'objectif spécifique de ce travail est d'évaluer l'effet de l'extrait sur le mouvement du glucose dans des fragments de foie de rat Wistar, placés dans une solution réactionnelle (le Mack-Ewen) ; Cette solution ne contient pas de glucose. Dans ce travail, il a été réalisé de manière couplée un screening phytochimique et le calcul de rendement de l'extraction.

La masse d'extraits secs obtenue est de 22,62g, correspondant à un rendement *R= (22.62 g /100 g) X 100 = 22.62%.*

L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* renferment d'abondants composés polyphénoliques tels que les tanins, les tanins catéchiques et les leuco-anthocyanes, et d'abondants saponosides tels que les sanosides avec un indice de mousse de 4. D'autres composés polyphénoliques tels que les anthocyanes, tout comme les dérivés anthracéniques tels que les O-hétérosides à génines réduites, sont peu abondants dans l'extrait, contrairement aux stéroïdes lesquels s'y trouvent en faible quantité (Tableau II, Publication N°2).

La densité optique obtenue pour le dosage de glucose a varié en fonction des différentes concentrations (2µg/L, 5 µg/L, 10µg/L et 20 µg/L) de l'extrait aux temps T= 0, 10, 20, 30, 40 et 60minutes (Figure 4, Publication N°2). Les variations de la densité optique pour le témoin ont évolué en courbe linéaire ascendante dans le temps. Les variations de la densité optique pour les extraits aux différentes concentrations ont été dans leur ensemble plus basses que celles du témoin aux temps T= 0, 10, 20, 30, 40 et 60minutes (Figures 6, 7 et 8, Publication N°2). Cependant les extraits à la concentration de 10µg/L portent ces variations de densité optiques au dessus de celles du témoin aux temps T= 0, 10, 20, 30 et40 minutes (Figure 5, Publication N°2). Au temps T= 60 minutes les extraits aux différentes concentrations ont maintenu la densité optique obtenue pour le dosage de glucose plus basse, comparée au témoin pour ce même temps (Figures 4, 5, 6, 7 et 8, Publication N°2). Les concentrations des extraits en dessous de 10µg/L ont semblé enregistrer les plus basses densités optiques (Figure 4, Publication N°2). La courbe dose-réponse (Figure 9, Publication N°2) a semblé prendre l'allure d'une hyperbole de LANGMUIR. Le taux de glucose dans la solution de Mack-Ewen a varié en fonction du temps d'une concentration à une autre des extraits. L'extrait a réduit la libération

hépatique du glucose. Les variations de la densité optique obtenues pour le dosage de glucose sous l'effet de la solution d'insuline, utilisée à la dose de 2,5UI comme substance de référence, ont été plus basses, comparées au témoin mais plus élevées que celles engendrées par les extraits aux concentrations de 2 µg/L et 5 µg/L (Figure 10, Publication N°2). L'allure des courbes des extraits aux concentrations de 2 µg/L et 5 µg/L est semblable à celle de l'insuline à la dose de 2,5UI.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication : [1]**Takin Marcellin**, [1]AHOKPE Mélanie, [1]ZOHOUN Loica, [2]BABA-MOUSSA Lamine, [1]SEZAN Alphonse, **2013**.**Effect of total *khaya senegalensis* (*Meliaceae*) barks extracts on hepatic liberation of glucose. National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology | 2014 | Vol 4 | Issue 2 | 105 – 110**

PUBLICATION N°2

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

RESEARCH ARTICLE

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

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

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

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

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

Received Date: 25.09.2013
Accepted Date: 29.09.2013

DOI: 10.5455/njppp.2014.4.290920133

INTRODUCTION

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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



Figure-1: Candied *K. senegalensis*



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



Figure-3: Solids *K. senegalensis*

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

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

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

by spectrophotometry using the GOD-PAP reagent ®. This is an enzymatic method based on the oxidation of glucose. Glucose was also assayed for insulin solution to 2.5UI and the effect was compared with extracts of *K. senegalensis* 2 and 5 µg/ L.

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

RESULTS

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

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

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

Table-2: Results of phytochemical analysis

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

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

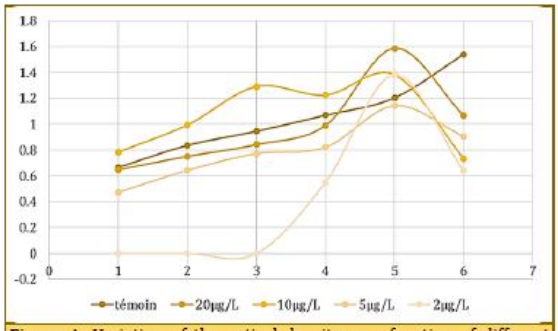


Figure-4: Variation of the optical density as a function of different concentrations of total extracts of *Khaya senegalensis*

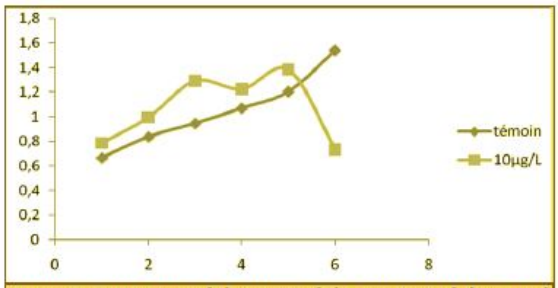


Figure-5: Comparison of the curve of the variation of the optical density of the control and extract to a concentration of 10 µg/ L

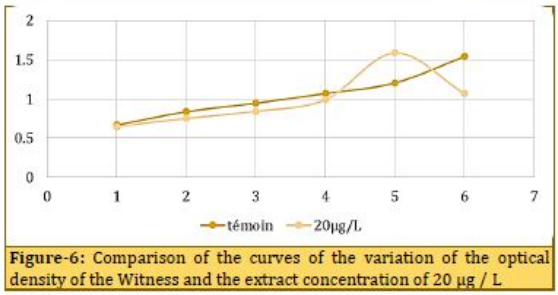


Figure-6: Comparison of the curves of the variation of the optical density of the Witness and the extract concentration of 20 µg / L

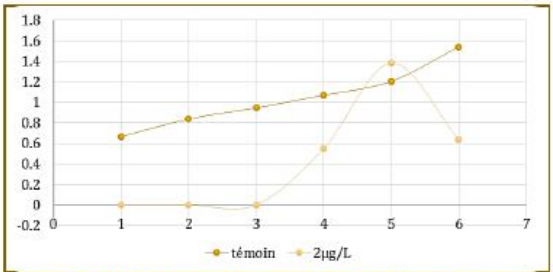


Figure-7: Comparison of the curves of the change in optical density of the control and the extract at the concentration of 2 µg/L

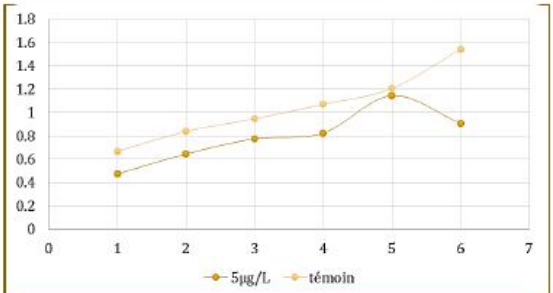


Figure-8: Comparison of the curve of variation of the optical density of the control and that of the extract to the concentration 5 µg/L

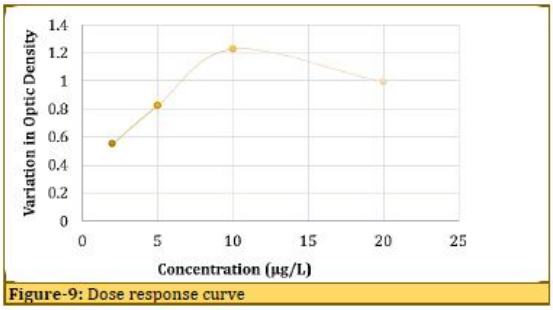


Figure-9: Dose response curve

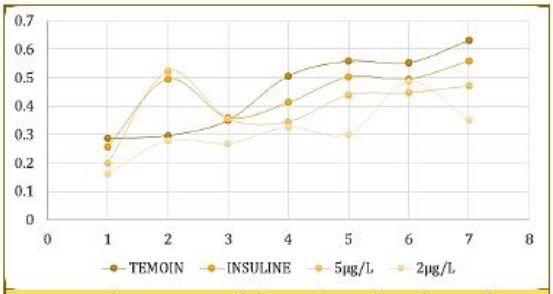


Figure-10: Changes in optical density due to the solution of 2.5 IU insulin and extracted 2 µg/L and 5 µg/L

The values of the variation of the optical density recorded at time T = 0, 10, 20, 30, 40, 50minutes 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 on 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 of 20 micrograms / L, a value of the change in higher than 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 2µg/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 min optical density. The values of the variation in optical density recorded under the effect of the extracts on 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 ideal 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

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

DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSION

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

REFERENCES

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

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

L'effet inhibiteur de l'extrait sur la libération du glucose hépatique a motivé l'évaluation de quelques paramètres physiques et biochimiques, notamment le poids corporel, le taux sanguin de glucose, des triglycérides et du cholestérol total, après administration de l'extrait chez le lapin.

III.3. Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur quelques paramètres biochimiques chez le lapin en état de surcharge de glucose.

Les variations du poids corporel et de quelques paramètres biochimiques sous l'effet de l'extrait ont été évaluées chez des lapins normo glycémiques et chez des lapins en état de surcharge de glucose.

L'extrait administré aux différentes doses (10mg, 25mg et 50mg/kg de poids corporel) n'a pas engendré de variations significatives (p >0, 05) du poids corporel chez les lapins traités comparés au lot témoin (Tableau II, Publication N°3). On note une augmentation fortuite et de manière respective de 1.82% à 6.55%, de 8.75% à 17.25% et de 5% à 7.75% pour les doses de 10mg/kg, 25mg/kg et 50mg/kg de poids corporel.

Chez les lapins normo glycémiques l'extrait administré à la dose journalière de 50mg/kg de poids corporel a fait baisser la glycémie au cours des 15 premiers jours du traitement. Après cette date la courbe de la glycémie prend une allure ascendante pour retrouver au bout des 30jours des valeurs légèrement supérieures aux valeurs de ce paramètre enregistrées au début de l'expérimentation (Figure 1, Publication N°3). Aucune variation sensible de la glycémie n'a été observée chez les lapins traités à l'extrait aux doses de 10 et 25mg/kg de poids corporel pendant les 30jours de traitement, en comparaison avec le lot témoin (Figure 1, Publication N°3). Au cours des 24heures qui ont suivi le traitement, de faibles variations de la glycémie ont été enregistrées chez les lapins traités à la dose de 10mg/kg de poids corporel comparés au lot

témoin. ; les doses de 25mg et 50mg/kg de poids corporel ont provoqué une augmentation de la glycémie pendant les 6 premières heures, puis une diminution de ce paramètre les 6heures suivant cette période (de 6à12heures après administration de l'extrait) ; après cette diminution de la glycémie, ce paramètre s'est stabilisé pendant les 6heures suivant la période antérieure (de 12à18heures après administration de l'extrait), pour atteindre au bout de 24heures ses valeurs initiales pour la dose de 25mg/kg de poids corporel, et des valeurs plus basses que celles enregistrées au début de l'expérimentation (au temps T= 0, où aucun traitement n'a été appliqué) pour la dose de 50mg/kg de poids corporel (Figure 2, Publication N°3). La dose de 10mg/kg de l'extrait a provoqué une légère augmentation de la glycémie pendant les 6 premières heures après le traitement ; cette augmentation s'est accentuée les 6heures suivant cette période (de 6 à 12heures après le traitement), puis s'est stabilisée entre 12heures et 18heures après le traitement pour enfin chuter dans les dernières heures qui suivent jusqu'à la vingt quatrième heure où la glycémie reprend presque ses valeurs initiales.

En condition de surcharge de glucose, la glycémie a augmenté tant chez les lapins du lot témoin que ceux des lots expérimentaux au terme des 2heures précédant le traitement des lapins à l'extrait pour atteindre un pic au bout d'une heure (Figure 3, Publication N°3). Passé ce temps, la glycémie a diminué au cours de l'heure qui a suivi pour atteindre des valeurs supérieures aux valeurs de ce paramètre obtenue chez les lapins en condition de jeûne ; cette chute de la glycémie est significative, comparée aux valeurs pic observées pour tous les lots à l'exception du lot L50mg. Il est à noté que les valeurs de la glycémie chez les lapins ayant reçu le traitement à l'extrait sont restés plus basses que celles du lot témoin et que les plus basses valeurs de ce paramètre ont été enregistrés avec la dose de 50mg/kg de poids corporel de l'extrait.

On note une augmentation soutenue de la triglycéridemie pendant les 15

jours suivant le début de l'expérimentation. Du 15^{e} au 30^{e} jour ce paramètre a chuté chez les lapins ayant reçu l'extrait à la dose de 10mg/kg de poids corporel. Tout au long de l'expérimentation la triglycéridemie a faiblement augmenté chez les lapins des lots L0mg et L50mg tandis que chez les lapins du lot L25mg cette augmentation a été franche et soutenue du 15^{e} au 30^{e} (Figure 4, Publication N°3). La triglycéridemie a faiblement baissé au cours des 6 premières heures après le traitement chez tous les lapins, y compris ceux du lot témoin, puis s'est significativement élevée au cours des 6heures qui ont suivi (de 6 à 12heures après le début de l'expérimentation) chez les lapins du lot L25mg ; cette augmentation a été faible dans les lots L10mg et L50mg et le lot témoin (Figure 5, Publication N°3). Entre 12heures et 18heures la triglycéridemie s'est stabilisée dans les lots L10mg et L50mg mais s'est légèrement abaissée dans les lots témoin et L25mg ; entre 18heures et 24hures ce paramètre a franchement chuté dans le lot L25mg et légèrement baissé dans les lots L10mg et L50mg. Il est à noter qu'entre 6heures et 24heures après le traitement les valeurs de la triglycéridemie dans les lots traités à l'extrait sont maintenues en dessous de celles du lot témoin, à l'exception du lot L25mg où il a été enregistré des valeurs plus élevées que celles du lot témoin.

En condition d'hyperglycémie temporaire, la triglycéridemie a constamment diminué tout au long de l'expérimentation dans les lots traités (Figure 6, Publication N°3); toutefois on a noté une légère augmentation de ce paramètre dans l'intervalle d'une heure après le traitement dans le lot L25mg tout comme dans le témoin dans les 2heures qui ont précédé le traitement.

On note une tendance à la hausse de la cholestérolémie totale dans tous les lots traités à l'extrait pendant les 15 premiers jours de l'expérimentation (Figure 7, Publication N°3). Du 15^{e} au 30^{e} jour du traitement la cholestérolémie totale est monté en pic dans le lot L50mg et le lot témoin et faiblement dans le lot L10mg ; ce paramètre est resté stationnaire dans le lot L25mg pendant la même

période. Au cours des 6heures qui ont suivi le début du traitement la cholestérolémie totale a sensiblement diminué dans tous les lots traités à l'extrait (Figure 8, Publication N°3) ; cette descente du paramètre se poursuit entre les 6heures et 12heures après le traitement dans les lots L10mg et L50mg tandis qu'il y a eu une légère monté dans le lot L25mg. Entre les 12heures et les 18heures les valeurs de la cholestérolémie totale sont restées stationnaires et ont légèrement diminué entre les 18heures et les 24heures. La cholestérolémie totale dans le lot témoin n'a pratiquement pas varié tout au long de l'expérimentation.

Il est à noter que 6heures après le traitement à l'extrait les valeurs de la cholestérolémie totale dans les lots traités sont maintenues en dessous de celles du lot témoin.

En condition d'hyperglycémie temporaire, la cholestérolémie totale a légèrement diminué dans tous les lots traités à l'extrait (Figure 9, Publication N°3).

Ce travail a donné lieu à une publication : **Takin [1]Marcellin**, [1]AHOKPE Mélanie, [1]YESSOUFOU Ganiou, [1]ZOHOUN Loica, [2]BABA-MOUSSA Lamine,[1]SEZANAlphonse, **2013**. Effect of the ethanolic extract of Khaya senegalensis on some biochemical parameters in rabbit's glucose overload condition. American Journal of Plant Sciences, 2013.

PUBLICATION 3

Références : **Takin [1]Marcellin**, [1]AHOKPE Mélanie, [1]YESSOUFOU Ganiou, [1]ZOHOUN Loica, [2]BABA-MOUSSA Lamine,[1]SEZANAlphonse, **2013**. **«**Effect of the ethanolic extract of Khaya senegalensis on some biochemical parameters in rabbit's glucose overload condition». American Journal of Plant Sciences, 2013.

American Journal of Plant Sciences, 2013, *, **-**
doi:10.4236/ajps.2013.***** Published Online *** 2013 (http://www.scirp.org/journal/ajps)

Scientific Research

Effect of the ethanolic extract of Khaya senegalensis on some biochemical parameters in rabbit's glucose overload condition.

[1]TAKIN Marcellin, [1]AHOKPE Mélanie, [1]YESSOUFOU Ganiou, [1]ZOHOUN Loica, [2]BABA-MOUSSA Lamine, [1]SEZAN Alphonse*

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

Received June 2013.

ABSTRACT

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

Keywords: Rabbit, Khaya senegalensis, glucose, lipid profile.

Corresponding autheur:
SEZAN Alphonse* : Laboratoire de Biomembranes et de Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey- Calavi, 06 B.P. 3041 Tél 00 229 21 36 04 78, Cell : 00 229 97 57 38 50 Email : alphonse.sezan@fast.uac.bj Cotonou, République du Benin

1. Introduction

The use of bioactive plant became popular more particularly in poor regions such as Africa and Asia [1] in the treatment of chronic diseases [2; 3; 4; 5]. The use of plants does not guarantee their full effectiveness and safety [6]. The risk of toxicity associated with chemical compounds of medicinal plants becomes the concern of Scientific Research [7]. Khaya senegalensis (Meliaceae), a tropical plant, is widely used for its therapeutic properties. It is used in the treatment of malaria, jaundice etc. [8]. The seeds and leaves of Khaya S. are used in the treatment of fever and headache [9], amenorrhea, smallpox, jaundice, lumbago and rheumatism whereas extracts of roots treat

Copyright © 2013 SciRes.

mental illness, leprosy and syphilis [9]. Many scientific studies have demonstrated the biological activity of extracts of Khaya senegalensis, aqueous extracts and ethyl showed biological activity in rats through effects on biochemical and hematological parameters [10; 11] , as it has been shown that extracts of Khaya ethyl S. possess antiradical activity [12]. Based on these results, it remains that the safety of this plant is to prove. On the basis of suspicion of an impact on Khaya S metabolism, we studied the effect of the extract ethyl Khaya senegalensis on blood glucose and blood lipid profile in rabbits.

