Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines

Université d'Abomey-Calavi

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale Pluridisciplinaire « Espace, Société et Développement »

Chaire UNESCO « Science, Technologie et Environnement » (CUSTE)

Thèse de Doctorat Unique présentée par : **Victorien Tamègnon DOUGNON**
pour l'obtention du grade de **Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi**

Mention : Gestion de l'Environnement

Spécialité : Microbiologie et Toxicologie

N° d'enregistrement : ……

Sujet:

Apports de *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) en santé humaine et intérêt de la biodigestion en anaérobiose des fientes de poulets utilisées pour sa culture au Bénin






Soutenue publiquement le 20 Décembre 2013 à la Salle Audiovisuelle de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Devant le Jury International composé de :

M. Messanvi F. GBEASSOR	Professeur Titulaire de Physiologie, Togo	Président du Jury
M. Thomas A. DADIE	Maître de Conférences de Microbiologie, Côte d'Ivoire	Membre du Jury
M. Michel BOKO	Professeur Titulaire de Climatologie, Bénin	Membre du Jury
M. Frédéric S. LOKO	Professeur Titulaire de Biochimie, Bénin	Membre du Jury
M. Honoré S. BANKOLE	Maître de Conférences de Microbiologie, Bénin	Codirecteur de Thèse
M. Patrick A. EDORH	Professeur Titulaire de Biochimie, Bénin	Directeur de Thèse

Décision après Délibération : Mention Très Honorable avec les Félicitations du Jury

DEDICACE

A mon père Jacques T. DOUGNON et ma mère Sika HOUNGNIHIN,

Pour qu'ils y voient la consécration des efforts consentis à mon égard depuis 25 ans !

REMERCIEMENTS

Je dois satisfaire à un agréable devoir, celui de témoigner ma gratitude à tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la rédaction de cette thèse :

- **A mes frères Godfried, Fabrice et Charles DOUGNON,**

Pour qu'ils y trouvent un exemple à suivre et à dépasser !

- **A Tatiana Nansi Ernestine GOHOUN,**

Pour l'aide et le soutien précieux.

- **A Modestie d'ALMEIDA,**

Pour ta modestie. Je n'ai jamais voulu te faire du tort. C'est si difficile à comprendre mais tu as toujours été une épaule compatissante. Merci pour tout, Modi !

- **Au Pr Michel BOKO, Directeur du Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (C.I.F.R.E.D),**

Pour qu'il reçoive la reconnaissance d'un enfant qui lui sait gré de tous les efforts qu'il a consentis à son égard ! Professeur, vous avez été plus qu'un soutien lors de cette aventure. Je ne saurai jamais vous remercier pour l'élan, la motivation et les conseils délivrés à mon endroit ! Que le Seigneur vous bénisse éternellement !

- **Au Pr Saïdou SALIFOU, Directeur de Cabinet du Ministère d'Etat Chargé de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique,**

Pour la promotion de la jeunesse et les conseils délivrés à mon endroit! Professeur, vous êtes un scientifique au cœur d'or. Je me rappelle encore votre appui et votre souci de me voir réussir ! Merci infiniment !

- **Au Pr Michel DELSENY, Directeur de Recherche Emérite au Centre National de la Recherche Scientifique (France),**

Professeur, vous avoir rencontré a été l'un des meilleurs événements de ma vie ! Merci pour votre soutien tout au long de ces années de recherche !

- **Au Pr Abdoulaye DIALLO et à toute l'équipe de l'Organisation Ouest Africaine de la Santé (OOAS), l'Agence Santé de la CEDEAO et leurs partenaires,**

Pour m'avoir octroyé une Bourse de Formation dans le cadre du Programme d'Echanges Professionnel et Linguistique entre Professionnels de Santé de l'espace CEDEAO (PEPL). Vos bénédictions ont porté leurs fruits. Merci pour le soutien.

- **A toute l'équipe du Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée (LARBA) de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC) et en particulier à son Directeur, Pr Frédéric LOKO,**

Merci pour la gentillesse et la sollicitude.

- **Au Pr Anatole LALEYE, Professeur Titulaire à la Faculté des Sciences de la Santé (F.S.S.),**

Pour la disponibilité.

- **Au Pr Christophe HOUSSOU, Professeur Titulaire à la Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines (F.L.A.S.H),**

Professeur, merci pour tout !

- **Au Dr Phyllis ADDO, Chef du Département d'Expérimentations Animales, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, Université de Legon (Ghana),**

Vous avez été si gentille avec moi ! Je vous prie de recevoir ces mots en guise de remerciements.

- **Au Dr Fernand GBAGUIDI, Maître de Conférences des Universités du C.A.M.E.S,**

Pour toutes les orientations et la disponibilité. Votre implication personnelle et votre soutien au cours de cette noble aventure méritent bien plus que des mots. Puisse Dieu vous bénir, Professeur.

- **Au Dr Jean-Marc ATEGBO, Maître de Conférences des Universités du C.A.M.E.S,**

Pour la gentillesse et le soutien.

- **Au Dr Issaka YOUSSAO, Maître de Conférences des Universités du C.A.M.E.S,**

Pour toute la sollicitude.

- **Au Dr Odile GUEDEGBE, Maître de Conférences et Vice-Doyenne de la Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines (F.L.A.S.H.),**

Seul Dieu peut vous dire à quel point je vous suis reconnaissant. Eternelle reconnaissance.

- **Au Dr Kissao GNANDI, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences (FDS) de l'Université de Lomé (Togo),**

Merci pour l'estime et l'aide apportée dans le cadre de ces travaux de thèse.

- **Au Dr Clément AHOUSSINOU, Médecin Coordonnateur de la Zone Sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori,**

Qui m'a beaucoup aidé dans ce travail. Sincères remerciements pour la disponibilité inconditionnelle. Voilà à quoi a servi l'argent du Cabinet INACESS ! J'espère que cela sera un motif de fierté pour vous, votre aimable épouse et vos sympathiques filles ! Vous êtes, à mes yeux une famille de soutien altruiste ! Soyez tous bénis.

- **Au Dr Roch HOUNGNIHIN, Coordonnateur du Programme National de la Pharmacopée et de la Médecine Traditionnelles, Ministère de la Santé, Bénin,**

Merci pour les conseils et surtout pour le financement par le Programme d'une partie de ces travaux. J'espère pouvoir toujours compter sur toi pour la suite.

- **Au Dr Maximin SENOU, Assistant à l'Université d'Abomey-Calavi (UAC),**

Merci pour votre appui lors de la lecture des lames. Nous avons de belles aventures qui nous attendent.

- **Au Dr Alain NAHUM,**

Les mots me manquent pour vous exprimer toute ma gratitude.

- **Aux Drs Théodora AHOYO et Casimir AKPOVI,**

Pour les exhortations et le soutien.

- **Au Dr Septime HESSOUH,**

Merci pour les prières et les exhortations.

- **Au Dr Célestin GBAGUIDI,**

Vous n'étiez pas obligé de m'épauler tel que vous l'avez fait. Je vous remercie du fond du cœur.

- **Au Dr Julien SEGBO, Chef de Département de Génie de Biologie Humaine (GBH) à l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC),**

Votre calme et votre rigueur scientifique m'ont durablement façonné ! Merci pour le soutien et les encouragements.

- **Au Dr Jean-Robert KLOTOE,**

Vous avez toujours été à mes côtés. Merci pour l'amitié et la considération. Beaucoup d'autres aventures passionnantes nous attendent !

- **A tous les enseignants du Département de Génie de Biologie Humaine (GBH) et de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC),**

Merci pour le soutien, les conseils avisés et la sollicitude !

- **Au Dr Thierry AZONHE,**

J'ai appris avec beaucoup de tristesse le décès de votre fils ! J'espère que cette thèse vous apportera un peu de réconfort. Merci d'avoir toujours été là à mes côtés.

- **Au Dr Françoise ASSOGBA-KOMLAN, Chargée de Recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique du Bénin (INRAB),**

Votre sympathie et votre soutien de tout instant m'ont beaucoup aidé. Merci pour votre appui scientifique !

- **Aux Drs Delphine ADANDEDJAN et Ibouraïma YABI,**

J'y suis arrivé ! Merci pour tous vos conseils et vos bons mots d'encouragement tout au long de ces années !

- **A Messieurs Lauris FAH, Brice FANOU, Moniteurs de Travaux Pratiques au Département de Génie de Biologie Humaine (GBH),**

Merci pour les prières et les conseils.

- **A Mesdames Roussine CODO et Charnel DOSSOU, Messieurs Hornel KOUDOKPON, Donatien KLOUYO, Carlos DANDJESSO et Guillaume TOSSOU,**

Merci pour la gentillesse. C'est à votre tour à présent d'enclencher ce processus passionnant qu'est la préparation d'une thèse.

- **A Messieurs Godefroy ZINSOU, Aurélien KANFON et Eustache ACLINOU, Techniciens de laboratoire à l'Hôpital de Zone de Ménontin,**

Merci infiniment.

- **A Monsieur Magloire LEGONOU,**

Merci pour vos apports critiques et votre aide. Vous pouvez être tranquille, je serai toujours digne de vous.

- **A Monsieur Sylvain KOUGBLENOU et à tout le personnel du Service des Explorations Diagnostiques (S.E.D) du Bénin,**

Merci pour tous les conseils délivrés à mon égard.

- **A mes 'mamans chéries', Rose ALLOCHEKPA, Agnès HOUNWANOU et à mes tontons François HOUNSOU, Emmanuel DJOSSOU,**

Merci pour le soutien de tout instant.

- **A Monsieur Elias POGNON, Ingénieur des Travaux en service au Laboratoire de Contrôle de Qualité des Eaux et des Aliments du Ministère de la Santé,**

Vous êtes vraiment sympathique et je ne vous remercierai jamais assez.

- **A Messieurs Alban HOUNGBEME, Clément GANDONOU et à tous les techniciens du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles du Centre Béninois de Recherche Scientifique (CBRST),**

Merci infiniment.

- **A Benjamin HOUNGNIHIN, Ferdinand DOUGNON, Luc DOUGNON et Gabriel HEGBE,**

Pour l'aide apportée dans le cadre de l'entretien de l'animalerie. Merci pour tout.

- **A Messieurs Gratien BONI, Théodore ADJAKPA et Madame Eugénie KEKE,**

Qui ont fait preuve d'une bonté et d'un soutien inestimables. Sincères gratitudes.

- **A Nadège AMOUSSOU, Grâce KOUHICO, Zeynabou YEHOUENOU, Christiane TALABI, Patricia FIOGBE, Denise HOUINATO et Déborah OGUI,**

Pour votre gentillesse et votre soutien de tout instant.

- **A mon oncle Philibert DOUGNON,**

Merci pour la documentation, l'aide précieuse et les conseils !

- **A Monsieur Pascal GOHOUN et sa femme Constance AIDEKON,**

Qui n'ont économisé aucun conseil quant à l'aboutissement de ce travail. Merci pour toutes ces valeurs dont vous m'avez doté.

- **A mon Tonton Jean Gillespie Cardin AGNON,**

J'espère que le fiston continuera de vous faire honneur. Merci pour tout le soutien.

- **A mes amis doctorants Armande BOKO et Jerrold AGBANKPE,**

Vous venez de démarrer ce que je suis en train de finir. Ne baissez jamais les bras. Je puis vous assurer que je jouerai pleinement mon rôle de devancier à vos côtés.

- **A Monsieur Guénolé VINANKPON,**

Merci pour l'appui technique lors des opérations de semis.

- **A tous mes amis du Village d'Enfants SOS d'Abomey-Calavi, du Complexe Scolaire Jean-Michel le Faucon et de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC),**

Cette thèse est la vôtre ! Sincères remerciements pour le soutien et les prières.

- **A tous ceux qui ont œuvré de près ou de loin pour l'aboutissement de cette œuvre,**

Je vous remercie infiniment !

HOMMAGES

- **A mon Directeur de Thèse, Pr. Patrick A. EDORH, Professeur Titulaire des Universités (C.A.M.E.S) et Directeur du Laboratoire de Toxicologie et de Santé Environnementale du Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (C.I.F.R.E.D) du Bénin,**

Vous avez bien voulu diriger mes travaux de recherche malgré vos occupations. Recevez-en un hommage mérité.

- **A mon Co-Directeur de Thèse, Prof. Honoré BANKOLE, Maître de Conférences des Universités (C.A.M.E.S), Chef du Service des Explorations Diagnostiques (S.E.D) du Bénin,**

Vous étiez là depuis le début de ma formation à l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC) et jamais enseignant n'a été aussi prolifique en conseils à mon égard ! Votre sens de l'honneur et de responsabilité font de vous un exemple à imiter. Hommages respectueux.

- **Au Président de Jury, Professeur Messanvi F. GBEASSOR,**

En acceptant de présider ce Jury de soutenance de thèse, vous me faites un grand honneur. Cher Président de Jury, je vous prie de croire en l'expression de mon profond respect et de mes vives gratitudes.

- **Aux Membres de Jury, Professeurs Frédéric S. LOKO, Michel BOKO et Thomas A. DADIE,**

Je suis très honoré par votre présence dans ce Jury de soutenance. Hommages respectueux.

SOMMAIRE

Introduction …….…….…..…….. 1

Première partie : Synthèse bibliographique…….…….…..…. 5

1.1. *S. macrocarpon*

1.2. Nutrition et substances impliquées

1.3. Troubles hypercholestérolémiques

1.4. Fientes de poulets, agriculture urbaine et polluants

Deuxième partie : Matériel et Méthodes……..……... 34

2.1. Propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou

2.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*

2.3. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*

Troisième partie : Résultats et Discussion...……...……..... 73

3.1. Résultats

3.2. Discussion

Conclusion……...…….……...…….……...….. 131

Perspectives de recherche...…….……...….. 134

Références bibliographiques……....……..…….. 137

Table des matières.……..……..……..…….…… 156

RESUME

S. macrocarpon est un légume produit par près de 95% des maraîchers béninois. Bien que la consommation de ce légume soit tout aussi importante dans ce pays, il n'existe aucune donnée relative à ses propriétés nutritionnelles et hygiéniques. La présente étude a pour objectif d'évaluer les propriétés nutritionnelles et médicinales de *S. macrocarpon* puis de proposer une technique de production du légume de qualité sanitaire améliorée, basée sur la biodigestion en anaérobiose des fientes de poulets.

L'évaluation des propriétés nutritionnelles et le criblage phytochimique ont été effectués sur des poudres de feuilles et de fruits du légume. La cytotoxicité a été testée sur des larves de crevette. La toxicité *in vivo*, le rôle hypocholestérolémiant ainsi qu'une exploration histologique du foie ont été déterminés avec des rats de souche Wistar. Une méthode de production du légume basée sur la digestion en anaérobiose des fientes de poulets a été enfin proposée et évaluée.

L'étude a montré que les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* sont riches en nutriments et présentent une innocuité sur les larves de crevette. Des parties du légume contribuent à l'abaissement du taux de cholestérol total, de triglycérides, de VLDL-Cholestérol et de LDL-Cholestérol puis à l'augmentation du HDL-Cholestérol. En outre, ces extraits régénèrent les cellules hépatiques. La charge des bactéries a diminué dans le compost produit, avec des valeurs passant de $6{,}510^6$ UFC/g à $3{,}4.10^4$ UFC/g pour les coliformes thermotolérants et de $3{,}5.10^5$ UFC/g à $5{,}4.10^3$ UFC/g pour *Enterococcus*. Le plomb, complexé par les réactions chimiques, a été réduit avec une teneur passant de 2,39 mg/kg à 0,204 mg/kg. La valeur amendante de ces fientes de poulets a été améliorée à travers l'augmentation des phosphores assimilables, de 9,96 % à 16,40 % et la réduction de l'azote total, de 18900 mg/kg à 13096,33 mg/kg.

Les données résultant de cette étude permettent d'envisager une production à grande échelle de *S. macrocarpon* de qualité hygiénique améliorée.

Mots-clés : *S. macrocarpon*- Légumes- Nutrition- Hypercholestérolémie- Bactéries- Métaux lourds- Biodigestion des fientes de poulets

ABSTRACT

S. macrocarpon is a vegetable produced by nearly of 95 % of growers in Benin. Although the consumption of this vegetable is such important in this country, there are no data on its nutritional and hygienic properties. This study aims to assess the nutritional and medicinal properties of *S. macrocarpon* and then propose a technique for producing vegetable with improved health quality, based on anaerobic bio-digestion of chickens manure.

The evaluation of the nutritional properties and phytochemical screening were carried out on powders of leaves and fruits of *S. macrocarpon*. The cytotoxicity was tested on the shrimp larvae. *In vivo* toxicity, cholesterol lowering's activities and an histological exploration of the liver were determined with Wistar rats. A method of vegetable's production based on anaerobic digestion of chickens manure was finally proposed and evaluated.

The study showed that the leaves and fruits of *S. macrocarpon* are rich in nutrients and have a safety on shrimp larvae. Portions of the vegetable contribute to the lowering of total cholesterol, triglycerides, VLDL-Cholesterol and LDL-Cholesterol and to increasing of HDL-Cholesterol. In addition, these extracts regenerate hepatic cells. Levels of bacteria decreased in the compost, with values from $6.5.10^6$ CFU/g to $3.4.10^4$ CFU/g for fecal coliforms and from $3.5.10^5$ CFU/g to $5.4.10^3$ CFU/g for *Enterococcus*. Lead complexed by chemical reactions was reduced with an amount from 2.39 mg/kg to 0.204 mg/kg. The amendante value of these chickens manure was improved by increasing phosphorus equivalent of 9.96 % to 16.40 % and the reduction of total nitrogen from 18900 mg/kg to 13096.33 mg/kg. The data from this study allow to consider a large-scale production of *S. macrocarpon* with improved hygienic quality.

Keywords: *S. macrocarpon*- Vegetables- Nutrition- Hypercholesterolemia- Bacteria- Heavy metals- Biodigestion of chicken's manure

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Molécule de cholestérol …….	12
Figure 2 :	Schéma général d'une lipoprotéine ……	14
Figure 3 :	Feuilles et fruits frais de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou ……	37
Figure 4 :	Feuilles séchées de *S. macrocarpon*……	37
Figure 5 :	Fruits séchés de *S. macrocarpon* ……..……	37
Figure 6 :	Gavage des rats Wistar avec les poudres de *S. macrocarpon*…	52
Figure 7 :	Schéma d'essai de toxicité aiguë……..……	53
Figure 8 :	Prélèvement rétroorbital de sang chez un rat Wistar ……	56
Figure 9 :	Localisation des quatre sites maraîchers ……	58
Figure 10 :	Localisation des fermes avicoles parcourues……	62
Figure 11 :	Socle du digesteur familial fabriqué…….	65
Figure 12 :	Cloche du digesteur familial fabriqué…….	65
Figure 13 :	Disposition des sites de culture pour le volet microbiologique….	67
Figure 14 :	Disposition des sites de culture pour le volet toxicologique …….	71
Figure 15 :	Teneur des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon* en métaux lourds……..……	77
Figure 16 :	Courbe de sensibilité des larves de crevettes au décocté des feuilles de *S. macrocarpon*……..…….	78
Figure 17 :	Courbe de sensibilité des larves de crevettes au décocté des fruits de *S. macrocarpon*……..……..	78
Figure 18 :	Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur la prise de poids des rats Wistar ……..……	79
Figure 19 :	Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur les transaminases des rats Wistar …….	80
Figure 20 :	Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur l'urémie des rats Wistar ……	81
Figure 21 :	Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur la créatininémie des rats Wistar …..……..…	82

Figure 22 : Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de cholestérol total des rats Wistar…….. 85
Figure 23 : Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de HDL-Cholestérol des rats Wistar……... 86
Figure 24 : Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de LDL-Cholestérol des rats Wistar …… 87
Figure 25 : Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de VLDL-Cholestérol des rats Wistar …… 88
Figure 26 : Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de triglycérides des rats Wistar …… 89
Figure 27 : Aspect histologique du foie des rats du lot témoin négatif..……. 90
Figure 28 : Aspect histologique du foie des rats du lot témoin positif....……. 91
Figure 29 : Aspect histologique du foie des rats traités par les feuilles de *S. macrocarpon* (400 mg/kg)……..…….. 92
Figure 30 : Aspect histologique du foie traité par les feuilles à une dose de 800 mg/kg…….……..…….. 93
Figure 31 : Aspect histologique du foie traité par les fruits à une dose de 400 mg/kg……..…….. 94
Figure 32 : Aspect histologique du foie traité par les fruits à une dose de 800 mg/kg……...…….. 94
Figure 33 : Aspect histologique du foie des rats traités par le médicament de référence…….……. 95
Figure 34 : Aspect histologique du foie des rats traités par le médicament de référence (suite)……. 95
Figure 35 : Charge des fientes de poulets et des sols en germes aérobies mésophiles……..……. 100
Figure 36 : Teneur des fientes en plomb ……..……. 103
Figure 37 : Teneur des fientes en cadmium…… 104
Figure 38 : Teneur des sols maraîchers en plomb……..…….. 105
Figure 39 : Teneur des feuilles de S. macrocarpon en plomb ……. 106
Figure 40 : Teneur des fientes et des sols de culture en plomb et en cadmium…… 107

Figure 41 : Valeur amendante des fientes de poulets et des sols de culture. 108
Figure 42 : Evolution de la teneur des métaux toxiques dans les fientes de poulets…… 109
Figure 43 : Teneur des fientes en éléments fertilisants avant et après compostage…….. 110
Figure 44 : Teneur des fientes en phosphores assimilables avant et après compostage ……..…...… 110
Figure 45 : Teneur en plomb des feuilles de *S. macrocarpon*…….. 111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Composition chimique des fientes de poulets…… 18

Tableau II : Composition des fumiers en éléments traces …… 19

Tableau III : Composition des fientes des poules en éléments traces …….. 20

Tableau IV : Composition microbiologique des fientes de volaille……. 21

Tableau V : Caractéristiques biochimiques de quelques espèces de *Staphylococcus*……..... 29

Tableau VI: Correspondance entre CL_{50} et toxicité……..…... 51

Tableau VIIa : Groupes chimiques présents dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*…….. 74

Tableau VIIb : Groupes chimiques présents dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* (suite)…….. 75

Tableau VIII : Valeur nutritionnelle des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*…….. 76

Tableau IXa : Effets de *S. macrocarpon* sur les éléments figurés du sang des rats Wistar…….. 83

Tableau IXb : Effets de *S. macrocarpon* sur les constantes globulaires du sang des rats Wistar……. 83

Tableau X : Valeurs initiales biochimiques des rats Wistar……. 84

Tableau XIa : Charge des eaux d'arrosage en coliformes thermotolérants … 97

Tableau XIb : Charge des eaux d'arrosage en *E. coli*……. 97

Tableau XII : Charge des feuilles de *S. macrocarpon* en coliformes thermotolérants ……..…… 98

Tableau XIII : Charge des feuilles de *S. macrocarpon* en *E. coli*.....….. 99

Tableau XIV : Teneur des fientes de poulets et des sols en bactéries …… 100

Tableau XV : Evolution de la population bactérienne après compostage…. 101

Tableau XVI : Charge des légumes en bactéries selon les fientes utilisées pour l'amendement…….... 102

Tableau XVII : Teneur en plomb des eaux d'arrosage……. 105

LISTE DES ABREVIATIONS

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

ASAT : Aspartate Amino Transférase

ALAT : Alanine Amino Transférase

CCMHP : Chromatographie sur Couche Mince en Haute Performance

EPT : Eau Peptonnée Tamponnée

CL_{50} : Concentration Létale 50

CT : Cholestérol Total

HDL : High Density Lipoprotein

LDL : Low Density Lipoprotein

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

NGB : Nombre de Globules Blancs

NGR : Nombre de Globules Rouges

Hb : Hémoglobine

Hte : Hématocrite

VGM : Volume Globulaire Moyen

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

Introduction

Les légumes constituent des apports excellents d'enrichissement et de diversification de l'alimentation de l'homme. Il s'agit de véritables sources primaires de nutriments minéraux, de vitamines et autres composés qui interviennent dans la santé humaine (Sinha, 2011). Au Bénin, nombreux sont les légumes cultivés par les maraîchers. Au nombre de ceux-ci, *S. macrocarpon* (ou *S. macrocarpum*) occupe une place de choix. En effet, il est produit par près de 95% des maraîchers (Assogba-Komlan *et al*., 2007). L'intérêt accordé à ce légume s'explique par sa forte appréciation par les consommateurs de tous âges. Communément appelé «Gboma» dans une des langues locales du Bénin, *S. macrocarpon* est également consommé dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest tels que le Togo, la Côte d'Ivoire et le Nigéria (Assogba-Komlan *et al*., 2007; Sodipo *et al*., 2012).

S. macrocarpon est aussi utilisé pour ses vertus thérapeutiques. Ainsi, en Sierra Léone, les feuilles chauffées sont mâchées pour traiter les affections de gorge (Grubben et Denton, 2004). Au Nigéria, les fruits sont consommés comme laxatifs et les fleurs pour traiter les affections dentaires (Grubben et Denton, 2004). Au Kenya, le jus des racines bouillies sert à lutter contre les troubles de l'estomac (Grubben et Denton, 2004).

L'extrait aqueux des fruits présenterait des activités hypolipidémiantes et hépatoprotectrices (Grubben et Denton, 2004 ; Sodipo *et al*., 2012). Ceci pourrait constituer une alternative pour la prise en charge des maladies cardiovasculaires dont essentiellement l'hypercholestérolémie qui constituent un véritable problème de santé publique dans le monde (Sodipo *et al*., 2012) . Quant aux feuilles, partie du légume la plus consommée au Bénin, aucune information relative à ces propriétés n'est disponible. Malgré les travaux réalisés par Assogba-Komlan *et al*. (2007), Sodipo *et al*. (2008, 2011, 2012) et Chinedu *et al*. (2011), peu d'informations existent en ce qui concerne l'importance nutritionnelle et médicinale de *S. macrocarpon* au Bénin. Le premier volet expérimental de cette thèse vise alors à évaluer les aspects nutritionnel et médicinal liés à la consommation de ce légume.

La culture de *S. macrocarpon* nécessite une grande quantité de nutriments. Ces nutriments peuvent facilement être mis à disposition par l'utilisation d'engrais inorganiques. Cependant, il y a de nombreuses conséquences liées à leur utilisation. Au nombre de celles-ci, le lessivage, la dégradation des sols et la pollution de l'eau souterraine peuvent être cités (Ullah *et al*., 2008). C'est pourquoi la fumure organique dont l'application fournit des éléments nutritifs aux plantes et améliore la structure du sol est de plus en plus promue (Ullah *et al*., 2008; Agbo *et al*., 2012). Il a été rapporté que l'application de la fumure organique, comparée à la fumure inorganique, augmente significativement le rendement dans la production d'aubergines par exemple (Ullah *et al*., 2008; Agbo *et al*., 2012). Parmi ces fumures organiques, il y a les fientes de poulets, très prisées en agriculture urbaine à Cotonou (Atidégla, 2011). Ces fientes reviennent moins chères aux maraîchers. Dans le sol, elles contribuent à alimenter la plante en éléments nutritifs majeurs tels que l'azote, les phosphores et le potassium. L'azote favorise la végétation, accélère la croissance de la plante et donne une bonne coloration verte aux feuilles. Les ions phosphores favorisent le développement des racines et des bulbes. Ils exercent une action accélérante sur la maturité des fruits, légumes et céréales. La potasse rend la plante vigoureuse ; ce qui lui permet de mieux résister à la sécheresse et aux maladies. Les fientes sont aussi une source de microéléments dont le magnésium, le zinc, le cuivre, le souffre et le bore. Outre les éléments nutritifs, la décomposition des fientes de poulets produit l'humus, très utile pour la consistance du sol qui devient meuble et perméable à l'air et aux racines (Onana Onana, 2006).

Malgré les avantages que présente l'utilisation des fientes de poulets en agriculture urbaine, des risques potentiels de contamination des légumes produits, liés à la présence de bactéries pathogènes et de métaux lourds (Métras, 2003) dans les fientes, restent une préoccupation. L'hygiénisation des fientes de poulets devient donc impérative, compte-tenu du contexte actuel: produits potentiellement contaminés dans les élevages et sécurisation de produits destinés à être commercialisés (Derel et Aubert, 2008). Cela est primordial afin de garantir la qualité sanitaire de *S. macrocarpon* produit à Cotonou.