2. Materials and methods

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

Plant material. The barks of Khaya senegalensis were collected in July 2011 in the town of Abomey Calavi, agro-ecological zone VI, in southern Benin. This area has a climate Guinean type with two rainy seasons (April-July, September-November) rainfall varies from 1000 to 1400mm and the soil is lateritic, ferruginous or hydro morph. They were dried in the shade in a ventilated after following identification keys recognition analytical flora of Benin [3].

2.1 Preparation of extract.

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

2.2 Biological material.

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

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

- Lot 1 (L1) was the control group receiving oral administration of distilled water in place of ethyl extract of Khaya senegalensis,
- Lot 2 (L2) was the group treated by oral administration at a dose of 10mg/kg body weight / day of ethyl extract of Khaya senegalensis, for 15 days.
- Lot 3 (L3) was the group treated by oral administration at a dose of 25mg/kg body weight / day of ethyl extract of Khaya senegalensis, for 15 days.
- Lot 4 (L4) was batch treated by oral administration at a dose of 50mg/kg body weight / day of ethyl extract of Khaya senegalensis, for 15 days.

2.3 Phytochemical screening.

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

Copyright © 2011 SciRes.

2.4 Determination of biochemical parameters.

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

2.4.1 glucose.

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

The principle of the assay is the Trinder: in aqueous medium and in the presence of oxygen, glucose oxidase (GOD) catalyses the oxidation of glucose to gluconic acid and hydrogen peroxide (H2O2) in the reaction.

Glucose + ½ O2 + 2H2O + H2O2 gluconic acid

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

2.4.2 Triglycerides.

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

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

LIPASE Triglycerides Glycerol + free fatty acids

GK Glycerol + ATP glycerol-3-phosphate + ADP

Glycerol-3-phosphate Dihydroxyacetone phosphate + O2 + H2O2 GPO

H2O2 + 4-chlorophenol + PAP quinoneimine POD (pink) + H2O

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

H2O2 + 4-chloro-phenol + 4-aminoantipyrine + 4H2O quinoneimine

2.4.3 Total Cholesterol.

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

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

EC + esterified cholesterol Cholesterol Free fatty acids

Cholesterol + O2 CO cholestene-4-one-3 + H2O2

2H2O2 + Phenol + 4-aminoantipyrine + 4H2O POD quinoneimine

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

Copyright © 2011 SciRes.

2.4.4 Data processing.

The data are processed in the Microsoft Office 2007 software Minitab14 2003 version was used for the different tests comparing average, the T-test was used for comparison of means of parameters between different batches of rabbits, we used analysis of variance (one-way ANOVA). The parameter results are expressed as mean ± standard deviation.

3. Results and discussions

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

Table 1.phytochemical sreening of ethanolic extracts of Khaya senegalensis

Chemical groups	Subgroups	Observation
polyphénolics	Tannins Tanins catéchiques Anthocyanin Leuco-anthocyanin	+++ +++ ++ +++
Saponins	Saponosides Indice du mousse est 4	+++
Steroids	Steroids	+
Dérivés anthracéniques	O-Hétérosides à génines réduites	++

+++ Abondant
++ not abondant
+ low

Weighed the on different ones periods (T0:beginning of the experiment;T+15:15 days after the beginning of the experiment ;and T+30:30 days after the beginning of the experiment) of rabbits separated in 4 batches (L 50mg, L 25mg, L 10mg, L 0mg) according to the amount from extracts which was managed to them, showed a variation of weight in the rabbits which is listed in table 2

Table 2. change in body weight of rabbits normoglycemic versus time

	T0	T +15days	T + 30days
L 0mg	0,93± 0,23	1,47±0,27	1,53±0,14
L 10mg	1,15±0,41	1,49±0,09	1,63±0,06
L 25mg	1,03±0,18	1,6±0,25	1,79±0,23
L 50mg	0,97±0,03	1,54±0,20	1,65±0,21

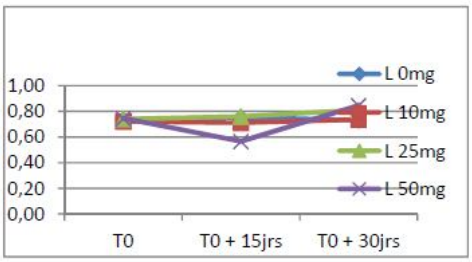


Figure 1. Variation of glucose under the influence of different doses of KS function of time.

The impact on the glycemia of the administration to rabbits of the various amounts of extracts of Khaya senegalensis, measured according to time, shows on the figure a weak variation of the glycemia with regard to the pilot batch and the batches of the amounts :L 25mg, L 10mg. While for rabbits of the batches of amount: L50mg, a fall of the glycemia is observed during the first 15 days of the experiment, then it goes up Until the 30th day of experiment.

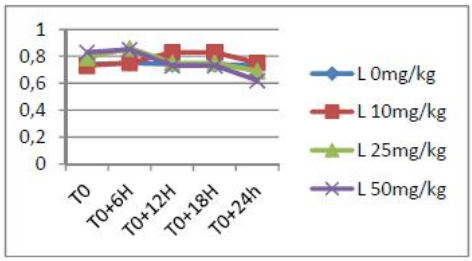


Figure 2. variation in blood glucose under influence of different doses of K.S. in 24hours

The impact on the glycemia of the administration to rabbits of the various amounts of extracts of Khaya senegalensis, measured at different hours on 24hours, does not show any variation of the glycemia on figure 2 with regard to the pilot batch over all the duration of the experiment for the batches of the amounts: L 25mg, L 50mg, a growth of the glycemia is observed over the first 6 hours of the experiment .This glycemia fall the 6 hours following, is stabilized 12th hour per 18th hour then falls until the end of the experiment. While for

Copyright © 2011 SciRes.

rabbits of the batches of amount:110mg, a weak growth of the glycemia is observed during the first 6 hours of the experiment, the slope of growth increases and the glycemia is stabilized to leave per 12th hour the experiment and starts to fall per 18th hour of the experiment.

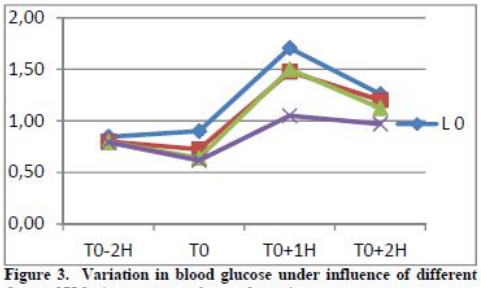


Figure 3. Variation in blood glucose under influence of different doses of K.S. in temporary hyperglycemia

The impact on the glycemia of the administration to rabbits in temporary hyperglycemia of the various amounts of extracts of Khaya senegalensis, measured at different hours, shows on figure 3 a fall of the glycemia for all the 2h batches before the beginning of the experiment this glycemia begins with croitre beginning of the experiment until 1h after the experiment the beginning of the experiment; then the glycemia still falls during 1h.it is necessary noted that the fall of the glycemia louse the batch of 150mg amount is weak, while it is significant for the other batches

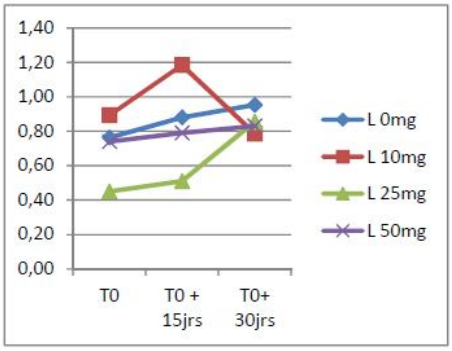


Figure 4: triglycerides variation under influence of different doses of K.S. versus time

The impact on the triglyceridemy of the administration to rabbits of the various amounts of extracts of Khaya senegalensis, measured according to time, shows on figure 4 a growth of this triglyceridemy hanging the 15 following days the beginning of this experiment. From the 15th day it falls until the 30e day with regard to the batch of amount L 10mg.For the batches of L0mg amounts and 50mg, a weak growth is observed all along the experiment. Finally for the batch L25mg weak a growth of the triglyceridemy is observed the first 15 days of the experiment, this growth increases until the 30e days.

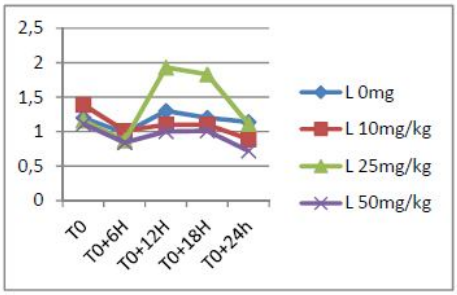


Figure 5.triglycerides variation under influence of different doses of K.S. in 24 hours

The variation all the 6hours of the triglyceridemy of hanging rabbits under influences 24h of the differentes amounts of extracts of Khaya senegalensis is illustrated on figure 5. For all the amounts one observes a weak fall of this triglyceridemy during the first 6 hours of the experiment, then a significant growth of this trygliceridemy with regard to the batch of 125mg amount, until the 12th hour for the other batches this growth is weak. After the trygliceridemy is stabilized for the batches L25mg and L50mg and a weak fall slightly for the other batches until the 18th heure. And finally a

Copyright © 2011 SciRes.

a

progressive fall for all the batches until the end of the experiment.

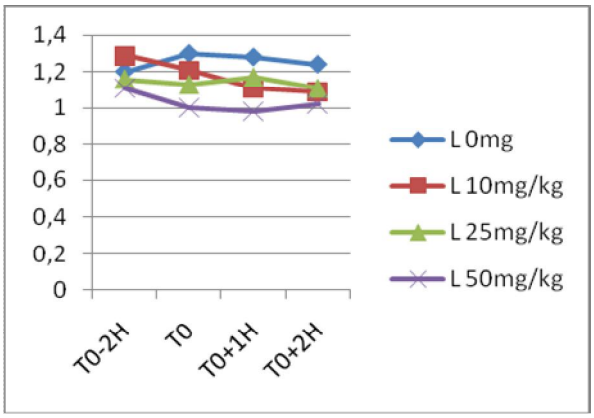


Figure 6 : triglycerides variation under influence of different doses of K.S. in temporary hyperglycemia

The triglyceridemy of rabbits in temporary hyperglycemia and under influences of the various amounts of extract of Khaya senengalansis is measured and is illustrated on figure 6. The general pace of the trygliceridemy of rabbits for all the amounts is with the fall during all the experiment. However light growth is observed during the 2h preceding the beginning of the experiment for the pilot batch and a light growth also for the batch of L25mg amount, during the hour following the beginning of the experiment.

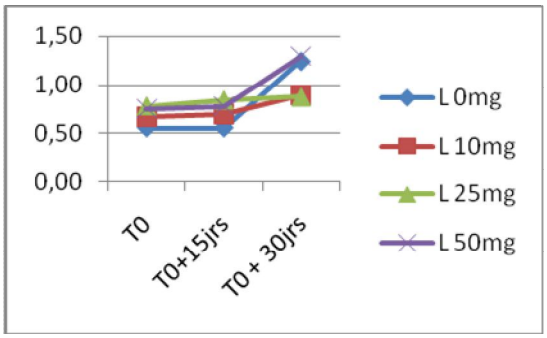


Figure 7. cholesterol variation under influence of different doses of K.S versus time

The variations of the cholesterolemy of rabbits subjected to the various amounts of extracts of Khaya senegalensis according to time, is illustrated on the figure7. Indeed cholesterolemy of rabbits with tendency to grow the first 15 days of the experiment for every amounts safe for the l0mg amount of the pilot batch which remains constant. From the 15th days until the end of the experiment the cholesterolemy strongly increases for the amounts l50mg and l0mg, and slightly for the l10mg. Amount while one observes a light fall for the l25mg amount

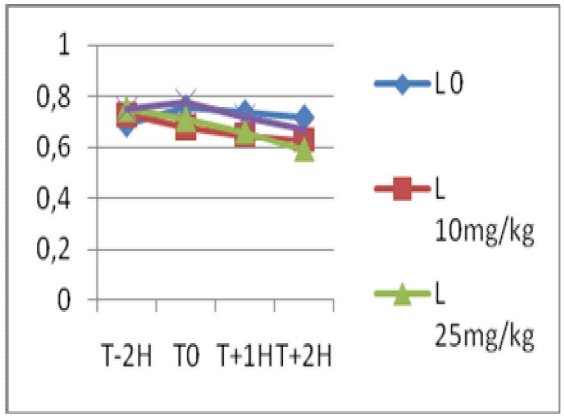


Figure 8. cholesterol variation under influence of different doses of K.S in 24 hours

The variation of the cholesterolemy of rabbits subjected to the various amounts of extracts of Khaya senegalensis during 24h, is illustrated on figure 8. During the first 12 hours of the experiment, the cholesterolemy has a downward trend for all the amounts except the l0mg amount which grows slightly. Between the 12th and the 18th hour of the experiment the cholesterolemy tends to become relatively constant for all the doses. Finally the measured cholesterolemy falls slightly for all the amounts.

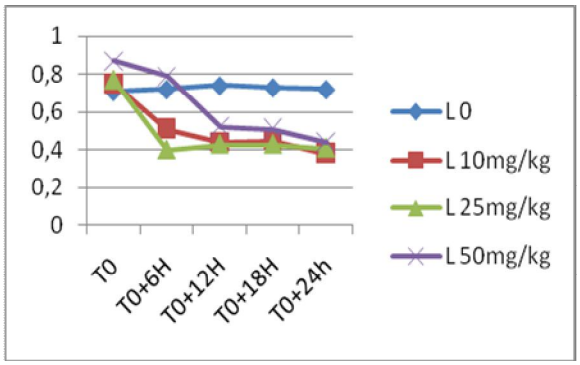


Figure 9 . cholesterol variation under influence of different doses of K.S in temporary hyperglycemia

The variation of the cholesterolemy of rabbits in temporary hyperglycemia subjected to the various amounts of extracts of khaya senegalensis, is illustrated on figure 9. During the 2 hours previous the experiment, the cholesterolemy has a downward trend for the amounts l10mg and while l25mg for the amounts l0mg and l50mg which grows slightly. Beginning of the experiment until 2h after the beginning of the experiment the measured cholesterolemy falls slightly for all the amounts.

1.

The variation of the cholesterolemy of rabbits in temporary hyperglycemia subjected to the various amounts of extracts of khaya senegalensis, is illustrated on figure 9. During the 2 hours previous the experiment, the cholesterolemy has a downward trend for the amounts 110mg and while 125mg for the amounts 10mg and 150mg which grows slightly. Beginning of the experiment until 2h after the beginning of the experiment the measured cholesterolemy falls slightly for all the amounts.

Discussion

The phytochemical analysis revealed the presence of polyphenolic compounds (tannins, anthocyanins, leuco anthocyanin) of saponins, steroids and anthracene compounds (o-glycosides) [find references].

The alcoholic extract of Khaya senegalensis administration for four weeks did not significantly altered the change of body weight of treated rabbits ($p < 0, 05$). ALTHOUGH we have noticed an increase respectively fortnightly from 1.82% and 6.55%, 8.75% ET17, 25%, 5% and 7.75% for doses of 10mg/kg , 25mg/kg and 50mg/kg body weight.

Blood glucose did not change in the rabbits treated de10mg/kg dose of PC extract, 24 hours after administration. For cons, the administration of 25mg and 50mg/kg PC extract resulted in a decrease of 12.66%, 25.30% in blood sugar after 24 hours, only the resulting decline in the dose of 50 mg / kg PC extract is significant, one could think of a dose-dependency for this effect. This could be justified by the presence in the extract of glycosides which increases hepatic glucose utilization [15], so the o-glycosides, even scarce in the extract could inhibit the néoglycogenèse and suppress insulin in rabbits treated by increasing the rate of membrane glucose transporters such as Al-Achi demonstrated in 2005. The extract may also increase the secretion of insulin via its anti-oxidant activity [16] as terpenes and flavonoids influence pancreatic β cells and stimulate insulin secretion by their anti activity oxidizing [6]. Indeed, it would set in motion a closing signal of K + / ATP, membrane depolarization and stimulation of Ca2 + influx, the first key step in insulin secretion [12; 17] showed that ethyl extract of Khaya senegalensis has an anti-radical activity. In fact, our study showed the presence in the extract of an abundant amount of polyphenolic compounds which have an anti-radical activity [18] . Some flavonoids, which have been isolated from plants, inhibit glucose transporters in the intestines, decrease the expression of genes that control gluconeogenesis, increase the storage of glucose in the liver and reduce the breakdown of glycogen [19], for example, which is a catechin tannin inhibits the intestinal absorption of glucose as well as epicatechin gallate increases hepatic glycogen synthesis and quercetin increases insulin synthesis, it has been reported in the literature that Khaya senegalensis bark are rich in these compounds it is possible that the hypoglycemic action of the plant is related to the presence of these compounds.

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

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

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

Similarly, in normoglycemic rabbits treated with the extract Khaya senegalensis, it was found that after a month trial, the daily administration of the extract ethyl 10-25-50mg/kg PC Khaya senegalensis n ' not result in significant changes in serum cholesterol compared to control group. However, cholesterol levels in normoglycemic rabbits

Copyright © 2011 SciRes.

after feeding different doses of ethyl extracts of Khaya senegalensis 24H, 6H shows that after beginning cholesterol decreased 29.17%, 44.44%, -9.72%, respectively 10-25-50mg/kg doses for PC. This decline was accentuated after 12H and password -9.72% to 29.73% for 50mg/kg dose, then continues to decline slowly. Statistical analysis of the results showed no significant difference both in rabbits.

Different doses of ethyl extracts of Khaya senegalensis not affect the lipid profile of rabbits (triglycerides and cholesterol) because they are not diabetic. Indeed, insulin deficiency or insulin resistance may be responsible for hyperlipidemia, because insulin has an inhibitory action on the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), a key enzyme for the biosynthesis of cholesterol. On the other hand, glucagon, catecholamines and other hormones increase lipolysis [20].