Ainsi, les risques sanitaires seraient minimisés en cas de compostage correct des fientes avant amendement des légumes. Le compostage en aérobiose dont la durée varie entre sept et huit semaines selon Znaïdi (2002) n'est pas du tout respecté par les maraîchers, souvent pressés de produire et de vendre leurs cultures. Il urge alors de mettre en place une technique de compostage en temps réduit pour produire des légumes sains du point de vue microbiologique et toxicologique. Les deux derniers volets expérimentaux de cette thèse abordent alors la mise en évidence de l'effet d'un type de compostage appelé digestion en anaérobiose des fientes de poulets sur les qualités microbiologique et toxicologique de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou.

Les hypothèses ci-après ont été formulées dans le cadre de cette étude :

- les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou sont riches en nutriments,
- les parties du légume cultivé à Cotonou possèdent des propriétés hypocholestérolémiantes,
- l'utilisation de fientes de poulets compostées par digestion en anaérobiose permet une production de feuilles de *S. macrocarpon* de qualité microbiologique satisfaisante,
- une technique basée sur le compostage des fientes de poulets réduit la teneur en métaux lourds des feuilles de *S. macrocarpon*.

La présente étude vise à évaluer l'intérêt de *S. macrocarpon* en santé humaine et l'impact de l'utilisation des fientes de poulets compostées par digestion en anaérobiose sur la qualité hygiénique de ce légume.

Plus spécifiquement, il s'est agi de :

1- identifier les propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou,

2- concevoir une technique de compostage de fientes de poulets en anaérobiose pour la production de *S. macrocarpon* de valeur microbiologique satisfaisante,

3- déterminer l'effet du compostage en anaérobiose des fientes de poulets sur la teneur en métaux lourds de *S. macrocarpon*.

Le présent document, en dehors de l'introduction et de la conclusion, comporte trois parties essentielles. La première est consacrée à la synthèse bibliographique sur *S. macrocarpon*, la nutrition, les troubles hypercholestérolémiques, la problématique de l'agriculture urbaine à Cotonou et les polluants inclus dans cette étude. La deuxième aborde la méthodologie utilisée. Enfin, la troisième partie présente les résultats et la discussion.

Première partie :
Synthèse bibliographique

1.1. *Solanum macrocarpon*

1.1.1. Botanique et culture de *S. macrocarpon*

S. macrocarpon est une plante de la même famille que la tomate, le piment et l'aubergine : celle des Solanaceae (CERPADEC-ONG, 2008). Ce genre botanique comporte des plantes herbacées ou des arbustes à feuilles généralement alternes, parfois opposées. L'inflorescence est une cyme, le plus souvent unipare. Les fleurs sont hermaphrodites, à corolle étoilée avec cinq pétales souvent réfléchis (retournés vers l'arrière). Les étamines saillantes forment un cône autour du gynécée. L'ovaire est supère. Les fruits sont des baies (CERPADEC-ONG, 2008).

Le cycle de production de *S. macrocarpon* est de 70 jours, de la pépinière à la récolte (CERPADEC-ONG, 2008). Le semis se fait en pépinière sous ombrage. La planche de la pépinière est d'abord désinfectée à l'eau chaude ou aux insecticides. Quatre semaines après le semis, les plants sont repiqués sur des planches à un écartement de 40 sur 40 cm. *S. macrocarpon* est souvent cultivé en association avec l'amaranthe (CERPADEC-ONG, 2008).

1.1.2. Ecologie de *S. macrocarpon*

Cette plante préfère les expositions mi-ensoleillées mais s'accommode à d'autres situations. Les exigences de *S. macrocarpon* sont faibles. Cette plante s'adapte à la plupart des sols pourvu que ceux-ci soient riches en humus et en éléments nutritifs. Elle préfère cependant les sols légers et fertiles. *S. macrocarpon* a besoin de l'oxygène pour mettre en place ses racines. Ainsi, le sol doit être aéré, non tassé et non hydromorphe (CERPADEC-ONG, 2008).

1.1.3. Maladies et parasites de *S. macrocarpon*

S. macrocarpon est une plante souvent attaquée par des insectes qui se nourrissent des feuilles et par des champignons qui provoquent des déformations foliaires (réduction importante du limbe) ou des pourritures sèches de cellules. On peut lutter contre ces agents nuisibles en pratiquant une rotation des cultures, par exemple avec des céréales ou d'autres plantes féculentes ou avec l'amarante, le gombo, l'arachide ou l'oignon. En général, *S. macrocarpon* n'est pas très sensible aux maladies (CERPADEC-ONG, 2008).

1.2. Nutrition et substances impliquées

La nutrition est une science qui étudie les multiples relations de l'être humain avec la nourriture. Elle concerne de nombreuses disciplines scientifiques et s'intéresse notamment aux processus biologiques entourant l'utilisation des nutriments, à la santé alimentaire, aux besoins nutritifs des populations, à l'étude des comportements et aux productions agroalimentaires. On distingue la macro-nutrition et la micro-nutrition (Cap Sciences, 2004).

1.2.1. Macro-nutrition

Les macronutriments sont représentés par les glucides, les lipides et les protides. La ration calorique doit provenir idéalement à 55-60% des glucides, à 30% des lipides et à 10% des protides (Riché, 1998).

1.2.1.1. Glucides

Les glucides sont aussi appelés "sucres" ou plus rarement "hydrates de carbone". La structure fondamentale commune des glucides repose sur l'union d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. On distingue des unités de base des glucides ou monosaccharides : il s'agit par exemple du glucose, du fructose ou du galactose. Associées deux à deux, ces unités de base forment des disaccharides. Parmi ces derniers, on trouve le lactose, le maltose et le saccharose. Les monosaccharides et les disaccharides sont appelés glucides simples. On les distingue des glucides complexes qui sont de longues chaînes glucidiques (Riché, 1998).

On reconnaît deux catégories, apparemment assez proches, qui ont pour nom amidon dans le règne végétal et glycogène dans le règne animal. L'amidon provient de notre ration et n'existe pas dans notre corps alors que le glycogène se situe dans le foie et dans les muscles (Riché, 1998).

1.2.1.2. Lipides

Les nutritionnistes préfèrent ce terme de lipides à ceux plus usuels de graisses, de corps gras ou de matières grasses ; ce dernier se révélant d'ailleurs bien trop approximatif. L'intérêt qu'on leur porte dans le domaine de la nutrition a une double origine. En effet, les lipides sont des constituants de notre ration et entrent dans la composition de notre organisme, sous forme de réserves adipeuses élaborées à partir de tous les excédents alimentaires (Riché, 1998).

1.2.1.3. Protides

On parle habituellement de protéines, mais les nutritionnistes préfèrent le terme plus précis de "protides". Cette famille regroupe plusieurs membres qui sont les protéines, les peptides et les acides aminés. Les protéines se composent d'un assemblage complexe et ordonné d'unités simples que sont les acides aminés. Cette architecture se révèle bien plus élaborée que celle du glycogène, notamment parce que pas moins de vingt sortes d'acides aminés différents entrent dans la composition de ces assemblages (Riché, 1998). Quand la chaîne ne comporte pas plus qu'une dizaine d'acides aminés, on parle de peptides. Beaucoup d'hormones s'y rangent. Les acides aminés enfin, se trouvent sous forme isolée ou modifiée dans nos tissus (Riché, 1998). Il s'agit d'un groupe de composés dont l'implication dans les phénomènes énergétiques, à l'inverse des glucides et de la plupart des lipides, se révèle mineure (Riché, 1998).

1.2.2. Micro-nutrition

Elle repose sur l’étude des vitamines, des sels minéraux, des éléments traces (dits oligo-éléments) qui sont, pour la plupart, des micronutriments que l’organisme humain ne peut pas synthétiser et qu’il doit impérativement trouver dans l’alimentation (FFBA, 2012).

1.2.2.1. Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques nécessaires à l'organisme et présentes en très petites quantités. Elles sont toutes indispensables à l'entretien des tissus. Certaines d'entre elles se comportent comme des hormones ou se conjuguent avec les sécrétions des glandes endocrines. Les plus nombreuses jouent le rôle d'enzymes et activent les transformations biochimiques de l'organisme. Elles ont une action très importante au niveau de la vie cellulaire. Elles interviennent dans le métabolisme des nutriments, la libération et l'utilisation de l'énergie fournie aux cellules par les protéines. Les glucides et les lipides seraient bloqués si ces substances venaient à manquer : il s'agit bien de facteurs vitaux (Cap Sciences, 2004). Les vitamines sont rangées en 2 groupes :

- les vitamines liposolubles ou solubles dans les corps gras : A, D, E, K.

- les vitamines hydrosolubles ou solubles dans l'eau : C et celles du groupe B (Cap Sciences, 2004).

1.2.2.2. Sels minéraux

Les sels minéraux ne constituent pas une source énergétique mais ils sont indispensables à la vie. Ils entrent dans la composition des tissus, participent à la conduction de l'influx nerveux, au fonctionnement musculaire, aux réactions enzymatiques. Ils sont présents en quantités importantes dans le corps humain dont ils représentent 4% du poids. Ces éléments sont éliminés régulièrement au niveau des reins et notre alimentation doit en apporter chaque jour des quantités suffisantes.

On distingue deux catégories de sels minéraux :

- les éléments principaux dont l'organisme a grandement besoin : le calcium, le sodium, le potassium, le magnésium, le fer et le phosphore ;
- les oligo-éléments qui sont nécessaires en petites quantités : le cuivre, le zinc, le manganèse, l'iode, le chlore, le fluor, le cobalt et le sélénium. Ces substances minérales se trouvent dans l'organisme en très petites quantités.

Une carence d'un de ces éléments minéraux montre cependant qu'ils sont essentiels pour la santé mais on ne connaît pas encore précisément leur fonction dans l'organisme. L'iode est nécessaire à la synthèse des hormones de croissance par la thyroïde. Des millions de personnes dans le monde souffrent encore d'une carence en iode qui provoque le goitre et un retard mental chez le nourrisson. Le cuivre et le zinc sont importants pour la formation des enzymes et le fluor présent dans les dents protège contre les caries (Cap Sciences, 2004).

1.2.3. Autres substances intervenant dans la nutrition

En dehors de ces groupes chimiques classiques reconnus par la nutrition, d'autres sont révélés dans les produits alimentaires d'origine végétale (comme c'est le cas de la présente étude) par le criblage phytochimique. C'est un ensemble de techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent donc d'identifier la présence des substances chimiques. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, etc. (Hamidi, 2013). Ces molécules sont d'excellentes réserves diététiques (Chinedu *et al*., 2011) et jouent un rôle important dans les propriétés pharmacologiques détenues par les plantes qui en contiennent (Badiaga, 2011). Ces groupes chimiques peuvent être révélés dans un produit soit sur la base de réactions de coloration et de précipitation soit grâce à la Chromatographie sur Couche Mince (Gbaguidi, 2005).

1.3. Troubles hypercholestérolémiques

1.3.1. Cholestérol

Malgré les avancées remarquables de la médecine et de la recherche, on constate une recrudescence des maladies cardio-vasculaires qui constituent la première cause de mortalité dans le monde (Callias, 2007). Elles sont responsables chaque année du décès de plus de 17 millions de personnes, soit 30% de la mortalité dans le monde, dont les ¾ ont lieu dans les pays à faibles et moyens revenus. Vingt-cinq millions de décès sont prévus en 2020 (Rachid et Hassan, 2007).

L'hypercholestérolémie est une condition métabolique qui détermine l'installation de maladies chroniques dégénératives comme l'athérosclérose (Devi et Sharma, 2004 ; Kim *et al*., 2008). Elle se caractérise par l'élévation des taux de LDL-cholestérol (LDL-C) et des triglycérides (TG) avec ou sans diminution du taux de HDL-cholestérol (HDL-C). Un mauvais mode de vie (alimentation déséquilibrée, sédentarité, manque d'activité physique) est souvent indexé (Callias, 2007).

1.3.1.1. Définition du cholestérol

Le cholestérol est une molécule organique de la famille des stérols. C'est une substance lipidique d'origine animale qui n'existe pas chez les végétaux, où il est remplacé par d'autres stérols. Le nom cholestérol vient du grec *chole-* (bile) et *–stereos* (solide) car il fut découvert sous forme solide dans les calculs biliaires. Il est indispensable à notre organisme puisqu'il est l'un des principaux constituants des membranes cellulaires et participe ainsi à de nombreux processus biochimiques (Callias, 2007). Lorsqu'on parle de «bon» ou de «mauvais» cholestérol, il s'agit en fait des High Density Lipoproteins (lipoprotéines HDL) et de Low Density Lipoproteins (lipoprotéines LDL) qui jouent toutes deux un rôle essentiel dans le transport du cholestérol (Callias, 2007).

1.3.1.2. Structure et rôle du cholestérol

Le cholestérol (Figure 1) peut se présenter sous deux formes :

- forme libre, non associée à une autre substance. La molécule est alors faiblement hydrophile,
- forme estérifiée où la fonction OH de la molécule se lie à un acide gras et rend la molécule complètement hydrophobe.

Comme toutes les molécules organiques, celle-ci est principalement composée d'un grand squelette de carbone et d'hydrogène.

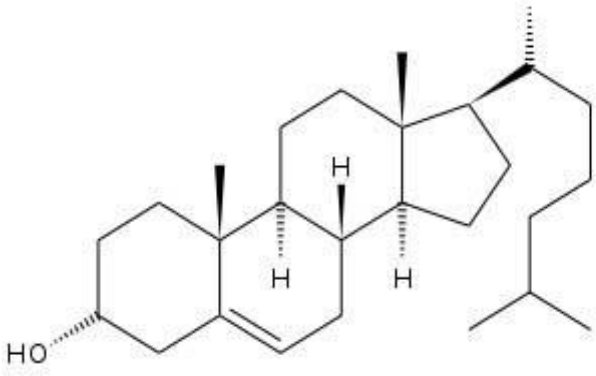


Figure 1. Molécule de cholestérol (Callias, 2007)

Le cholestérol est un des principaux constituants des membranes plasmiques et tissus cellulaires. C'est d'ailleurs pourquoi on le trouve de manière extrêmement abondante dans l'organisme et dans le sang (Djamel, 2009). De plus, les neurones humains en sont riches et il est le précurseur indispensable de toutes les hormones sexuelles (progestérone, testostérone, œstrogènes) ainsi que de nombreuses hormones stéroïdes (cortisol, cortisone). Il est également utilisé pour la synthèse de la vitamine D et est un des principaux constituants de la bile (Callias, 2007).

1.3.1.3. Double origine et transport du cholestérol par LDL et HDL

1.3.1.3.1. Double origine du cholestérol

Chaque jour, un organisme adulte doit disposer d'environ un gramme et demi de cholestérol. Cet apport va lui être fourni de deux manières différentes:

- 75% d'une manière endogène: cholestérol synthétisé par l'organisme lui-même à l'intérieur du foie et de certaines cellules intestinales,
- 25% d'une manière exogène: cholestérol fourni par notre alimentation (aliments d'origine animale tels que les viandes, les crustacés, le jaune d'œuf, les matières grasses animales).

Cette double origine pourrait poser problème si la quantité produite par le corps était toujours fixe. L'alimentation transmettrait alors souvent, soit un taux trop élevé de cholestérol, soit un taux trop faible. Mais notre corps adapte constamment sa production de cholestérol endogène en fonction de l'apport en cholestérol exogène reçu. Pourtant, certaines personnes ont des problèmes d'hypercholestérolémie. Bien que les causes de cette maladie ne soient pas encore très claires, on suppose qu'elles sont principalement le fruit d'une anomalie génétique (Callias, 2007).

1.3.1.3.2. Transport du cholestérol par LDL et HDL

Les lipoprotéines sont des assemblages de différentes graisses (cholestérol, triglycérides, etc.) qui, entourées d'une coque de protéine peuvent passer dans le sang (Figure 2). Les LDL et HDL sont deux types de lipoprotéines qui jouent un rôle essentiel dans le transport du cholestérol jusqu'à son lieu d'action (Djamel, 2009).

Le cholestérol est un produit de nature lipidique. Il est hydrophobe, donc incapable de passer sans aide dans le sang qui est de nature aqueuse. Sans les lipoprotéines, il ne pourrait donc pas atteindre les différentes cellules de l'organisme qu'il doit alimenter (Rachid et Hassan, 2007).

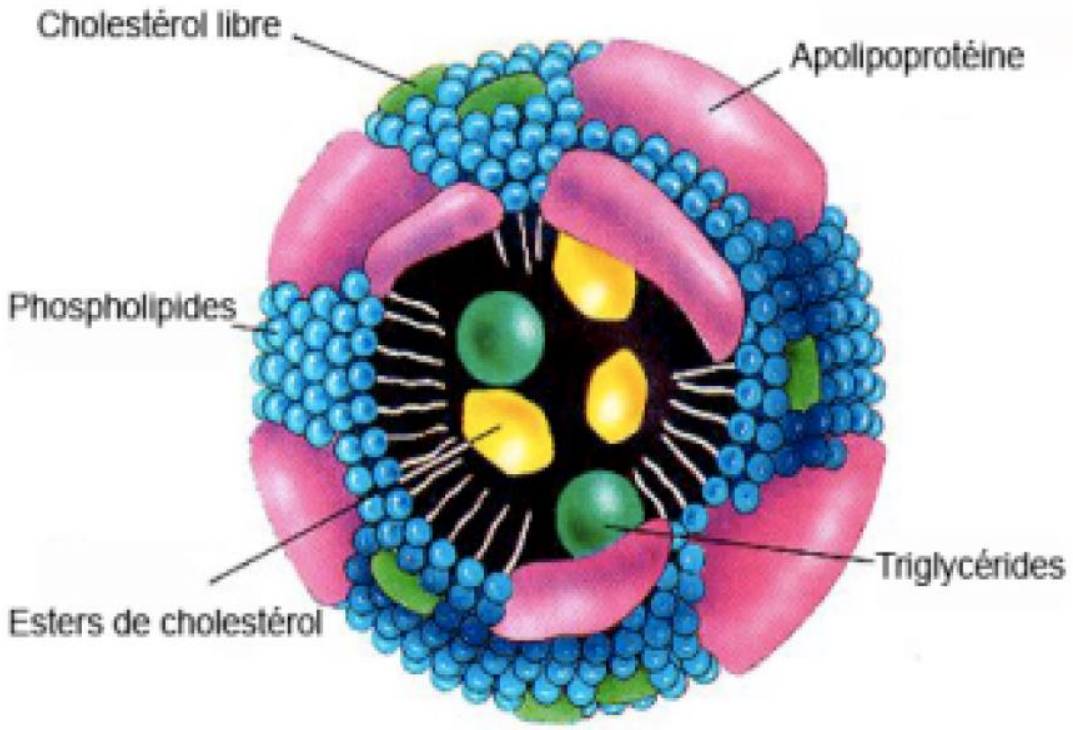


Figure 2. Schéma général d'une lipoprotéine (Rachid et Hassan, 2007)

Après chaque repas, le corps reçoit une quantité plus ou moins importante de cholestérol et d'acides gras exogènes. Celui-ci arrive tout d'abord dans l'intestin grêle. Là, le cholestérol va se combiner aux sels biliaires et former de petits amas appelés micelles. C'est grâce à ces amas que le cholestérol ainsi que les autres lipides vont pouvoir passer à l'intérieur de la muqueuse intestinale. Puis cet assemblage va se dissocier et c'est grâce à une autre sorte de lipoprotéine nommée chylomicron que le cholestérol va être transporté jusqu'au foie par le sang (Callias, 2007).

Dans le foie, le cholestérol exogène et le cholestérol endogène se regroupent et vont tous deux être acheminés jusqu'aux différentes cellules. Pour rejoindre sa destination finale, le cholestérol est cette fois-ci introduit à l'intérieur d'autres transporteurs: les lipoprotéines LDL (Callias, 2007).

Celles-ci vont le transporter à travers le sang jusqu'à ce qu'elles soient captées par les récepteurs qui leur sont propres et qui sont présents à la surface des cellules. Le cholestérol est alors transféré à l'intérieur de la cellule. L'opération terminée, les lipoprotéines LDL retournent au foie (Rachid et Hassan, 2007).

L'inconvénient de ce type de lipoprotéines est qu'elles ont tendance à se déposer contre les parois des vaisseaux sanguins, formant ainsi des plaques nommées athéromes qui, à long terme obstruent les artères et provoquent des accidents. C'est là qu'entre en jeu le deuxième type de transporteur: les lipoprotéines HDL. Celles-ci vont récupérer le cholestérol présent en excès dans la circulation sanguine, ainsi que le cholestérol déposé sur les parois des artères et vont le ramener au foie. Une personne qui a suffisamment de lipoprotéines HDL court beaucoup moins de risques d'accidents cardio-vasculaires qu'une personne qui en a peu (Callias, 2007).

Une fois le cholestérol excédentaire ramené au foie, il se mélange au nouveau cholestérol arrivé de l'alimentation et des cellules du foie. Il est alors trié. La partie excédentaire va être transformée en sels biliaires et être incorporée à la bile. Le tout repart vers l'intestin où les sels sont définitivement éliminés et quittent le corps. L'autre partie du cholestérol rejoint les cellules. Les chylomicrons sont hydrolysés et transformés en résidus de chylomicrons: les remnants. Ils sont reconnus par les récepteurs présents à la surface du foie (Rachid et Hassan, 2007).

1.3.2. Hypercholestérolémie et ses causes

1.3.2.1. Hypercholestérolémie

On parle d'hypercholestérolémie lorsque le taux de cholestérol présent dans le sang est supérieur à nos besoins réels. L'excès non utilisé par les cellules a alors tendance à se déposer contre les parois des vaisseaux, provoquant, s'il n'est pas récupéré et ramené au foie par les HDL, une obstruction des artères amenant à l'infarctus. On estime que chez l'Homme, lorsque le taux de cholestérol sanguin total est supérieur à 6,5 mmol/l, il y a hypercholestérolémie. En réalité, il faut regarder au cas par cas. Pour un patient n'ayant aucun autre facteur de risques, le taux peut être jugé acceptable jusqu'à 8 mmol/l. De plus, avoir beaucoup de lipoprotéines HDL réduirait les risques d'accidents cardio-vasculaires (Callias, 2007).

Il faut donc également tenir compte du rapport entre le cholestérol total et le taux de lipoprotéines HDL présentes dans le sang (cholestérol total/HDL), une valeur considérée comme normale étant inférieure ou égale à 4,5. Dans le cas contraire, on parle alors fréquemment d'hypercholestérolémie (Callias, 2007).

1.3.2.2. Causes de l'hypercholestérolémie

On ne comprend pas encore entièrement les causes de l'hypercholestérolémie. Alors que certains spécialistes mettent en avant des causes génétiques, d'autres avancent que c'est l'hygiène alimentaire qui en serait responsable. De multiples hypothèses et théories s'affrontent, aucune n'ayant réussi pour l'instant à s'imposer. Il semble toutefois irréfutable que dans certains cas, un problème génétique provoquant un dérèglement du métabolisme, serait la cause de l'hypercholestérolémie (Rachid et Hassan, 2007).

Selon Callias (2007), en temps normal, lorsque l'apport alimentaire est trop élevé, le corps le détecte et réduit sa production endogène (rétro-inhibition due entre autres à une enzyme : la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA-reductase ou HMG-Co-A reductase. La production endogène diminue considérablement, mais même dans les cas extrêmes, elle ne peut être nulle. Le corps en fabrique toujours une quantité minimale. En général, sans d'autres problèmes génétiques ou dus à d'autres éléments perturbateurs, la régulation se fait de manière normale puisque le cholestérol se trouve en faible quantité dans la plupart des aliments. Lors d'une hypercholestérolémie dite familiale (maladie autosomique dominante fréquente), on constate que cette régulation ne se fait pas de manière normale. Le taux de cholestérol sanguin est trop élevé, avoisinant les 14-15 mmol/l, et des xanthomes peuvent apparaître au niveau des paupières. C'est au niveau des récepteurs LDL des cellules que se situe le problème. Il a été remarqué que chez les personnes atteintes, ils étaient absents ou présents en quantité insuffisante (Callias, 2007).

De plus, malgré ce taux élevé, les cellules n'en recevant que très peu (absence de récepteurs) ne transmettaient pas l'ordre au corps de réduire sa production, ce qui accentuait le problème. D'autres spécialistes affirment que l'hypercholestérolémie serait dans d'autres cas due aux acides gras. On parle alors d'hyperlipidémie. On sait depuis quelques années que les acides gras saturés et insaturés ont un effet important sur la cholestérolémie (Rachid et Hassan, 2007).

Les acides gras saturés stimuleraient la synthèse du cholestérol endogène et inhiberaient son excrétion. A l'inverse, les acides gras insaturés stimuleraient son excrétion et sa transformation en sels biliaires (Callias, 2007).

Les huiles à l'intérieur desquelles on trouve des acides gras *trans* et qui sont rendues solides par hydrogénation auraient des effets plus néfastes : augmentation plus forte du taux de LDL et diminution marquée des HDL. D'autres scientifiques encore affirment que les triglycérides présents en trop grande quantité dans le sang sont responsables de l'inhibition des récepteurs LDL des cellules (Rachid et Hassan, 2007). On assiste alors au même effet que dans une hypercholestérolémie familiale, mais due cette fois à l'alimentation. Apparemment, les hypercholestérolémies pourraient avoir plusieurs causes suivant les cas: hypercholestérolémie familiale due à un défaut chromosomique d'un côté, et de l'autre une hypercholestérolémie due à une trop grande consommation de graisses (hyperlipidémie). La combinaison des causes différentes peuvent aggraver le problème (Callias, 2007).

1.4. Fientes de poulets, agriculture urbaine et polluants

1.4.1. Caractéristiques des fientes de poulets

Les fientes de poulets sont les déjections avicoles. Elles sont constituées de fèces, d'urines, de plumes, d'œufs ou de coquilles d'œufs et de litière. C'est un mélange hétérogène (Métras, 2003). L'aspect des fientes varie en fonction de leur humidité :

- de 15 à 20% d'humidité, elles sont sèches, poussiéreuses, gris clair. Elles sont plus volontiers appelées «fumiers» et concernent les volailles de chair,
- à 70% d'humidité, elles sont visqueuses, magmatiques et très foncées. On parle alors de fientes de poules pondeuses (Fourmond, 1982).

1.4.1.1. Composition chimique des fientes de poulets

La composition chimique des fientes est très variable (Tableau I).

Tableau I : Composition chimique des fientes de poulets (Fourmond, 1982)

Composantes	Pourcentage
Matière Sèche	20-30%
Matière Organique	60-80 % de la MS
Glucides	16 %
Lipides	2-4 %
Azote non protéique	Acide urique : 70% de l'azote urinaire Urée-Créatinine : 17% de l'azote urinaire Azote ammoniacal : 13% de l'azote urinaire
Azote protéique	30% de l'azote total
Azote soluble	33% de l'azote total
Minéraux	53%

1.4.1.2. Concentration en éléments traces des fientes de poulets

Les fumiers de volailles sont principalement composés d'eau et de carbone, avec des quantités plus faibles d'azote, de phosphore et d'éléments à l'état de trace tels le chlore, le calcium, le magnésium, le sodium, le manganèse, le fer, le cuivre, le zinc et l'arsenic (Kelleher *et al*., 2002). Le tableau II présente la composition en éléments traces des fumiers de poulets de chair et le tableau III, la composition en éléments traces des fientes de poules pondeuses.

Tableau II : Composition des fumiers en éléments traces

Substances	Concentration (mg/kg)
Chlore	9300 à 11430
Calcium	9000 à 99100
Magnésium	1900 à 24400
Sodium	2100 à 18640
Cuivre	47 à 2763
Fer	180 à 12400
Manganèse	183 à 2307
Zinc	148,3 à 1848
Arsenic	0 à 100
Cadmium	1 à 50,4
Plomb	20 à 35
Chrome	3,8 à 10
Sélénium	2
Aluminium	180 à 900
Bore	100

Source : Gupta et Charles (1999) ; Haggard *et al*. (2003) ; Sistani *et al*. (2003) ; Priyadarsan *et al*. (2005) ; Omeira *et al*. (2006) ; Franzluebbers *et al*. (2007) ; Guo *et al*. (2009) ; Tewolde *et al*. (2009) ; Qiu et Guo (2010)

Tableau III : Composition des fientes des poules en éléments traces

Substances	Concentration (mg/kg)
Chlore	2400±0,2
Calcium	90500± 1,1
Cuivre	571± 32
Fer	1615± 41
Manganèse	715±17
Zinc	193,0 à 612
Arsenic	1,9± 0,1
Cadmium	5,7 à 7,2

Source : Omeira *et al*. (2006); Dao et Zhang (2007)

1.4.1.3. Composition microbiologique des fientes

Les bactéries sont présentes en grand nombre dans les fientes de poulets. On dénombre parmi elles, des bactéries pathogènes et non pathogènes. Les bactéries non pathogènes sont utilisées comme indicatrices de contamination fécale du milieu naturel (Métras, 2003). Ces bactéries indicatrices sont essentiellement représentées par les coliformes thermotolérants (Bouedo *et al*., 1993). En plus des germes témoins de contamination fécale, les fientes de poulets sont fréquemment contaminées par des bactéries pathogènes au rang desquels on retrouve *Escherichia coli, Salmonella spp, Campylobacter jejuni* (Marly *et al*., 1995, Vallet et Marly, 1997).