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

Ethyl bark extract of Khaya senegalensis has an effect on the liver and kidneys of normoglycemic stuffed rabbits for a month. In the liver, hepatocytes are almost normal. However, we note the presence of many cells in the connective tissue of the central vein and dilation space of Disse. This would mean that the ethyl extract of bark of Khaya senegalensis have induced liver cell proliferation that led to an expansion of the space of Disse. Also, note do we with the 50mg/kg dose of PC hepatocytes pyknotic nuclei.

Compared to the kidneys, it notes that there are abnormal glomeruli. The renal tubules appeared dilated in places and there are glomeruli being destroyed. (REMAINS TO ANALYZE paragraphs in gray)

REFERENCES.

[1] **Musa H. R., Ambroggi M., Souto A. and Angeby K. A.** 2005. Drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by nitrate reductase essay applied directly on microscopy-positive sputum sample. J. Clin Microbiol

[2] **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. Food Chemistry 110: 697–705.

[3] **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

[4] **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.

[5] **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

[6] **Sarkhail P. et al.**, 2007. Antidiabetic effect of Phlomis anisodonta: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. Pharmacological Research, vol.56, pp261 - 266.

[7] **Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research, pp83 - 94.

[8] **Gill L.S., 1992**; Ethnomedical uses of plants in Nigeria. Uniben Press, Benin City, pp 15-65.

[9] **Maydell H. J.**, 1986. Trees and Shrubs of Sahel-thier Charactérisatics and Uses. Gesdtschaft, Fur,Germany, pp105-110

[10] **Kolawole S.O., et al.**, (2011); Effects of aqueous extract of Khaya senegalensis Stem Bark on biochemical and hematological parameters in Rats. J. of Pharm. And Toxic., vol.6 N°6, pp602-607.

[11] **Adebayo J.O., Yacubu M.T., Egwin E.C., Owoyele V.B.et Enaibe BU., 2003**. Effect of ethanolic extract of **Khaya senegalensis** on

Copyright © 2011 SciRes.

some biochemical parameters of rat kidney. Journal of Ethnopharmacology, vol.88 N°1, pp69–72

[12] **Lompo M. et al.**, 2007. In vitro preliminary study of free radical scavenging activity of extracts from Khaya senegalensis A. Juss.; J. Boil.Sci., vol.7, pp677-680.

[13] **Houghton P.J. and Raman A**, 1998 Laboratory Handbook for fractionation of natural extracts. Chapman and Hall, London.199p

[14] **Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G., Richmond W. and Fu P.C.**, 1974. Clinical Chemistry, 20,470.

[15] **Al- Achi A.**, 2005. Herbs that affect blood glucose level. Womens health in primary care, 8(7): 325-330

[16] **Pari L., Venkateswaran S. 2002.**Hypoglycaemic Activity Of Scoparia Dulcis L. Extractin In Alloxan Induced Hyperglycaemic Lapins Phytpther.Res.; 16 (7); 662-664

[17] **Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK., 2002.** Epigallocatechin Gallate, A Constituent Of Green Tea, Represses Hepatic Glucose Production. J Biol Chem, 277: 34933 - 34940.

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

Copyright © 2011 SciRes.

Les variations observées sous l'effet de l'extrait dans les paramètres mesurés ont suscité l'idée d'une étude histologique du foie et du rein chez les lapins traités.

III.4. Modifications histologiques engendrées par l'extrait éthylique de *khaya senegalensis* dans le foie et le rein chez le lapin.

L'objectif spécifique de ce travail est d'observer d'éventuels dommages tissulaires au niveau du rein et du foie des lapins traités en corroborant les résultats histologiques aux altérations de paramètres indicateurs tels que l'ALAT, l'ASAT, l'urémie…

«Modifications histologiques et biochimiques dues à l'administration *per os* d'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* chez le lapin (*Oryctolagus cuniculus*)».

Résumé

Les modifications histologiques et biochimiques dues à l'administration d'extrait éthylique d'écorces de tronc de *Khaya senegalensis* ont été évaluées chez le lapin. Sept lots de 3 lapins de race zélandaise ont été traités à l'extrait en administration *per os* respectivement aux doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, et 50mg/kg de poids corporel; un lot contrôle a reçu en lieu et place du traitement de l'eau distillée. Quelques paramètres biochimiques tels que la glycémie, l'urémie, la cholestérolémie totale, le taux de triglycérides, de l'alanine amino transférase (ALAT), de l'aspartate amino transférase (ASAT) et de la gamma glutamyl transférase (GGT), ont été mesurés par spectrophotométrie. Après 30 jours de traitement (une administration quotidienne de la dose correspondante de l'extrait), les lapins ont été sacrifiés pour une étude histologique du foie et du rein par microscopie en utilisant la coloration de P.A.S. L'activité de la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PD) hépatique et rénale a été mesurée par spectrophotométrie suivant la méthode décrite par Camus et al., en 1969. Les résultats des tests indiquent que les différentes doses de l'extrait n'ont pas modifié la glycémie chez les lapins traités. Les doses de 1 et 2.5mg/kg de poids corporel ont induit une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de triglycérides contrairement aux doses de 5, 10, 25 et 50mg/kg de poids corporel, lesquelles ont provoqué une augmentation non significative de ce paramètre par comparaison au lot témoin . Le taux de cholestérol total n'a pas pratiquement varié sous l'effet de l'extrait. Cependant, de manière isolée la dose de 5mg/kg de poids corporel a induit une augmentation significative ($p < 0,05$) de la cholestérolémie totale dans les lots traités comparés au lot témoin. L'urémie a significativement augmenté ($p < 0,05$) pour toutes les doses supérieures ou égales à 1mg/kg de poids corporel expérimentées. L'augmentation du taux de ALAT, de ASAT et de gamma GGT, induite par l'extrait est dose dépendante. La dose de 1mg/kg de poids corporel a engendré une diminution significative

($p<0,05$) de l'activité de l'enzyme G6PD rénale ; l'activité de la G6PD hépatique n'a pas varié pour la même dose. La dose de 5mg/kg de poids corporel induit une baisse significative ($p<0,05$) de l'activité de la G6PD rénale et hépatique ; cet effet est dose dépendant. Il existe une corrélation significative

entre l'augmentation de l'urémie et la dimunition de l'activité de la G6PD. L'étude histologique a montré que déjà à 10mg/kg de poids corporel, l'extrait induit des altérations morphologiques dans les tissus hépatique et rénal. L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* n'aurait pas d'impact significatif sur le métabolisme glucidique ni sur le métabolisme des lipides mais pourrait prédisposer l'organisme à l'oxydation cellulaire et donc altérer quelques fonctions hépatiques et rénales.

Mots clés : foie, rein, lapin, *Khaya senegalensis*, G6PD, NADPH, oxydation cellulaire.

Introduction.

L'homéostasie glucidique et du cholestérol, de même que la synthèse et la dégradation protéiques, se trouvent parmi les principales fonctions métaboliques hépatiques. Ces fonctions sont contrôlées par un système enzymatique où on retrouve l'alanine amino transférase (ALAT), l'aspartate amino transférase (ASAT), la gamma glutamyl transpeptidase (Gamma GT) et la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PD), etc...

La manière de vérifier l'usage sans danger d'une plante médicinale est de montrer comment celle-ci affecte les paramètres hématologiques et biochimiques (Akpanabiatu *et al*., 2005; Aboderin and Oyetayo, 2006). Des variations des valeurs physiologiques de ces paramètres sous l'effet d'un agent chimique chez les animaux expérimentaux est un indicateur des effets adverses dudit agent sur les organismes vivants (Cheesborough, 1991). Dans ce travail il s'agit de corroborer, à travers une étude histologique, les variations de quelques paramètres d'intérêts par les altérations tissulaires que causerait l'extrait éthylique d'écorces de tronc de *Khaya senegalensis (Meliaceae)* au niveau du foie et du rein, suite à son administration per os chez le lapin.

Matériel et méthodes.

Cadre d'étude.

L'étude a été réalisée au Laboratoire de Biomembrane et Signalisation Cellulaire de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, au sud du Bénin entre juillet 2011 et mars 2012. Les travaux d'extraction ont été effectués au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles essentielles à l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), Cotonou, Bénin.

Il s'agit d'une étude préclinique in vivo où le modèle animal utilisé est le lapin de race zélandaise.

Matériel végétal. Les écorces de tronc de *Khaya senegalensis* ont été récoltées en juillet 2011 dans la commune d'Abomey Calavi, zone agro écologique VI, au sud du Bénin (Figure 8). Cette zone a un climat de type Guinéen avec deux saisons de pluies (avril à juillet, septembre à novembre) ; la pluviométrie varie de 1000 à 1400mm et son sol est latéritique, ferrugineux ou hydro morphe. Elles ont été séchées à l'ombre dans un local aéré après identification suivant les clés de reconnaissance de la flore analytique du Bénin.

Préparation de l'extrait. Les écorces sèches de *Khaya Senegalensis* ont été réduites en menus morceaux et ensuite broyées dans un moulin à couteaux. 100g de la poudre obtenue, pesés à l'aide d'une balance analytique **SARTORIUS®** et déposés dans un bocal préparé à cette fin, ont été macérés dans 500ml d'éthanol 96% pendant 72heures. 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 **ROTAVAPOR®**. 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, concassés puis gardés dans des bocaux secs.et étiquetés

Matériel biologique. Vingt quatre lapins de poids corporel compris entre 1,155 et 1,370 kg, fournis par l'animalerie du département de zootechnie de l'université d'Abomey Calavi ont été utilisés pour le test.

Mise à condition des animaux. Les 24 lapins ont été nourris exclusivement de fourrages et abreuvés d'eau ; ils n'ont reçu aucun autre traitement médicamenteux dans le temps en dehors de l'extrait. Ils ont été répartis au hasard en huit lots de 3lapins traités comme suit :

- le lot $L_{0,}$ témoin, recevant par administration orale, de l'eau distillée à la place de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*,

- le lot $L_{0.5}$ a été le lot traité par administration orale, à la dose de 0.5mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30 jours.
- le lot L_1 a été le lot traité par administration orale, à la dose de 1mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30 jours.
- le lot $L_{2.5}$ a été le lot traité par administration orale, à la dose de 2.5mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30 jours.
- le lot L_5 a été le lot traité par administration orale, à la dose de 5mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30 jours.
- le lot L_{10} a été le lot traité par administration orale, à la dose de 10mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30jours.
- le lot L_{25} a été le lot traité par administration orale, à la dose de 25mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30 jours.
- le lot L_{50} a été le lot traité par administration orale, à la dose de 50mg/kg de poids corporel/jour de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*, pendant 30 jours.

Dosage de paramètres biochimiques. Afin de doser la glycémie, l'urémie, les cholestérolémies totale, le taux de triglycérides, de ALAT, de ASAT et de GGT chez les lapins, nous avons prélevé sous vide, du sang de ces animaux, 6heures après administration de l'extrait, à partir de la veine marginale de l'oreille ; le sang est recueilli dans des tubes à essais avec anticoagulant (l'EDTA, pour la glycémie) et secs (pour les autres paramètres), et ensuite est centrifugé à 3000

tours/minute pendant 5 minutes ; le sérum et le plasma surnageant ont été décantés et gardés pour le dosage de ces paramètres.

Glycémie. Nous avons dosé la glycémie par la méthode enzymatique avec le réactif GOD-PAP® (Bio labo : lot : 021101A / 2013/02 IVD) aux temps $T_{0,}$ T_0+6heures, T_0 correspondant au temps de prélèvement au terme des 12heures de jeûne, avant l'administration de l'eau distillée et de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis*.

Le principe du dosage 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.

Glucose + ½ O_2 + $2H_2O$ ⟶ :ide 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.

Urémie. L'urée a été dosée par la méthode décrite par Toro et Ackermann **en 1975,** après 30jours de traitement.

Triglycérides. Le Kit BIOLABO TRIGLYCERIDES méthode GPO du lot 071106B de ref 80019 est utilisé pour déterminer le taux sanguin de trigycérides

Le principe de dosage est basé 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 $\xrightarrow{\text{LIPASE}}$ Glycérol + acides gras libres

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

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

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

L'absorbance du complexe coloré (quinonéimine), proportionnelle à la concentration en triglycérides dans l'échantillon du sérum est mesuré à 500nm [5 ; 7].

H_2O_2+ chloro-4-phénol + 4-aminoantipyrine $\longrightarrow$ quinonéimine + $4H_2O$

Cholestérol total. Le Kit BIOLABO CHOLESTEROL CHOD-PAP du lot 081104A de REF 80106 a été utilisé.

Le principe du dosage est le suivant : la cholestérolémie a été déterminé suivant la méthode enzymatique CHOD-PAP décrite par Allain et al., selon le schéma suivant :

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

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

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

La quinonéimine formée présente une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de cholestérol présent dans l'échantillon du sérum. Cette intensité est mesurée au spectrophotomètre à 590nm.

Dosage des transaminases (ASAT, ALAT)

L'essai a été réalisé suivant la cinétique de l'enzyme IFCC. Le principe est basé sur la détermination de l'activité de GTO ou GTP selon les réactions suivantes:

ASAT

L-aspartate + 2-Oxoglutarate → oxaloacetate + Lglutamate oxaloacetate + NADH + H+ → NAD+ + Lmalate

ALAT

Alanine + glutamate de l'acide alpha-ceto pyruvique + glutamate → Acide Pyruvique + NADH + H+ → NAD+ + lactate

La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD+ est proportionnelle à l'activité de la GTO (ou GTP) et est mesurée à 340 nm

Mesure de l'activité de l'enzyme G6PD. Elle a été réalisée en trois étapes :

- **préparation de la fraction cytosolique.** Le foie et le rein prélevés ont été traités par les méthodes décrites par Camus et al., en 1969 afin d'obtenir la fraction cytosolique ; 1g de chaque foie et rein a été utilisé pour la préparation de l'homogénat du tissu hépatique et du tissu rénal (20%) (poids/volume). L'homogénat a été préparé par l'addition du 4ml de tampon phosphate 0.1M (0.1 M, PH 8 et KCl 154 mM) à 1g du tissu, puis broyé dans une porcelaine et centrifugé à 1400g pendant 10 minutes. Le surnageant recueilli a été à nouveau centrifugé à 12000g pendant 10 minutes puis le culot de cette deuxième centrifugation a été repris dans le tampon d'homogénéisation et centrifugé à nouveau. Les deux surnageant ont été recueillis pour le dosage**.** Le surnageant constitue la fraction dans laquelle les protéines totales et l'activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase ont été dosées.

- **Protéines totales.** Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de Biuret tel décrite par **(références)** pour doser les protéines totales dans les surnageant obtenus antérieurement, ce qui nous a permis de rapporter l'activité de la G6PD par unité de masse protéique. La quantité des protéines a été exprimée en g/L de l'échantillon. Elle a été obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du sérum albumine traité dans les mêmes conditions.

- **Activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase.** Dans la fraction cytosolique obtenue, nous avons mesuré l'activité de la G6PD suivant la méthode décrite par Camus **en** 1969 en utilisant le kit du dosage de la G6PD (BIOLABO REF 97089)**.** La méthode de dosage a consisté à prélever d'abord dans une cuvette 2.95mL de tampon coenzyme, constitué de 100mmol/L de tampon tris pH 8,0 ; 10mmol/L de $MgCl_2$; 0,5mmol/L de EDTA ; 310mmol/L de $NADP^+$ et de conservateur**,** auxquels nous avons ajouté 50 µL de surnageant puis le tout est incubé à 37°C pendant 5minutes. Nous avons déclenché la réaction avec l'ajout à ce mélange de 100 µL de la solution de Glucose-6-phosphate 0,6mmol/L. Nous avons lu l'absorbance initiale après 30secondes puis les autres chaque minute pendant 3mnutes. Ensuite nous avons calculé la moyenne des absorbance par minute (ΔAbs/min). Le dispositif utilisé calcule automatiquement l'activité enzymatique exprimée en U/mL (Une unité internationale correspond à la quantité qui transforme dans des conditions optimales bien définies (température, pH, quantité de substrat), une micromole de substrat par minute, puis nous l'avons convertie en mU/mg de protéines. Nous avons, juste après avoir obtenu la fraction cytosolique, procédé au dosage des paramètres sus-indiqués pour essayer d'assurer la linéarité du dosage.

Prélèvement d'organes. Après 30 jours de traitement, les 24 lapins ont été anesthésiés à l'éther, sacrifiés et ensuite disséqués ; le foie et le rein ont été immédiatement prélevés, lavés dans une solution de NaCl à 0,9% puis envoyés, dans la demi-heure qui suit, au Laboratoire d'histologie.

Coupes histologiques du foie et du rein.

Les coupes histologiques ont été réalisées suivant les techniques classiques utilisées en histologie. La méthode de coloration des coupes est celle de Hotchkiss-McManus ou la méthode à l'Acide Périodique-Schiff (APS).

Le principe est basé sur deux découvertes différentes :

- la réaction de Malaprade (1928), où on utilise l'oxydation par l'acide periodique pour transformer des groupes glycol en aldéhydes ;
- la leucofuchsine de Schiff (1966), solution de fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux, qui réagit avec les aldéhydes libres pour produire une coloration rouge.

Traitement des données. Les données recueillies ont été traités dans le Microsoft office 2007 et le logiciel Minitab14 version 2003 a été utilisé pour les différents tests de comparaison de moyenne ; le T-test a été utilisé pour la comparaison des moyennes des paramètres biochimiques entre les différents lots de lapins et pour la variation des paramètres biochimiques dans le temps. Pour apprécier la signification statistique de la différence des moyennes des paramètres entre les différents lots de lapins, nous avons utilisé l'analyse de variance (one-way ANOVA). Les résultats des paramètres sont exprimés sous forme de ***moyenne ± écart type***

Résultats.

Effet de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis* sur quelques paramètres biochimiques

Tableau IX Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur quelques les paramètres biochimiques

	Témoin	**L0.5**	**L1**	**L2.5**	**L5**	**L10**	**L25**	**L50**
Glycémie (g/L)	0.73±0.03	0.79±0.02	0.81±0.13	0.82±0.05	0.84±0.04	0.75±0.03	0.78±0.04	0.85±0.04
Triglycerides (g/L)	0.70±0.08	0.69±0.03	0.36±0.1*	0.41±0.0*	0.58±0.03	0.98±0.08	0.87±0.05	0.84±0.01
Cholesterol Total (g/L)	0.76±0.05	0.78±0.02	1.07±0.23	1.02±0.09	1.17±0.2*	0.80±0.13	0.86±0.13	0.79±0.02
Urémie (g/L)	0.11±0.16	0.19±0.03	0.23±0.1*	0.29±0*	0.34±0.2*	0.39±0.09*	0.42±0.13*	0.46±1.0*
ALAT (UI/L)	36±0.4	39±0.1	41±0.5	49±0.2*	55±0.1*	67±0.3*	81±0.0*	93±0.3*
ASAT (UI/L)	22±1.3	26±0.5	38±1.1*	51±0.9*	63±1.0*	76±0.4*	98±0.2*	122±0.6*
GGT (UI/L)	2±0.8	3±1.2	4±0.3*	8±2.1*	17±0.7*	19±0.5*	63±1.1*	49±0.3*
$G6PD_{Foie}$ (mU/mg)	127.3±12	124.5±10	122.8±22	62.6±13*	53±10*	48.2±8*	39.8±11*	40.6±10*
$G6PD_{Rein}$ (mU/mg)	168.6	153.11	121.7*	114.4*	110.9*	108.7*	105.3*	103.4*

*= Différence significative avec p-value < 0.05

Les valeurs de quelques paramètres biochimiques obtenues chez des lapins non traités (L_0) et ceux traités pendant 30jours à différentes doses de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sont consignées dans le tableau IX.

La glycémie n'a pratiquement pas varié pour aucune des doses expérimentées. Les lipides dosés ont quelque peu subit de variation avec une diminution significative des triglycérides chez les lapins ayant reçu respectivement l'extrait à la dose de 1mg/kg (L_1) et 2.5mg/kg de poids corporel ($L_{2.5}$), comparés aux lapins du lot témoin. La diminution de ce paramètre chez les lapins du L_5 n'est pas significative ($p > 0.05$) comparée au lot témoin. Le

cholestérol dans les différents lots n'a pas subit de variations sensibles sauf qu'il a été noté une augmentation significative de ce paramètre chez les lapins du $L_{5.}$

L'urémie a significativement augmenté ($p < 0,05$) chez tous les lapins ayant reçu l'extrait à l'une des doses expérimentales supérieures ou égales à 1mg/kg de poids corporel ; ce paramètre augmente avec l'élévation de la dose de l'extrait.

Les différentes doses de l'extrait utilisées dans les essais ont provoqué une augmentation des enzymes hépatiques telles que l'ALAT, l'ASAT et la Gama GT (Tableau IX) ; l'augmentation de l'ALAT est significative ($p < 0,05$) pour les lots ayant reçu l'extrait à des doses supérieures ou égales à 2.5mg/kg de poids corporel, comparés au lot témoin ; l'augmentation de l'ASAT et de la GGT est significative ($p < 0,05$) pour les lots ayant reçu l'extrait à des doses supérieures ou égales à 1mg/kg de poids corporel, comparés au lot témoin. L'activité de ces enzymes augmente au fur et mesure qu'on augmente la dose de l'extrait ; cet effet de l'extrait serait dose dépendant comme dans le cas de l'urémie.

On note une diminution de l'activité de l'enzyme G6PD dans le foie des animaux ayant reçu l'extrait à la dose de 1mg/kg de PC en comparaison avec le lot témoin (127.3 pour le contrôle contre 1228 pour le test). Cette diminution n'est pas significative. Par contre la diminution de l'activité de la G6PD hépatique est significative ($p< 0.05$) chez les animaux ayant reçu l'extrait à des doses supérieures ou égales à de 5mg/kg de poids corporel. Dans le rein, on observe une diminution significative ($p< 0.05$) de l'activité de la G6PD chez les lapins ayant reçu l'extrait à des doses supérieures ou égales à 1mg/kg de poids corporel. Il existe une corrélation significative entre l'augmentation de l'urémie et la diminution de l'activité de la G6PD dans le rein et dans le foie.

Effet de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis* sur l'histologie rénale

L'histologie du rein montre que l'extrait aux doses de 5, 10 et25mg/kg de poids corporel (figure 9, B,C,D,E) n'a pas engendré de dommages tissulaires au niveau du rein chez le lapin après 30 jours de traitement ; les glomérules (G) et les tubes (T) rénaux sont normaux, cependant on en observe quelques quasi-normaux et quelques rares anormaux pour les doses de 10 et 25mg/kg de PC (figure 9, D,E); pour la dose de 25mg/kg de PC (figure 9, E) les tubes rénaux paraissent dilatés par endroit. A la dose de 50mg/kg de PC (figure 9, F) on note la présence de glomérules rénaux anormaux, de tubes rénaux dilatés et des glomérules en voie de destruction.

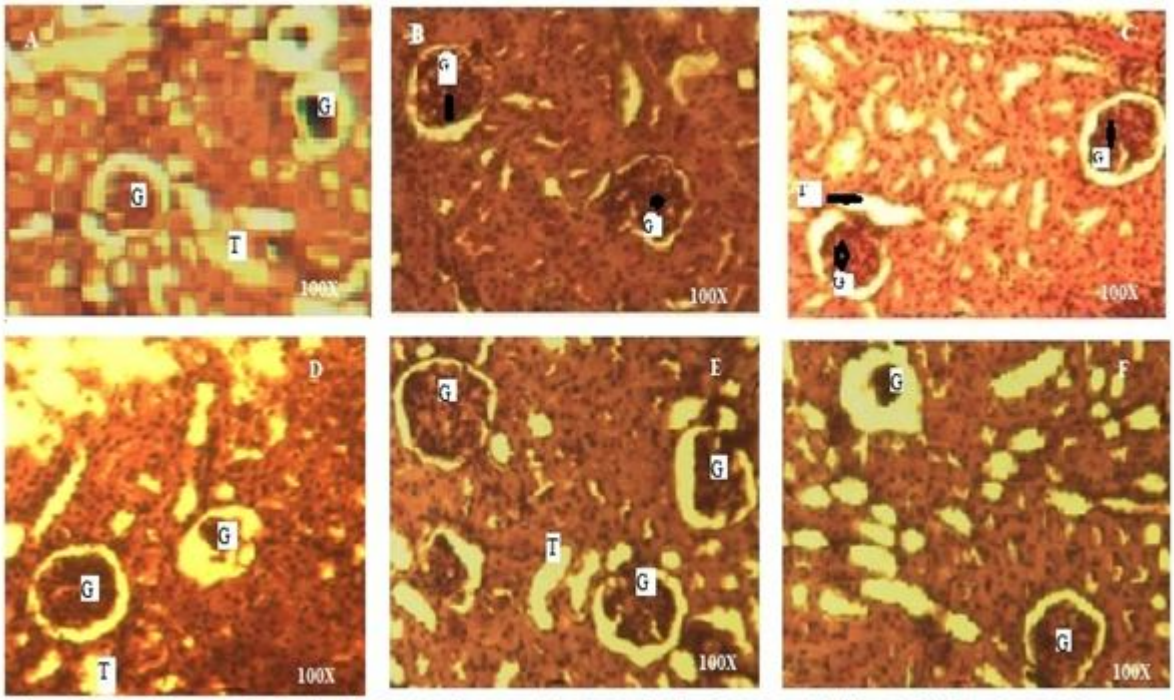


Figure 10 Histologie comparée de rein de lapin. A, lapins non traités (lot témoin); B et C, lapins traités à 5mg/kgPC; D, lapins traités à 10mg/kgPC; E, lapins traités à 25mg/kgPC; F, lapins traités à 50mg/kgPC. G=glomérule rénal; T=tube rénal . Coloration de P.A.S.

Effet de l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* sur l'histologie hépatique

L'histologie du foie a montré des hépatocytes normaux, un espace de Disse (ED) normal chez les lapins traités à l'extrait à 5mg/kg de PC (figure 10. C). A la dose de 10mg/kg de PC (figure 10. D et E) les hépatocytes sont quasi normaux et l'espace de Disse est normal mais on note parfois la présence de nombreux cellules dans le tissu conjonctif (TC) de la veine centrolobulaire (V). A la dose de 25 mg /Kg de poids corporel les hépatocytes sont quasi normaux et l'espace de Disse parait plus dilaté (figure10. F). Les hépatocytes présentent un noyau pycnotique sous la dose de 50mg/Kg de poids corporel et on note la présence de nombreuses cellules dans le tissu conjonctif de la veine centrolobulaire (figure 10. G et H).

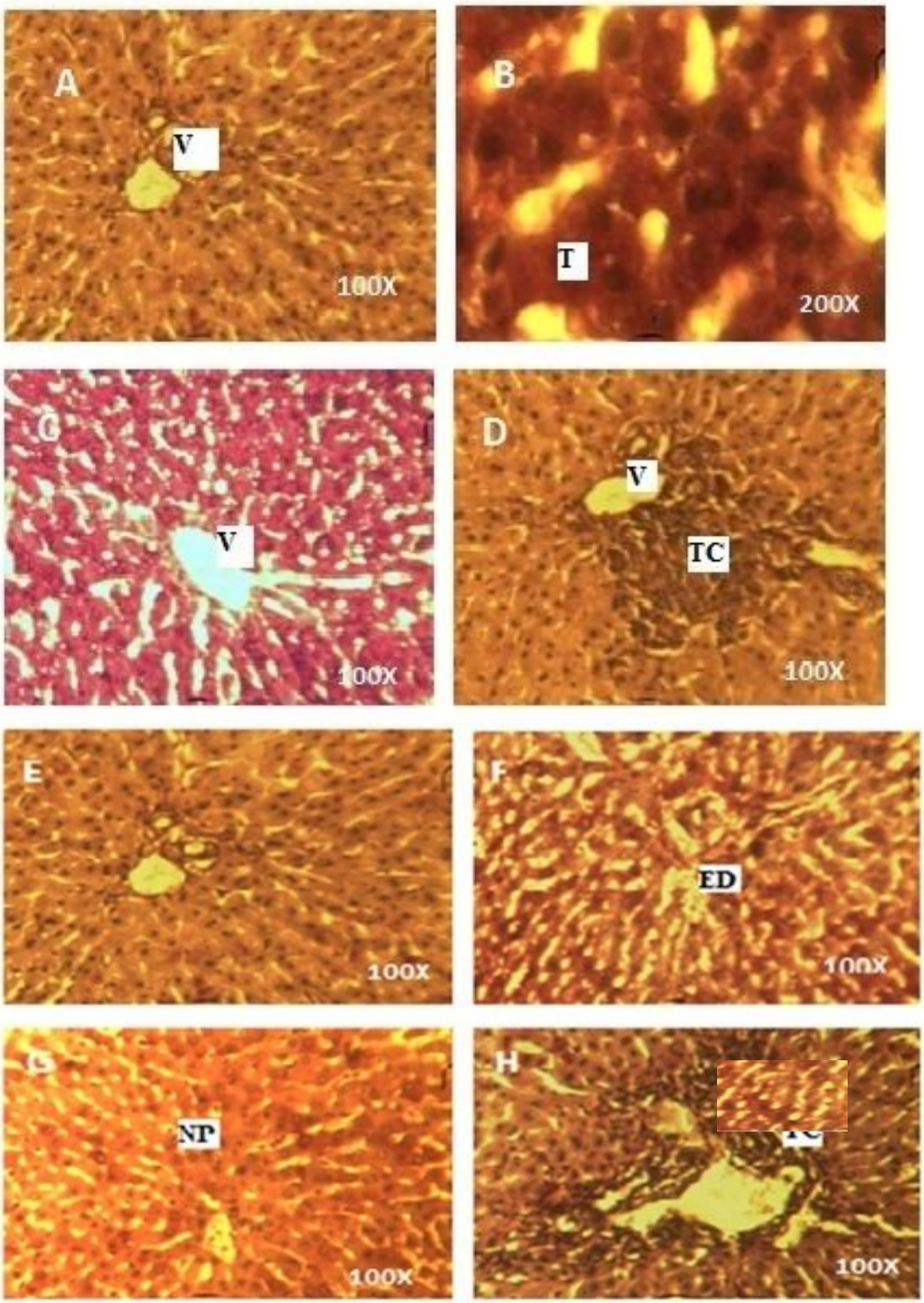


Figure 11 Histologie comparée de foie de lapins expérimentaux. A et B, lot témoin; C, lot traité à 5mg/kgPC; Det E, lot traité à 10mg/kgPC; F, lot traité à 25mg/kgPC; G et H, lot traité à 50mg/kgPC. V=veine centrolobulaire ; T= travées hépatiques; TC=tissus conjonctif; NP= noyeaux picnotiques; ED=espacede Disse. Coloration de P.A.S

Discussion

Chez le lapin, l'administration journalière de la même dose de l'extrait pendant quatre semaines n'a pas altéré la glycémie. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Ben *et al.*, (2008) qui ont constaté une diminution de 29% de la glycémie après neuf semaines de traitement par une décoction de la plante. Ceci serait du à la durée de traitement prolongée chez ces auteurs. Il est à noté que la décoction est une méthode d'extraction en milieux aqueux à des températures voisines de 100°C, donc la composition de l'extrait utilisé par ces auteurs pourrait être, dans une certaine mesure, différente de celle de l'extrait utilisé dans la présente étude qui est dans ce cas un extrait éthylique.

Les valeurs de la glycémie de 0.73±0.3g/L enregistrées chez les lapins non traités sont voisines de celles rapportées dans la littérature (0.77±0.4 à 1.54±0.8g/L) et de celles publiées par Othomani *et al*. en 2005 (0.8 à1.15g/L).

Les lipides dosés ont quelque peu subi de variations sous l'effet de l'extrait, avec une diminution significative ($p < 0,05$) des triglycérides chez les lapins des lots L_1 et $L_{2.5}$ comparés au lot témoin. Toutefois ces valeurs restent dans les normes physiologiques de notre modèle expérimental.

Les doses de l'extrait supérieures ou égales à 1mg/kg de poids corporel ont engendré une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'urémie chez les lapins traités comparés au lot témoin ; Kolawolé *et al.* en 2011, avaient déjà démontré que l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* administré à la dose de 100mg/kg de poids corporel provoquait une augmentation significative de l'urémie dans une étude réalisée sur le rat. Le lapin serait plus prédisposé que le rat aux effets toxiques de l'extrait ; cette prédisposition serait due à la variabilité biologique des espèces animales; le rat aurait mieux toléré l'extrait que le lapin. En effet un premier essai avec des

doses de 100, 200 et 300mg/kg de poids corporel a eu pour le résultat le décès de tous les lapins traités à l'extrait. Il est à noter qu'avec les doses supérieures ou égales à 2.5mg/kg de poids corporel les valeurs de l'urémie vont au-delà des valeurs physiologiques (0.096 à 0.28g/L) dudit paramètre chez les lapins traités. Une augmentation de l'urémie pourrait être un indice de disfonctionnement rénal (Aliyu *et al*., 2007b, Kolawolé et al., 2005).

L'augmentation de l'ALAT, de l'ASAT et de la GGT respectivement pour des doses de l'extrait supérieures ou égales à 2.5mg/kg, 1mg/kg et 1mg/kg de poids corporel est significative. L'ALAT et L'ASAT sont des enzymes hépatiques qui sont impliquées respectivement dans la désamination de l'alanine et de l'acide aspartique. L'augmentation de ces enzymes reflète une lésion tissulaire, en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire (Kolaawolé *et al*., 2011, Satpal et al., 2010) ; généralement, l'extension de la lésion est directement proportionnelle à l'augmentation de l'activité de ces enzymes (Aliyu *et al*., 2007a). Entre autres causes d'une élévation des transaminases (ALAT et ASAT) et de la GGT nous pouvons citer l'hépatite toxique ou médicamenteuse, l'insuffisance rénale aiguë, le syndrome néphrotique et l'infarctus du myocarde, maladie cardiovasculaire liée à une augmentation de la cholestérolémie (Attakpa *et al*. 2012). Tous ces résultats obtenus sur les enzymes et l'urémie dans cette étude confirment bien ces altérations tissulaires observées dans le rein et le foie des lapins traités ;

Les doses de 10mg, 25 et 50mg/kg de poids corporel ont engendré quelques altérations dans le tissu hépatique (accumulation de tissus conjonctifs, dilatation de l'espace de Disse, apparition de noyaux pycnotiques dans les hépatocytes) et le tissu rénal (anomalies glomérulaires, dilatation tubulaire).

La diminution significative de l'activité de la G6PDH permet de mieux expliquer ces altérations histologiques hépatiques et rénales observés chez les animaux traités ; Il existe une corrélation significative entre l'augmentation de

l'urémie et la diminution de l'activité de la G6PD dans le rein chez tous animaux traités à l'extrait, et dans le foie chez les animaux ayant reçu l'extrait à la dose de 5mg/kg de poids corporel.

La G6PDH **(EC 1.1.1.49)** est une enzyme de la voie des pentoses mono-phosphates. Elle catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phospho-gluconate avec réduction concomitante du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP+ ; NADPH, H+). Le NADPH réduit permet la régénération du glutathion, dont le rôle est la neutralisation des peroxydes, quelques fois très toxiques pour les cellules. C'est le cas chez certains sujets dont les hématies présentent un déficit de l'activité Glucose-6-phosphate déshydrogénase produisent moins de NADPH, H+ nécessaire à la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme. Ces hématies sont donc plus sensibles à l'hémolyse lors d'agressions oxydatives variées (infections, ingestion de certains médicaments ou aliments) (Mura M *et al*., 2009**)**. Le principal réducteur intracellulaire (de ces radicaux) est le NADPH dont la production est principalement dépendante de l'activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase qui constitue l'enzyme limitant de la voie des pentoses phosphates (Yizhen and al, 2005)**.** la G6DPH est la principale source de la NADPH et ont conclu qu'une faible activité de cette enzyme conduit à la diminution de NADPH et rend alors la cellule sensible aux effets délétères des oxydants.

Conclusion

L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* n'aurait pas d'impact significatif sur le métabolisme glucidique ni sur le métabolisme des lipides chez le lapin au terme des 30jours de traitement. Cependant il pourrait prédisposer l'organisme de l'animal à l'oxydation cellulaire qui se manifesterait par des altérations histologiques au niveau des organes vitaux comme le rein et le foie. L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* administré pendant 30 jours chez le lapin pourrait compromettre quelques fonctions hépatiques et rénales chez cette espèce. L'extrait serait hépatotoxique et néphrotoxique pour un usage à long terme.