Araba et Hachana (2000) ont par ailleurs déterminé la composition microbiologique des fientes de poulets. Neuf échantillons de fientes ont été prélevés : 3 sur des pondeuses en cage, 1 sur des pondeuses sur sol, 4 sur des poulets de chair et 1 sur des poulettes sur sol. Les genres *Salmonella* et *Clostridium* ont été recherchés et les résultats sont présentés par le tableau IV.

Tableau IV : Composition microbiologique des fientes de volaille

Fientes (provenance)	Effectif de poulet	*Clostridium* x 10^3 (germes/g)	*Salmonella* (germes/g)
Poulettes sur sol	1	0,3	0
Pondeuses en cage	3	7,7	0
Poulets de chair	4	2,3	0
Pondeuses sur sol	1	20	0

Source : Araba et Hachana (2000)

Il existe d'autres agents pathogènes retrouvés dans les fientes de poulets à savoir les virus et les parasites. Les virus pathogènes pour l'homme retrouvés dans les effluents d'élevage sont rares. Ce sont essentiellement les rotavirus ou calicivirus (Métras, 2003). D'origine digestive, certains parasites se retrouvent dans les lisiers ou fumiers (Agosto, 1995). Les parasites sont susceptibles d'infester l'homme ou l'animal. Ils sont rencontrés sous forme adulte ou végétative (Agosto, 1995).

1.4.1.4. Utilité des fientes de poulets dans le maraîchage

L'azote contenu dans les fientes de poulets est rapidement disponible pour la plante. Il en est de même pour les autres éléments fertilisants. Les fientes sont utilisées comme engrais riches en azote, en phosphore, en potassium et en calcium afin de produire un effet d'amendement basique du sol. Les fientes de poulets ont une valeur amendante organique d'environ 50 kg d'humus par tonne apportée (MVAD, 2003).

Dans le contexte de l'agriculture urbaine, la notion du compostage de ces fientes est assez récurrente. En effet, il ne s'agit pas d'une technique récente mais pratiquée depuis l'Antiquité. Ainsi, le mot « compost » vient du latin « *Compositus* » qui signifie « composé de plusieurs choses » (Znaïdi, 2002). La définition du compost n'est pas une chose facile car c'est un processus complexe. Selon Znaïdi (2002), le compostage est la culture de la faune et de la flore naturelle du sol activées par aérations du tas. Mustin (1987) le considère comme étant un procédé biologique assurant la décomposition des constituants organiques des sous-produits.

Pour Gobat *et al*. (1998), le compostage est un procédé de traitement intensif des déchets organiques qui met en œuvre, en les optimisant, des processus biologiques aérobies de dégradation et de stabilisation des matières organiques complexes. Le compostage, et c'est la définition la mieux adaptée, est un processus naturel de «dégradation» ou de décomposition de la matière organique par les microorganismes dans des conditions bien définies. Les matières premières organiques, telles que les résidus de culture, les déchets animaux, les restes alimentaires, certains déchets urbains et les déchets industriels appropriés, peuvent être appliquées aux sols en tant que fertilisants, une fois le processus de compostage terminé (Misra *et al*., 2005). Le compost est une source importante de matière organique. La matière organique du sol joue un rôle important dans la durabilité de la fertilité, et donc pour une production agricole durable. En plus d'être une source d'éléments nutritifs pour les cultures, la matière organique améliore les propriétés biologiques et physico-chimiques du sol (Misra *et al*., 2005).

Suite à ces améliorations, le sol: (i) devient plus résistant aux agressions telles que la sécheresse, les maladies et la toxicité, (ii) aide la culture à mieux prélever les éléments nutritifs, (iii) présente un cycle nutritif de bonne qualité en raison d'une activité microbienne vigoureuse. Ces avantages se manifestent par une réduction des risques pour les cultures, des rendements plus élevés et une réduction des dépenses des agriculteurs pour l'achat d'engrais minéraux (Misra *et al*., 2005). Il existe plusieurs types de compostage dont le compostage en aérobiose et celui en anaérobiose.

Plusieurs paramètres (température, pH, taux d'oxygène) présentent des variations au cours du compostage en aérobie. L'évolution de la température, qui exprime l'activité de la succession de populations microbiennes liées aux modifications du milieu, est la manifestation la plus perceptible de la dynamique du compostage. Elle permet de distinguer quatre phases (Znaïdi, 2002) :

- la phase mésophile : C'est la phase initiale de compostage. Les matières premières sont envahies par les micro-organismes mésophiles indigènes (bactéries et champignons essentiellement). Leur activité engendre une montée en température (de 10-15°C à 30-40°C), un dégagement important de CO_2 ainsi qu'une acidification.

- la phase thermophile : Elle est atteinte au centre du tas, à des températures élevées (de l'ordre de 60 à 70°C) pour les composts agricoles, auxquelles ne résistent que des microorganismes thermotolérants ou thermophiles (arrêt de l'activité des champignons, développement des actinomycètes et des bactéries thermophiles). Les pertes en azote minéralisé sous forme ammoniacale (NH_4^+) qui peut être volatilisé sous forme d'ammoniac (NH_3) dans certaines conditions, ainsi que l'évaporation d'eau, sont plus importantes au cours de cette phase. La libération de CO_2 peut entraîner, à la fin des phases thermophiles, jusqu'à 50% de perte en poids sec,

- la phase de refroidissement : C'est la phase intermédiaire entre la phase thermophile et la phase de maturation. Elle prend fin avec le retour à la température ambiante. Le milieu est colonisé de nouveau par des microorganismes mésophiles. Ils dégradent les polymères restés intacts en phase thermophile et incorporent l'azote dans des molécules complexes,

- la phase de maturation : Cette phase présente peu d'activités microbiologiques (recolonisation par des champignons) mais est adaptée à la colonisation par la macrofaune, en particulier les lombrics lorsque ceux-ci sont présents dans l'environnement du tas. Les matières organiques sont stabilisées et humifiées par rapport aux matières premières mises à composter. Les trois premières phases sont relativement rapides par rapport à la phase de maturation. Leur durée ainsi que l'amplitude des variations dépendent cependant des matériaux de départ et des conditions techniques dans lesquelles s'effectue le compostage. Les dates des retournements ne peuvent donc être fixées selon un calendrier précis, mais sont déterminées par la baisse de la température.

La phase de maturation se prolonge *a priori* jusqu'à l'épandage du compost. Il est impossible de définir une période de maturation puisque celle-ci dépend de la composition des matières premières. Il est cependant possible de distinguer les composts des déchets ligno-cellulosiques (les fumiers) qui peuvent être utilisés au bout de 6 semaines (la phase de maturation est alors très courte, voire inexistante), des composts de déchets ligneux (les déchets verts par exemple) qui ne sont utilisés en général qu'au bout de 6 mois.

Lors du compostage en anaérobiose par contre, la décomposition se produit quand l'oxygène est absent ou présent en quantité limitée. Dans ce processus, les bactéries anaérobies dominent et élaborent des composés intermédiaires comme du méthane, des acides organiques, du sulfure d'hydrogène et d'autres substances. Une fois revenues à l'air libre, ces bactéries disparaissent ; ce qui hygiénise le compost (Misra *et al*., 2005). Les divers échanges ioniques qui se déroulent lors de ce processus pourraient avoir un effet bénéfique sur la teneur en métaux toxiques puisque le pH essentiellement influence la teneur en métaux lourds (Ouali Alami *et al*., 2013).

1.4.2. Agriculture urbaine

La FAO (1999) définit l'agriculture urbaine et périurbaine comme ''les pratiques agricoles dans et autour des villes qui compétissent pour les ressources (terres, eau, travail et énergie) et qui peuvent également satisfaire les besoins de la population urbaine''. Selon Henk (2000), l'agriculture urbaine peut se définir comme la culture de plantes et l'élevage d'animaux destinés à la consommation alimentaire et à d'autres fins, dans les villes (agriculture intra-urbaine) et en périphérie des villes (agriculture périurbaine) ainsi que le traitement et la consommation de ces produits. Elle repose essentiellement sur les exploitations maraîchères considérées comme des parcelles mises en valeur par un ou des paysans pour la production et la vente des légumes et fruits. Lorsque l'exploitation maraîchère est située à l'intérieur ou à la périphérie des villes, elle est appelée exploitation maraîchère urbaine ou périurbaine (Atidégla, 2011).

1.4.3. Etude de quelques polluants

1.4.3.1. Bactéries

Le chapitre concerne les germes témoins de contamination fécale (les coliformes thermotolérants dont *Escherichia coli* et *Enterococcus*), les germes aérobies mésophiles et d'autres germes pathogènes (*Staphylococcus* à coagulase positive, *Salmonella*). Les germes témoins de contamination fécale sont des bactéries dont on sait que le milieu de vie normal est l'intestin des animaux et des hommes (Pilet, 1981).

Leur présence dans un environnement autre que ce milieu indique que cet environnement a été souillé, à un moment ou à un autre par des déjections fécales (Cuq, 1991). L'intérêt de ces espèces est que, outre le fait qu'elles aient vécu obligatoirement dans l'intestin, leur survie plus ou moins longue dans un environnement extérieur en fait de précieux indicateurs sur la pollution qui peut être récente ou ancienne, chronique ou accidentelle. Les germes aérobies mésophiles sont responsables de l'altération de l'eau et des denrées tandis que la pathogénicité de *Stapylococcus* à coagulase positive et de *Salmonella* n'autorise pas leur présence dans des aliments (Atidégla, 2011).

1.4.3.1.1. Germes aérobies mésophiles ou flore totale

Selon Adandotohou (2009), il s'agit de bactéries pouvant se développer à une température optimale située entre 25°C et 45°C. Leur numération indique une déficience sur le plan de l'application des bonnes pratiques d'hygiène et peut être ainsi associée à des risques microbiologiques pour le consommateur. Elles indiquent également que le processus d'altération microbienne est enclenché en même temps qu'elles constituent un indicateur de qualité sanitaire et reflètent l'histoire du produit naturel comme l'a notifié Cuq (1991).

1.4.3.1.2. Coliformes thermotolérants

Les coliformes thermotolérants sont des entérobactéries (bacilles Gram-, asporulés, glucose+, aérobies, anaérobies facultatifs) qui appartiennent à un groupe disparate non défini sur le plan taxonomique qui comprend les genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Cuq, 1991). Ces bactéries sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C. Elles sont des bactéries associées aux fèces de l'homme et des animaux. Leur présence est souvent corrélée à celle des entérobactéries pathogènes comme *Salmonella* et *Shigella*. Il existe un grand nombre de microorganismes pathogènes susceptibles de se retrouver dans les aliments. La recherche systématique de tous les microorganismes pathogènes serait techniquement et économiquement impossible. Afin de détecter une éventuelle contamination fécale, il est plus judicieux de rechercher un nombre restreint de microorganismes représentatifs de ce type de contamination (Atidégla, 2011).

L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (Edberg *et al*., 2000). Hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, souvent retrouvé en petit nombre dans les urines saines, c'est une bactérie largement répandue dans le milieu extérieur. Elle ne semble cependant pas pouvoir y mener une vie saprophyte authentique (Pilet, 1981). C'est une bactérie qui fait partie du groupe des coliformes totaux et qui constitue le seul membre de ce groupe que l'on trouve exclusivement dans les matières fécales des humains et des animaux. La présence de ce germe dans un aliment indique non seulement une contamination récente par des matières fécales, mais aussi la présence possible de bactéries, virus et protozoaires pathogènes (Santé Canada, 2006). Comme il est membre de la famille des entérobactéries, on trouve naturellement *E. coli* dans les intestins des êtres humains et des animaux à sang chaud. Contrairement à d'autres bactéries de cette famille, il n'est habituellement pas présent naturellement sur les plantes, ni dans le sol ou l'eau (Santé Canada, 2006). Dans les matières fécales humaines et animales, sa concentration s'établit à environ 10^9 UFC par gramme (Edberg *et al*., 2000), ce qui représente environ 1% de la biomasse totale du gros intestin (Leclerc *et al*., 2001). Même si *E. coli* fait partie de la flore fécale naturelle, certaines souches de cette bactérie peuvent causer des effets gastro-intestinaux et d'autres problèmes de santé plus graves. De plus, sa présence dans un aliment pose d'emblée de sérieux risques sanitaires (Pilet, 1981). On retrouve surtout cette bactérie dans des affections génito-urinaires mais aussi dans des syndromes digestifs, circulatoires et pulmonaires (Pilet, 1981).

1.4.3.1.3. Salmonella

De nombreuses espèces animales hébergent *Salmonella*, pathogènes ou non pour l'homme. On en rencontre hautement pathogènes pour l'homme chez des porteurs de germes apparemment bien portants, qui contribuent à disséminer l'infection. Ces porteurs sont généralement des sujets convalescents mais il existe des porteurs permanents de *Salmonella Typhi*. On peut retrouver dans l'eau et diverses denrées alimentaires, des sérotypes habituellement pathogènes ou de nombreux sérotypes qui ne sont jamais pathogènes pour l'homme et les animaux à sang chaud (Pilet, 1981).

On peut les trouver également dans l'intestin d'un homme sain. Les espèces de *Salmonella* sont pathogènes, soit exclusivement pour l'homme, soit exclusivement pour l'animal, soit, le plus souvent, à la fois pour l'homme et pour l'animal (Pilet, 1981).

Chez l'homme, ces bactéries peuvent être responsables :

- de la fièvre typhoïde due à *S. Typhi*, ou de fièvres paratyphoïdes généralement provoquées par *S. Para A*, *S. Para B* et plus rarement par *S. Para C*. Ces maladies, graves et souvent mortelles si elles ne sont pas traitées, associent un état septicémique avec fièvre et splénomégalie, un état de prostration très particulier et des signes digestifs graves,

- de gastro-entérites, succédant généralement à une contamination massive. Elles sont caractérisées par un syndrome digestif associé à des signes généraux infectieux modérés (Pilet, 1981).

1.4.3.1.4. Enterococcus

Les streptocoques du groupe D ou *Enterococcus* font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux. Leur nombre varie de 10^5 à 10^7 UFC par g de matière fécale. Ces germes sont abondamment répandus dans la nature et de ce fait, leur présence dans un aliment n'indique pas forcément une contamination d'origine fécale (Rodier *et al*., 1996). De toutes les bactéries non sporogènes, ces germes sont parmi ceux qui résistent le mieux à des conditions de milieu très défavorables. Elles sont souvent moins associées aux germes pathogènes que les coliformes thermotolérants (Rodier *et al*., 1996). Selon Cuq (1991), le rapport coliformes thermotolérants/*Enterococcus* est en général supérieur à 1 si la contamination est d'origine humaine. Dans le cas contraire, elle est d'origine animale.

1.4.3.1.5. Staphylococcus à coagulase positive

Les staphylocoques appartiennent à la famille des Micrococcaceae et au genre *Staphylococcus*. Ce sont des coques, immobiles et non sporulés, réunis en amas, aéro-anaérobies facultatifs, Gram positifs, catalase positifs, oxydase négatifs (De Buyser, 1996). La classification du genre *Staphylococcus* ne cesse d'évoluer. Ainsi, un grand nombre d'espèces a pu être identifié. Des sous-espèces existent également. Une classification en trois espèces a été proposée: *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* (Bourgeois *et al*., 1996).

S. aureus se distingue des deux autres espèces par la production d'une enzyme, la coagulase, dont l'association avec le «coagulase reacting factor » transforme le fibrinogène du plasma en fibrine. Le développement des techniques moléculaires (hybridation ADN/ARN) a permis d'affiner cette classification. Cependant, le critère de base reste la production de coagulase. En 1996, une trentaine d'espèces a été identifiée (Bourgeois *et al.*, 1996). Trois sont productrices de coagulase. Ce sont *S. aureus*, *S. intermedius* et *S. hyicus*. La contamination des aliments reste peu probable pour *S. intermedius*. Par contre, l'isolement de *S. aureus* chez l'homme et les animaux et de *S. hyicus* chez de nombreuses espèces animales d'élevage rendent ces souches potentiellement dangereuses en santé animale et en hygiène alimentaire (Bourgeois *et al*., 1996).

Au sein des *Staphylococcus* à coagulase positive, certaines souches ont la possibilité, sous certaines conditions, de produire des entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires. Cette production suppose en outre la présence en quantité importante de germes dans l'aliment. Un dénombrement supérieur à 10^5 UFC par gramme d'aliment est en fait nécessaire (Brisabois *et al*., 1997).

Nous allons donc nous intéresser aux conditions de culture de *Staphylococcus*, plus particulièrement à celles de *S. aureus* qui est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les toxi-infections alimentaires staphylococciques (De Buyser *et al*., 1996, Brisabois *et al*., 1997). Ainsi, il faut retenir :

- la température : *S. aureus* est un germe mésophile. Il cultive de 6°C à 46°C. Sa température optimale est de 37°C,

- le pH : *S. aureus* cultive à un pH qui va de 4 à 9,8. Le pH optimal se situe entre 6 et 7,

- la teneur en sel : *S. aureus* est un germe halophile qui supporte des taux de sel allant de 7 à 20%,

- l'activité en eau : *S. aureus* tolère une activité en eau très réduite (Aw = 0,83),

- la concurrence bactérienne : les staphylocoques supportent mal la concurrence avec les lactobacilles acidifiants, les streptocoques et les entérobactéries. La pasteurisation, en réduisant la compétition bactérienne, favorise donc la multiplication de *Staphylococcus* (Arnal, 2003).

En dehors de la recherche directe des entérotoxines, aucun test simple ne permet de juger le caractère toxinogène des souches de *Staphylococcus*. Or la recherche de ces toxines est longue, coûteuse et encore difficile à réaliser (Arnal, 2003). Afin de juger de la qualité sanitaire des aliments, on se contente souvent de rechercher des caractères présomptifs de toxinogénèse par culture d'un échantillon d'aliment. Trois enzymes (coagulase liée, coagulase libre, thermonucléase) sont ainsi intéressantes à mettre en évidence. La coagulase libre, active en quelques heures, coagule le plasma d'homme ou de lapin autour des colonies de cocci par transformation du fibrinogène en fibrine. La coagulase liée, ou clumping factor, liée à la paroi de *Staphylococcus*, provoque une agglutination du fibrinogène (Arnal, 2003). La thermonucléase se recherche sur le milieu de Lachica, de couleur bleue. Les souches possédant cette enzyme provoquent l'apparition d'une auréole rosée autour des colonies (Arnal, 2003). La présence ou l'absence de ces différentes enzymes en fonction de l'espèce de *Staphylococcus* est résumée dans le tableau V :

Tableau V : Caractéristiques biochimiques de quelques espèces de *Staphylococcus*

	Espèces de *Staphylococcus*				
	S. aureus	*S. intermedius*	*S. hyicus*	*S. schleiferi*	*S. lugdunensis*
Coagulase liée	+	Variable	-	+	+
Coagulase libre	+	+	Variable	-	-
Thermonucléase	+	+	+	+	-
Entérotoxines	Variable	Variable	-	-	-

Source : De Buyser (1996)

+ = Présence et - = Absence

Les staphylocoques qui produisent des toxines sont donc en général à coagulase libre positive et à thermonucléase positive. Compte-tenu de l'existence de souches non entérotoxinogènes à thermonucléase positive et de souches toxinogènes dépourvues de coagulase liée, la recherche de la coagulase libre est primordiale. Ainsi, les milieux couramment utilisés pour l'identification de *Staphylococcus* ont été remplacés par des milieux qui mettent directement en évidence la coagulase libre (Chaubeau-Duffour, 1992; Su *et al*., 1997).

1.4.3.2. Métaux lourds

Les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5g /cm^3 s'appellent métaux lourds (OPECST, 2001). D'après Arod (2007), le terme « métaux lourds » a été introduit historiquement au début du 20ème siècle et ne comportait à l'époque que le mercure, le plomb et le cadmium. Depuis, leur toxicité a été abondamment démontrée ainsi que celle de nombreux autres métaux appelés « métaux traces» comme par exemple l'étain, le titane, l'aluminium ou le nickel qui peuvent également avoir des effets dévastateurs sur l'organisme quand ils y sont accumulés (Arod, 2007).

Même si les métaux lourds sont le plus souvent présents dans l'environnement à l'état de traces, ils n'en restent pas moins très dangereux, puisque leur toxicité se développe par bioaccumulation dans les organismes. Les métaux lourds peuvent également être absorbés par le biais de la chaîne alimentaire entraînant alors des effets chroniques ou aigus. Les plus toxiques d'entre eux sont le plomb et le cadmium (Atidégla, 2011).

1.4.3.2.1. Plomb

Le plomb est un métal utilisé depuis l'Antiquité dans de nombreuses applications. Très résistant à la corrosion, il a notamment longtemps servi à la fabrication de conduites d'eau et comme pigment de peintures (céruse) malgré sa toxicité à long terme. Il est très répandu dans la nature parce qu'il est également utilisé dans les additifs de carburant automobile et des piles (CISMeF, 2007).

Une fois entré dans l'organisme, le plomb s'accumule dans les tissus et fait l'objet d'une bioaccumulation. La dose admissible établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est de 25 mg/kg de poids corporel par semaine selon Sanny (2002). La pollution par le plomb a des conséquences néfastes pour la santé, principalement pour le bon fonctionnement des reins. Une exposition de longue durée peut provoquer de l'emphysème. En cas d'absorption de taux élevés dans la nourriture, on peut également souffrir de problèmes osseux comme l'ostéoporose. Le plomb devient toxique par inhalation ou ingestion (CISMeF, 2007). Il provoque des problèmes au niveau du système nerveux. Il entrave la fabrication de l'hémoglobine et modifie la composition du sang. Le plomb agit également sur le système nerveux central ; son intoxication chronique conduit au saturnisme qui, selon CISMeF (2007), est le terme consacré aux nombreux problèmes de santé pouvant découler de l'exposition régulière au plomb. D'après Arod (2007), au titre des effets du plomb sur la santé humaine, on peut également citer la colique, la fatigue, les convulsions, l'hyperkinésie, la psychose. Sur l'environnement, le plomb n'a pas nécessairement de conséquences visibles comme pourrait l'avoir un pesticide mais il s'accumule sans jamais se dégrader. C'est un immense problème ; on parle souvent des déchets nucléaires qui se dégradent en milliers d'années. Le plomb lui, ne se dégrade pas du tout. Dans 100. 000 ans, il sera toujours là (Leclerc, 2008).

1.4.3.2.2. Cadmium

Selon Lenntech (2009), on peut trouver principalement le cadmium dans la croûte terrestre. Il est toujours présent en combinaison avec du zinc. Il est présent aussi dans l'industrie comme sous-produit inévitable de l'extraction du zinc, du plomb et du cuivre. On le trouve dans les pesticides et les engrais. Il peut donc pénétrer dans l'environnement par le sol. Arod (2007) a ajouté d'autres sources possibles que sont les écrans de télévision, les particules de pneus, les eaux de boisson, les revêtements de cadmium galvanisé, les casseroles émaillées, les bonbons de charcuterie, les huiles de moteur et les gaz d'échappement.

Une autre source importante d'émission de cadmium est la production de fertilisants non naturels à base de phosphate. Une partie du cadmium se retrouve dans le sol après que le fertilisant ait été appliqué sur les terres agricoles et le reste du cadmium se retrouve dans les eaux de surface quand les déchets provenant de la production des fertilisants sont rejetés par les entreprises de production (Lenntech, 2009).

Daoust-Boisvert (2005) a reconnu au cadmium, des effets toxiques aigus et chroniques sur les reins, les os et les poumons. Il limite, selon le même auteur, l'action des œstrogènes et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) l'a classé parmi les cancérigènes humains à contrôler. En effet, ce métal lourd n'est pratiquement pas éliminé par l'organisme et sa demi-vie chez l'humain varie de 17 à 30 ans. Il pénètre dans l'organisme par les voies digestives ou respiratoires et peut provoquer des troubles de la respiration et des voies urinaires. Une fois qu'il a pénétré les tissus, il ne subit qu'une excrétion minime et aucune dégradation métabolique. Il faut beaucoup de temps pour que le cadmium qui s'est accumulé dans les reins soit excrété du corps. Ces facteurs expliquent pourquoi le cadmium entraîne des effets toxiques chroniques particulièrement importants. A l'heure actuelle, on reconnaît que le cadmium ingéré cause des problèmes d'insuffisance rénale et de fragilité osseuse (Daoust-Boisvert, 2005). Le cadmium inhalé, corrèle avec des maladies comme l'emphysème et le cancer du poumon. Une intoxication aiguë par voie respiratoire peut provoquer une pneumopathie et par voie digestive, des vomissements et des diarrhées. Une exposition prolongée entraîne des atteintes rénales irréversibles. Il est responsable de troubles hépato-digestifs, sanguins et osseux parfois mortels (Atidégla, 2011).

Le cadmium a été identifié comme le seul responsable de la maladie d'Itaï-Itaï, apparue dans les années 50 dans des zones contaminées du Japon (Daoust-Boisvert, 2005). Une variété de facteurs influence la mobilité du cadmium dans les sols. Le plus important est probablement le pH du sol. Le cadmium peut être transporté sur de grandes distances par les boues. Ces boues riches en cadmium peuvent polluer aussi bien les eaux de surface que les sols. Le cadmium est fortement absorbé par les matières organiques dans les sols (Atidégla, 2011).

Quand le cadmium est présent dans les sols, cela peut être extrêmement dangereux car sa consommation par l'intermédiaire de la nourriture va augmenter. Les sols acidifiés amplifient la consommation de cadmium par les plantes. C'est un danger potentiel pour les animaux qui ont besoin de plantes pour survivre car le cadmium peut s'accumuler dans leurs organismes. C'est le cas des vaches qui ont des quantités importantes de cadmium dans les reins (Atidégla, 2011).

Deuxième partie :

Matériel et Méthodes

2.1. Propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou

2.1.1. Cadre

Les travaux relatifs à ce volet de la thèse ont été réalisés dans les laboratoires suivants :

- Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée de l'Ecole Polytechnique de l'Université d'Abomey-Calavi au Bénin,
- Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées du Bénin,
- Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles du Centre Béninois de Recherche Scientifique et Technique du Bénin,
- Laboratoire des Sciences du Sol, Eaux et Environnement du Centre de Recherche d'Agonkanmey/ Institut National de Recherche Agronomique du Bénin,
- Laboratoire de Contrôle de Qualité des Eaux et Aliments du Ministère de la Santé du Bénin,
- Laboratoire d'Anatomie Pathologique et Cytopathologie de la Faculté des Sciences de la Santé du Bénin.

2.1.2. Matériel

Le matériel végétal utilisé dans le cadre de cette étude est *S. macrocarpon*. Un total de 40 kilogrammes respectivement de feuilles et de fruits matures de *S. macrocarpon* a été utilisé pour la présente étude. Ce matériel végétal a été récolté à maturité sur le site maraîcher de Houéyiho situé à 6° 21' 20'' latitude Nord et 2° 21' 35'' longitude Est en République du Bénin. Il s'agit du plus grand site maraîcher au Bénin et le sol y est assez fertile (Chidikofan, 2010).

Le dosage des ions minéraux a été réalisé à l'aide du Spectrophotomètre d'Absorption Atomique VARIAN SPECTRA 110 avec flamme et du Spectrophotomètre d'Absorption Moléculaire HACH DR 2800. L'automate SYSMEX KX-21N a été utilisé pour la numération des cellules sanguines.

Les tests de toxicité ont été effectués sur des larves de crevette Saumure dont la poudre d'œufs a été obtenue au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées du Bénin et des rats albinos Wistar acquis à l'Institut Nigérian de la Recherche Médicale. Ces rats ont été acclimatés dans l'animalerie du LARBA à température constante de 22±1°C avec un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Ils ont été nourris avec de la provende granulée et de l'eau *ad libitum*.