Bibliographie

1. Abubakar M.G., Lawal A. et Usman M.R., 2009. Hepatotoxicity studies of sub-chronic administration of aqueous stem bark of *Khaya senegalensis* in Albino rats. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 3(1): 26-28.*
2. Adebayo J.O., Yakubu M.T., Egwim E.C., Owoyele V.B. et Enaibe B.U., 2003. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *Journal of Ethnopharmacology, 88(2003) 69-72.*
3. AdesoganE.K., 1968. The chemical constituents of *Khaya senegalensis*. Communication au Symposium interafricain: Pharmacopées traditionnelles et
   Plantes Médicinales Africaines, Dakar, Sénégal ; Mars 1968.
4. Adjanohoun E.J., Ahyi M.R.A., Ake Assi L., 1986. Contribution aux études ethnobotaniques floristiques au Togo. *ACCT, 389-392.*
5. Agbahungba A.G. et Sokpon N., 1998. Rapport national sur les ressources phytogénétiques forestières du Bénin. Cotonou, Bénin, 30 p.
6. Ali S.A.M., Elbadwi S.M.A., Idris T.M. et Osman K.M., 2011. Hepatoprotective activity of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark in rats. *Journal of Medicinal Plants Research 5(24) : 5863-5866.*
7. **Allain C. C. et al., (1974)**. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem,* **20(4)**:, P. 470-475
8. Androulakis X.M., Muga S.J., Chen F., Koïta Y., Touré B., Wargovich M.J., 2006. Chemopreventive Effects of *Khaya senegalensis* Bark Extract on Human Colorectal Cancer.*Anticancer Research, 26 : 2397-2406.*
9. Arbonnier M (2002). Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. The Netherlands: Cirad Margraf Publishers, pp. 189- 426.

10. Athanasiadou S, Githiori J et Kyriazakis I, 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal, 1(9) : 1392-1400.*
11. Ayo RG, Audu OT et Amupitan JO. 2007. Physico-chemical characterization and cytotoxicity studies of seed extracts of *Khayasenegalensis* (Desr.). *African Journal of Biotechnology, 6(7): 894-896.*
12. Azaizeh, H., Fulder S., Khalil K. et Said O., 2003. Ethnomedicinal knowledge of local arab practitioners in the middle east region. *Fitoterapia, 74: 98-108.*
13. Belem B., Olsen C.S., Theilade I., Bellefontaine R., Guinko S., Lyk A.M., Diallo A. et Boussim J.I., 2008. Identification des arbres hors forêt préférés des populations du Sanmatenga (Burkina Faso). *Bois et forêts des tropiques, 2008, 298 (4) : 53-64.*
14. CAB International, 2000. Forestry Compendium – a silvicultural reference. Global Module. Wallingford, UK: CAB International.
15. Caventou E., 1849. Recherches chimiques sur l'écorce du Caïlcédrat. *Pharm.*
    Chim., 16,355-362.
16. Centre Technique Forestier Tropical (CTFT), 1988. *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. *Bois et Forêts des Tropiques, 218 : 43-55.*
17. Chiezey N.P., Gefu J.O., Jagun A.G., Abdu P.A., Alawa C.B.I., Magaji S.O., Adeyinka I.A., Eduvie L.O., 2000. Evaluation of some nigerian plants for anthelmintic activity in young cattle. Actes de l'Atelier international sur Pratiques Ethnovétérinaires, ont 14-18 août, Kaduna, Nigeria.
18. Daniel-Yves A., 2002. Initiation à l'agroforesterie en zone sahélienne : les arbres des champs du Plateau Central au Burkina Faso. KARTHALA Editions. Paris France. 220 p.

19. Farrance **I.,** *Clin, Biochem. Reviews (1987),* 8, P.55 à 68
20. Fortin D., Lo M., Maynart G., 1990. Plantes médicinales du Sahel CECI (Montreal) et ENDA (Dakar). *Série Etude et Recherche, 174-176.*
21. **Fossati P, Prencipe L (1982)**. Serum triglyceride determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxyde. *Clin Chem,*28: 2077-80.
22. Full A.B., Vanhaelen-Faster R., Vanhaelen M., Lo L., Toppet M., Ferter A. et Fondu P., 1999. *In vitro* antisickling activity of a rearranged limonoid isolated from *Khaya seneglensis. Plant Med. 63(3): 209-212.*
23. Funke I. et Melzig M.F., 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of a-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(1): 1-5.*
24. Ibrahim M.A., Njoku G.C. et Sallau A.B., 2008. *In vivo* activity of stem barks aqueous extract of Khaya senegalensis against *Trypanosoma brucei. Afr. J. Biotechnol., 7: 661- 663.*
25. Karou D., Dicko M.H., Simpore J. et Traore A.S., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr. J. Biotechnol., 4: 823-828.*
26. Koffi N. 1, Beugré K , Guédé N. Z 1, Dossahoua T 1 & Laurent A 1, 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennesutilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)
27. Konaté K., Kiendrébéogo M., Ouattara M.B., Souza A., Lamien-Meda A., Nongasida Y., Barro N., Millogo-Rasolodimby J. et Nacoulma O.G., 2011. Antibacterial potential of aqueous acetone extracts from five medicinal plants used traditionally to treat Infectious Diseases in Burkina Faso. *Current Research Journal of Biological Sciences 3(5): 435 – 442.*

28. Le Strange J.N., 1977. The Useful Plants of West Tropical Africa. The Crown Agents, London, p. 325.
29. Lompo M., 1993. Etude pham1aco-toxicologique chez la souris et le rat de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss (Melliaceae) utilisé en tradithérapeutique
au Burkina Faso. Mémoire de D.E.A. Physiol. Anim. Appl. Université de Ouagadougou.
30. Lompo M., 1999. Activité anti-ilflammatoire des extraits d'écorces de tronc de *Khaya senegalensis A. Juss* (Melliaceae) : Mise au point d'une forme galénique topique (Phase 1). Thèse de Doctorat du Troisième Cycle. Université de Ouagadougou. Burkina Faso. 177p.
31. Nacoulma, O.G., 1996. Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. Ph.D. Thesis, University of Ouagadougou, pp: 328.
32. Ndiaye S.S., 2013. *Khaya senegalensis* ou hay en wolof. http://sambamara.com/index.php?option=com_content&view=article&id=11khaya-senegalensis-ou-hay-en-wolof&catid=52:des-plantes&Itemid=70
33. Nwosu C.U., Hassan S.W., Abubakar M.G. et Ebbo A.A., 2012. Anti-diarrhoeal and toxicological studies of leaf extracts of Khaya senegalensis. *Journal of Pharmacology and Toxicology, 7(1) : 1-10.*
34. Okpara J.O., Anagor P.O., Okpalia E.J., Abdullahi A. et Ahmed M.S., 2004. The anthelmintic efficacy of medicinal herb extracts against gastrointestinal helminths of sheep. Rapport de la 9ème Conférence Annuelle de Animal Science Association of Nigeria (ASAN), 13–16 Sept. 2004. Ebonyi State University, Nigeria.
35. Puri A., Saxena R., Saxena R.P., Saxena K.C., Strivastav V. et Tandon J.S., 1993. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod., 58 : 995-999.*

36. René H**.** Techniques d'histolopathologie et de cytopathologie *Décarie éditeur, Montréal Maloine éditeur Paris pp : 20-183*
37. Sablassou K., Aklikokou A.K. et Gbeassor M., 1998. Activité anti-contracturante de l'extrait de Khaya senegalensis sur l'iléon de cobaye. *Pharm. Méd. Trad. Afr., 10 : 3-15.*
38. Sale M., De N., Doughari J.H., Pukuma M.S., 2008. In vitro assessment of antibacterial activity of bark extracts of Khaya senegalensis. *Afr. J. Biotechnol., 7: 3443-3446.*
39. Satpal S.K.J. et Punia J.S., 2010. Studies on biochemical change in subacute thiodicarb toxicity in rats. *Toxicol. Int., 17 : 30-32.*
40. Sokpon N. et Ouinsavi C., 2002. Utilisations du *Khaya senegalensis* en médecine traditionnelle au Bénin. *Revue de Médecine et Pharmacopée Africaine, 16 : 9-19.*
41. Sokpon N. et Ouinsavi C., 2004. Gestion des plantations de *Khaya senegalensis* au Bénin. *Bois et Forêts des Tropiques, 279(1) : 37-46.*
42. Sule M.S., Abdulraheem R.B. et Aminu B.M., 2008. Potency of aqueous stem bark extract of Khaya senegalensis against liver diseases in rats. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 1(1) : 29-31.*
43. Toro, G. and P.G. Ackermann, 1975. The Practical Clinical Chemistry. 1st Edn., Little Brown and Co., Boston, USA.
44. **Trinder P**., *Ann. Clin. Biochem. (1969)*, 6, P.24-27
45. Umar I.A., Ibrahim M.A., Fari N.A., Isah S. et Balogun D.A., 2010. *In-vitro* and *-vivo* anti-*Trypanosoma evansi* activities of extracts from different parts of *Khaya senegalensis*. *Journal of Cell and Animal Biology, 4(6) : 91-95.*
46. Umar I.A., Wurochekke A.U., Gidado A. et Igbokwe I.O., 1999. Effects of combined parenteral Vitamins C and E administration on the severity

of anaemia, hepatic and renal damage in *Trypanosoma brucei* brucei. Vet. Parasitol. 85: 43-47.

47. Von Maydell H.J., 1983. Arbres et Arbustes du Sahel. Leurs caractéristiques et
leurs utilisations. G.T.Z. ESCHBORN. 283-284.
48. Williamson J.A., Bosher J.M., Skinner A., Sheer D., Williams T. et Hurst H.C., 1996. Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors. *Genomics, 35: 262-264.*
49. Yakubu M.T., Adebayo O.J., Egwim E.C. et Owoyele V.B., 2005.Increased liver alkaline phosphatase and aminotransferase activities following administration of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* stem bark to rats. *Iokemistri, 17(1) : 27-32.*

III.4 Bioactivité des extraits de *Khaya senegalensise* et la mobilisation des transporteurs lipidiques : ATP-binding cassette G5/G8 (ABCG5/8) et Nieman Pick C1 like 1 Protein (NPC1L1).

L'objectif de ce travail est d'établir un lien entre la modification de la synthèse des transporteurs lipidiques observée chez la souris soumise à une diète riche en cholestérol, et les variations des taux des lipides observées chez le lapin après administration de l'extrait.

Dans le jéjunum comme dans le foie des souris soumises à une diète enrichie à 5% en cholestérol, la RT-PCR a révélé l'induction du gène codant pour l'expression de l'ABCG5. Le niveau de la protéine NPC1L1 impliquée dans l'assimilation du cholestérol a significativement diminué chez les souris soumises à une diète enrichie à 5% en cholestérol ; chez ces souries le niveau de phospholipides a augmenté mais la portion des triglycérides n'a pas varié. De manière similaire, la mase du foie des souris de ce groupe a augmenté en pic. La concentration plasmatique des transaminases a confirmé le développement de stéatose.

Publication 4

Références**:** Attakpa S.E., Djibril M**.** N., **Takin C. M**. Baba-Moussa F. and Sezan A., 2012.«**The Impact of CholesterDiet on NPC1L1 and ABCG5 Transporters and Some Biochemical Parameters in Mouse». Jounal Of Physiology and Pharmacolgy Advances, 2012. 2(10): 337-348**

JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY ADVANCES

The Impact of Cholesterol Diet on NPC_1L_1 and ABCG5 Transpoters and Some Biochemical Parameters in Mouse

Attakpa S. E., Djibril M. N., Takin C. M., Baba-Moussa F. and Sezan A.

J Phys Pharm Adv 2012, 2(10): 337-348



Online version is available on: www.grjournals.com

Original Article

The Impact of Cholesterol Diet on NPC_1L_1 and ABCG5 Transpoters and Some Biochemical Parameters in Mouse

[*1]Attakpa S. E., [2]Djibril M. N., [1]Takin C. M., [3]Baba-Moussa F. and [1]Sezan A.

[1]Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques 01 BP 4521 Université d'Abomey Calavi Cotonou (Rép. du Bénin).
[2]Unité de Pharmacologie, Faculté des Sciences de la Santé (FSS) -UAC 01 BP 188 Cotonou.
[3]Laboratoire de Microbiologie et de Technologie Alimentaire, Département de Biologie Végétale Faculté des Sciences et Techniques BP : 526 Université d'Abomey Calavi Cotonou (Rép. du Bénin).

Abstract

Cholesterol homeostasis in the body is controlled mainly by endogenous synthesis, intestinal absorption, and hepatic excretion. Changes in cholesterol absorption and hepatic excretion were reflected by changes in major transporters: ATP-binding cassette G5/G8 (Abcg5/8) and Nieman Pick C1 like 1 Protein (Npc1l1).

The aim of our study is to investigate the impact of cholesterol diet on those transporters. Eight (8) weeks male mice have been used, fed during fifteen (15) days and divided into two (2) groups: a control group of (15) mice fed with standard diet and other (15) mice fed with 5%cholesterol diet (second group) .The dosage of excreted cholesterol in feces was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Concentration of total cholesterol and triglycerides in the plasma and in the liver is determined by enzyme assay.The expression of mRNA was quantitatively analyzed by RT-PCR. In the jejunum as in the liver of mice subjected to 5% cholesterol diet the RT-PCR revealed the induction of the gene encoding Abcg5 expression. The level of Npc1l1 protein, involved in the intestinal uptake of cholesterol was decreased significantly in mice subjected to 5% cholesterol diet. In those mice, the level of phospholipids has increased, but the rate of triglycerides does not vary. Similarly the masses of livers of mice of that group have increased sharply. The plasma concentration of transaminases, confirmed the development of steatosis. This may explain partially, why mice subjected to 5% cholesterol diet did not develop the syndrome of high cholesterol.

Key words: Mouse, ABCG5/G8, NPC1L1, ALT, AST

[*] Corresponding author: Laboratoire de Biomembranes et Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques 01 BP 4521 Université d'Abomey Calavi Cotonou (Rép. du Bénin).
Received on: 27 Jul 2012
Revised on: 02 Oct 2012
Accepted on: 21 Oct 2012
Online Published on: 30 Oct 2012

Abbreviations

CHOL	Cholesterol
ABCG5/G8	ATP-binding cassette G5 and G8
NPC1L1	Nieman Pick C1 likes 1 Protein
ALT	Alanine Amino Transferase
AST	Aspartate Amino Transferase.

Introduction

Increased blood cholesterol is an independent risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease. Atherosclerosis is characterized by the formation of atherosclerotic plaques which constitute the inflammatory sites in the arterial wall with accumulation of lipids and fibrous elements (Berliner JA et al., 1995; Lusis AJ 2000).

The incidence of coronary events is directly related to plasma level of LDL cholesterol (low density lipoprotein) and inversely related to the level of HDL-cholesterol (high density lipoprotein) (Assmann G, Cullen P, Jossa F, et al., 1999; Braunwald E 1997). Thus, cholesterol's metabolism is a key development of cardiovascular diseases (Ros E 2000; Russell DW 1992). Nowadays, studies of cholesterol absorption have steadily grown and continue with the arrival of new cholesterol-lowering agents (Ezetimibe), which act either by inhibiting the synthesis, of cholesterol and also by inhibiting its absorption. In search of the molecular target of ezetimibe, Altmann et al. (Altmann, S. W., H. R. Davis, Jr., L. J. Zhu et al., 2004) identified a polytopic transmembrane protein named Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), which localizes at the brush border membrane of the small intestine and mediates intestinal absorption of cholesterol.

Physiological, genetic and nutritional factors are involved in cholesterol metabolism. But it is difficult to determine the relation between the cause and effect, because of the complexity of the regulatory mechanisms of cholesterol and the involvement of several factors (Santosa S et al., 2007C). Cholesterol homeostasis in the body is controlled mainly by endogenous synthesis, intestinal absorption, and hepatic excretion. That homeostasis implements complex regulatory mechanisms that involve both the absorption and cholesterol synthesis.

It is known that the metabolism of cholesterol and bile acids are linked. Bile acids are synthesized in the liver from cholesterol. Following this review, approximately 98% of bile acids synthesized are conjugated to glycine or taurine and then excreted in the bile. Bile is stored in the gallbladder until it is released into the duodenum during food intake.

The transport of conjugated bile acid in key organs requires more carriers. The modulation of the excretion of these transporters may be responsible for the excretion of bile acids through cholesterol elimination. The cholesterol carried in LDL is derived principally from de novo synthesis and absorption from the diet (Turley SD and Dietschy JM; 1988). In population, there is a significant and positive correlation between the level of plasma LDL-cholesterol and the efficiency of intestinal cholesterol absorption (Kesäniemi YA and Miettinen T., 1987). Therefore, understanding the genetic regulation of cholesterol absorption may lead to novel approaches to the treatment of cardiovascular diseases that affect millions of people in societies. Thus great efforts have been made to search for molecular, genetic, biochemical, and physical-chemical determinants of intestinal cholesterol absorption (Lammert F and Wang DQH., 2005). Recent studies show that ATP-binding cassette (abc) transporters ABCG5 and ABCG8 may work together as an apical sterol export pump promoting active efflux of cholesterol and plant sterols from the enterocyte back into the intestinal lumen for excretion (Plosch T, Bloks VW, Terasawa Y et al.,2004; Wang HH et al.,2005; Yu L et al., 2003).

Also, the newly identified Niemann-Pick C1-like 1 (Npc1l1) protein may play a critical role in the ezetimibe-sensitive cholesterol absorption pathway and might induce active influx of cholesterol from the intestinal lumen into the enterocyte (Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ et al., 2004; Davis HR, Zhu LJ, Hoos LM et al., 2004).

It functions as a sterol transporter to mediate intestinal cholesterol absorption and counterbalances hepatobiliary cholesterol excretion.These findings strongly support the notion that cholesterol absorption is a multistep process that is regulated by multiple genes at the enterocyte level (Lammert F and Wang DQH, 2005; Wang DQH et al.,2001). Therefore, it is imperative to investigate molecular mechanisms underlying the dominant rate-limiting step/factor in cholesterol absorption. Cholesterol may be directly excreted when the major carriers were identified. In the liver,

the hetero dimer formed by the ATP-binding cassette G5 and G8 (Abcg5/g8) secrete cholesterol in the bile. The two ATP-binding cassette (abc) half-transporters, g5 and g8, reside at the canalicular membrane of hepatocytes and the apical membrane of absorptive enterocytes where they function as heterodimers to transport cholesterol and noncholesterol sterols into the bile canaliculus and the gut lumen for fecal excretion (Yu, L., J. Li-Hawkins et al.,2002; Yu, L., R. E. Hammer et al., 2002; Graf, G. A., W. P. Li et al., 2002; Graf, G. A., L. Yu, W. P. Li et al., 2003). At the ileum level, the protein Nieman Pick C1 like Protein 1 (Npc1l1) could permit intestinal capture of biliary and diet cholesterol.

The aim of this study is not only to evaluate the impact of a high cholesterol diet on the ileal and liver transport system and on some biochemical parameters in mice but also to contribute to a better molecular and physiological knowledge that would be the origin of cholesterol metabolism.

Materials and Methods

Animals

Eight (8) weeks C57BL/6J male mice have been used. Those mice have been fed fifteen (15) days and Divided into Two (2) groups:

- A control group of fifteen (15) mice fed with standard diet: wheat, fish and vitamins
- Other fifteen (15) mice fed with a rich diet of 5% cholesterol called: group of 5% cholesterol then, mice are killed. For Physiological Studies, the fifteen (15) control mice and the fifteen (15) 5% cholesterol mice were placed into two different metallic cages to monitor parameters like the fecal excretion of cholesterol. Finally, the mice were then sacrificed and target organs were removed and frozen at -80 ° C. The experimental protocol was approved by Benin Ethics Committee.

Biochemical assays

Dosage of cholesterol excreted in feces

The dosage of cholesterol excreted in feces was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Dosage of plasma concentrations of free cholesterol, cholesterol ester, total cholesterol, and triglycerides

Enzyme assays were performed to determine plasma concentrations and for dosages following concentrations were used:

- Concentration of free cholesterol: Free Cholesterol C-R1, Wako
- Concentration of cholesterol ester: see Principle
- Concentration of total cholesterol: Cholesterol 100, ABX Diagnostics
- Concentration of triglycerides: Triglycerides 25, ABX Diagnostics

The principle of the assay is as follows:

$$\text{Cholesterol ester} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Cholestrol} + \text{Fat acids}$$

$$\text{Cholestrol} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholestrol oxydase}} \text{Cholestrol} - 3 - \text{one} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + 4\text{a min oantipyrine} + \text{Phenol} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{Quinone imine} + 4H_2O_2$$

The absorbance is measured at 590nm

$$\text{Triglycerides} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipoprotein lipase}} \text{Glycerol} + \text{Fat acids}$$

$$\text{Glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glycerol kinase}} \text{Chycerol} - 3 - \text{phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerol} - 3 - \text{phosphate} + O_2 \xrightarrow{\text{G-3-P oxydase}} H_2O_2 + \text{DHAP}$$

It is indeed by the principle of Triglyceride dosage.

Storage of liver phospholipids of triglycerides and total cholesterol

Liver phospholipids were assayed using the enzymatic kit Phospholipids PAP 150 (BioMérieux).

- The principle is based on the release of cholin under hydrlitic action of phospholipase D. Cholin is then oxidized by cholin oxydase. That reaction generates hydrogen peroxide which under the action

of peroxydase gave a colored compound which absorbance is measured at 450nm.

- Then from the liver we proceed to prior extraction of total lipid by Ter-butanol.The principle remains the same as previously.

Transaminases dosage (AST, ALT)

Assays were carried out according to the IFCC enzyme kinetics. The principle is the determination of activity of GOT or GPT according to the following reactions:

AST

L-aspartate + 2-Oxoglutarate → oxaloacetate + Lglutamate oxaloacetate + NADH + H^+ → NAD^+ + Lmalate

ALT

alanine + alpha-ceto pyruvic acid glutamate + glutamate → Pyruvic acid + NADH + H^+ → NAD^+ + lactate

Decreasing in absorbance due to conversion of NADH to NAD^+ and proportional to the activity of GOT (or GTP) was measured at 340 nm.

RT-PCR quantification assay

Total RNA from treated fish Prepared WAS T-cells using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Groningen, the Nederland) According to the manufacturer's instructions. The Integrity of RNA electrophoretically checked by ethidium WAS bromide staining and by the absorption ratio OD OD260nm/OD280nm.A microgram of RNA transcribed reversibly with WAS RNAze Superscript II reverse transcriptase using H-oligo (dT) According To the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technology, France).

PCR Real Time was performed I cycler one year, real time detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and amplification WAS done by using SYBR Green I detection (SYBR Green Jumpstart Taq Ready mix for quantitative PCR, Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA). Oligonucleotide primers and probes for mouse Abcg5, and Npc1l1 have been described elsewhere (Duan LP et al., 2004; Wang HH et al., 2004) (Tableau 1), used for mRNA analysis, were based on the sequences of mice gene in the GenBank database. Primers, which were designed by Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

To obtain a normalized target value, the target amount was divided by the endogenous reference rodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) as the invariant control (part no. 4308313, Applied Biosystems).

Table 1: Primer and probe sequences used in mRNA quantification by real-time PCR

Abcg5	Forward: 5-CCTGCAGAGCGACGTTTTTC-3; Reverse: 5-GCATCGCTGTGTATCGCAAC-3; Probe: 5-AGCAGCCTCACTGTGCGCGAGA-3 ;
Npc1l1	Forward: 5-CCACAGACCCTGTGGAACTGT-3; Reverse: 5-GCTCGTCATGGAAAGCCTTT-3; Probe: 5-CCCCTAAAAGCCAAGCCCGGAAAG-3.

The amplification WAS carried out in a total volume of 25µl Containing 12.5µl SYBR Green Taq Ready Mix, 0.3µM of each primer and diluted cDNA. Cycling conditions consisted to denaturation step initial year of 95 ° C for hot start has 3minas Followed by 40 cycles of 95 ° C for 30 sec or at 60 ° C for 30sec with a simple fluorescence detection developed at the end of the annealing or extension under segment. At the end of the PCR, the temperature from 60 WAS laundry charges to 90 ° C for 15sec and 2 at 58 ° C for 60sec, and the fluorescence WAS Measured Every 15 seconds to draw the melting curve. The standard curves generated were for each protein or β-actin using serial dilution of positive control template in order to ESTABLISH PCR efficiencies. All determinations were performed at least in duplicates using two dilutions of each assay reproducibility to achieve. Results were evaluated by IQ software I cycler including standard curves, amplification

efficiency (E) and threshold cycle (Ct). Relative mRNA quantization of speech was determined using the ΔΔCt ΔΔCt = ΔCt in which (gene of interest)-Δ Ct (β-actin). ΔCt = Ct (interest group)-Ct (control group). Relative quantity (RQ) was calculated as follow: RQ = (1 + E) (-ΔΔCt)

Statistical Analysis

Results are shown as means clustering ± SEM. The significance of the differences between mean values was determined by two-way ANOVA (STATISTICA, version 4.1, Stat soft, Paris, France), followed by the least significant difference (LSD) test. Were differences regarded significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Expression of ABCG5 transcript levels involved in the transport of cholesterol into the jejunum and liver

To appreciate the impact of rich cholesterol diet on cholesterol transport, two systems have been studded. Regarding to the two proteins: ABCG5 and ABCG8 associated in heterodimer, only the expression of ABCG5 has been appreciated.

In the jejunum (Fig. 1A) as in the liver (Fig. 1B), the analysis by real time PCR revealed an induction of the gene coding for ABCG5 mice subjected to 5% cholesterol diet.

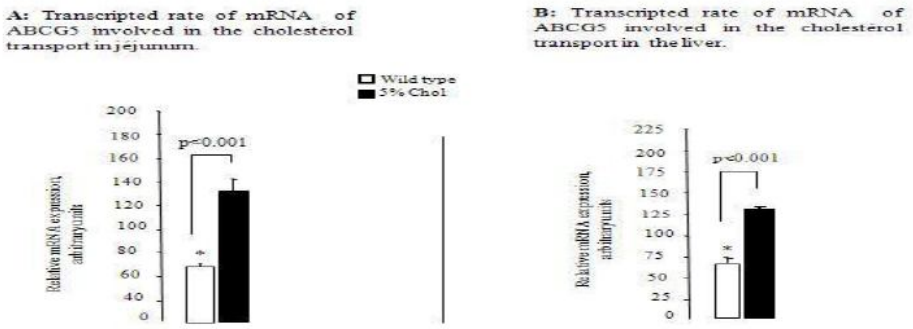


Figure. 1 Expression of transcripted ABCG5 levels involved in the transport of cholesterol into the jejunum and liver.

Eight weeks male mice wild type C57BL/6J have been used. Those mice have been fed during fifteen days and divided into two groups: control mice group fed with standard diet: wheat, fish and vitamins. Other mice second group fed with a rich diet of 5%cholesterol . The parameters were determined as described in materials and methods section. Values are means ± SEM, n = 15 per group of animals. Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. *significant differences ($p<0.001$) between WT and mice subject to the 5% cholesterol regime. NS =insignificant differences. ABCG5: ATP-binding cassette G5.

Expression levels of NPC1L1 transcripts involved in transport of cholesterol into the jejunum

NPC1L1 protein involved in the intestinal uptake of cholesterol and specifically localized in the jejunum, sees its expression decreased significantly in mice subjected to 5% cholesterol diet (Fig. 2).

Cholesterol excretion in feces

Npc1l1 protein involved in intestinal storage of cholesterol at jejeunal level has seen its expression decreased in mice subjected to 5%cholesterol diet so we think to another regulatory mechanism which took over. Hence the idea of quantifying excreted cholesterol in the feces. In mice subjected to 5% cholesterol diet, there is a sharp increase in fecal

leakage of cholesterol compared to the control group (Fig. 3).

Plasma concentrations of free cholesterol, cholesterol ester, total cholesterol and triglycerides

To verify that mice subjected to 5% cholesterol diet developed in the 15th day hypercholesterolemia or not, we proceed to the plasmatic dosage of free cholesterol, cholesterol ester, total cholesterol and triglycerides. The results of the dosage of all those biochemical parameters showed no significant differences between the two groups of mice (Fig.4).

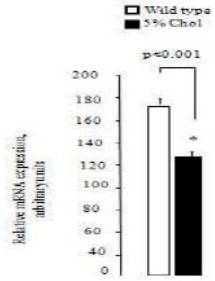


Figure. 2: Expression levels of transcripted NPC1L1 involved in transport of cholesterol in the jejunum.

The expression of mRNA was quantitatively analyzed by employing RT-PCR as described in materials and methods section.. Values are means ± SEM, n = 15 per group of animals. Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. *significant differences ($p<0.001$) between WT and mice subject to the 5% cholesterol regime. NPC1L1: Nieman Pick C1 like Protein 1.

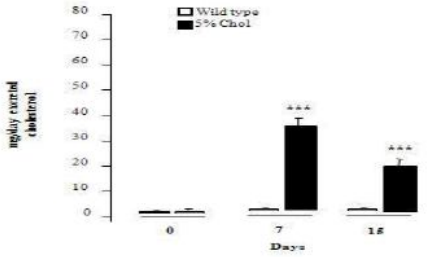


Figure. 3: Quantity of excreted cholesterol in feces

The dosage of cholesterol excreted in feces was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry.). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. *** significant differences ($p<0.001$) between different treatments.

Storage of liver phospholipids of triglycerides and total cholesterol

In order to better appreciate cholesterol storage modification with physiological modifications which accompany it, we proceed to the dosage of phospholipids, triglycerides and total cholesterol. In mice subjected to 5%cholesterol diet, the quantity of phospholipids has increased comparing to control mice. The rate of triglycerides didn't change. Endly, we assist to a strong storage of cholesterol in the livers of mice subjected to 5% cholesterol diet compared to the control mice (Fig. 5).

Liver mass of mice

The results of biochemical parameters determination like the concentration of free plasmatic cholesterol, cholesterol ester, total cholesterol and triglycerides which didn't reveal any significative differences between control mice and those subjected to 5% cholesterol diet confirmed that mice subjected to 5% cholesterol diet didn't develop hypercholesterolemia.

Otherwise, despite of the maintain of normal cholesterolomia, cholesterol hemostazia can be disturbed. Hence the importance of weighing of mice livers. Livers mass of mice subjected to 5% of cholesterol have increased significantly. In any case those livers were gray with blacks spots suggesting steatosis (Fig. 6).

Determination of ALT and AST

The increase in liver mass of mice subjected to 5% of cholesterol diet has been significantly then we suggest a liver damage. The plasma level of hepatic transaminases which are non specific markers of liver damage like hepatitis, steatosis including tumors.

We found that the plasmatic concentration of transaminases has increased significantly in mice subjected to 5% cholesterol diet, compared to the control group; it confirmed the development of steatosis.

We also noticed a greater increase of alanin aminotransferaze (ALT) than aspartat amino transferaze (AST) (Fig.7)

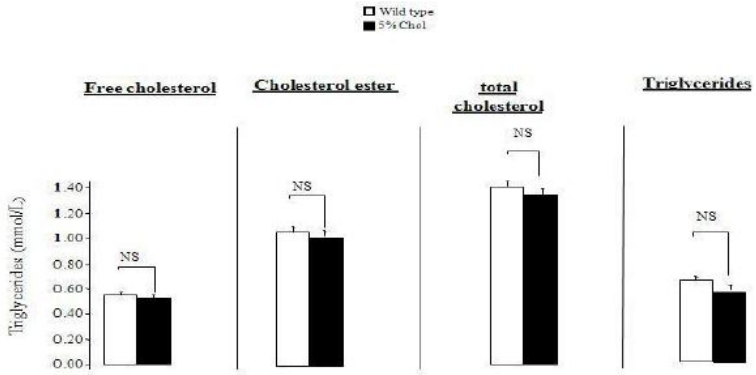


Figure. 4: Plasmatic concentration of free cholesterol, cholesterol ester, total cholesterol and triglycerides

Plasmatic concentration of different cholesterol was performed as described in materials and methods section. Values are means ± SEM, n = 15 per group of animals. Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. NS: =insignificant differences. (p=0.001) between WT and mice subject to the 5% cholesterol regime.

Cholesterol overload (CO) is likely to cause at least two effects on various intestinal genes:

The induction of expression of ileal bile acid-binding protein (*Ibabp*), which increase the reabsorption of bile acids (BA) in the ileum, and the rise, via the liver-X-receptor (*LXR*), of the synthesis of membrane transporters Abcg5 and G8, leaders of the efflux of cell cholesterol.

Recent progress in understanding the molecular basis of intestinal sterol transporters has provided many new insights into the complex physiological mechanisms involved in intestinal cholesterol

absorption (Lammert F et al., 2005). The first effect contributes to maintain the integrity of the ileac mucosa, whereas the coordination of the two effects is likely to increase fecal excretion of cholesterol.

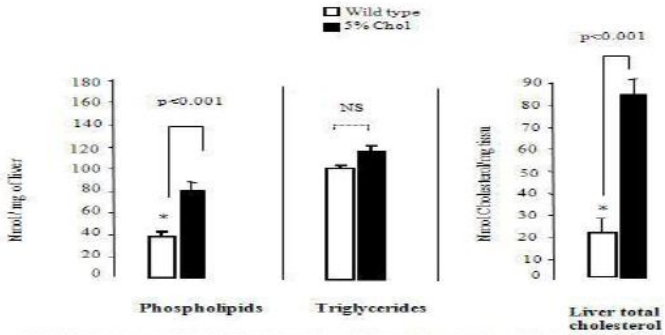


Figure. 5: Storage of liver phospholipids , triglycerides and total cholesterol.

Liver phospholipids were assayed using the enzymatic kit Phospholipids PAP 150 (BioMérieux).
The storage of liver phospholipids, triglycerides and total cholestérol were performed as described in materials and methods section. Values are means ± SEM, n = 15 per group of animals. Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. NS: =insignificant differences. ($p<0.001$) between WT and mice subject to the 5% cholesterol regime .

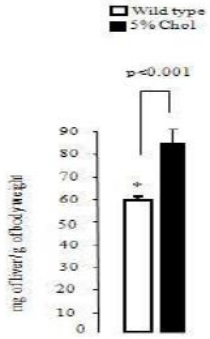


Figure. 6: Liver mass of mice.

The parameters were determined as described in materials and methods section. Values are means ± SEM, n = 15 per group of animals. Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. *significant differences ($p<0.001$) between different treatments.

Cholesterol induced in the liver the transcribed rate of Cholesterol 7α-hydroxylaze (CYP7A1), limiting enzyme of bile acids synthesis. What's more expression of CYP7A1 encoding gene is induced in mice with 5% diet of cholesterol. Also we noticed an increase of distribution and wealth

expression related to the RNA and CYP7A1 in the liver reported by Northern Blotting. According to ileum role in intestinal re-absorption of bile acids, our interest was focused on the ileac transportation: the standard expression of Ileal Bile Acid Transporter (IBAT) has strongly reduced; in mice subjected to the rich diet of cholesterol the Western Blotting of proteins has quantitatively reduced. IBAT's oppression can be explained by the diminution of the ileac transportation of taurocholic acid (TCA). It results an increase of fecal flight of TCA in mice with a rich diet of cholesterol (Attakpa S. E et al., 2012).

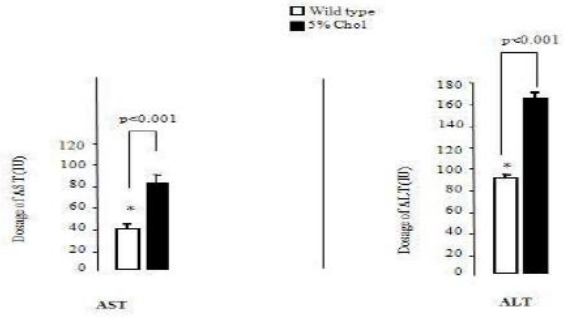


Figure. 7 The plasma level of liver transaminases.

Assays were carried out according to the IFCC enzyme kinetics. The principle is the determination of activity of GOT or GPT . ALT: Alanine amino transferase, AST: aspartate amino transferase.). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. *significant differences ($p<0.001$) between different treatments.

To appreciate the impact of rich cholesterol diet on cholesterol transport, two systems have been studded. Regarding to the two proteins: ABCG5 and ABCG8 associated in heterodimer, only the expression of ABCG5 has been appreciated. We have shown that, under our experimental conditions, under cholesterol diet: In the jejunum as in the liver, the analysis revealed an induction of the gene encoding ABCG5 for mice subjected to 5% cholesterol diet. The Abcg5 is important for biliary secretion and intestinal excretion of cholesterol. Invalidation of the genes encoding these proteins leads to a significant drop of bile secretion, while their over expression increases it seriously (Yu L, Gupta S et al., 2005).