Le Triton X-100 de Sigma Aldrich (Paris, France) [CAS : 9002-93-1 $(C_2H_4O)_nC_{14}H_{22}O$, Pcode : 101022734 93418-250 ml, Lot ≠ BCBC9283V] a permis de provoquer l'hypercholestérolémie. L'Atorvastatin (médicament de référence) a été acquis en pharmacie [Nom de spécialité : Atorfit, B.No./No.Lot. : CK0041, MFG./FAB. : 11/11, EXP. : 04/16, fabriqué par Ajanta Pharma (Mauritius) Limited, Media Industrial Building, Goodlands, Mauritius]. Les kits du laboratoire Cyprex Diagnostics ont servi à doser les paramètres biochimiques sur un Semi-Automate de marque RAYTO.

2.1.3. Méthodes

2.1.3.1. Identification et authentification des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

Un spécimen de la plante a été identifié et authentifié par l'Herbier National du Bénin sous le N° AA 6423/ HNB du 31 juillet 2012 (Annexe 1).

2.1.3.2. Traitement des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

Respectivement deux kilogrammes de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* (Figure 3) ont été prélevés chez chacun des maraîchers du site. Le total de quarante kilogrammes pour chacune des deux parties du légume a donc été obtenu chez vingt maraîchers. Les feuilles ont été soigneusement lavées dans de l'eau distillée contenant de l'eau de Javel (1/100ème) puis séchées à la température du laboratoire (16°C) pendant 17 jours (Figure 4). Les fruits ont été également lavés et finement découpés en petits morceaux puis séchés pendant 09 jours (Figure 5) à la même température.



Figure 3. Feuilles et fruits frais de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou



Figure 4. Feuilles séchées de *S. macrocarpon*



Figure 5. Fruits séchés de *S. macrocarpon*

2.1.3.3. Obtention de la poudre des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

Les feuilles et les fruits séchés de *S. macrocarpon* ont été broyés pendant dix minutes à l'aide d'un Moulinex de marque SAYONA. Les poudres obtenues ont été passées au tamis de maille de 0,2 mm. Elles ont été ensuite stockées dans des récipients stériles à la température du laboratoire pendant deux mois.

2.1.3.4. Tests phytochimiques

Ces tests ont été réalisés sur la base des réactions (coloration et précipitation) différentielles des principaux groupes de composés chimiques contenus dans la plante selon la méthode de Houghton et Rama (1998) revue et adaptée aux conditions du Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin). Les poudres de feuilles et de fruits ont été utilisées et divers composés chimiques y ont été recherchés.

2.1.3.4.1. Recherche des alcaloïdes

Cinq grammes de la poudre ont été mélangés à 25 ml d'acide chlorhydrique dilué à 5%. Le mélange a été macéré pendant 24 heures. Un millilitre du filtrat a été recueilli et 5 gouttes de réactif de MAYER y ont été ajoutées. En cas de présence d'alcaloïdes, on observe un précipité jaune ou louche dans le tube.

2.1.3.4.2. Recherche des composés polyphénoliques

Dans un erlenmeyer, 5 g de poudre ont été ajoutés à 100 ml d'eau bouillante. Le mélange infusé a été laissé 15 minutes sous agitation continue, puis filtré. Ce filtrat réparti en 2 portions de 50 ml a servi à la recherche des composés polyphénoliques ci-après :

a) Tanins

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

i. Tanins cathéchiques

A 30 ml de la seconde portion, 15 ml de réactif de STIASNY ont été ajoutés et le mélange a été chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité rose indique la présence des tanins cathéchiques.

ii. Tanins galliques

Après récupération du filtrat, celui-ci a été saturé d'acétate sodique additionné de trois gouttes de chlorure ferrique à 1%. Une teinte bleue ou noire indique la présence de tanins galliques.

b) Flavonoïdes

A 5 ml de la deuxième portion, 5 ml d'alcool chlorhydrique et une pincée de poudre de magnésium ont été ajoutés: c'est la réaction de la cyanidine, dite réaction de SHINODA. L'apparition d'une coloration orangée indique la présence de flavones. Lorsque la coloration est rouge, il s'agit de flavonols. Enfin, une coloration violette est synonyme de la présence de flavonones.

c) Anthocyanes

Deux gouttes d'acide chlorhydrique à 5% ont été additionnées à 1 ml de la deuxième portion. Ce mélange a été ensuite alcalinisé par ajout de deux gouttes d'ammoniaque dilué au demi. Une coloration rouge qui s'accentue et vire au bleu-violacé ou verdâtre indique la présence d'anthocyanes.

d) Leuco-anthocyanes

A 5 ml de la deuxième portion, 5 ml d'acide chlorhydrique ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été chauffé pendant 15 minutes au bain marie à 90°C. L'observation d'une coloration rouge cerise ou violacée indique la présence de leuco-anthocyanes.

2.1.3.4.3. Recherche des dérivés quinoniques

Dans un erlenmeyer, 2 ml d'acide chlorhydrique à 5% et 2 g de poudre ont été mélangés. A ce mélange, 20 ml de chloroforme ont été apportés et le tout laissé en agitation continue pendant 24 heures. Après macération, 5 ml d'ammoniaque dilué au demi ont été ajoutés au mélange précédent : c'est la réaction de Born-Träger. Une coloration rose ou rouge violacée indique une réaction positive.

2.1.3.4.4. Recherche des saponosides

Ils ont été mis en évidence par l'indice de mousse qui est fourni par le degré de dilution d'un décocté aqueux de la plante. Le décocté de 1 g de poudre a été préparé pendant 30 minutes dans 100 ml d'eau distillée avec une ébullition de 70°C. Le filtrat refroidi puis ajusté à 100 ml a été réparti dans 10 tubes à essais en série arithmétique à raison de 1/10ème de concentration du décocté. Il a été pris soin d'ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Après 30 agitations dans le sens de la longueur pendant 15 secondes (deux agitations par seconde, après l'avoir bouché avec le pouce), le tube a été laissé au repos pendant 15 minutes. La hauteur de la mousse a été mesurée. La dilution du premier tube ayant présenté une mousse dont la hauteur est supérieure ou égale à 1 cm est l'indice de mousse recherché. Sinon, l'indice est inférieur à 100.

2.1.3.4.5. Recherche des triterpénoïdes, des stéroïdes et des cardénolides

Pour cette recherche, à 1 g de poudre, 10 ml d'alcool éthylique ont été ajoutés à 70°. Ce mélange a été agité pendant 30 minutes. Dix millilitres d'eau distillée et 2 ml d'acétate de plomb à 10% à volume égal y ont été additionnés. Après 15 minutes de repos, le filtrat a été récupéré dans une fiole. Deux millilitres de solution aqueuse de phosphate disodique à 10% y ont été ajoutés. Après 15 minutes de repos, le filtrat a été recueilli dans une ampoule à décanter et extrait à trois reprises avec 5 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques ont été séchées sur du sulfate de sodium anhydre puis divisées en trois portions et évaporées à siccité.

a) Triterpénoïdes

La première portion a été solubilisée par trois gouttes d'acide acétique. Au mélange obtenu, 3 ml d'un mélange d'anhydride acétique-acide sulfurique ont été ajoutés. Une coloration violette, bleue ou verte indique la présence de triterpénoïdes.

b) Stéroïdes

Deux gouttes d'une solution alcoolique à 2% d'acide dinitrobenzoïque et 2 gouttes d'hydroxyde de sodium à 1N ont été ajoutés à la seconde portion. L'apparition d'une coloration rouge pourpre ou rouge au vin indique la présence de stéroïdes. C'est la réaction de KEDDE.

c) Cardénolides

Elle a consisté à ajouter à la troisième portion successivement 2 gouttes d'une solution alcoolique à 1% de métadinitrobenzène et 2 gouttes d'hydroxyde de sodium à 20%. Une coloration bleue indique une réaction positive. C'est la réaction de RAYMOND.

2.1.3.4.6. Recherche des dérivés cyanogéniques

Dans un erlenmeyer, à 15 ml d'eau distillée, 2 g de poudre ont été ajoutés. Le mélange a été immédiatement bouché et laissé en macération pendant 1 heure. Le col de l'erlenmeyer a été recouvert de papier imbibé d'acide picrique puis chauffé pendant quelques minutes. L'apparition d'une coloration marron indique le dégagement d'acide cyanhydrique.

2.1.3.4.7. Recherche des mucilages

Un millilitre de décocté à 10% a été introduit dans un tube à essai avec addition de 5 ml d'alcool absolu. L'apparition, après dix minutes, d'un précipité floconneux indique la présence de mucilages.

2.1.3.4.8. Recherche des coumarines

A 20 ml d'éther, il a été ajouté 1 g de poudre. Le mélange réalisé dans un petit erlenmeyer a été immédiatement bouché et laissé en macération pendant 24 heures. Le filtrat a été ajusté à 20 ml avec l'éther. 5 ml de filtrat ont été évaporés dans une capsule à l'air libre. Au résidu obtenu, 2 ml d'eau chaude ont été ajoutés et la solution partagée dans deux tubes à essai.

Dans l'un des tubes, 0,5 ml d'ammoniaque à 25% a été introduit. Le second tube représente le témoin. La fluorescence des deux tubes à essai a été observée sous UV à 365 nm. Une fluorescence intense dans le tube test indique la présence de coumarines.

2.1.3.4.9. Recherche des composés réducteurs

Le décocté à 10% a été obtenu par ébullition modérée pendant 3 minutes d'un mélange de 50 ml d'eau distillée et de 5 g de poudre. Après refroidissement, le filtrat a été ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. Cinq millilitres de filtrat ont été introduits dans un tube à essai.

Après le chauffage au bain-marie à 90°C pendant cinq minutes, 1 ml de réactif de Fehling y a été ajouté et l'observation d'un précipité rouge vif indique la présence de composés réducteurs.

2.1.3.4.10. Recherche des dérivés anthracéniques

a) Anthracéniques libres

A 1 g de poudre, 10 ml de chloroforme ont été ajoutés et le tout a été chauffé pendant 3 minutes à 90 °C au bain-marie. Après filtration à chaud, le mélange a été complété à 10 ml avec le chloroforme. 1 ml de l'extrait chloroformique a été additionné de 1 ml d'ammoniaque dilué à 1/2 puis agité. L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence d'anthracéniques libres.

b) Anthracéniques combinés

i. O-Hétérosides

A une partie du résidu épuisé par le chloroforme, on ajoute 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le tube à essai maintenu au bain marie bouillant pendant 15 min a été ensuite refroidi sous un courant d'eau. L'hydrolysat obtenu a été filtré et le filtrat a été ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Cinq millilitres de l'hydrolysat ont été prélevés puis agités avec 5 ml de chloroforme.

La phase organique soutirée a été introduite dans un tube à essai et additionnée de 1 ml d'ammoniaque dilué au 1/2 puis agité. La phase aqueuse a été conservée. La présence d'anthracéniques est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

Si la réaction est négative ou faiblement positive, les O-hétérosides à génines réduites sont recherchées. Pour ce faire, à 5 ml d'hydrolysat, 4 gouttes de chlorure ferrique à 10% ont été additionnées. Le mélange chauffé au bain-marie pendant 5 min a été ensuite refroidi sous courant d'eau puis agité avec 5 ml de chloroforme. A la phase chloroformique soutirée et introduite dans un tube à essai, 1 ml d'ammoniaque au 1/2 a été ajouté. Après agitation, une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence des O-hétérosides à génines réduites.

ii. C-hétérosides

A la phase aqueuse conservée plus haut, 1 ml de chlorure ferrique à 10% a été ajouté. Le mélange a été porté à ébullition au bain-marie bouillant pendant 30 minutes puis refroidi. Après agitation avec 5 ml de chloroforme, la phase chloroformisée a été soutirée et recueillie dans un tube à essai. 1 ml d'ammoniaque dilué à 1/2 y a été ajouté. Après agitation, une coloration rouge plus ou moins intense signe la présence de génines de C-hétérosides.

2.1.3.5. Dosage des éléments minéraux nutritionnels

La première étape a consisté à minéraliser les poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* selon la procédure de HACH (1999). Une fois la minéralisation des poudres achevée, le sodium, le potassium, le calcium et le magnésium ont été dosés aussi bien dans les feuilles que dans les fruits par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique au Laboratoire des Sciences du Sol, Eaux et Environnement du Centre de Recherches d'Agonkanmey/ Institut National de Recherche Agronomique du Bénin. Pour le dosage des phosphores, des protéines, du fer, du cuivre et du zinc, c'est la Spectrophotométrie d'Absorption Moléculaire qui a été utilisée au Laboratoire de Contrôle de Qualité des Eaux et Aliments du Ministère de la Santé du Bénin. Les lipides, la teneur en eau, les vitamines ont été dosées au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles du Centre Béninois de Recherche Scientifique et Technique.

Les cendres totales et les glucides ont été recherchés au Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi.

2.1.3.5.1. Sodium, potassium, calcium et magnésium

Les poudres des feuilles et des fruits ont été incinérées au four à moufle à 550°C pendant 24 heures. Les cendres ainsi obtenues ont été dissoutes dans 2 ml de solution d'acide chlorhydrique à 6N qui a été évaporée sur plaque chauffante à 125°C. Le reliquat plus ou moins visqueux obtenu est à nouveau dissout et récupéré à l'aide d'acide nitrique à 0,1 M dans une fiole de 100 ml. La solution ainsi obtenue a été utilisée, après dilution, pour doser les éléments conformément à la norme de référence EN 14082 (Hach, 1999).

2.1.3.5.2. Protéines

Elles ont été dosées selon la méthode de KJELDAHL qui a consisté à prélever 10 ml de la solution minéralisée à laquelle 1/10 d'une solution d'hydroxyde de potassium à 12 N a été ajoutée. Trois gouttes de stabilisant minéral et trois gouttes d'alcool polyvinyle ont été apportées au mélange. Après avoir complété le mélange à 25 ml dans la cuve de lecture avec de l'eau distillée, 1 ml de réactif NESSLER a été ajouté avant la lecture par rapport à l'eau distillée traitée de la même manière (eau distillée à la place de la solution minéralisée). Cette méthode a permis d'obtenir l'azote Kjeldahl par la formule suivante :

$$NTK\ (mg/kg) = A \times 75 / B \times C$$

avec A= valeur lue sur l'appareil en mg/l

B = poids engagé pendant la minéralisation

C = Volume prélevé pour les analyses

La limite de détection de l'appareil est de 1 mg/l et le taux de protéines est obtenu en multipliant le précédent résultat par un facteur de 6,25 (Hach, 1999).

2.1.3.5.3. Fer, cuivre, zinc et phosphores

Un volume connu a été neutralisé (pH compris entre 4 et 5) par ajout d'hydroxyde de sodium à 5N. Le volume final est ajusté avec de l'eau distillée dans une proportion connue. Les réactifs utilisés pour le dosage sont ceux recommandés par Hach (1999). Les méthodes à la FERROZINE (Méthode 8147) pour le fer ; au BICINCHONINATE (Méthode 8026) pour le cuivre, ZINCOVER (Méthode 8009) pour le zinc et à l'ACIDE ASCORBIQUE (Méthode 8048) pour les phosphores ont été utilisées conformément aux instructions de Hach (1999). Les formules suivantes ont été appliquées pour obtenir les divers résultats :

Fe, Cu, P (mg/kg) = A X 2500 / B X C
Zn (mg/kg) = A X 5000 / B X C

avec A= valeur lue sur l'appareil en mg/l

B = poids engagé pendant la minéralisation et C = Volume prélevé pour les analyses

2.1.3.5.4. Dosage des lipides, cendres totales, teneur en eau, glucides et vitamines

a) Lipides, cendres totales et teneur en eau

Les lipides ont été dosés aussi bien dans les feuilles que les fruits selon la méthodologie de Gbaguidi (2005). Les cendres totales y ont été recherchées selon les méthodes de l'Association of Official Analytical Chemists à la section 923.03 (A.O.A.C., 1990). La teneur en eau des feuilles et fruits a été déterminée selon la méthodologie de Audigié *et al*. (1978).

b) Glucides

Il n'existe pas de méthode d'analyse globale des sucres comme il en existe pour les lipides, les protides (protéines), les matières minérales (cendres), etc. La méthode de Fehling a été adoptée pour détecter la présence de glucides dans les feuilles et fruits du légume (E.P.S.I.C., 1999).

c) Vitamines liposolubles A, E, K_1

Elles ont été dosées par HPLC selon la méthode décrite ci-dessous (Gbaguidi, 2005) :

i. Préparation de la phase stationnaire

Elle a consisté en un lavage de la plaque. Celle-ci a été posée verticalement pendant une heure dans une cuve de Chromatographie sur Couche Mince (CCM) contenant 50 ml d'isopropanol. Elle a été ensuite retirée et séchée à 120°C à l'étuve pendant 30 minutes.

ii. Préparation de la solution standard des vitamines

C'est une solution méthanolique de 1 mg/ml préparée par dissolution du rétinol®, α-tocophérol® et de vitamine K_1® standard dans le méthanol.

iii. Préparation de l'échantillon

Pour ce faire, 2 grammes d'échantillon ont été pesés dans un flacon de 50 ml. Après ajout de 10 ml de n-hexane sur la prise d'essai, le mélange a été laissé en agitation continue pendant 1 heure. Le tout a été ensuite soniqué pendant 30 minutes à l'ultrason. Après décantation, 5 ml du filtrat ont été prélevés dans un flacon de 12 ml recouvert de papier aluminium. L'ensemble a été évaporé et le résidu sec a été repris dans le flacon avec 5 ml de méthanol puis soniqué pendant 5 minutes. La solution obtenue a été enfin filtrée dans un petit flacon de 3 ml.

iv. Analyse par CCMHP

Un millilitre d'extrait de chaque échantillon et de la solution standard a été introduit dans les vials du déposeur automatique qui effectue les dépôts sur une phase stationnaire constituée de plaque HPTLC Silica gel 60 F254s 20x10 (Merck®) sur support de verre. Les volumes déposés sont 2 µl, 3 µl et 5 µl pour le standard de rétinol et 1 µl, 2 µl, 3 µl et 5 µl pour les standards de α-tocophérol et vitamine K_1 puis 10 µl pour les échantillons. Les dépôts sont des bandes de 6 mm de longueur espacées de 11,2 mm.

Après les dépôts, la plaque a été retirée, séchée à l'air pendant 10 minutes et développée dans une cuve conventionnelle de dimension 20 X 20 cm contenant la phase mobile constituée du mélange acétone- méthanol dans les proportions 8 : 2. Le temps de saturation de la plaque est de 15 minutes. La distance de migration est 80 mm. La plaque a été ensuite retirée de la cuve, séchée, observée aux rayons UV et placée dans le densitomètre Camag TLC Scanner III puis lue à 254 nm. Les données ont été acquises et traitées par le logiciel winCATS 1.2.4. En partant de la quantité déposée sur la plaque et du volume d'extraction, l'expression de la teneur en µg de vitamines pour cent grammes d'échantillon est donnée par la relation :

$$T\ (\mu g/100\ g) = 5.10^4\ q$$

avec q la quantité en µg de vitamines dans les 10 µl déposés.

d) Vitamine C

i. Préparation de la phase stationnaire

Elle a consisté en un lavage de la plaque. Celle-ci a été posée verticalement pendant une heure dans une cuve de Chromatographie sur Couche Mince (CCM) contenant 50 ml d'isopropanol. Elle a été ensuite retirée et séchée à 120°C à l'étuve pendant 30 minutes.

ii. Préparation de la solution standard de vitamine C

C'est une solution aqueuse de 1 mg/ml préparée par dissolution de l'acide ascorbique standard dans l'eau distillée.

iii. Dérivation de la solution standard et de l'échantillon

A 2 ml du filtrat aqueux de la poudre, prélevés dans une fiole de 100 ml, 25 ml de la solution aqueuse d'acide oxalique à 4% et 2 ml de la solution aqueuse de 2,6-dichlorophénolindophénol à 0,5% ont été ajoutés.

Au bout de 5 minutes, l'acide ascorbique a été complètement oxydé. Après l'oxydation de l'acide ascorbique, 10 mg de thiourée ont été ajoutés pour neutraliser l'excès de l'oxydant. Le mélange a été complété à 100 ml avec de l'eau distillée. Vingt millilitres du mélange obtenu ont été prélevés et déposés dans un erlenmeyer de 50 ml, puis 4 ml de la solution à 2% de 2,4-dinitrophénylhydrazine et d'acide sulfurique à 70% sont ajoutés. Le contenu de l'erlenmeyer a été alors transféré dans une ampoule à décanter de 500 ml où l'hydrazone est extrait avec 3x6 ml du mélange acétate d'éthyle-acide acétique dans les proportions de 98 : 2. Les hydrazones extraits de chaque échantillon sont rassemblés et complétés à 20 ml avec le mélange acétate d'éthyle-acide acétique. Ces hydrazones deviennent les solutions à analyser à la CCMHP-densitométrique. Cette dérivation a été appliquée aussi bien aux échantillons qu'à la solution standard d'acide ascorbique.

iv. Analyse par CCMHP

Un millilitre de l'hydrazone de l'échantillon et de la solution standard ont été introduits dans les vials du déposeur automatique qui effectue les dépôts sur une phase stationnaire constituée de plaque HPTLC Silica gel 60 F254s 20x10 (Merck®) sur support de verre. Les volumes déposés étaient 1 µl, 3 µl, 5 µl, 10 µl et 15 µl pour le standard et 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl et 5 µl pour les échantillons. Les dépôts sont des bandes de 6 mm de longueur espacées de 11,2 mm.

Après les dépôts, la plaque a été retirée, séchée à l'air pendant 10 minutes et développée dans une cuve conventionnelle contenant la phase mobile constituée du mélange acétate d'éthyle-chloroforme dans les proportions de 1 : 1 (v/v). Le temps de saturation de la plaque a été de 20 minutes. La distance de migration a été 80 mm.

La plaque a été ensuite retirée de la cuve, séchée et observée aux rayons UV avant d'être placée dans le densitomètre Camag TLC Scanner III puis lue à 360 nm. Les données ont été acquises et traitées par le logiciel winCATS 1.2.4. Partant de la quantité q lue à l'appareil, du volume du filtrat obtenu et de la masse de prise d'essai, l'expression de la teneur en vitamines C des échantillons est donnée par la formule suivante :

$$T\left(\frac{mg}{100g}\right) = 9\,q$$

2.1.3.6. Dosage des éléments minéraux toxiques

Le plomb et le cadmium ont été recherchés par Spectrophotométrie d'Absorption Moléculaire selon la méthode à la dithizone (Hach, 1999) au Laboratoire de Contrôle de Qualité des Eaux et Aliments du Ministère de la Santé. Après la phase de minéralisation, 20 ml du minéralisât ont été prélevés et complétés à 250 ml avec de l'eau distillée dans une ampoule à décanter munie de robinet. Les consignes du manuel (Hach, 1999) ont été respectées jusqu'à l'extraction du cadmium et du plomb dans du chloroforme recta pur. Une lecture comparée avec le chloroforme sur le Spectrophotomètre d'Absorption Moléculaire DR 2800 a été faite.

Les limites de détection de l'appareil sont de 1 µg/l pour le plomb et 0,2 µg/l pour le cadmium. Les résultats ont été obtenus en appliquant la formule suivante :

$$Cd\ (mg/kg) = A \times 25 / B \times C$$

$$Pb\ (mg/kg) = A \times 25 / B \times C$$

avec A = valeur lue sur l'appareil en mg/ l ;

B = poids engagé pendant la minéralisation

C = Volume prélevé pour les analyses

2.1.3.7. Test de cytotoxicité sur les larves de crevettes

Ce test est basé sur la survie des larves de crevettes (*Artemia salina*) dans l'eau de mer en présence de la solution à tester. Il a été réalisé au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles du Centre Béninois de Recherche Scientifique et Technique. C'est un test primaire de toxicité non clinique qui a été proposée par Michael *et al*. (1956), et mis au point plus tard par Vanhaecke *et al.* (1981) d'une part et Sleet et Brendel (1983) d'autre part. Ce test a été proposé comme une méthode simple de bio-essai d'évaluation préliminaire de toxicité dans la recherche de produits actifs naturels (Solis *et al.*, 1993).

Les œufs de *A. salina* ont été mis en culture dans un erlenmeyer contenant de l'eau de mer prélevée dans l'Océan Atlantique et filtrée avant utilisation. L'ensemble a été laissé en agitation continue pendant 48 heures. Pendant ce temps, les œufs ont éclos pour donner naissance à de jeunes larves. Une solution mère a été préparée par chauffage à 50°C pendant 20 minutes du mélange de 1 g de poudre de feuilles de *S. macrocarpon* dans 20 ml d'eau distillée afin d'obtenir une concentration de 50 mg par millilitre d'eau distillée de décocté. Une gamme de 10 dilutions successives au 1/2 a été réalisée avec de l'eau de mer à partir des décoctés. Les concentrations exprimées en mg/ml des dilutions contenues dans des tubes à essai numérotés de 1 à 10 ont été respectivement de 25- 12,5- 6,25- 3,12- 1,56- 0,78- 0,39- 0,19- 0,09- 0,04. La même procédure a été adoptée pour les fruits.

A l'aide d'une micropipette à cônes, une colonie de 16 larves vivantes a été mise en contact avec la série de solutions de concentrations progressives de décocté des poudres de feuilles et fruits de *S. macrocarpon*. Ces milieux et les témoins ne contenant pas de décoctés de *S. macrocarpon* ont été laissés sous agitation et lus 24 heures après incubation. En cas de décès dans le milieu témoin, les données sont corrigées par la formule de Abbott (1925) :

$$\% \text{ décès} = [(\text{Test-témoin}) / \text{témoin})] \times 100$$

Les données dose-réponse ont été transformées par logarithme et la Concentration Létale 50 (CL_{50}) a été déterminée par une étude de régression linéaire (Hafner *et al*, 1977). Afin d'apprécier le degré de toxicité à partir des valeurs de CL_{50}, le tableau de correspondance (Tableau VI) établi par Mousseux (1995) a été utilisé.

Tableau VI: Correspondance entre CL_{50} et toxicité

CL_{50}	Toxicité
$CL_{50} \geq 0,1$ mg/ ml	-
0,1 mg/ ml > $CL_{50} \geq 0,050$ mg/ ml	+
0,050 mg/ ml > $CL_{50} \geq 0,01$ mg/ ml	++
$CL_{50} < 0,01$ mg/ ml	+ + +

- = Non toxique, + = Faible toxicité, ++ = Toxicité modérée, +++ = Toxicité forte, CL_{50} = Concentration Létale$_{50}$

2.1.3.8. Evaluation des propriétés hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*

2.1.3.8.1. Tests exploratoires de toxicité in vivo des poudres des feuilles et fruits

Les tests ont été réalisés conformément à la Ligne Directrice de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) pour les essais de produits chimiques à travers la Méthode 423 (OCDE, 2001) au Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel, utilisant un nombre minimum d'animaux par étapes, des informations sur la toxicité aiguë de la substance sont obtenues et suffisantes pour les besoins de classification.

Une dose déterminée de la substance a été administrée par voie orale à un groupe d'animaux. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire :

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

Au début de l'essai, les rats âgés de 12 semaines et de poids compris entre 140 et 170 grammes ont été choisis au hasard. Ils ont été marqués pour permettre une identification individuelle puis gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant 5 jours avant l'expérience. Chacune des poudres a été dissoute dans de l'eau physiologique et administrée aux rats à raison de 1 ml/ 100 g de poids corporel. Une seule dose a été administrée et ceci en utilisant une sonde gastrique. Les rats témoins ont reçu à la place des poudres de l'eau physiologique (Figure 6).