An indirect role of I-babp in the fecal excretion of cholesterol is also possible. This hypothesis involves the joint involvement of membrane transporters responsible for cellular efflux of cholesterol, the ATP-binding cassette G5 and G8 (Plösch T et al., 2002).

It was recently shown that the expression of genes encoding these proteins is under the control of LXR, and the simultaneous induction of the expression of *I-babp*, *Abcg5* and *Abcg8* resulting from a charge could result in cholesterol level by increasing the ileocyte joint reabsorption of bile acids and cholesterol efflux. This opposing flow cell, causing the progressive imbalance of cholesterol / bile acids in the intestinal lumen, should lead to a drop of micellar solubilization of cholesterol. In addition, genes involved in cholesterol uptake (Ldlr) and bile acid excretion (Abcg5 and Abcg8) were increased in the livers of fat-1 transgenic mice (fat-1) capable of converting n-6 to n-3 PUFAs mice (Kim EH et al., 2012)

NPC1L1 protein involved in intestinal storage of cholesterol at jejeunal level has seen its expression decreased in mice subjected to

5%cholesterol diet so we think to another regulatory mechanism which took over. Biliary and dietary cholesterol is less absorbed. Our results corroborate the observations of Jia L et al. (2010) who have shown that the NPC1L1 deficiency in mice prevents HFD-induced fatty liver by reducing hepatic lipogenesis, at least in part, through attenuating HFD-induced insulin resistance, a state known to drive hepatic lipogenesis through elevated circulating insulin levels.

Hence the idea of quantifying excreted cholesterol in the feces. In mice subjected to 5% cholesterol diet, there is a sharp increase in fecal leakage of cholesterol compared to the control group. We therefore observed that the leakage of fecal cholesterol is correlated to the decrease of intestinal absorption and the increase of intestinal excretion of cholesterol. The final consequence would be an increased fecal excretion of cholesterol, a phenomenon actually observed in mice treated with a pharmacological agonist of LXR (Plösch T et al., 2002). Mice whose gene for Npc1l1 was invalidated, have the intestinal absorption of cholesterol more reduced (Altman SW, Davis HR et al., 2004), illustrating the fundamental role played by this protein in cholesterol transport. Recent studies have identified Npc1l1 protein may play an important role in the hepatic secretion of cholesterol. Hepatic over expression of Npc1l1 in mice significantly decreases biliary cholesterol concentration (Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL et al., 2007). In rodents, Npc1l1 is almost exclusively expressed in the small intestine, and there are no detectable Npc1l1 proteins in the liver (Altmann, S. W., H. R. Davis, Jr., L. J. Zhu et al., 2004; Yu, L., S. Bharadwaj, J. M. Brown et al., 2006; Davies, J. P., C. Scott, K. et al., 2005; Temel, R. E., W. Tang, Y. Ma et al., 2007). The direct effect of hepatic Npc1l1 on biliary cholesterol secretion would be minimal, if any, in rodents.

We proceed to the plasmatic dosage of free cholesterol, cholesterol ester, total cholesterol and triglycerides to verify that mice subjected to 5% cholesterol diet developed in the 15^{th} day hypercholesterolemia or not. The results of the dosage of all those biochemical parameters showed no significant differences between the two groups of mice.

In order to better appreciate cholesterol storage modification with physiological modifications which accompany it, we proceed to the dosage of phospholipids, triglycerides and total cholesterol. In mice subjected to 5%cholesterol diet, the quantity of phospholipids has increased comparing to control mice. The rate of triglycerides didn't change. Endly, we assist to a storage of cholesterol in the livers of mice subjected to 5% cholesterol diet compared to the control mice. Campbell et al. (2002) have explained this phenomenon by demonstrating that there is a marked increase in malonyl-CoA, a potent inhibitor of fatty acid oxidation, in the hearts of mice.

The results of biochemical parameters determination like the concentration of free plasmatic cholesterol, cholesterol ester, total cholesterol and triglycerides which didn't reveal any significative differences between control mice and those subjected to 5% cholesterol diet confirmed that mice subjected to 5% cholesterol diet didn't develop hypercholesterolemia.

Otherwise, despite of the maintain of normal cholesterolomia, cholesterol hemostazia can be disturbed.

Hence the importance of weighing of mice livers. Livers mass of mice subjected to 5% of cholesterol have increased significantly. In any case those livers were gray with blacks' spots suggesting steatosis.

The increase in liver mass of mice subjected to 5% of cholesterol diet has been significantly then we suggest a liver damage.

The plasma level of hepatic transaminases which are non specific markers of liver damage like hepatitis, steatosis including tumors.

We found that the plasmatic concentration of transaminases has increased significantly in mice subjected to 5% cholesterol diet, compared to the control group; it confirmed the development of steatosis. Our observations, in part, corroborate the findings of Kim EH et al., (2012) who have also shown that Wild-type (WT) and fat-1 transgenic mice (fat-1) capable of converting n-6 to n-3 PUFAs mice were maintained on a high-fat diet (HFD) for 5months. HF diet fed mice HFD-induced

weight gain and fatty liver were more prominent in WT mice than fat-1 mice. Histological analysis indicated that WT mice fed the HFD developed moderate-to-severe macro vesicular steatosis, whereas fat-1 mice developed very mild steatosis. In addition, HFD-induced hepatocyte ballooning and fibrosis were ameliorated in fat-1 mice. Serum alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) levels were within the respective normal ranges in HFD-fed fat-1 mice, whereas both were significantly elevated in HFD-fed WT mice. We also noticed a greater increase of alanin amino transferase (ALT) than aspartat amino transferase (AST).

We conclude that this work therefore may lead to novel approaches to the treatment of hypercholesterolemia.

References

Altman SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. Science 303: 1201-1204.

Assmann G, Cullen P, Jossa F, et al (1999). Coronary heart disease: Reducing the risk: The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 1819-24.

Attakpa SE, Djibril MN, Ahokpè M, Sezan A (2012). Expressive Modulation of the Cyp7a1 and Ibat Protein by Cholesterol and its Contribution to the Maintenance of the Normal Cholesterolemia in Mouse. J Phys Pharm Adv 2012, 2(6): 243-249.

Batta AK, Salen G, Rapol KR, Batta M, Batta P, Albert D, Ernest D (1999). Highly simplified method for gas-liquid chromatography quantization of bile acids and sterol in human stool. J Lipid Res 40: 1148-54.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al (1995). Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation 91: 2488-96.

Braunwald E (1997). Shattuck lecture cardiovascular medicine at the turn of the millennium: Triumphs, concerns, and opportunities. N Engl J Med 337: 1360-9.

Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, Severson DL, Kelly DP, Lopaschuk GD (2002). A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. J Biol Chem 277:4098–4103.

Davis HR, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW (2004). Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. J Biol Chem 279: 33586–33592, 2004.

Duan LP, Wang HH, Wang DQH (2004). Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice. J Lipid Res 45: 1312–1323, 2004.

Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH (2003). ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. J. Biol. Chem.278: 48275–48282.

Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. J. Clin. Invest. 110: 659–669.

Jia L, Ma Y, Rong S, Betters JL, Xie P, Chung S, Wang N, Tang W, Yu L (2010). Niemann-Pick C1-Like 1 deletion in mice prevents high-fat diet-induced fatty liver by reducing lipogenesis. J Lipid Res. 2010 Nov; 51(11): 3135-44.

Kesäniemi YA, Miettinen TA (1987). Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. Eur J Clin Invest 17: 391–*395,* 1987.

Kim EH, Bae JS, Hahm KB, Cha JY (2012). Endogenously synthesized n-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. Biochemical Pharmacology 2012 Sep 6. pii: S0006-2952(12)00585-0. doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.029 [Epub ahead of print].

Lammert F, Wang DQH (2005). New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. Gastroenterology 129: 718–734, 2005.

Lusis AJ (2000). Atherosclerosis. Nature 407: 233-41.

Plosch T, Bloks VW, Terasawa Y, Berdy S, Siegler K, van Der Sluijs F, Kema IP, Groen AK, Shan B, Kuipers F, Schwarz M (2004). Sitosterolemia in ABC-transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor. Gastroenterology 126: 290–300, 2004.

Plösch T, Kok T, Bloks VW, et al. (2002). Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver-X-receptor (LXR) is independent of ABCA1. J Biol Chem. 277: 33870-7.

Ross E (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. Atherosclerosis 151: 357-79.

Russell DW (1992). Cholesterol biosynthesis and metabolism.Cardiovasc Drugs Ther 6: 103-10.

Santosa S, Varady KA, Abu Mweis S, Jones PJ (2007c). Physiological and therapeutic factors affecting

cholesterol metabolism: does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist. Life Sci 80(6): 505-14.

Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL, Willingham MC, Ioannou YA, Davies JP, Nilsson LM, Yu L (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. J. Clin. Invest. 117: 1968–1978.

Turley SD, Dietschy JM (1988). The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. In: The Liver: Biology and Pathobiology, edited by Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, and Shafritz DA. New York: Raven, 1988, p. 617–641.

Wang DQH, Paigen B, Carey MC (2001). Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. J Lipid Res 42: 1820–1830.

Wang HH, Afdhal NH, Wang DQH (2004). Estrogen receptor α, but not β, plays a major role in 17 β-estradiol-induced murine cholesterol gallstones. Gastroenterology 127: 239–249.

Wang HH, Patel SB, Carey MC, Wang DQH (2005). Increased cholesterol and sitostanol absorption and reduced biliary cholesterol secretion in ATP-binding cassette transporter Abcg8 (−/−) mice. Gastroenterology 128: A678.

Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Repa JJ, Hobbs HH, Cohen JC (2005). Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. J Biol Chem. 280: 8742-7.

Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH (2002). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. Proc Natl Acad Sci USA 99: 16237–16242.

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH (2002). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. J Clin Invest 110: 671–680.

Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH (2003). Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. J Biol Chem 278: 15565–15570.

Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC (2004). Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. J. Lipid Res. 45: 301–307.

IV. CHAPITRE IV : DISCUSSIONS GENERALES

CHAPITRE IV : DISCUSSIONS GENERALES

IV.1. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est de 22,62%. Ce résultat montre que les écorces sèches de tronc de *Khaya senegalensis* contiennent des principes actifs qui sont solubles dans l'éthanol à 96°, donc extractibles par ce solvant. L'éthanol étant un solvant polaire, l'extrait obtenu contiendrait essentiellement des composés polaires selon le principe de la solubilité différentielle. Le rendement d'une extraction dépend du solvant utilisé (Maroua, 2009 ; Akowuah et al., 2005). D'autres facteurs peuvent aussi influencer le rendement de l'extraction à partir de la matière végétale : la température, la méthode d'extraction, la structure chimique des composés, la granulométrie et le temps de macération (Maroua, 2009).

IV.2. Composition de l'extrait éthylique des écorces de *Khaya senegalensis.*

Le screening phytochimique a révélé la présence d'abondants composés polyphénoliques tels que les tanins, les tanins catéchiques et les leuco-anthocyanes, et d'abondants saponosides tels que les sanosides, dans l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis.* D'autres composés polyphénoliques tels que les anthocyanes, tout comme les dérivés anthracéniques tels que les O-hétérosides à génines réduites, sont peu abondants dans l'extrait, contrairement aux stéroïdes lesquels s'y trouvent en faible quantité. Ces résultats concordent en partie à ceux obtenus par Moyse-Mignon qui en 1942 avait déjà trouvé dans les feuilles du caïlcédrat, 2% de saccharose, un principe amer et avait également signalé la présence d'une saponine et du principe amer « caïlcédrin »dans les écorces de tronc de cette espèce végétale. Le caïlcédrin serait un mélange de deux composés non saturés renfermant dans

leur molécule un oxydryle phénolique. Des travaux plus avancés ont révélé la présence de triterpenoïdes à fonction lactone ou époxyde et cycle furanique, susceptibles d'exister sous différentes formes dans les organes de la plante. Les stéroïdes constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement le squalène. Ils se caractérisent par un *noyau cyclopentanophénanthrénique* (stérane) hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné. Habituellement, les carbones C_{10}, C_{13} sont liés à un groupe méthyle -CH_3 et le carbone C_{17} à un groupe alkyle. Par extension, les stéroïdes incluent également les lipides dont le noyau cyclopentanophénanthrénique a été modifié par scission d'une liaison et l'ajout ou la délétion d'un carbone (G. P. Moss. 1989)

Lompo (1995) a obtenu des résultats similaires à ceux de la présente étude ; le screening phytochimique des écorces de tronc lui a permis de mettre en évidence les principaux groupes chimiques que sont : acides gras, caroténoïdes, coumarines, emodols, tanins, composés réducteurs, anthracenosides, glycosides stéroidiques, flavonosides, glucides, saponosides, stérols et triterpènes, anthocyanosides. Le solvant utilisé dans l'extraction étant l'éthanol à 96°(solvant polaire), les poly phénols étant de solubilité variable (Maroua, 2009), ceux qui se trouvent en abondance dans l'extrait, tout comme les saponosides (composés polaires), seraient des polyphénols polaires, contrairement aux poly phénols de l'anthocyane et les o-hétérosides à génine réduites, lesquelles sont moins polaires donc peu abondants dans l'extrait, et contrairement aux stéroïdes, lesquelles sont peu polaires donc en faible quantité dans l'extrait.

IV.3. **Influence de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sur la libération hépatique du glucose.**

IV.3.1. **Mouvement de glucose à travers la membrane des hépatocytes**

Le graphe de dosage du glucose dans le tube témoin prend l'allure d'une droite ascendante dans le temps (cf. figure 2, publication N°2) Ce phénomène expliquerait un mouvement du glucose depuis l'intérieur des hépatocytes vers le milieu extérieur qu'est la solution réactionnelle (la solution de Mack-Ewen), exempt de glucose. En cas de déficit de glucose, le glycogène (forme de réserve de glucose dans le foie ou le muscle squelettique, ou autres tissus) se dégrade en libérant le glucose lequel diffuse à l'extérieur des cellules.

On pouvait à priori penser à une simple diffusion du glucose (mouvement du glucose suivant un gradient de concentration), mais ce phénomène est beaucoup plus complexe. Il implique un groupe d'enzymes telles que le glycogène synthétase, le glycogène-phosphorylase et la phosphatase, et des molécules telles que l'ATP et des protéines de type PEPCK. En effet lorsque le niveau de glucose baisse sensiblement dans le milieu extérieur des hépatocytes, le glycogène synthétase et la phosphatase sont inactivés, ce qui entraîne l'activation du glycogène phosphorylase par la phosphorisation (apport du groupe phosphatase par l'ATP ou autre forme de réserve d'énergie cellulaire) laquelle va phosphoryler le glycogène et l'hydrolyse en glucose. Le phosphoénol pyruvate carboxy-kinase (PEPCK), l'enzyme qui catalyse la gluconéogenèse (réaction de conversion des intermédiaires non glucidiques comme l'oxaloacétate en glucose) pourrait être aussi activée en augmentant ainsi le flux du glucose vers le milieu extérieur des hépatocytes. Alors cette sortie du glucose pourrait se justifier par le bon fonctionnement des enzymes du foie de rat isolé, lequel serait conservé dans des conditions requises ou très proche des physiologiques qu'offre la solution réactionnelle. Cela serait aussi la marque d'une bonne préparation de ladite solution.

IV.3.2. **Effet des extraits totaux de *Khaya senegalensis* sur le taux de glucose**

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

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

Dès que nous appliquons les extraits totaux de *Khaya senegalensis* aux différentes concentrations 2µg/L, 5µg/L, 20µg/L aux temps t=o, t=10, t=20, t=30, t=40, t=60 minutes, nous remarquons une diminution du taux de glucose dans le milieu (cf. figure 4, Publication N°2). Deux phénomènes possibles pourraient justifier ces résultats :

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

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

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

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

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

  Cet effet de l'extrait pourrait favoriser in vivo une accumulation excessive de glucose dans le foie et provoquer un stress oxydatif dans les hépatocytes par inhibition de la G6PD via activation du PKA (Yizhen, 2005).

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

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

IV.3.4. Comparaison de l'effet des extraits totaux de *Khaya senegalensis* à l'effet de l'insuline.

- Nous remarquons que la courbe de l'effet des extraits de *Khaya senegalensis* à la concentration 5 µg/L et celle de l'effet de l'insuline semblent avoir une même cinétique (cf. figure 8, Publication N°2) ; on pourrait penser à une similitude entre le mode d'action de l'insuline et

celui des extraits ; le rôle de l'insuline dans la régulation de la glycémie est d'accélérer la dégradation du glucose pour la formation de l'ATP ou de stimuler l'entrée puis le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le foie (Boureïma Yaro, 1992). L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* a réduit la libération hépatique du glucose et cet effet est plus marqué avec cet extrait qu'avec une solution d'insuline à 2.5UI.

IV.4. Effet de l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* sur quelques paramètres biochimiques et sur l'histologie rénale et hépatique

IV.4.1. Effet sur les paramètres biochimiques

L'administration journalière de la même dose de l'extrait pendant quatre semaines n'a pas altéré la glycémie ni les taux sanguins des lipides (triglycérides et cholestérol dans le cas de la présente étude) chez les lapins normaux ni chez les lapins en condition d'hypeyglycémie. Cependant la dose de 50mg/kg de PC de l'extrait a significativement démunie la glycémie chez les animaux en condition d'hypeyglycémie 24 heures après le traitement. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Ben Abid et al., (2008) qui ont constaté une diminution significative de 29% de la glycémie après neuf semaines de traitement par une décoction de la plante. Ceci serait du à la durée de traitement prolongée chez ces auteurs. Il est à noté que la décoction est une méthode d'extraction en milieux aqueux à des températures voisines de 100°C, donc la composition de l'extrait utilisé par ces auteurs pourrait être, dans une certaine mesure, différente de celle de l'extrait utilisé dans la présente étude qui est dans ce cas un extrait éthylique. Cet effet hypoglycémiant de l'extrait des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* pourrait s'expliquer par une augmentation de la sécrétion de l'insuline via son activité anti oxydante (El-Alfy et al., 2005) tout

comme les terpènes et les flavonoïdes influencent les cellules beta pancréatiques et stimulent la sécrétion de l'insuline par leur activité antioxidantes (Sarkhail *et al.*, 2007). Lompo *et al.*, en 2007 avaient montré que l'extrait éthylique de *Khaya senegalensis* a une activité anti radicalaire, ce qui serait justifié par la présence d'abondante quantité de composés polyphénoliques (substances à activité anti radicalaire, Kinsky, 1989).