Figure 6. Gavage des rats Wistar avec les poudres de *S. macrocarpon*

Chaque étape a nécessité trois animaux. Pour la dose initiale, le niveau de toxicité à 300 mg/kg a été choisi car *S. macrocarpon* est un légume consommé par les populations. La figure 7 décrit le mode opératoire :

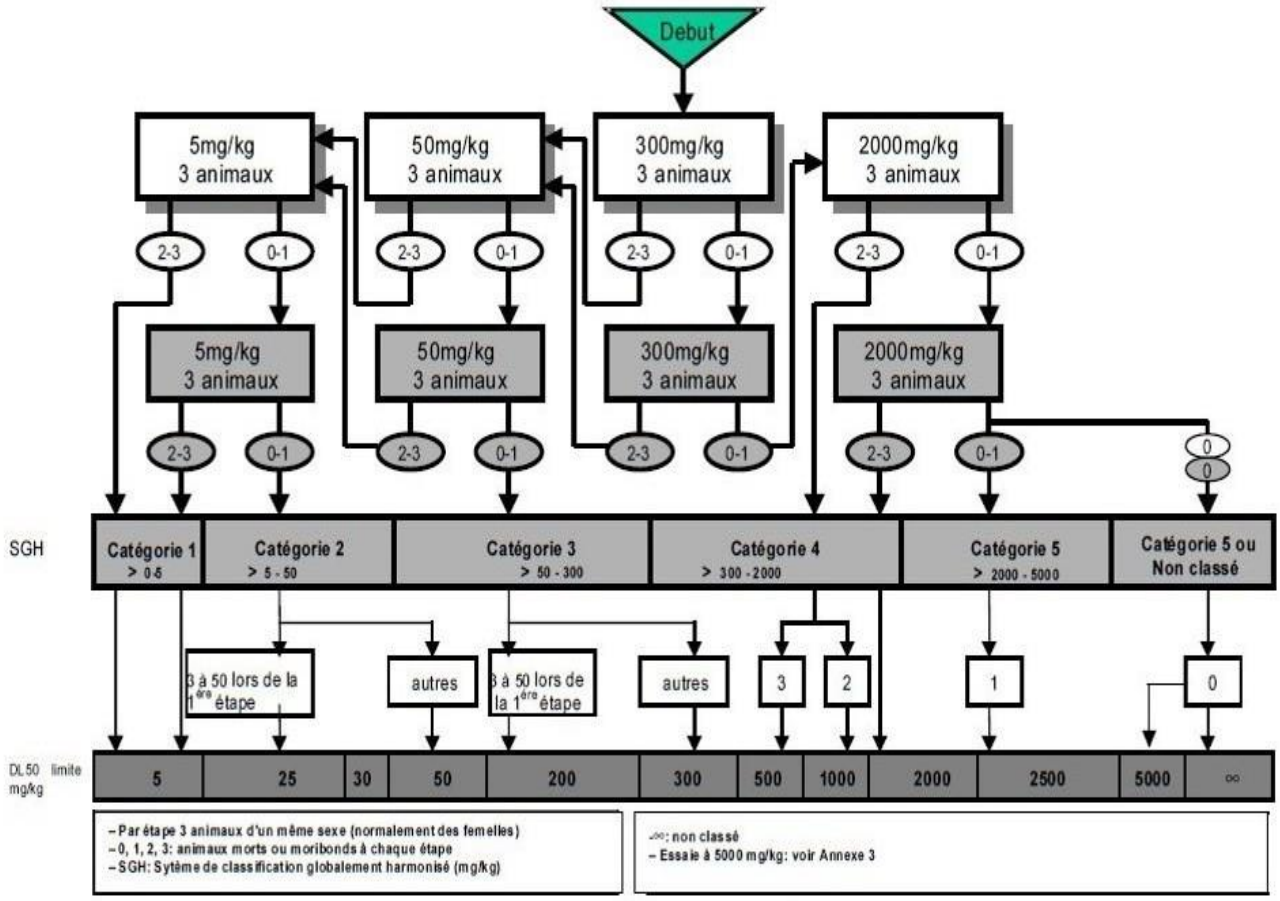


Figure 7. Schéma d'essai de toxicité aiguë (OCDE, 2001)

Les rats ont été répartis en différents lots après des tests sanguins afin de s'assurer de l'homogénéité des lots. Le lot Témoin n'a reçu aucun traitement tandis que les lots I et II ont reçu respectivement 300 mg/kg et 2000 mg/kg de poudre de feuilles. Les lots III et IV ont reçu respectivement 300 mg/kg et 2000 mg/kg de poudre de fruits. Les animaux ont été observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et au moins deux fois pendant les premières 24 heures après le traitement. Une attention particulière leur a été consacrée quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance. Toutes les observations ont été enregistrées de façon systématique. L'attention a porté en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblements, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

Les paramètres suivants ont été recherchés :

a) Poids corporel

Le poids individuel de chaque rat a été déterminé une heure avant l'administration de la substance d'essai et ensuite au moins une fois par semaine. Les changements de poids ont été calculés et enregistrés. A la fin de l'essai, les animaux ont été pesés puis sacrifiés par injection létale de kétamine.

b) Examens hématologiques et biochimiques

Des prélèvements sanguins ont été effectués sur tous les rats par ponction rétroorbitale en vue des examens hématologiques et biochimiques au Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi.

i. Examens hématologiques

Les examens hématologiques ont été réalisés à l'aide d'un automate SYSMEX KX-N21 selon la méthode employée par Sodipo *et al*. (2012). Ces examens ont comporté le dénombrement des globules rouges et des globules blancs et des plaquettes. Ils ont également comporté la détermination du taux d'hémoglobine, de l'hématocrite, du Volume Globulaire Moyen, de la Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine et de la Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

ii. Examens biochimiques

Les examens biochimiques ont été réalisés par la méthode cinétique conformément à la méthodologie de Sodipo *et al*. (2012) à l'aide du Semi-Automate de marque RAYTO. Il s'agit du dosage de l'urée, de la créatinine et des transaminases.

2.1.3.8.2. Potentiel hypocholestérolémiant des feuilles et des fruits de S. macrocarpon

En dépit de la différence dans la distribution des lipoprotéines et du métabolisme entre les hommes et les rats de laboratoire, les modèles de rats de souche Wistar hypercholestérolémiques sont fortement utilisées en recherche sur les lipides (Kothiyal et Gupta, 2011).

a) Traitement des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon*

Les poudres de feuilles et de fruits ont été dissoutes dans de l'eau physiologique pendant 24 heures selon la technique de Giri *et al*. (2012). Les solutions obtenues ont été conservées à la température du laboratoire pendant deux semaines.

b) Induction des troubles hypercholestérolémiques

Trente-cinq rats adultes ont été sélectionnés après une phase de tests préliminaires. Ces tests ont permis de s'assurer de l'état initial des rats Wistar à travers le dosage des paramètres lipidiques sur 50 rats de l'animalerie. Avant la mise en place du protocole, tous les rats inclus dans l'étude ont été pesés. Six groupes de 5 rats Wistar chacun ont été constitués. Ces groupes de rats ont été marqués 1, 2, 3, 2', 3' et A. Ils ont été ensuite traités par du Triton X-100 à une dose unique de 150 mg/kg pour induire l'hypercholestérolémie. Le Triton X-100 a été administré par voie intrapéritonéale et a été choisi en raison de sa commodité, sa disponibilité et surtout de la reproductibilité du modèle animal créé (Kothiyal et Gupta, 2011). Un groupe additionnel B de 5 rats a servi de témoin négatif. Ce groupe n'a pas reçu le traitement au Triton X-100 mais de l'eau physiologique par voie orale à la place. Soixante-douze heures après le traitement au Triton X-100, les rats ont été traités avec les poudres de fruits et de feuilles *S. macrocarpon*.

c) Traitement des rats Wistar avec les poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon*

Le groupe 1 n'a reçu aucun traitement correctif (Témoin positif) pendant que les groupes 2 et 3 ont respectivement reçu 400 et 800 mg/kg de la poudre des fruits de *S. macrocarpon* par voie orale une fois par jour pendant 7 jours. Les groupes 2' et 3' ont respectivement reçu 400 et 800 mg/kg de la poudre de feuilles dans les mêmes conditions. Le groupe A a reçu une dose d'Atorvastatin de 10 mg/kg par voie orale.

d) Prélèvement du sang des rats Wistar et analyses de laboratoire

Au 8ème jour, le sang a été prélevé par ponction rétroorbitale (Figure 8) dans des tubes secs à l'aide d'une micropipette à hématocrite non hépariné.

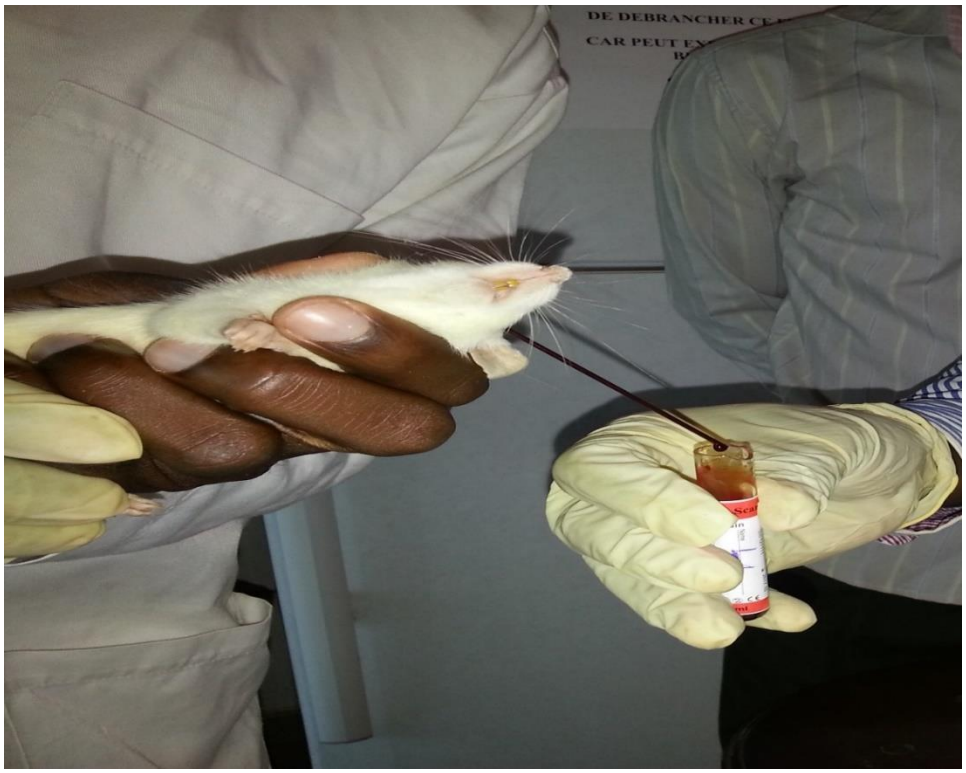


Figure 8. Prélèvement rétroorbital de sang chez un rat Wistar

Les échantillons de sang ont été centrifugés à 3000 tours par minute pendant 15 minutes. Le sérum recueilli a servi au dosage du cholestérol total (CT), du cholestérol HDL et des triglycérides (TG). Ces dosages ont été réalisés en point final conformément à la méthode décrite par Deweerdt et Later (2009). Le cholestérol LDL a été calculé par la formule de Friedewald (Friedewald, 1972) :

LDL-C = CT – HDL-C – Cholestérol VLDL

Le cholestérol VLDL (VLDL-C) a été estimé à partir des triglycérides plasmatiques totaux (Friedewald, 1972) :

VLDL-C = TG / 5

Deux rats par groupe ont été disséqués afin d'évaluer l'état histologique du foie selon la démarche décrite en annexe 2 (Codo, 2012). Les tests histologiques se sont déroulés au Laboratoire d'Anatomie Pathologique et Cytopathologie de la Faculté des Sciences de la Santé du Bénin.

2.1.3.9. Analyses statistiques

Concernant le volet nutritionnel de *S. macrocarpon*, le test de Mann Whitney qui est un test non paramétrique consistant à comparer deux à deux les moyennes a été utilisé. Les dosages de chaque paramètre ont été répétés trois fois. Les résultats ont été présentés sous forme de Moyenne±Ecart-Type pour les éléments nutritifs et toxiques. Un seuil de 5% a été défini et les logiciels XL Stat 2011 et Microsoft Excel 2010 ont été utilisés.

Pour l'étude de toxicité sur les larves de *A. salina*, une analyse Probit a permis d'analyser les données. Elle a été faite pour calculer les valeurs de CL_{50} des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* testées avec le logiciel Microsoft Excel 2010. Un intervalle de confiance de 95% a été défini.

Concernant l'évaluation de la toxicité *in vivo*, les moyennes et les écarts-types ont été comparées à un seuil de significativité de 5%. A l'aide du test non paramétrique de Mann Whitney, les moyennes du Lot Témoin ont été comparées à celles des Lots I, II, III et IV puis les moyennes des lots I, II d'une part et III et IV d'autre part ont été comparées entre elles. Le logiciel XL Stat a été utilisé pour les tests statistiques tandis que Microsoft Excel 2013 a permis la réalisation des graphes.

A propos de l'évaluation des propriétés hypocholestérolémiantes, le logiciel SPSS version 17 a été utilisé. Les données ont été initialement examinées pour apprécier la normalité et l'homogénéité de la variance. Par la suite, le Brown-Forsythe ANOVA et le test de comparaison multiple T3 de Dunnett ont été utilisés pour déterminer si les moyennes des sept groupes expérimentaux diffèrent et d'identifier les groupes induisant la différence. Enfin, le test t de Dunnett a permis de comparer les témoins (Lot témoin négatif, lot témoin positif et lot médicament de référence) aux lots tests. Un seuil de significativité de 5% a été appliqué pour les tests réalisés.
Par ailleurs, le pourcentage de réduction des différents paramètres a été calculé au niveau des lots de rats Wistar par la formule :

% de réduction = (Valeur d'arrivée – Valeur de départ / Valeur de départ) x 100 (Klotoé, 2013)

2.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*

2.2.1.Cadre

Une phase expérimentale a été réalisée sur quatre sites de culture de *S. macrocarpon* indiqués sur la figure 9. Cette étape a permis de faire un état des lieux en situant les sources de contamination des légumes.



Figure 9. Localisation des quatre sites maraîchers

Tous les maraîchers de ces sites utilisent les fientes de poules pondeuses pour amender les différentes cultures produites. Seul un site, celui de Glo-Djigbé n'a pas connu de compostage de fientes avant amendement des cultures. Aucun compostage n'y a été réalisé alors que sur les autres sites, les fientes sont laissées au séchage pendant trois jours à deux semaines. Deux systèmes d'arrosage à savoir le forage et la terre creusée du marécage sont pratiqués sur deux sites. Les deux autres sites d'étude connaissent un seul système d'arrosage : terre creusée de marécage pour le site d'Agongbomey et robinet pour celui de Glo-Djigbé.

L'étude proprement dite s'est ensuite déroulée dans un champ expérimental à Abomey-Calavi et s'est appesantie sur le rôle des fientes de poulets dans la contamination des légumes produits, du fait que selon les résultats des travaux préliminaires, les eaux d'arrosage posent moins de problèmes au plan de la qualité microbiologique des légumes produits (Dougnon, 2012).

Les manipulations microbiologiques se sont déroulées au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire du Laboratoire National de Santé Publique du Bénin.

2.2.2. Matériel

Le matériel utilisé dans le cadre de ce volet de l'étude est composé entre autres des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*, des réactifs de laboratoire, des milieux de culture, d'un broyeur et d'un biodigesteur familial.

Pour la fabrication du biodigesteur familial, un matériel simple et adapté selon ce qui est disponible localement a été employé suivant le procédé modifié de Lecesve (2008). Il s'agit essentiellement de petits tuyaux PVC, de chambre à air, de tige métallique, de papier de verre, de robinet, de boîtes de conserve, d'un grand fût et d'un petit fût pouvant s'encastrer dans le premier. Initialement conçu par Lecesve (2008) pour produire du gaz domestique, ce biodigesteur a été dépourvu du dispositif devant conduire le gaz vers le robinet.

2.2.3. Méthodes

2.2.3.1. Détermination de la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers

Il s'est agi d'une étude préliminaire transversale qui s'est déroulée à Cotonou de Novembre 2011 à Janvier 2012 sur les sites d'Agongbomey, de Fidjrossè, de Houéyiho et de Glo-Djigbé. Sur chacun de ces sites, des prélèvements au niveau des sols, d'eaux d'arrosage et de feuilles de *S. macrocarpon* ont été réalisés chez deux maraîchers choisis de façon aléatoire. Etant donné que les fruits de *S. macrocarpon* ne font pas partie des habitudes alimentaires au Bénin (Guidi, 2007), la suite de l'étude s'est essentiellement consacrée aux feuilles, beaucoup consommées et non toxiques.

2.2.3.1.1. Technique de prélèvement des feuilles de S. macrocarpon

La récolte a été faite en coupant les feuilles à quatre centimètres environ de la racine à l'aide d'une lame stérile. Cinq cents grammes de feuilles fraîches ont été récoltés sur les plants de légume puis introduits dans des sachets en plastique stériles hermétiquement fermés.

2.2.3.1.2. Technique de prélèvement des échantillons de sol et d'eaux

Sur chaque site, 500 grammes de sol ont été prélevés dans des sachets stériles en plastique à une profondeur de 15 centimètres. Le prélèvement a été réalisé à l'aide d'une tarière. Les échantillons d'eaux d'arrosage des plants de *S. macrocarpon* à savoir les eaux de marécage et de robinet ont directement été prélevées dans des bouteilles en plastique stériles d'un demi-litre.

Tous les échantillons ont été transportés dans une glacière contenant de la glace vers le laboratoire dans un intervalle d'une heure après le prélèvement. Ils y ont été aussitôt conservés à une température de 4°C. Les analyses microbiologiques ont été effectuées dans les douze heures suivant les prélèvements des échantillons. Elles ont permis de rechercher *Salmonella*, les coliformes thermotolérants et *E. coli* dans les divers échantillons. Les méthodes utilisées sont celles de la norme française relative à ces germes et adoptée dans l'espace UEMOA [(Méthodes de routine NF V08-051 février 1999) (Tété-Bénissan *et al*., 2012)].

2.2.3.1.3. Protocole de dénombrement des coliformes thermotolérants et d' E. coli

a) Feuilles de *S. macrocarpon*

A 25 grammes de feuilles de *S. macrocarpon*, 225 ml d'Eau Peptonnée Tamponnée (EPT) ont été ajoutés afin d'obtenir une solution mère. Des dilutions successives ont été réalisées jusqu'à 10^{-4} à partir de la solution mère. Un millitre de chacune de ces dilutions a été ensemencé par incorporation sur le milieu Rapid *E. coli* 2. Après incubation à 44°C pendant 24 heures±2 heures, la lecture a été faite. Les colonies d'*E.coli* sont violettes et celles des coliformes thermotolérants sont bleues.

b) Eau de marécage

A partir de 1 ml de l'échantillon d'eau de marécage, des dilutions successives ont été réalisées jusqu'à 10^{-2}. Un millilitre de chacune de ces dilutions a été ensemencé par incorporation sur le milieu Rapid *E.coli* 2. Après incubation à 44°C pendant 24 ± 2 heures, la lecture a été faite. Les colonies *d'E.coli* sont violettes et celles des coliformes thermotolérants sont bleues.

c) Eau de robinet

Un volume de 1 ml d'eau de robinet a été filtré au moyen d'une membrane filtrante de porosité 0,45 µm. Cette membrane a été déposée sur le milieu Rapid *E.coli* 2 et incubée à 44°C pendant 24±2 heures. A la lecture, les colonies *d'E.coli* sont violettes et celles des coliformes thermotolérants sont bleues.

2.2.3.1.4. Protocole de recherche de Salmonella

Le protocole a été le même pour les échantillons de sol et de feuilles de *S. macrocarpon*. A 25 g de l'échantillon, 225 ml d'Eau Peptonée Tampon (EPT) ont été ajoutés. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, 0,1 ml de cette culture a été ensemencé dans 10 ml du bouillon Rappaport Vassiliadis et 2 ml dans 20 ml du bouillon Mueller Kaufman. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24±4 heures. L'isolement de *Salmonella* a été fait par ensemencement des milieux Xylose Lysine Décarboxylase (XLD) et Hektoen. La sélection des colonies caractéristiques de *Salmonella* a été faite après incubation à 37°C pendant 24±4 heures. Le test de discrimination a été réalisé en ensemençant le milieu Urée-Indole. *Salmonella* est dépourvu d'uréase (Pilet, 1981). La galerie Api a été enfin ensemencée.

Pour les échantillons d'eau de robinet et d'eau de marécage, 5 litres d'eau ont été filtrées à travers des membranes filtrantes de porosité 0,45 µm. Toutes les membranes utilisées ont été mises dans 225 ml d'EPT et incubées à 37±1°C pendant 18±2 heures. A partir de cette étape, la suite du protocole s'est déroulée comme décrit ci-dessus.

2.2.3.2. Evaluation du rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets sur la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*

2.2.3.2.1. Collecte des fientes de poulets et tests préliminaires

Neuf fermes ont été repérées dans la commune d'Abomey-Calavi (Figure 10). Dans chacune d'elles, 25 kilogrammes de fientes ont été collectés selon la méthode décrite par Dougnon (2012) puis convoyés vers le site de culture.

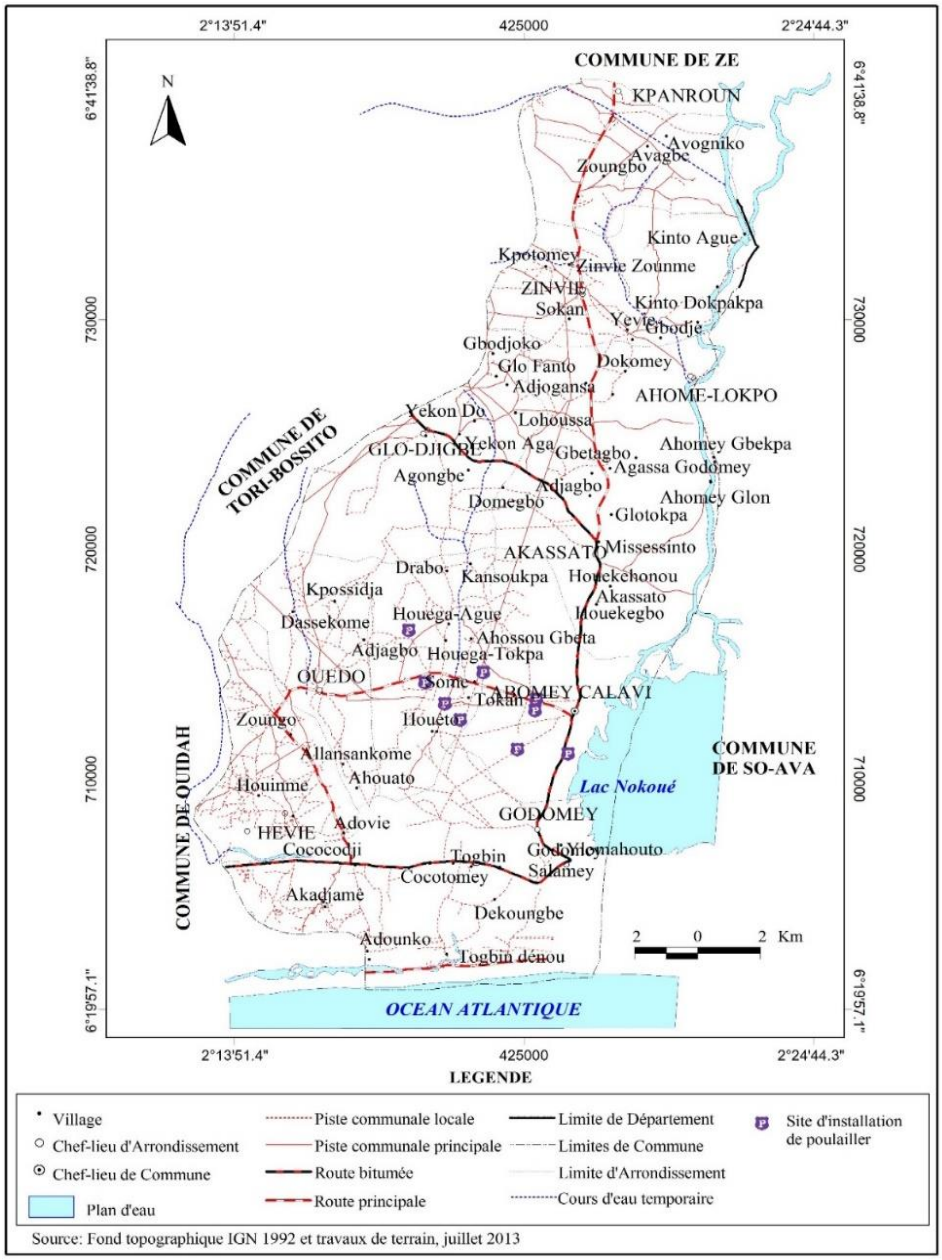


Figure 10. Localisation des fermes avicoles parcourues

Après mélange du contenu de tous les sacs à raison de 3 kilogrammes par sac, cinq prélèvements aléatoires ont été réalisés dans le tas formé. Cinq prélèvements de sol ont été également effectués au centre et aux quatre extrémités du site de culture. Tous ces prélèvements ont été ramenés au laboratoire pour la recherche de germes aérobies mésophiles, de *Staphylococcus* à coagulase positive, d' *Enterococcus*, de coliformes thermotolérants et de *Salmonella* (Tété-Bénissan *et al*., 2012).

a) Recherche des germes aérobies mésophiles

Chacun des échantillons a été dilué jusqu'à 10^{-8} dans de l'Eau Peptonnée Tamponnée. Un millilitre de chacune de ces dilutions a été ensemencé dans une boîte de Pétri stérile. Ensuite, un volume de 15 ml de la gélose PCA en surfusion à 45°C y a été coulé, homogénéisé et laissé solidifier. Après solidification, une deuxième couche de gélose blanche de 5 ml y a été additionnée. Les boîtes ont été incubées à 30°C±1°C pendant 72±2 heures. Toutes les colonies obtenues sur la gélose ont été comptées.

b) Recherche de *Staphylococcus* à coagulase positive

Chacun des échantillons a été dilué jusqu'à 10^{-4} dans de l'Eau Peptonnée Tamponnée. Quatre plaques de gélose Baird Parker additionnée de jaune d'œuf enrichi au tellurite de potassium ont été ensemencées à raison d'un millilitre de dilution par plaque. Un volume de 0,1 ml de la dilution mère a été également étalé sur une autre plaque de gélose Baird Parker additionnée de jaune d'œuf enrichi au tellurite de potassium. L'incubation a été faite à 37°C ± 1°C pendant 48±2 heures. Seules les colonies noires avec ou sans halo clair ont été prises en compte pour la recherche de la coagulase libre. Pour ce faire, 3 colonies de chacun des 2 types ont été respectivement ensemencées dans 3 ml de bouillon cœur cervelle et le tout incubé à 37°C±1°C pendant 22 ± 2 heures. Un volume de 0,1 ml de chaque suspension microbienne obtenue a été respectivement ensemencé dans du plasma oxalaté de lapin et enfin incubé à 37°C±1°C pendant 19 heures. Le résultat positif se manifeste par la prise en masse du contenu au fond du tube.

c) Recherche d' *Enterococcus*

L'échantillon a été ensemencé par incorporation à la gélose Slanetz Bartley avec une incubation à 37±1°C pendant 48±2 heures. La présence de colonies rouges est une présomption de présence de *Streptococcus*. La confirmation a été réalisée par l'isolement de quelques colonies sur la gélose Bile Esculine Azide avec une incubation à 37°C pendant 18 heures. Le noircissement des colonies indique la présence d' *Enterococcus*.

2.2.3.2.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets

La fermentation de matières biologiques dans une enceinte en anaérobiose entraîne une suite de réactions chimiques qui produisent un gaz appelé biogaz. Après ce processus, l'effluent obtenu est un fertilisant naturel, reconnu comme source riche en azote et très assimilable (Lecesve, 2008). Ainsi, un digesteur familial formé de deux fûts a été conçu suivant la technique de Lecesve (2008) modifiée. Le plus grand est appelé socle (Figure 11). Le dessus du fût a été au préalable découpé pour permettre au petit fût renversé d'y rentrer. A l'aide d'une chambre à air, la partie du tuyau à coller pour permettre la sortie des effluents a été enduite de colle. Le tuyau a été introduit dans le trou et maintenu pour qu'il soit bien fixé. L'espace entre le grand et le petit fût a été le plus restreint possible. Le petit fût est appelé cloche (Figure 12). Le fond a été découpé. Les deux extrémités du fût ont été perforées. En haut, un trou a été créé et recouvert d'une boîte vide. Un second trou a permis d'installer un robinet grâce auquel le débit du gaz produit a été régulé. En bas, le couvercle a été entièrement découpé, donnant directement accès au socle. L'étanchéité du dispositif a été totale. Des fûts en plastique ont été choisis afin de les travailler facilement à l'aide d'outils métalliques chauffés.



Figure 11. Socle du digesteur familial fabriqué



Figure 12. Cloche du digesteur familial fabriqué

Trente kilogrammes de fientes, en tenant compte de la réduction du volume du produit obtenu après digestion, ont été introduits dans le digesteur ainsi fabriqué avec 60 litres d'eau de robinet et deux boîtes de yaourt de 0,5 litres obtenues en pharmacie. Le rôle du yaourt est d'accélérer le processus de fermentation. Un volume de fientes de poulets pour deux volumes d'eau permet de maintenir l'anaérobiose (Lecesve, 2008).

Le mélange a été laissé dans le biodigesteur en anaérobiose pendant 3 semaines. Les sédiments de fientes ainsi obtenus ont été séchés au soleil pendant 7 jours. Tout le processus a duré quatre semaines, soit la moitié de la durée réglementaire du compostage des fientes (Znaïdi, 2002). Selon Lecesve (2008), il faut au minimum trois semaines pour que la fermentation soit optimale or au-delà d'un mois, les maraîchers n'auront pas la patience d'attendre. C'est cette double contrainte qui a motivé le choix d'un compostage en anaérobiose de trois semaines en plus d'un séchage en aérobiose d'une semaine. La qualité microbiologique de ces sédiments a été évaluée dans les mêmes conditions que celles du compost prélevé avant la mise en place de l'expérimentation culturale.

2.2.3.2.3. Mise en place des zones de culture sur le site expérimental

Sur le site de culture, 2 zones ont été délimitées et repérées de la manière suivante :

- une zone A où les sédiments issus de la digestion en anaérobiose et des eaux de robinet recueillies la veille ont été utilisés,
- une zone B où des fientes de poulets non compostées et des eaux de robinet recueillies la veille ont été utilisées.

Chaque zone a été subdivisée en sous-zones (Figure 13).

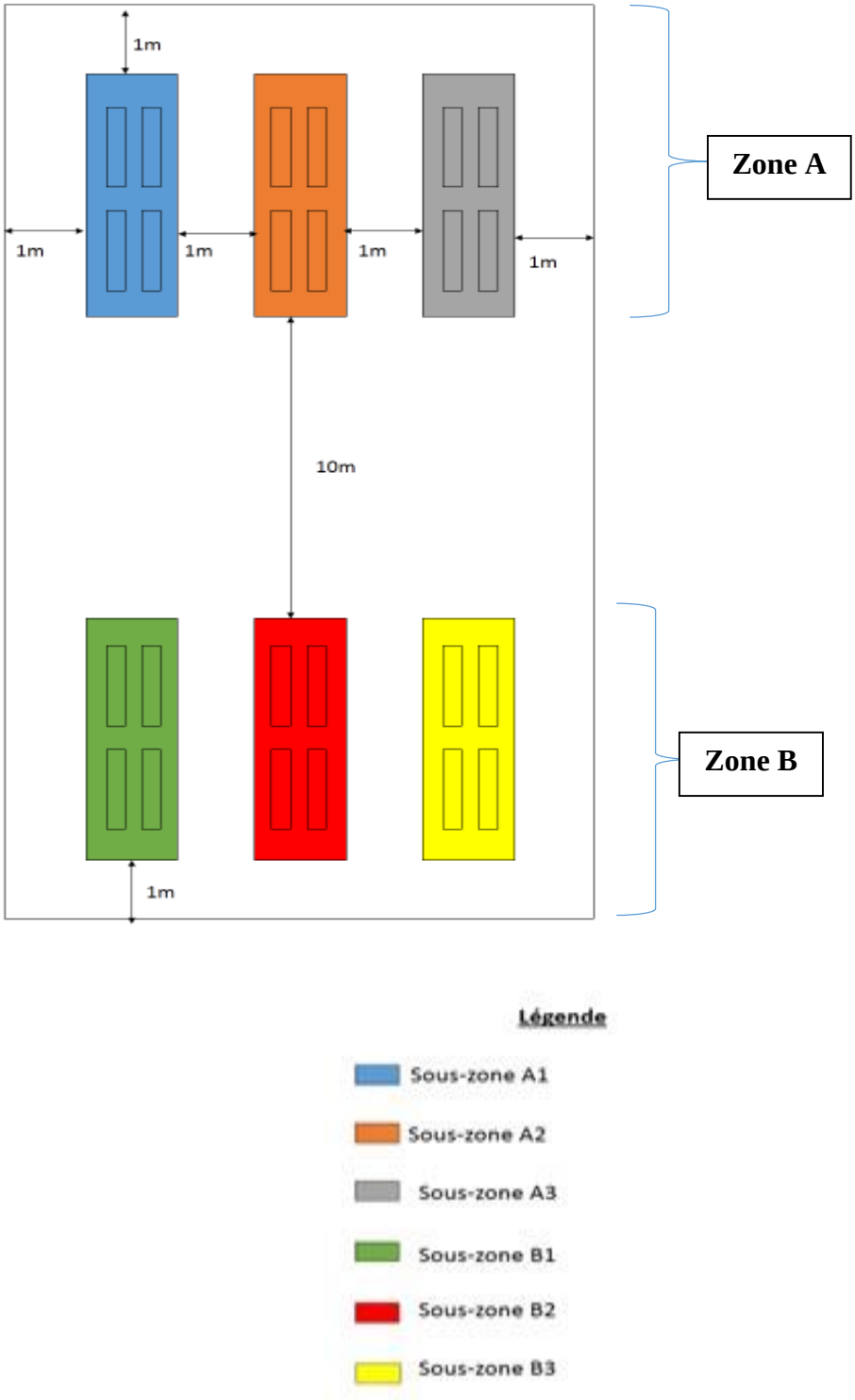


Figure 13. Disposition des sites de culture pour le volet microbiologique

La culture de *S. macrocarpon* a été faite pendant 6 semaines selon la méthode de CERPADEC-ONG (2008).

2.2.3.2.4. Evaluation de la qualité microbiologique des feuilles de S. macrocarpon

La récolte a été faite en coupant les feuilles à quatre centimètres environ de la racine à l'aide d'une lame stérile. Cinq cents grammes de feuilles fraîches ont été récoltés sur 5 plants de légume par sous-zones et introduits dans des sachets en plastique stériles hermétiquement fermés. Les échantillons ont été ramenés au laboratoire pour recherche de germes aérobies mésophiles, de *Staphylococcus* à coagulase positive, d' *Enterococcus*, de coliformes thermotolérants dont *E. coli* et de *Salmonella* selon les méthodes précédemment décrites (Tété-Bénissan *et al*., 2012).

2.2.3.2.5. Analyses statistiques

Soit un ensemble de n mesures X_1, X_2, …, X_n. Il est possible d'avoir une idée globale sur la répartition des mesures par le calcul de deux paramètres spécifiques qui sont la moyenne et l'écart-type (Gabada, 2010). La moyenne est un paramètre statistique de tendance centrale. En effet, elle permet de connaître l'ordre de grandeur des mesures d'un type donné. Les moyennes obtenues dans le cadre de cette étude ont été calculées sur la base de la formule :

$$M = (X_1 + X_2 + X_3 + X_n) / n \text{ avec } n = \text{effectif considéré}$$

L'écart-type est un paramètre statistique de dispersion permettant de savoir si la moyenne peut représenter valablement chacune des mesures de la série statistique. Si l'écart type est faible, les valeurs de l'échantillon sont regroupées autour de la moyenne. S'il est important, elles sont en revanche très dispersées. Il est calculé à l'aide de la formule :

$$\sigma = 1/ n \sqrt{\sum} (X_i-X)^2 \text{ allant de } i = 1 \text{ (Gabada, 2010)}$$

Des comparaisons ont été faites à l'aide du test de Student p (T>t) = 0,05. Après le volet exploratoire, des comparaisons multiples ont été faites entre les résultats issus des deux zones de culture. Les logiciels Microsoft Excel 2010 et XL Stat 2011 ont été utilisés. Par ailleurs, le pourcentage de réduction des différents paramètres a été calculé par la formule :

% de réduction = (Valeur d'arrivée – Valeur de départ / Valeur de départ) x 100 (Klotoé, 2013)

2.3. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*

2.3.1.Cadre

Après une phase expérimentale réalisée sur les mêmes sites de culture de *S. macrocarpon*, l'étude s'est déroulée dans un champ expérimental à Abomey-Calavi. Les travaux de laboratoire ont été réalisés au Laboratoire des Sciences du Sol, Eaux et Environnement de l'Institut National de Recherches Agronomiques du Bénin, au Laboratoire de Gestion, de Valorisation et de Traitement des Déchets de l'Université de Lomé au Togo et au Laboratoire de Contrôle de Qualité des Eaux et des Aliments du Ministère de la Santé du Bénin.

2.3.2.Matériel

Des sachets blancs étiquetés ont été utilisés pour les prélèvements. Les tests ont été réalisés grâce à un Spectrophotomètre d'Absorption Atomique de marque VARIAN SPECTRA 110, un Spectrophotomètre d'Absorption Moléculaire de marque HACH DR 2800 et de la verrerie. Des fruits et des feuilles de *S. macrocarpon* et le même digesteur familial modifié ont également servi à réaliser l'étude.

2.3.3.Méthodes

2.3.3.1. Détermination de la qualité toxicologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers

Sur chaque site, des prélèvements de sols, d'eaux d'arrosage, de feuilles de *S. macrocarpon* et de fientes de poulets ont été réalisés chez deux maraîchers choisis de façon aléatoire. Le plomb y a été dosé par lecture au Spectrophotomètre d'Absorption Atomique avec flamme suivant les normes de référence NF ISO 1146 1995 et NF X 31-147 1996 (Annexe 3). Il en a été de même pour le cadmium, recherché dans les fientes et les eaux d'arrosage uniquement. Ce choix est justifié par le fait qu'il s'agisse d'un métal industriel. Cette étape a permis de s'assurer de la possibilité d'existence de ce métal dans les produits sus-cités.

2.3.3.2. Evaluation du rôle de la digestion en anaérobiose des fientes dans la qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*

Les fientes de poulets issues des neuf fermes avicoles ont été mélangées à raison de trois kilogrammes par ferme. Cinq prélèvements aléatoires de fientes et 5 prélèvements de sol ont été réalisés au centre et aux quatre extrémités du site de culture. Ils ont été ramenés au laboratoire pour la recherche de plomb et de cadmium conformément à la technique décrite par Ukpabi *et al.* (2012). Les phosphores totaux, les phosphores assimilables et l'azote total ont été déterminés dans les échantillons de fientes pour apprécier la valeur amendante du compost fabriqué (Hach, 2009). Les échantillons de sol ont connu les mêmes dosages afin d'établir la situation de départ du terrain de culture. Trente kilogrammes de fientes ont été introduits dans le digesteur fabriqué avec 60 litres d'eau de robinet et deux boîtes de yaourt de 0,5 litres. Le mélange a été composté en anaérobiose pendant 3 semaines. Les sédiments de fientes obtenus ont été séchés pendant 7 jours en aérobiose. La qualité toxicologique et la valeur amendante du compost obtenu ont été évaluées dans les mêmes conditions que précédemment.

2.3.3.2.1. Mise en place des zones de culture sur le site expérimental

Sur le site de culture, 2 zones ont été délimitées et repérées de la manière suivante :

- une zone C où les sédiments issus du compostage en anaérobiose et des eaux de robinet recueillies la veille,
- une zone D où les fientes de poulets non compostées et des eaux de robinet recueillies la veille.

Chaque zone a été subdivisée en sous-zones (Figure 14).

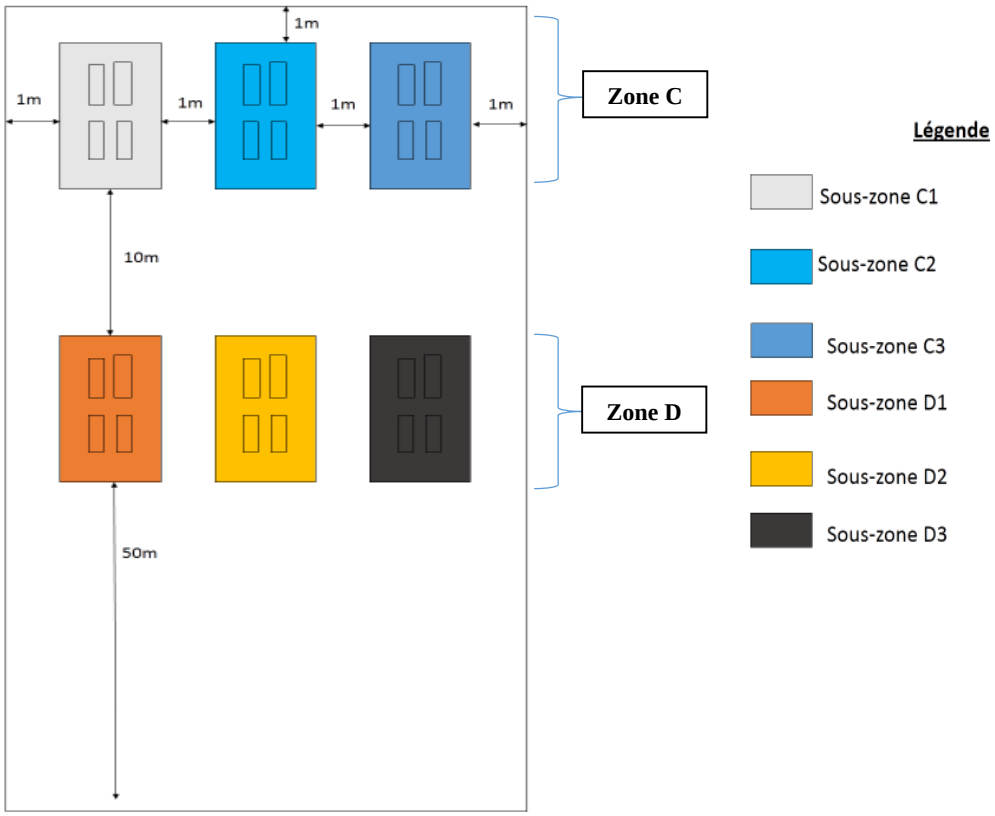


Figure 14. Disposition des sites de culture pour le volet toxicologique

La culture de *S. macrocarpon* a été faite pendant 6 semaines selon la méthode de CERPADEC-ONG (2008).

2.3.3.2.2. Prélèvement des échantillons et tests toxicologiques

La récolte a été faite en coupant les feuilles à quatre centimètres environ de la racine à l'aide d'une lame stérile. Cinq cents grammes de feuilles fraîches ont été récoltés sur 5 plants de légume par sous-zones et introduits dans des sachets en plastique hermétiquement fermés. Les échantillons ont été ramenés au laboratoire pour la recherche du plomb et du cadmium suivant les normes de référence NF ISO 1146 1995 et NF X 31-147 1996 (Annexe 3).

2.3.3.2.3. Analyses statistiques

Des comparaisons ont été réalisées à l'aide du test de Student p (T>t) = 0,05. Après le volet exploratoire, des comparaisons multiples ont été faites entre les résultats issus des zones de culture. Le logiciel XL-Stat 2011 a été utilisé.

Troisième partie :

Résultats et Discussion

3.1. Résultats

3.1.1. Propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou

3.1.1.1. Criblage phytochimique des feuilles et fruits de *S. macrocarpon*

Les groupes chimiques présents dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* sont présentés par les tableaux VIIa et VIIb. Les feuilles de *S. macrocarpon* contiennent des alcaloïdes, des tanins galliques, des mucilages, des composés réducteurs et des saponosides tandis que les fruits contiennent des alcaloïdes, des tanins cathéchiques et galliques, des mucilages et des composés réducteurs et des coumarines.

Tableau VIIa : Groupes chimiques présents dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*

Groupes chimiques	Feuilles		Fruits	
	Observations	Résultats	Observations	Résultats
Alcaloïdes	Précipité louche	+	Précipité louche	+++
Dérivés quinoniques	Pas de coloration rose	-	Pas de coloration rose	-
Tanins	Coloration noire	++	Coloration noire	++
Tanins cathéchiques	Pas de précipité	-	Précipité rose	++
Tanins galliques	Légère teinte bleue	+	Teinte bleue	++
Flavonoïdes	Pas de coloration	-	Pas de coloration	-
Dérivés cyanogéniques	Pas de coloration marron	-	Pas de coloration marron	-
Triterpénoïdes	Pas de coloration	-	Pas de coloration	-
Stéroïdes	Pas de coloration rouge	-	Pas de coloration rouge	-
Cardénolides	Pas de coloration	-	Pas de coloration	-

+ = présence faible - = Absence ++ = présence modérée +++ = présence forte

Tableau VIIb : Groupes chimiques présents dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* (suite)

Groupes chimiques	Feuilles		Fruits	
	Observations	Résultats	Observations	Résultats
Saponosides	Présence de mousse >1 cm	++	Présence de mousse < 1 cm	-
Anthocyanes	Pas de coloration	-	Pas de coloration	-
Leucoanthocyanes	Pas de coloration	-	Pas de coloration	-
Mucilages	Précipité floconneux	+++	Précipité floconneux en masse	+++
Composés réducteurs	Précipité rouge vif	+++	Précipité rouge vif	+++
Coumarines	Pas de fluorescence	-	Présence de fluorescence	++
Dérivés anthracéniques libres	Pas de coloration rouge	-	Pas de coloration rouge	-
Dérivés anthracéniques combinés	Pas de coloration	-	Pas de coloration	-

+ = présence faible - = Absence ++ = présence modérée +++ = présence forte

3.1.1.2. Profil nutritionnel des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

Les feuilles de *S. macrocarpon* contiennent du sodium, du potassium, du calcium, du magnésium, du fer, du cuivre, du zinc et des protéines à des valeurs supérieures à celles contenues dans les fruits ($p < 0,05$) (Tableau IX). Par contre, les fruits contiennent plus de phosphores (5100±1 mg/kg) que les feuilles (4300±2 mg/kg) ($p < 0,05$). Les feuilles et les fruits de ce légume contiennent des lipides à des teneurs respectives de 21670±71 mg/kg et 16470±19 mg/kg. Les feuilles et fruits sont très riches en eau (respectivement 88,6% et 92,9%). Les cendres totales varient de 90,23% pour les fruits à 92,58% pour les feuilles. Les vitamines A ont été détectées aussi bien dans les feuilles que dans les fruits avec des valeurs respectives de 3530 mg/kg et 3680 mg/kg.

Il en est de même pour les vitamines K1 retrouvées dans les fruits (1320 mg/kg) et les feuilles (55 mg/kg). Aucune trace de vitamines E n'a été retrouvée dans les feuilles et fruits de *S. macrocarpon* (Tableau VIII). Les feuilles ont une richesse en vitamines C (8730,09 mg/kg) supérieure à celle des fruits (3746,70 mg/kg). Les glucides ont été identifiés aussi bien dans les feuilles que les fruits (Tableau VIII).

Tableau VIII : Valeur nutritionnelle des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

Paramètres	**Quantité en mg/kg**	
	Feuilles	**Fruits**
Sodium	1760,33±1,52 a	1370,33±1,52 b
Potassium	45960±1,00 a	37410±1,00 b
Calcium	19650±1,00 a	3770±1,00 b
Magnésium	5960±1,00 a	2430±1,00 b
Fer	251±1,00 a	203±1,00 b
Cuivre	40±1,00 a	34±1,00 b
Zinc	220±1,00 a	156±1,00 b
Protéines	271600±1,00 a	147000±1,00 b
Phosphores	4300±2,00 a	5100±1,00 b
Lipides	21670±71a	16470±19a
Teneur en eau	88,6 %	92,9 %
Cendres totales	92,58 %	90,23 %
Vitamines A	3530	3680
Vitamines K1	55	1320
Vitamines E	0	0
Vitamines C	8730, 09	3746, 70
Glucides	+++	+++

Les moyennes portant les mêmes lettres dans différentes colonnes ne sont pas significativement différentes au seuil de significativité α = 0,05 et le signe +++ = Abondance

3.1.1.3. Eléments toxiques présents dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*

Les feuilles (1,2 ± 0,05 mg/kg) sont moins contaminées en plomb que les fruits [(1,6 ± 0,002 mg/kg) ($p < 0,05$)]. Pour ce qui est du cadmium, il n'y a eu aucune différence significative entre les feuilles (0,4 ± 0,10 mg/kg) et les fruits (0,4 ± 0,17 mg/kg) de *S. macrocarpon* (Figure 15).

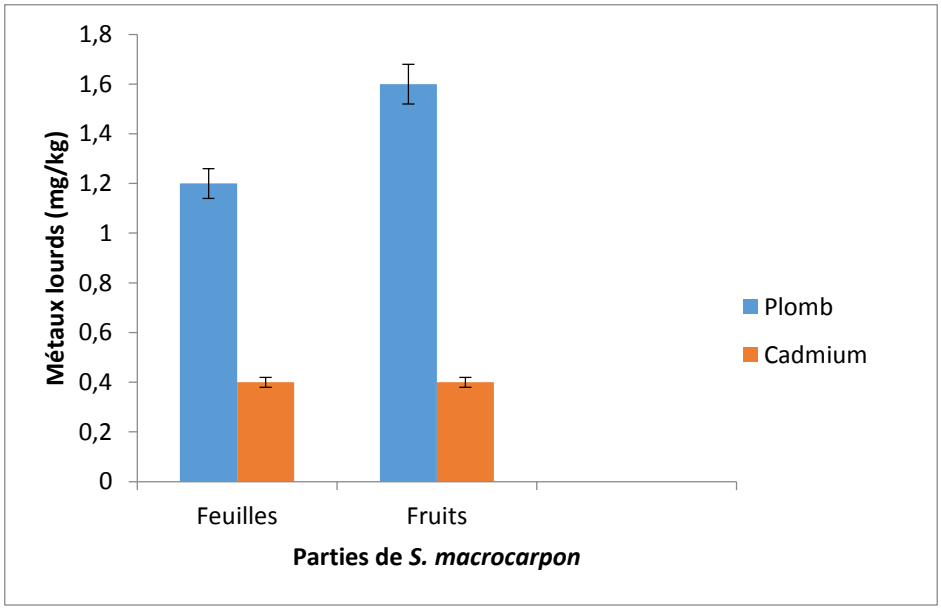


Figure 15. Teneur des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon* en métaux lourds

3.1.1.4. Cytotoxicité des feuilles et fruits de *S. macrocarpon*

Les larves de crevettes *A. salina* sont restées sensibles aux décoctés des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon* avec une dose seuil de mortalité égale à 0,39 mg/ml (Figures 16 et 17). Les courbes de sensibilité ont montré que la mortalité larvaire augmente avec la concentration. Cette sensibilité suit donc une relation de dose-réponse. Par ailleurs, les valeurs de la demi-concentration létale (CL_{50} = 1,33 mg/ ml pour les feuilles et 1,51 mg/ml pour les fruits) sont toutes supérieures à 0,1 mg/ml, limite supérieure de toxicité (Mousseux, 1995). Il s'en ressort que les feuilles et les fruits présentent une innocuité sur les larves de crevettes pour la gamme de concentrations explorée.

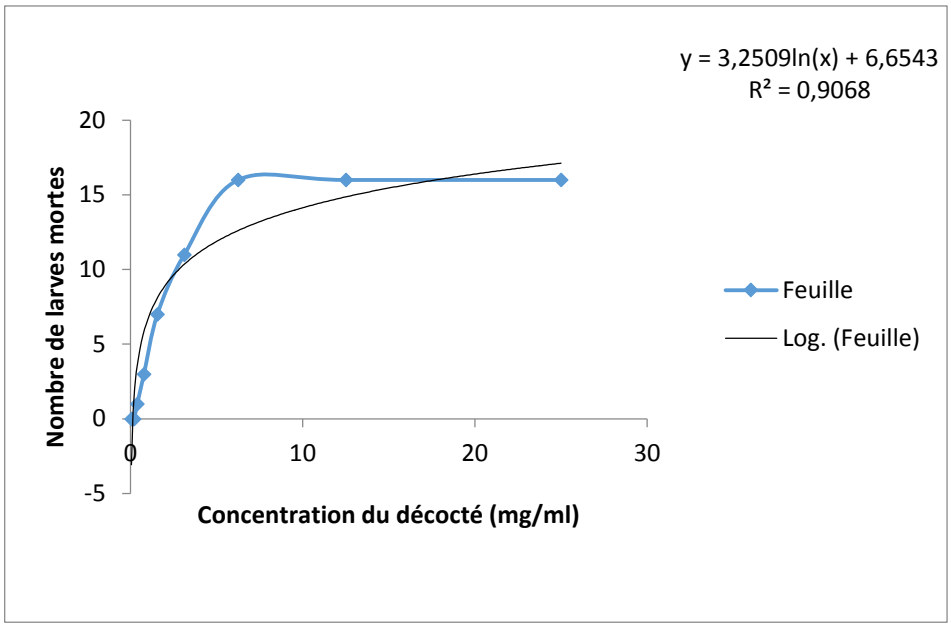


Figure 16. Courbe de sensibilité des larves de crevettes au décocté des feuilles de *S. macrocarpon*

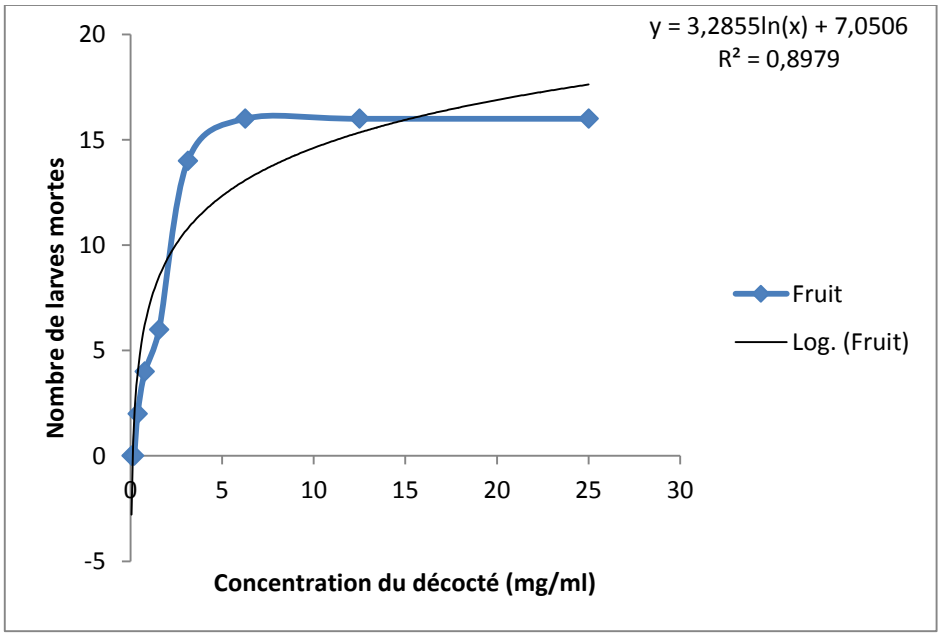


Figure 17. Courbe de sensibilité des larves de crevettes au décocté des fruits de *S. macrocarpon*

3.1.1.5. Propriétés hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*

3.1.1.5.1. Tests de toxicité in vivo des poudres des feuilles et fruits

a) DL_{50} des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

En ce qui concerne les feuilles de *S. macrocarpon*, aucune mortalité n'a été notée avec les doses de 300 mg/kg et de 2000 mg/kg de poids. Il en a été de même pour la poudre des fruits. Toutefois, une certaine léthargie a été remarquée au niveau des rats traités.

b) Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur la prise de poids des rats Wistar

Il y a eu une augmentation significative du poids des rats par lot de traitement après l'administration des poudres de *S. macrocarpon* (Figure 18).