Les valeurs de la glycémie de 0.73±0.3g/L enregistrées chez les lapins non traités sont voisines de celles rapportées dans la littérature (0.77±0.4 à 1.54±0.8g/L) et de celles publiées par Othomani Mecif *et al.* en 2005 (0.8 à1.15g/L).

Certes, les lipides dosés ont quelque peu subit de variations sous l'effet de l'extrait mais on note une diminution significative ($p < 0,05$) des triglycérides chez les lapins des lots $L_{1\ et}$ $L_{2.5}$ comparés au lot témoin. Toutefois ces valeurs restent dans les normes physiologiques de notre modèle expérimental.

Les doses de l'extrait supérieures ou égales à 1mg/kg de poids corporel ont engendré une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'urémie chez les lapins traités comparés au lot témoin. Kolawolé *et al.* en 2011, avaient déjà démontré que l'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* administré à la dose de 100mg/kg de poids corporel provoquait une augmentation significative de l'urémie dans une étude réalisée sur le rat. Le lapin serait plus prédisposé que le rat aux effets toxiques de l'extrait ; cette prédisposition serait due à la variabilité biologique des espèces animales; le rat aurait mieux toléré l'extrait que le lapin. En effet un premier essai avec des doses de 100, 200 et 300mg/kg de poids corporel a eu pour le résultat le décès de tous les lapins traités à l'extrait. Il est à noter qu'avec les doses supérieures ou égales à 2.5mg/kg de poids corporel les valeurs de l'urémie vont au-delà des valeurs physiologiques (0.096 à 0.28g/L) dudit paramètre chez les lapins traités..

Une augmentation de l'urémie pourrait être un indice de disfonctionnement rénal (Aliyu *et al*., 2007b) donc est directement liée à une insuffisance rénale et au syndrome néphrotique (Kolawolé *et al*., 2005). Les effets néfastes des extraits de *Khaya Senegalensis* ne semblent pas toucher que le rein. Le groupe de Kolawolé *et al.* (2011) avait constaté que les extraits aqueux de *Khaya Senegalensis* élevaient le niveau de la phosphatase alcaline. Des augmentations des phosphatases alcalines sont observées dans les affections hépatiques **(**Valdiguié P) ce qui soutient une attaque hépatique lors d'un traitement prolongé. D'autres indicateurs des fonctions rénales ont été explorés sous *Khaya Senegalensis*. Il s'agit de l'alanine amino-transférase (ALAT) et de l'aspartate amino-transférase (ASAT). L'augmentation de ces enzymes (transaminases) est modérée, dans les hépatites chroniques**,** et traduit l'atteinte parenchymateuse par nécrose cellulaire. Aussi, elle est due aux obstructions des voies biliaires **(**Valdiguié P).

L'augmentation de ces enzymes reflète aussi une lésion cellulaire au niveau cardiaque ou musculaire (Kolaawolé *et al*., 2011, Satpal *et al*., 2010) ; généralement, l'extension de la lésion est directement proportionnelle à l'augmentation de l'activité de ces enzymes (Aliyu *et al*., 2007a)

L'augmentation de l'ALAT, de l'ASAT et de la GGT respectivement pour des doses de l'extrait supérieures ou égales à 2.5mg/kg, 1mg/kg et 1mg/kg de poids corporel est significative. L'ALAT et L'ASAT sont des enzymes hépatiques qui sont impliquées respectivement dans la désamination de l'alanine et de l'acide aspartique.

Entre autres causes d'une élévation des transaminases (ALAT et ASAT) et de la GGT nous pouvons citer l'hépatite toxique ou médicamenteuse, l'insuffisance rénale aiguë, le syndrome néphrotique et l'infarctus du myocarde, maladie cardiovasculaire liée à une augmentation de la cholestérolémie (Attakpa *et al*. 2012). Tous ces résultats obtenus sur les enzymes et l'urémie

dans cette étude confirment bien les altérations tissulaires observées dans le rein et le foie des lapins traités ;

Les doses de 10mg, 25 et 50mg/kg de poids corporel ont engendré quelques altérations dans le tissu hépatique (accumulation de tissus conjonctifs, dilatation de l'espace de Disse, apparition de noyaux pycnotiques dans les hépatocytes) et le tissu rénal (anomalies glomérulaires, dilatation tubulaire).

La diminution significative de l'activité de la G6PDH permet de mieux expliquer ces altérations histologiques hépatiques et rénales observés chez les animaux traités ; Il existe une corrélation significative entre l'augmentation de l'urémie et la diminution de l'activité de la G6PD dans le rein chez tous animaux traités à l'extrait, et dans le foie chez les animaux ayant reçu l'extrait à la dose de 5mg/kg de poids corporel.

La G6PDH **(**EC 1.1.1.49**)** est une enzyme de la voie des pentoses mono-phosphates. Elle catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phospho-gluconate avec réduction concomitante du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP+ ; NADPH, H+). Le NADPH réduit permet la régénération du glutathion, dont le rôle est la neutralisation des peroxydes, quelques fois très toxiques pour les cellules. C'est le cas chez certains sujets dont les hématies présentent un déficit de l'activité Glucose-6-phosphate déshydrogénase produisent moins de NADPH, H+ nécessaire à la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme. Ces hématies sont donc plus sensibles à l'hémolyse lors d'agressions oxydatives variées (infections, ingestion de certains médicaments ou aliments) (Mura M *et al* 2009**)**. Le principal réducteur intracellulaire (de ces radicaux) est le NADPH dont la production est principalement dépendante de l'activité de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase qui constitue l'enzyme limitant de la voie des pentoses phosphates (Yizhen and al, 2005)**.** la G6DPH est la principale source de la NADPH et ont conclu qu'une faible activité de cette enzyme conduit à la

diminution de NADPH et rend alors la cellule sensible aux effets délétères des oxydants. Les poly phénols n'auraient pas pu produire leur effet anti radicalaire qui a été publié par Lompo en 2007. Il existe une corrélation significative entre cette diminution de l'activité de la G6PD dans le rein et dans le foie, et l'augmentation de l'urémie chez les animaux traités.

CONCLUSIONS GENERALES

L'extrait éthylique des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* est riche en composés polyphénoliques qui pourraient lui conférer des propriétés anti radicalaires ce qui aurait pu justifier les usages thérapeutiques multiples de cette espèce végétale. Malheureusement un usage prolongé (30 jours) de l'extrait altère de manière significative le système anti oxydant fondamental de l'organisme vivant (le système G6PDH, NAD+), ce qui prédisposerait des organes vitaux tels que le foie et le rein au stress oxydatif cellulaire lequel s'est traduit par quelques altérations histologiques de ces organes. Cet effet étant dose dépendant, les lésions pourraient s'étendre davantage à des doses plus élevées que celles expérimentées dans cette étude. La dose de 10mg/kg de poids corporel en administration per os journalière pendant 30 jours pourrait déjà être néfaste à l'histologie rénale et hépatique.

L'usage de l'extrait à long terme ne saurait doter cette espèce végétale de propriétés hypoglycémiantes ni de propriétés hypolipémiantes quoique la dose de 50mg/kg de l'extrait a montré une activité hypoglycémiante temporaire (24heures après administration) et pendant les 15premiers jours du taitement.

L'usage de l'extrait à long terme pourrait engendrer à certaines doses l'augmentation de l'urémie et des enzymes hépatiques donc provoquer des altérations fonctionnelles au niveau du foie et du rein, ayant pour corollaires les lésions susmentionnées.

PERSPECTIVES

A l'issue de cette étude nous envisageons approfondir, à travers des études fondamentales, sur la toxicité et surtout sur la tératogénicité de *Khaya senegalensis*.

Nous envisageons l'usage des extraits des écorces de tronc de *Khaya senegalensis* dans les recherches en cancérologie pour ses propriétés prolifératives cellulaires.

REFERENCES

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

2. Adakole JA and Balogun JB (2011). Acute ecotoxicity of aqueous and ethanolic extract of leaves of *Khaya se-negalensis* on chironomid larvae. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol., 15(2): 41-45.*

3. Adebayo JO, Yakubu MT, Egwim EC, Owoyele VB and Enaibe BU (2003). Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. Journal of Ethnopharmacology, 88: 69-72.

4. Adesogan EK (1968). The chemical constituents of *Khaya senegalensis*. Symposium: Traditional pharmacopoeia and African Medicinal Plants, Dakar, Senegal, March 1968.

5. Adjanohoun EJ, Ahyi MRA and Ake Assi L (1986). Contribution aux études ethnobotaniques floristiques au Togo. ACCT, 389-392.

6. Agbahungba AG and Sokpon N (1998). Rapport national sur les ressources phytogénétiques forestières du Bénin. Cotonou, Bénin, 30 p.

7. Ali SAM, Elbadwi SMA, Idris TM and Osman KM (2011). Hepatoprotective activity of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark in rats. Journal of Medicinal Plants Research 5(24): 5863-5866.

8. Androulakis XM, Muga SJ, Chen F, Koïta Y, Touré B and Wargovich MJ (2006). Chemopreventive Effects of *Khaya senegalensis* Bark Extract on Human Colorectal Cancer. Anticancer Research, 26: 2397-2406.

9. Arbonnier M (2002). Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. The Netherlands: Cirad Margraf Publishers, pp. 189- 426.

10. Athanasiadou S, Githiori J and Kyriazakis I (2007). Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal, 1(9): 1392-1400.*

11. Ayo RG, Audu OT and Amupitan JO (2007). Physicochemical characterization and cytotoxicity studies of seed extracts of *Khaya senegalensis* (Desr.). African Journal of Biotechnology, 6(7): 894-896.

12. Azaizeh H, Fulder S, Khalil K and Said O (2003). Ethnomedicinal knowledge of local Arab practitioners in the Middle East region. Fitoterapia, 74: 98-108.

13. Belem B, Olsen CS, Theilade I, Bellefontaine R, Guinko S, Lyk AM, Diallo A and Boussim JI (2008). Identification des arbres hors forêt préférés des populations du Sanmatenga (Burkina Faso). Bois et forêts des tropiques, 298 (4): 53-64.

14. CAB International (2000). Forestry Compendium – a silvicultural reference. Global Module. Wallingford, UK: CAB International.

15. Capeau J, Desbois-mouthon C, magré 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.

16. Caventou E (1849). Recherches chimiques sur l'écorce du Caïlcédrat. Pharm.

    Chim., 16:355-362.

17. Centre Technique Forestier Tropical, CTFT (1988). *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. Bois et Forêts des Tropiques, 218: 43-55.

18. Chiezey NP, Gefu JO, Jagun AG, Abdu PA, Alawa CBI, Magaji SO, Adeyinka IA, Eduvie LO (2000). Evaluation of some Nigerian plants for anthelmintic activity in young cattle. Proceedings of the International Workshop on Ethnoveterinary Practical, 14-18 August, Kaduna, Nigeria.

19. Daniel-Yves A (2002). Initiation à l'agroforesterie en zone sahélienne: les arbres des champs du Plateau Central au Burkina Faso. KARTHALA Editions. Paris France. 220 p.

20. Djoueche CM, Azebaze AB and Dongmo AB (2011). Investigation of plants used for control of gastrointestinal parasites in Cameroon. Tropicultura, 29(4):205-211.

21. El Badwi SMA, Bakhiet AO and Abdel Gadir EH (2012). Haemato-biochemical Effects of Aqueous Extract of *Khaya senegalensis* Stem Bark on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats. Journal of Biological Sciences, 12: 361-366.

22. Elisha IL, Makoshi MS, Makama S, Dawurung CJ, Offiah NV, Gotep JG, Oladipo OO and Shamaki D (2013). Antidiarrheal evaluation of aqueous and ethanolic stem bark extracts of *Khaya senegalensis* A. Juss (Meliaceae) in albino rats. Pak Vet J, 33(1): 32-36.

23. Fortin D, Lo M, Maynart G (1990). Plantes médicinales du Sahel CECI (Montreal) et ENDA (Dakar). Série Etude et Recherche, 174-176.

24. Full AB, Vanhaelen-Faster R, Vanhaelen M, Lo L, Toppet M, Ferter A and Fondu P (1999). *In vitro* antisickling activity of a rearranged limonoid isolated from *Khaya senegalensis.* Plant Med. 63(3): 209-212.

25. Funke I and Melzig MF (2006). Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of a-amylase activity. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(1): 1-5.

26. Ibrahim MA, Njoku GC and Sallau AB (2008). *In vivo* activity of stem barks aqueous extract of Khaya senegalensis against *Trypanosoma brucei.* Afr. J. Biotechnol., 7: 661- 663.

27. Jubinville**,** Fernande**,** *Notes de cours d'Histologie II*, Cégep de Saint-Jean-sur-Richelieu, 1980.

28. Karou D, Dicko MH, Simpore J and Traore AS (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. Afr. J. Biotechnol., 4: 823-828.

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

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

31. Konaté K, Kiendrébéogo M, Ouattara MB, Souza A, Lamien-Meda A, Nongasida Y, Barro N, Millogo-Rasolodimby J and Nacoulma OG (2011). Antibacterial potential of aqueous acetone extracts from five medicinal plants used traditionally to treat Infectious Diseases in Burkina Faso. Current Research Journal of Biological Sciences 3(5): 435 – 442.

32. Le Strange JN (1977). The Useful Plants of West Tropical Africa. The Crown Agents, London, p. 325.

33. Lompo M (1993). Etude pham1aco-toxicologique chez la souris et le rat de

Khaya senegalensis (Desr.) A. Juss (Melliaceae) utilisé en tradithérapeutique

au Burkina Faso. Mémoire de D.E.A. Physiol. Anim. Appl. Université de Ouagadougou.

34. Lompo M (1999). Activité anti-ilflammatoire des extraits d'écorces de tronc de *Khaya senegalensis A. Juss* (Melliaceae) : Mise au point d'une forme galénique topique (Phase 1). Thèse de Doctorat du Troisième Cycle.Université de Ouagadougou. Burkina Faso. 177p.

35. Lompo M, Guissou IP, Kabore IZ and Sawadogo M (1995). Effet hypothermisant et toxicité générale aigue chez les souris des écorces de tronc de Kase. Pharm. Méd. trad. afro, 73-80.

36. M.-G. Fusi – M.- T. Bandera**.** Guide de l'alimentation du diabétique. *Éditions de VECCHI S.A.* Pages 17-18-20

37. Moyse-Mignon H (1942). Recherches sur quelques Méliacées africaines et sur leurs principes amers. Université de Paris. France. Thesis, 112p.

38. Nacoulma OG (1996). Medicinal plants and their traditional uses in Burkina Faso. Ph.D. Thesis, University of Ouagadougou, pp: 328.

39. Ndiaye SS (2013). *Khaya senegalensis* ou hay en wolof. Retrieval on 2013/04/28 at

http://sambamara.com/index.php?option=com_content&view=article&id=11khaya-senegalensis-ou-hay-en-wolof&catid=52:des-plantes&Itemid=70

40. **Nelson D.L., Cox M., 2004.** Lehninger Principles of Biochemistry. *Ed. W H Freeman and Co. Ltd, 4 th edition, Newyork*.p. 881-901.
41. Nwosu CU, Hassan SW, Abubakar MG and Ebbo AA (2012). Anti-diarrhoeal and toxicological studies of leaf extracts of Khaya senegalensis. Journal of Pharmacology and Toxicology, 7(1): 1-10.
42. Okpara JO, Anagor PO, Okpalia EJ, Abdullahi A and Ahmed MS (2004). The anthelmintic efficacy of medicinal herb extracts against gastrointestinal helminths of sheep. Rapport de la 9ème Conférence Annuelle de Animal Science Association of Nigeria (ASAN), 13–16 Sept. 2004. Ebonyi State University, Nigeria.
43. Oberley LW. 1988**.** Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med,* 5: 113-124.
44. Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC, Strivastav V and Tandon JS (1993). Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. J. Nat. Prod., 58: 995-999.
45. Sablassou K, Aklikokou AK and Gbeassor M (1998). Activité anti-contracturante de l'extrait de Khaya senegalensis sur l'iléon de cobaye. Pharm. Méd. Trad. Afr., 10: 3-15.

46. Sale M, De N, Doughari JH and Pukuma MS (2008). In vitro assessment of antibacterial activity of bark extracts of Khaya senegalensis. Afr. J. Biotechnol., 7: 3443-3446.

47. Satpal SKJ and Punia JS (2010). Studies on biochemical change in subacute thiodicarb toxicity in rats. Toxicol. Int., 17: 30-32.

48. Sokpon N and Ouinsavi C (2002). Utilisations du *Khaya senegalensis* en médecine traditionnelle au Bénin. Revue de Médecine et Pharmacopée Africaine, 16: 9-19.

49. Sokpon N and Ouinsavi C (2004). Gestion des plantations de *Khaya senegalensis* au Bénin. Bois et Forêts des Tropiques, 279(1): 37-46.

50. Sule MS, Abdulraheem RB and Aminu BM (2008). Potency of aqueous stem bark extract of Khaya senegalensis against liver diseases in rats. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 1(1): 29-31.

51. Tchacondo T., Karou S.D., Batawila K, Agban A., Ouro-Bang'na K., Anani K.T., Gbeassor M and de Souza C (2011). Herbal remedies and their adverse effects in tem tribe traditional medicine in Togo. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 8(1): 45-60.

52. Umar IA, Ibrahim MA, Fari NA, Isah S and Balogun DA (2010). *In-vitro* and *-vivo* anti-*Trypanosoma evansi* activities of extracts from different

parts of *Khaya senegalensis*. Journal of Cell and Animal Biology, 4(6): 91-95.

53. Umar IA, Wurochekke AU, Gidado A and Igbokwe IO (1999). Effects of combined parenteral Vitamins C and E administration on the severity of anaemia, hepatic and renal damage in *Trypanosoma brucei* brucei. *Vet. Parasitol., 85: 43-47.*

54. Von Maydell HJ (1983). Arbres et Arbustes du Sahel. Leurs caractéristiques et leurs utilisations. G.T.Z. ESCHBORN, 283-284.

55. Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM. 1997**.** Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1

56. Williamson JA, Bosher JM, Skinner A, Sheer D, Williams T and Hurst HC (1996). Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors. Genomics, 35: 262-264.

57. Yakubu MT, Adebayo OJ, Egwim EC and Owoyele VB (2005). Increased liver alkaline phosphatase and aminotransferase activities following administration of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* stem bark to rats. Biokemistri, 17(1): 27-32.