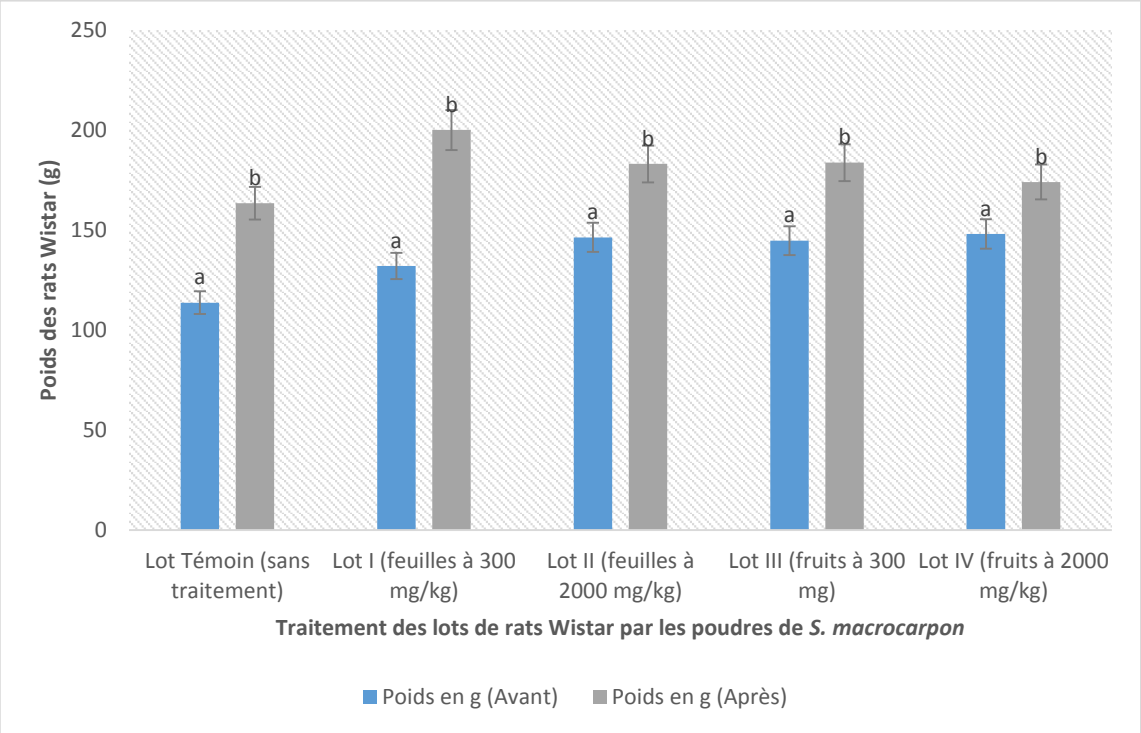


Figure 18. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur la prise de poids des rats Wistar

c) Paramètres hépatiques des rats Wistar ayant reçu les poudres de *S. macrocarpon*

Suite à l'administration des doses de poudres de *S. macrocarpon*, aucune différence statistique n'a été notée lors de la comparaison des moyennes des différents groupes (p>0,05) aussi bien pour les transaminases Alanine Amino Transférase (ALAT) qu'Aspartate Amino Transférase [(ASAT) (Figure 19)].

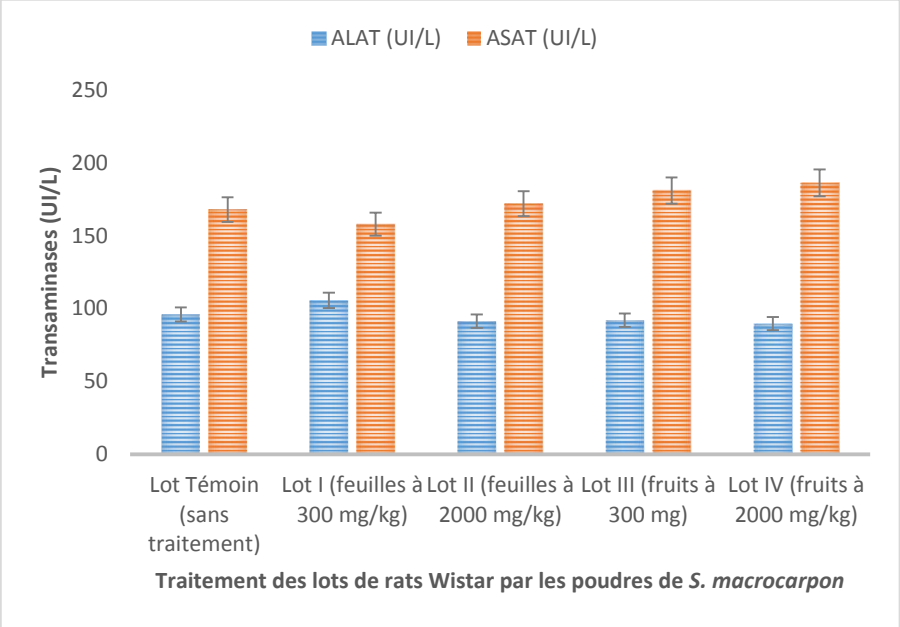


Figure 19. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur les transaminases des rats Wistar

Lot I et Lot II : p>0,05; Lot Témoin et Lot I : p>0,05; Lot Témoin et Lot II: p>0,05; Lot III et Lot IV: p>0,05; Lot Témoin et Lot III: p>0,05 ; Lot Témoin et Lot IV: p>0,05.

d) Paramètres rénaux des rats Wistar ayant reçu les poudres de *S. macrocarpon*

La consommation des poudres de *S. macrocarpon* a induit une diminution significative du taux d'urée dans le sang des rats des lots II, III et IV avec des pourcentages de diminution respectifs de 70,42 %, 66,19 % et 76,05 % lorsqu'ils sont comparés au Lot Témoin négatif. Des deux organes utilisés (feuilles et fruits), seuls les fruits ont eu cet effet peu importe la dose (Figure 20).

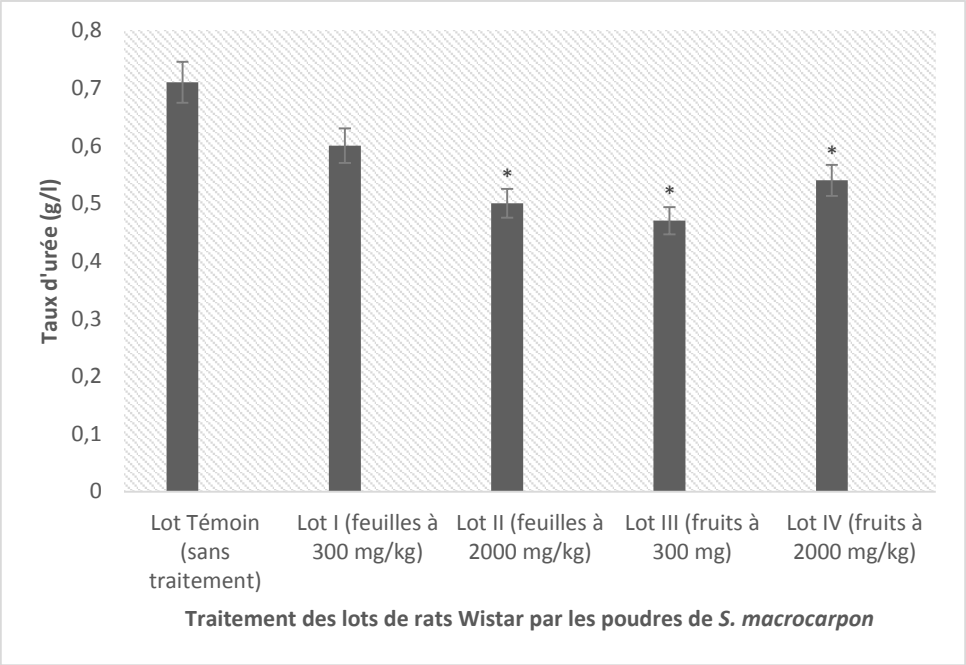


Figure 20. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur l'urémie des rats Wistar

* : Différence significative entre le Lot considéré et le Lot Témoin pour le paramètre considéré ($p<0,05$)

De même, l'ingestion de la poudre de *S. macrocarpon* a provoqué une diminution significative du taux de créatinine dans le sang des rats des lots II, III et IV. Ainsi, des pourcentages de réduction respectifs de 68,78 %, 77,00 % et 73,27 % lorsqu'ils sont comparés au Lot Témoin négatif ont été remarqués. Des deux organes utilisés (feuilles et fruits), seuls les fruits ont eu cet effet peu importe la dose (Figure 21).

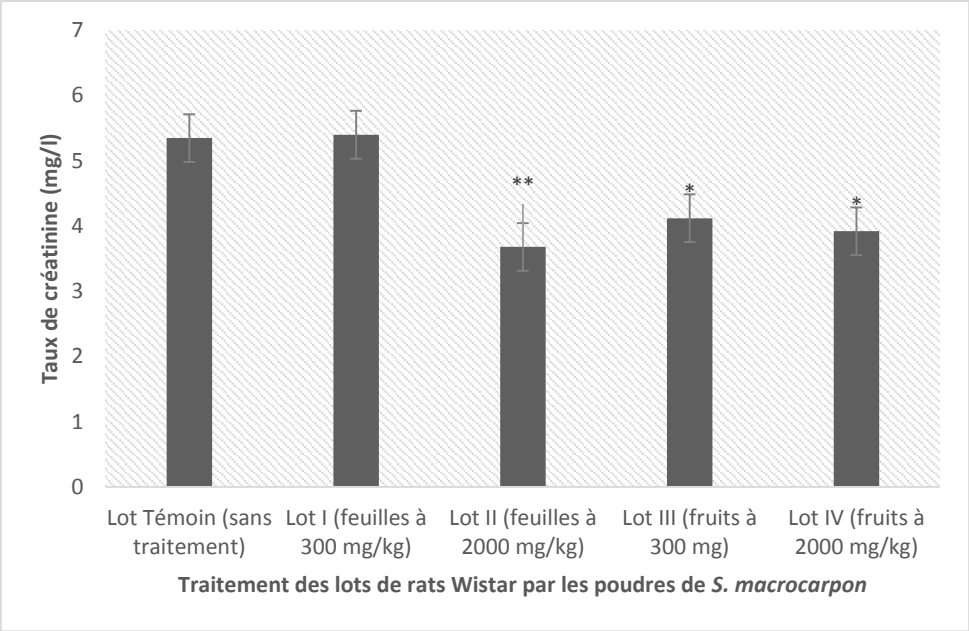


Figure 21. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur la créatininémie des rats Wistar

* : Différence significative entre le Lot considéré et le Lot Témoin (p<0,05)

** : Différence significative entre le Lot considéré et le Lot Témoin d'une part et entre le Lot I et le lot considéré d'autre part (p<0,05).

e) Paramètres hématologiques des rats Wistar ayant reçu les poudres de *S. macrocarpon*

Le nombre de globules blancs et de plaquettes a significativement augmenté entre le lot Témoin d'une part et les lots I (feuilles à 300 mg/kg), II (feuilles à 2000 mg/kg), III (fruits à 300 mg/kg) et IV (fruits à 2000 mg/kg) d'autre part (Tableaux IXa et IXb).

Tableau IXa : Effets de *S. macrocarpon* sur les éléments figurés du sang des rats Wistar

Lots traités	Paramètres recherchés (G/L)		
	NGB	NGR	Plaquettes
Lot Témoin (Sans traitement)	4,90±0,26	6740±0,65	507±77,94
Lot I (feuilles à 300 mg/kg)	6,06±0,15*	6200±0,27	513,66±31,8*
Lot II (feuilles à 2000 mg/kg)	7,03±2,02*	7020±1,10	865±26,7*
Lot III (fruits à 300 mg/kg)	6,80±2,51*	6360±0,34	895±19,2*
Lot IV (fruits à 2000 mg/kg)	7,43±2,49*	7160±0,33	952±12,2*

* : Différence significative entre le Lot considéré et le Lot Témoin pour le paramètre ($p<0,05$), G/L = Giga par litre

Tableau IXb : Effets de *S. macrocarpon* sur les constantes globulaires du sang des rats Wistar

Lots traités	Paramètres recherchés				
	Hb (g/dl)	Hte (%)	VGM (fl)	TCMH (pg)	CCMH (%)
Lot Témoin	12,06±0,77	40,26±2,13	59,90±2,70	17,93±0,52	29,96±0,63
Lot I	12,10±0,69	40,63±1,24	65,70±4,65	19,50±0,52	29,83±2,27
Lot II	12,53±0,25	42,83±1,06	66,73±0,56	19,56±0,25	29,26±0,41
Lot III	12,50±0,40	41,96±1,79	66,06±4,82	19,66±0,47	29,80±1,55
Lot IV	13,60±0,50	47,23±2,37	65,96±0,72	19±0,36	28,80±0,79

g/dl = gramme par litre, fl = fentolitre et pg = picogramme

3.1.1.5.2. Potentiel hypocholestérolémiant de S. macrocarpon

a) Résultats biochimiques

Les valeurs de base des rats Wistar avant le démarrage du protocole sont résumées dans le tableau X :

Tableau X : Valeurs initiales biochimiques des rats Wistar

Paramètres biochimiques	Valeurs sanguines (g/l)
CT	0,70 ± 0,03
HDL-C	0,61 ± 0,07
LDL-C	0,04 ± 0,02
VLDL-C	0,08 ± 0,003
TG	0,71 ± 0,08

CT = Cholestérol Total, HDL-C = High Density Lipoproteins, LDL-C = Low Density Lipoproteins, VLDL-C = Very Low Density Lipoproteins et TG = Triglycérides

Le taux de cholestérol total a significativement baissé ($p<0,05$) chez les rats ayant reçu une injection de triton X-100 puis traités à la poudre de *S. macrocarpon* comparés aux rats du groupe contrôle positif (Figure 22). Les pourcentages de réduction sont respectivement de 42 %, 36,39 %, 48,37 % et 46,30 % pour les rats des lots 2, 3, 2’ et 3’. Cependant, il n’y a eu aucune variation significative ($p>0,05$) entre les rats traités à la poudre et ceux ayant reçu l’Atorvastatin ou le contrôle négatif.

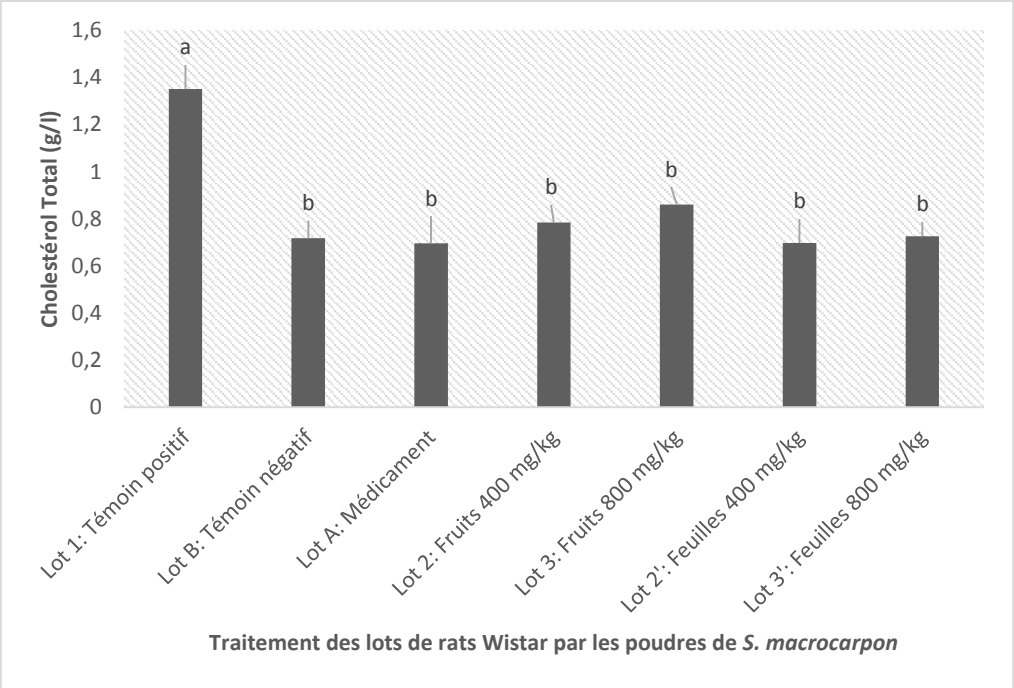


Figure 22. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de cholestérol total des rats Wistar

Les moyennes portant des lettres différentes sont statistiquement différentes à un seuil de signicativité de 5%

Suite au traitement à la poudre de *S. macrocarpon*, le taux de HDL-C a significativement augmenté ($p<0,05$) chez les rats traités comparés au groupe témoin positif. Des pourcentages d'augmentation de 96,44 %, 102,95 %, 80,47 % et 83,43 % respectivement pour les lots ayant reçu la poudre de fruits de *S. macrocarpon* (Lots 2 et 3) et ceux ayant reçu la poudre de feuilles de *S. macrocarpon* (Lots 2' et 3') ont été observés. Les variations entre les moyennes des rats traités et le contrôle négatif ne sont pas significatives. Il n'y a eu aucune différence entre l'effet de la poudre des feuilles de *S. macrocarpon* et celui de la poudre issue des fruits de *S. macrocarpon* (Figure 23).

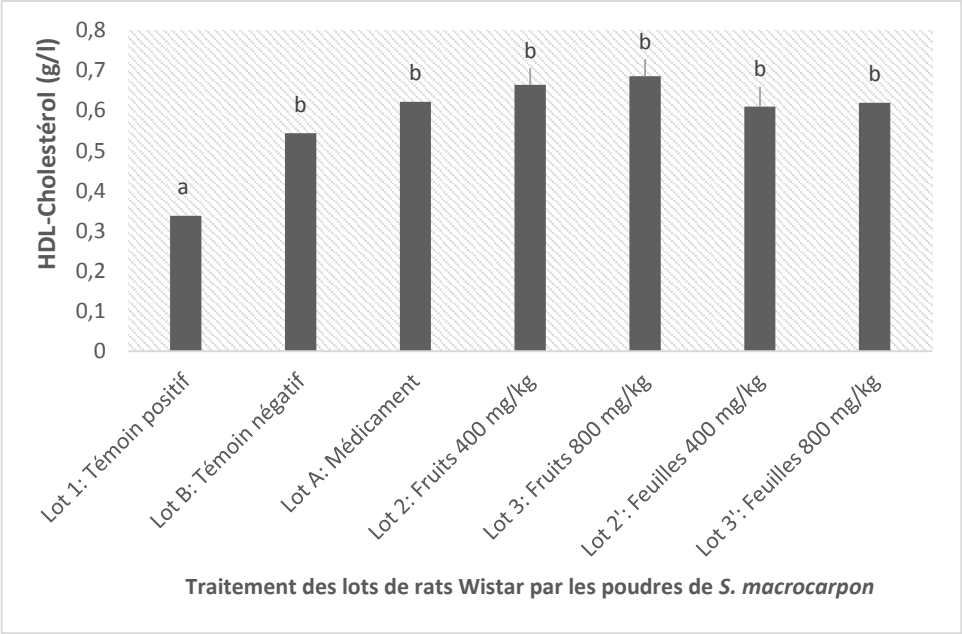


Figure 23. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de HDL-Cholestérol des rats Wistar

Les moyennes portant des lettres différentes sont statistiquement différentes à un seuil de signicativité de 5%

La valeur du LDL-Cholestérol a connu un pic au niveau du Témoin Positif comparativement aux valeurs du lot négatif et des lots traités ($p<0,05$). Ainsi, des pourcentages de réduction de 94,13 %, 74,66 %, 90,93 % et 85,06 % ont été enregistrés respectivement pour les lots 2, 3, 2' et 3'. Comparées à celle du témoin négatif, les moyennes de LDL-Cholestérol des lots traités par les poudres de fruits et de feuilles n'ont montré aucune différence significative [($p>0,05$) (Figure 24)].

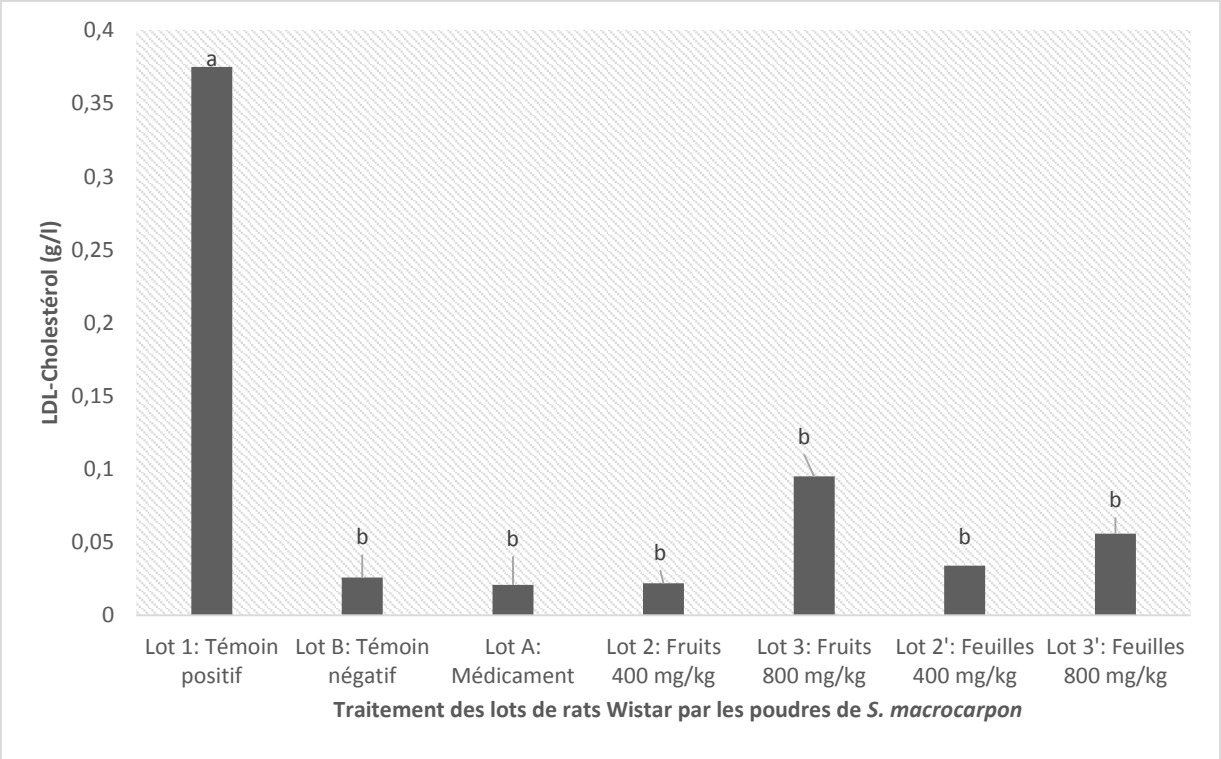


Figure 24. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de LDL-Cholestérol des rats Wistar

Les moyennes portant des lettres différentes sont statistiquement différentes à un seuil de signicativité de 5%

Concernant le VLDL-Cholestérol, il y a eu un pic au niveau du témoin positif en comparaison avec les autres lots ($p<0,05$). Des pourcentages de réduction respectifs de 53,72 %, 69,01 %, 75,29 % et 80,39 % ont été calculés au niveau des rats des lots 2, 3, 2' et 3'. Une diminution de ce paramètre a été observée au niveau de tous les lots comparés au contrôle négatif ($p<0,05$). Il n'y a aucune différence significative entre le lot ayant reçu le médicament de référence et ceux ayant reçu les poudres de fruits et des feuilles (Figure 25).

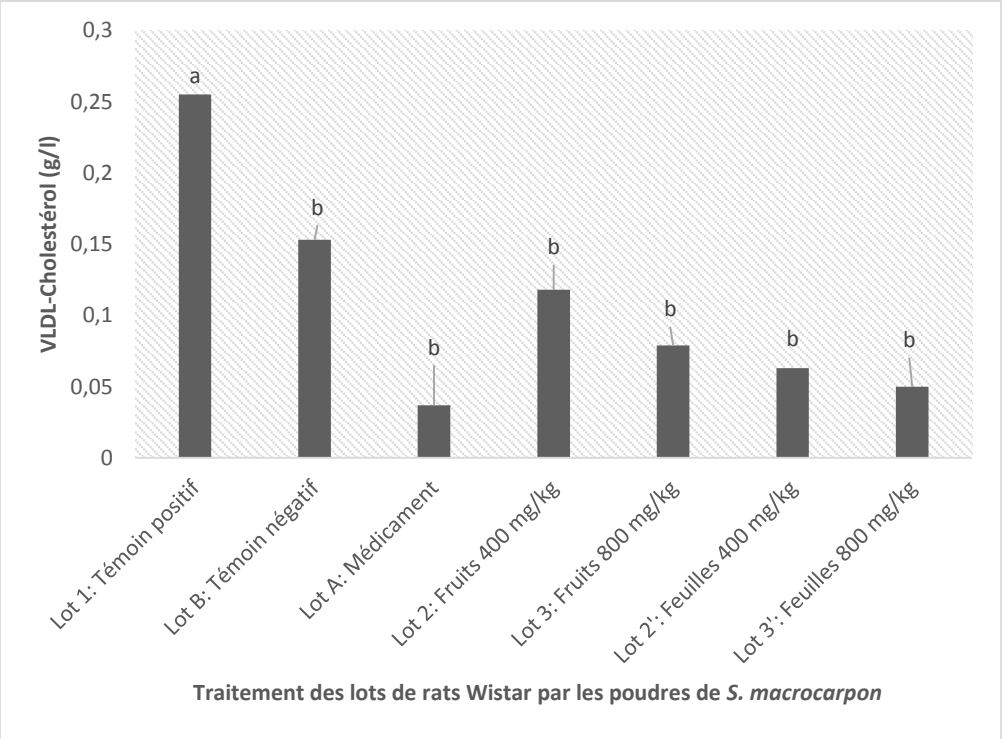


Figure 25. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de VLDL-Cholestérol des rats Wistar

Les moyennes portant des lettres différentes sont statistiquement différentes à un seuil de signicativité de 5%

A propos des triglycérides, une diminution significative ($p<0,05$) a été observée entre le témoin positif et les autres lots. Au niveau des lots traités avec les poudres de fruits et de feuilles de *S. macrocarpon* par exemple, des pourcentages de réduction de 60,16 %, 73,17 %, 78,59 % et 82,92 % ont été enregistrés respectivement pour les lots 2, 3, 2' et 3'. Par rapport au contrôle négatif, les valeurs des triglycérides des lots traités avec les poudres de fruits et de feuilles ont connu une diminution significative sauf celles du lot ayant reçu la poudre de fruits à 400 mg/kg ($p = 0,563$). Aucune différence n'a été notée en comparant les lots traités avec les poudres de fruits et de feuilles à celui traité avec l'Atorvastatin ($p>0,05$) (Figure 26).

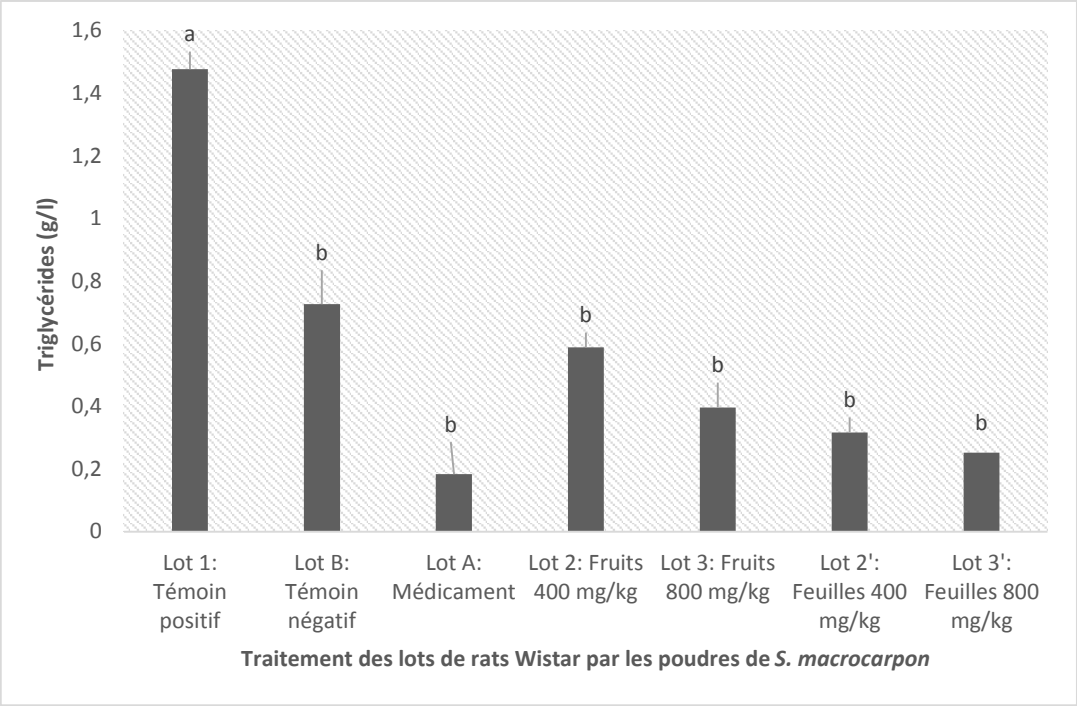


Figure 26. Effet des poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* sur le taux de triglycérides des rats Wistar

Les moyennes portant des lettres différentes sont statistiquement différentes à un seuil de signicativité de 5%

b) Effet histologique des poudres de *S. macrocarpon* sur le foie des rats Wistar intoxiqués par le Triton X-100

Les résultats histologiques au niveau du foie se présentent comme suit :

i. Rats Wistar non intoxiqués, Lot B (Témoin négatif)

Ces rats ont un foie normal de structure typique, organisé en lobules. Chaque lobule est centré sur une veine centrolobulaire. Le lobule est formé de travées hépatocytaires organisées de façon plus ou moins radiaire autour de la veine centrolobulaire. Entre les travées, se trouvent des sinusoïdes veineuses. On retrouve au carrefour de plusieurs lobules, des espaces portes contenant des vaisseaux et des canaux biliaires (Figure 27).

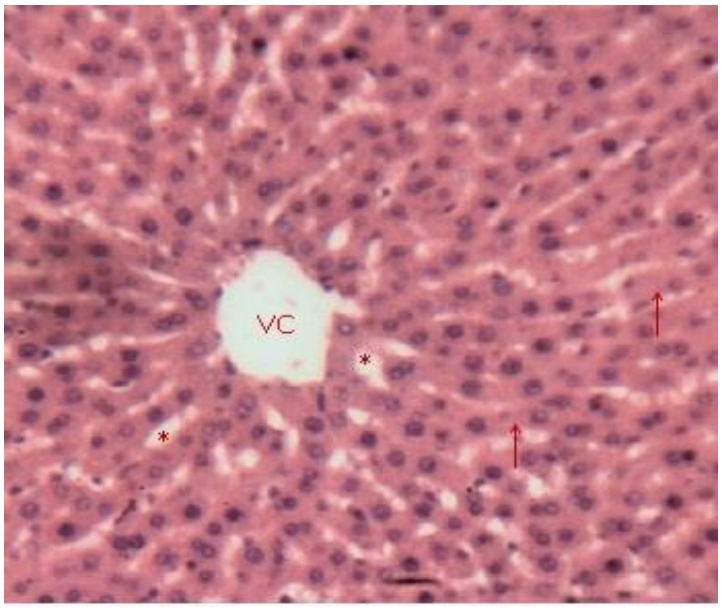


Figure 27. Aspect histologique du foie des rats Wistar du lot témoin négatif

Légende : Structure lobulaire typique. Au centre, se trouve la veine centrolobulaire (VC). Les astérisques (*) indiquent les sinusoïdes veineux et les flèches désignent les travées hépatocytaires. Image prise au grossissement 10x.

ii. Rats Wistar intoxiqués au Triton X-100, lot 1 (Témoin positif)

L'injection de Triton X-100 aux rats Wistar a entraîné une altération de l'architecture générale des lobules hépatiques, une désorganisation des sinusoïdes et une réduction des lumières sinusoïdales. Certains hépatocytes sont en dégénérescence hydropique et des micro-vacuoles apparaissent dans d'autres (Figure 28).

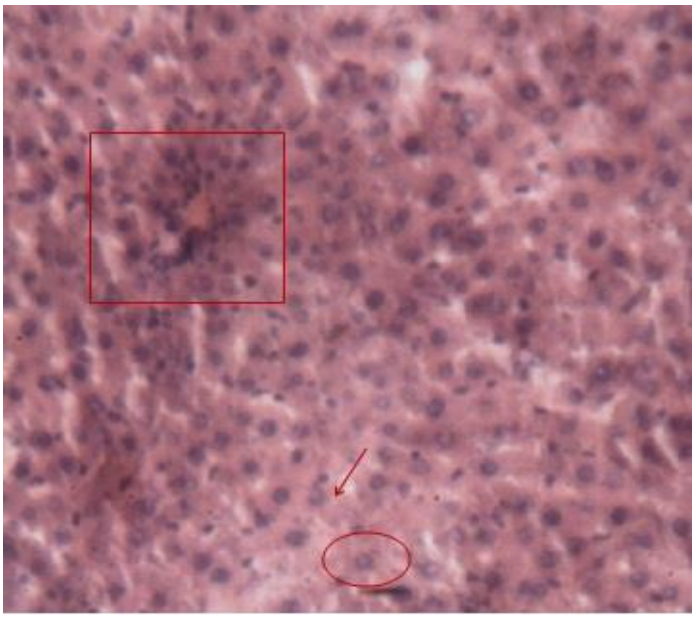


Figure 28. Aspect histologique du foie des rats du lot témoin positif

Légende : Architecture lobulaire désorganisée. Une cellule en dégénérescence hydropique a été encerclée et une vacuole intracellulaire est indiquée par une flèche. Un espace porte encore reconnaissable a été encadré. Image prise au grossissement 10x

iii. Rats Wistar intoxiqués et traités par 400 mg/kg de feuilles (Lot 2')

Le traitement par 400 mg/kg de feuilles a restauré la structure lobulaire. Les sinusoïdes sont redevenues normales et la disposition radiaire des travées hépatiques s'est rétablie. Cependant, les micro-vacuoles existent dans plusieurs hépatocytes et indiquent une souffrance cellulaire persistante (Figure 29).

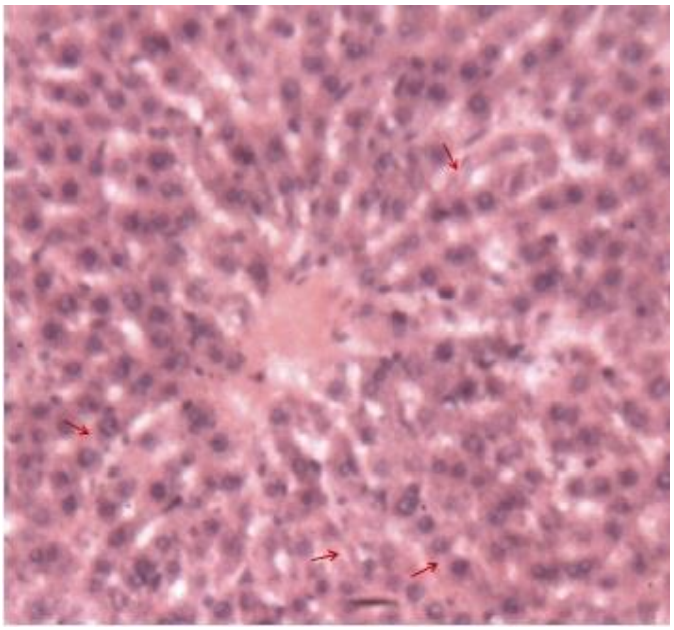


Figure 29. Aspect histologique du foie des rats traités par les feuilles de *S. macrocarpon* (400 mg/kg)

Légende: Les flèches indiquent les vacuoles intracellulaires. Image prise au grossissement 10x

iv. Rats Wistar intoxiqués et traités par 800 mg/kg de feuilles (Lot 3')

Le traitement avec 800 mg/kg de feuilles rétablit l'architecture lobulaire et les sinusoïdes veineuses. Il ne persiste de vacuoles que dans de rares hépatocytes (Figure 30).

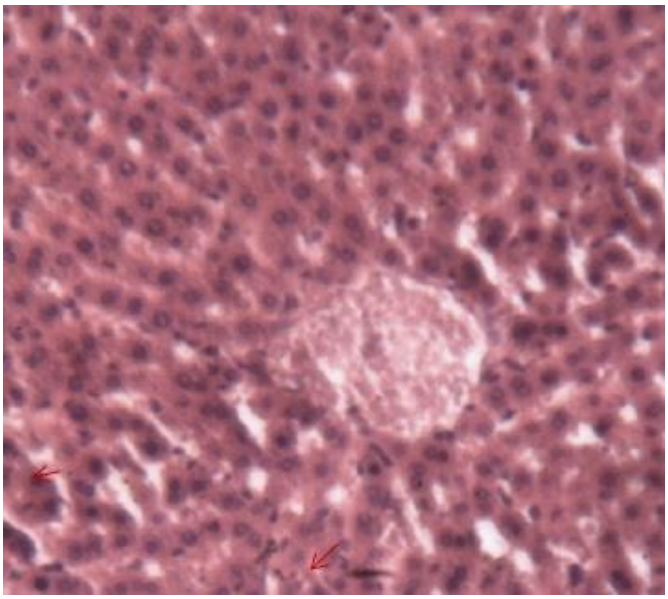


Figure 30. Aspect histologique du foie traité par les feuilles à une dose de 800 mg/kg

Légende : Les flèches indiquent la présence de vacuoles dans de rares hépatocytes. Image prise au grossissement 10x.

v. Rats Wistar intoxiqués et traités par les doses de 400 mg/kg (Lot 2), 800 mg/kg (Lot 3) de fruits et par Atorvastatin (Lot A)

Dans ces différents groupes de rats, les lobules hépatiques sont restaurés et ressemblent à ceux des rats Wistar non intoxiqués du lot B (contrôle négatif). Les vacuoles sont très rares dans les hépatocytes et les lumières sinusoïdales clairement visibles sont bien disposées. En périphérie des lobules, les espaces portes clairement identifiables sont de structure typique (Figures 31-34).



Figure 31. Aspect histologique du foie traité par les fruits à une dose de 400 mg/kg

Légende: Structure lobulaire quasi-normale. Image prise au grossissement 10x.

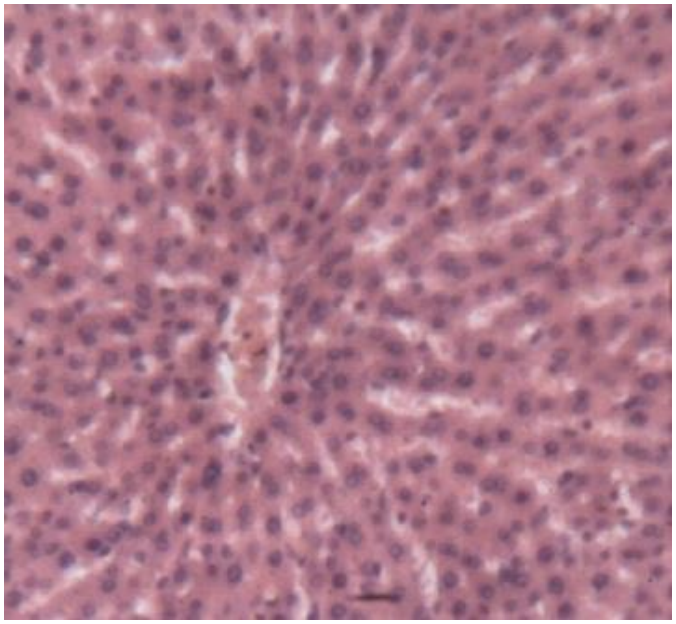


Figure 32. Aspect histologique du foie traité par les fruits à une dose de 800 mg/kg

Légende: Structure lobulaire quasi-normale. Image prise au grossissement 10x.

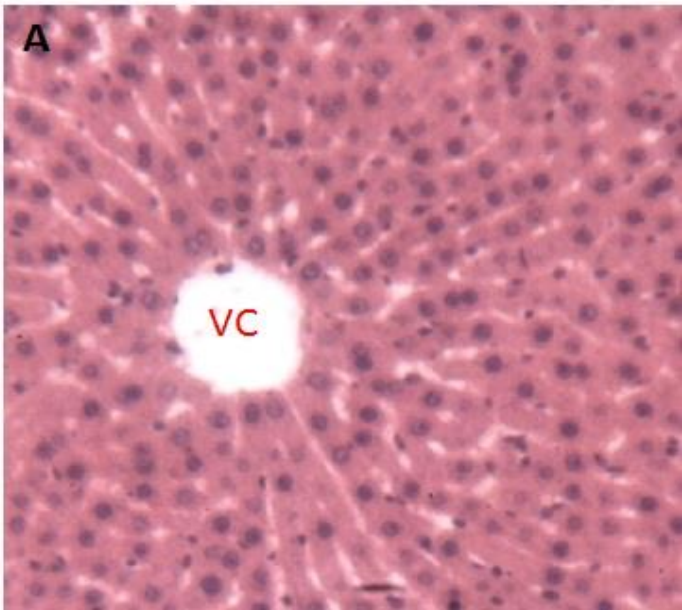


Figure 33. Aspect histologique du foie des rats traités par le médicament de référence

Légende: Structure lobulaire quasi normale. Une veine centrolobulaire (VC) est visible dans la figure A. Image prise au grossissement 10x.

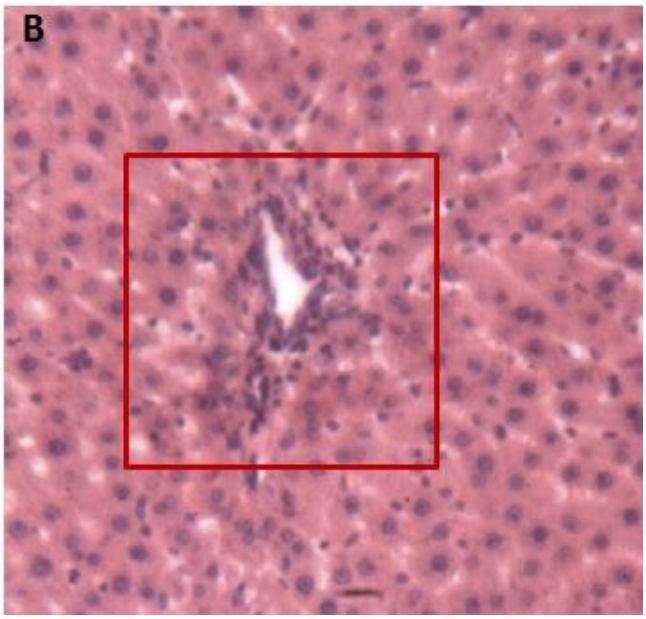


Figure 34. Aspect histologique du foie des rats traités par le médicament de référence (suite)

Légende:
Structure lobulaire quasi normale. Un espace porte est encadré dans la figure B. Image prise au grossissement 10x.

3.1.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*

3.1.2.1. Qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers

3.1.2.1.1. Charge des eaux d'arrosage et des feuilles de S. macrocarpon en coliformes thermotolérants

a) Eaux d'arrosage

Les eaux d'arrosage du site témoin de Glo-Djigbé n'ont pas été contaminées par des coliformes thermotolérants (0 UFC/100 ml) alors que celles de Houéyiho, Fidjrossè et Agongbomey l'ont été respectivement à $14,5.10^4$±70,06 UFC/100 ml, $8,5.10^4$±106,01 UFC/100 ml et $1,05.10^5$±70,06 UFC/100 ml. *E. coli* est absent sur le site témoin de Glo-Djigbé contrairement à Houéyiho ($1,8.10^4$±28,42 UFC/100 ml), à Fidjrossè ($0,95.10^4$±70,10 UFC/100 ml) et à Agongbomey (5545±77,53 UFC/100 ml). Ces différences se sont avérées significatives puisqu'il s'agit d'absence totale sur le site de Glo-Djigbé et de présence de coliformes thermotolérants sur les autres sites ($p<0,05$).

Les eaux d'arrosage, quelle que soit leur origine ont été contaminées par les coliformes thermotolérants. Les logarithmes décimaux des valeurs de coliformes thermotolérants et *E. coli* dans les eaux d'arrosage ont été calculés afin de mieux expliquer l'étendue de cette contamination. Les charges en coliformes thermotolérants et *E. coli* sont consignées dans les tableaux XIa et XIb.

Tableau XIa : Charge des eaux d'arrosage en coliformes thermotolérants

Site	Type d'eau	CF (UFC/100 ml)	log (UFC/100 ml)
Houéyiho	Marécage	$1,4.10^5$	5,14
	Forage	$1,5.10^5$	5,17
Fidjrossè	Marécage	$1,6.10^5$	5,2
	Forage	$0,1.10^5$	4
Agongbomey	Marécage	1.10^5	5
	Marécage	$1,1.10^5$	5,04

CF = Coliformes Fécaux et UFC = Unité Formant une Colonie

Tableau XIb : Charge des eaux d'arrosage en *E. coli*

Site	Type d'eau	*E.coli* (UFC/100 ml)	log (UFC/100 ml)
Houéyiho	Marécage	2.10^4	4,3
	Forage	$1,6.10^4$	4,2
Fidjrossè	Marécage	1.10^4	4
	Forage	$0,9.10^4$	3,95
Agongbomey	Marécage	$0,009.10^4$	1,95
	Marécage	$1,1.10^4$	4,04

UFC = Unité Formant une Colonie

b) Feuilles de *S. macrocarpon*

La charge en coliformes thermotolérants des feuilles de *S. macrocarpon* du site témoin de Glo-Djigbé est de $6{,}05.10^5$±219,10 UFC/g alors que celles de Houéyiho, Fidjrossè et Agongbomey le sont respectivement à raison de $9{,}5.10^2$±70,71 UFC/g, $3{,}5.10^3$±21,32 UFC/g et $1{,}82.10^5$ ±25,01 UFC/g (Tableau XII).

Tableau XII : Charge des feuilles de *S. macrocarpon* en coliformes thermotolérants

Sites	Moyenne (UFC/g)	Ecart-type
G	$6{,}05.10^5$ a	219,10
H	$9{,}5.10^2$a	70,71
F	$3{,}5.10^3$a	21,32
A	$1{,}82.10^5$a	25,01

G = Glo-Djigbé, H = Houéyiho, F = Fidjrossè et A = Agongbomey. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de significativité α = 0,05 et UFC/g = Unité Formant une Colonie par gramme.

La charge des feuilles de *S. macrocarpon* en *E. coli* est de $3{,}5.10^4$±457,08 UFC/g sur le site témoin de Glo-Djigbé alors qu'elle est respectivement de $9{,}5.10^2$±70,71 UFC/g ; $0{,}1.10^5$±0 UFC/g et 9.10^2±0 UFC/g sur les sites de Houéyiho, Fidjrossè et Agongbomey. L'analyse statistique a révélé que la différence théorique entre les moyennes de Glo-Djigbé et Houéyiho n'est pas significative au seuil de significativité α = 0,05. Par contre, elle l'est au même seuil entre les moyennes de Glo-Djigbé et Fidjrossè puis Glo-Djigbé et Agongbomey (Tableau XIII).

Tableau XIII : Charge des feuilles de *S. macrocarpon* en *E. coli*

Sites	Moyenne (UFC/g)	Ecart-type
G	$3,5.10^5$a	457,08
H	$9,5.10^2$a	70,71
F	$0,1.10^5$b	0
A	9.10^2b	0

G = Glo-Djigbé, H = Houéyiho, F = Fidjrossè et A = Agongbomey. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de significativité α = 0,05 et UFC/g = Unité Formant une Colonie par gramme.

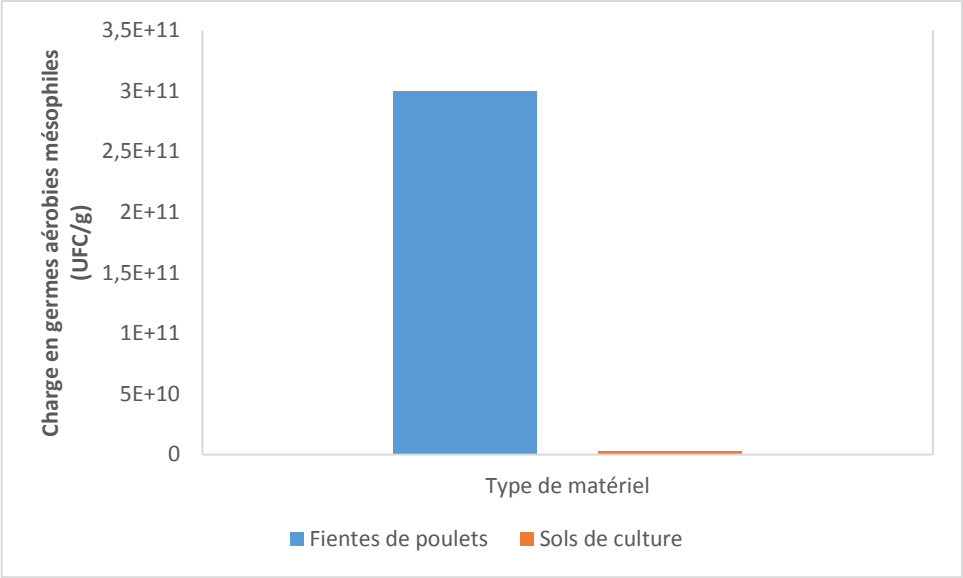
3.1.2.1.2. Contamination de l'environnement de culture de S. macrocarpon par Salmonella

Salmonella n'a pas été isolé dans l'environnement de culture de *S. macrocarpon*. En effet, aucune UFC n'a été dénombrée dans les échantillons de sols, d'eaux d'arrosage et de feuilles de *S. macrocarpon* issus des sites d'étude.

3.1.2.2. Rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets dans la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* cultivé

3.1.2.2.1. Teneur en bactéries des sols de culture et des fientes avant compostage

Les fientes de poulets renferment plus de germes aérobies mésophiles (3.10^{11}±2020 UFC/g) que les sols de culture [(2.10^9 UFC/g) ($p<0,05$)] comme le présente la figure 35.



5E+10 = 5.10^{10} et ainsi de suite

Figure 35. Charge des fientes de poulets et des sols en germes aérobies mésophiles

Les fientes de poulets ont une charge plus élevée en *Enterococcus*, *Staphylococcus* coagulase positive et en coliformes thermotolérants dont *E. coli* que celle des sols de culture [(p<0,05) (Tableau XIV)]. *Salmonella* a été retrouvé dans les échantillons de sols tandis que les fientes en sont exemptes.

Tableau XIV : Teneur des fientes de poulets et des sols en bactéries

	Bactéries recherchées (UFC/g)			
	Enterococcus	Coliformes thermotolérants	*Staphylococcus* coagulase +	*Salmonella*
Fientes de poulets	$3,54.10^6$ ± 2020a	$6,518.10^6$ ± 1421,38a	10200 ± 1,42a	Absence dans 100 g
Sols de culture	10.000 ± 430b	980 ± 20,12b	100 ± 6,20b	Présence

Les moyennes portant les mêmes lettres verticalement ne sont pas significativement différentes au seuil de significativité α = 0,05.

3.1.2.2.2. Impact de la digestion en anaérobiose sur la charge bactérienne des fientes de poulets

Le compostage réalisé a significativement abaissé les charges des fientes de poulets en germes aérobies mésophiles (99 % de réduction), en coliformes thermotolérants (99,5 % de réduction) et en *Enterococcus* (99,8 % de réduction). Par contre, la diminution des *Staphylococcus* à coagulase positive n'est pas significative même si le pourcentage de réduction est de 0,3 % (Tableau XV).

Tableau XV : Evolution de la population bactérienne après compostage

	Bactéries recherchées (UFC/g)			
	Germes aérobies mésophiles	Coliformes thermotolérants	*Enterococcus*	*Staphylococcus* coagulase +
Charge en bactéries des fientes brutes	3.10^{11} ± 30150a	$6,5.10^{6}$ ± 1421,38a	$3,54.10^{6}$ ± 3044,73a	10.200 ± 142a
Charge des fientes compostées en bactéries	3.10^{9} ± 23520b	34.000 ± 2020b	5.433,33 ± 1500b	10.166,66 ± 230a

Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de significativité α = 0,05.

3.1.2.2.3. Culture de S. macrocarpon avec les fientes compostées et qualité microbiologique des feuilles

Les feuilles de la zone amendée avec les fientes compostées ont une charge bactérienne inférieure à celles de la zone amendée avec les fientes non compostées (Tableau XVI).

Les pourcentages de réduction des charges bactériennes des feuilles de *S. macrocarpon* cultivé avec les fientes compostées sont respectivement de 98,8 %, 99,9%, 100 % et 60 % pour les germes aérobies mésophiles, les coliformes thermotolérants*, E. coli* et *Enterococcus*. *Salmonella* et *Staphylococcus* à coagulase positive n'ont pas été mis en évidence dans les feuilles de *S. macrocarpon* cultivé avec les fientes compostées.

Tableau XVI : Charge des légumes en bactéries selon les fientes utilisées pour l'amendement

Bactéries (UFC/g)	**Feuilles**	
	Fientes non compostées	Fientes compostées
Germes aérobies mésophiles	$4{,}2.10^{7}$±5348,25a	$5{,}13.10^{5}$±4853,2b
Coliformes thermotolérants	$5{,}9.10^{5}$±10320a	855±26,05b
E. coli	18250±2543,25a	9±0,34b
Salmonella	Absence	Absence
Enterococcus	1000±45a	400±32,4b
Staphylococcus à coagulase +	Présence	Absence

Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de significativité α = 0,05 et UFC/g = Unité Formant une Colonie par gramme

3.1.3. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*

3.1.3.1. Qualité toxicologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers

3.1.3.1.1. Teneur des fientes de poulets en métaux lourds

Les moyennes obtenues en mg/kg pour la teneur en plomb ont été évaluées à 3,618±0,051 à Glo-Djigbé, 0,887±0,017 à Houéyiho, 1,921±0,079 à Fidjrossè et 0,696±0,048 à Agongbomey. On note un pic de contamination au niveau du site de Glo-Djigbé.

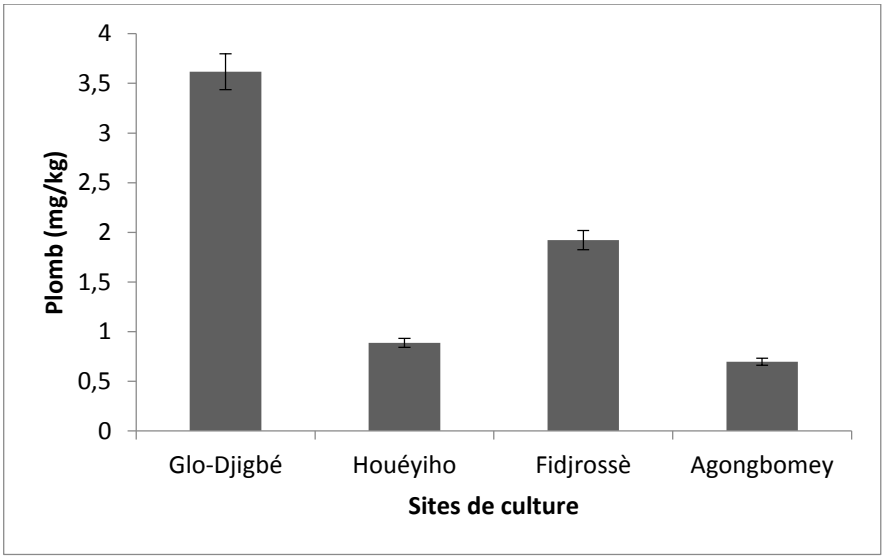


Figure 36. Teneur des fientes en plomb

En ce qui concerne le cadmium, les moyennes en mg/kg se présentent comme le montre la figure 37. Elles ont été estimées à 0,08±0,02 à Glo-Djigbé, 0,04±0,01 à Houéyiho, 0,05±0,01 à Fidjrossè et 0,07±0,01 à Agongbomey.

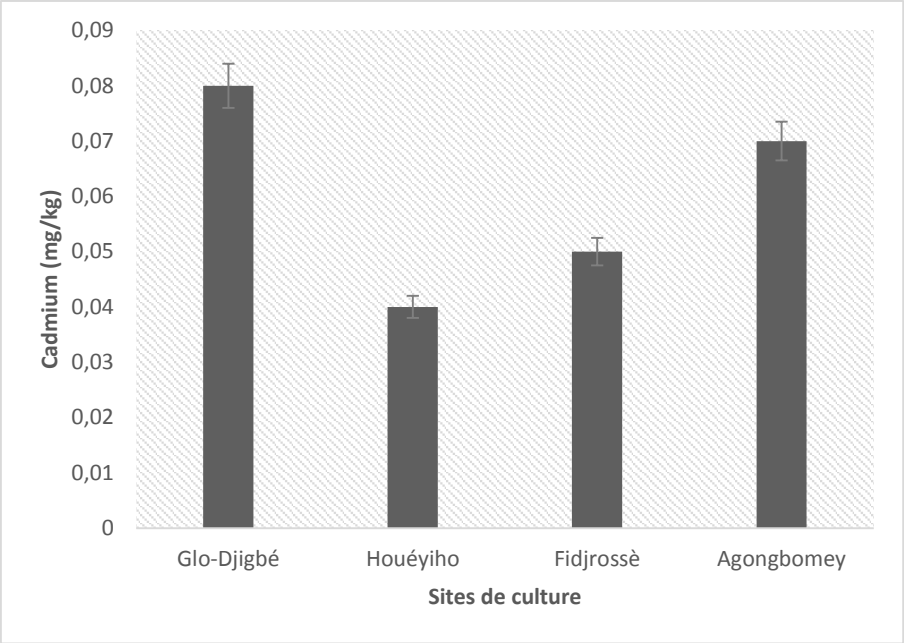


Figure 37. Teneur des fientes en cadmium

3.1.3.1.2. Teneur des sols maraîchers en plomb

Les moyennes obtenues en mg/kg sont présentées par la figure 38 : 5,189±0,058 à Glo-Djigbé, 46,320±0,651 à Houéyiho, 2,544±0,158 à Fidjrossè et 12,154±0,529 à Agongbomey.

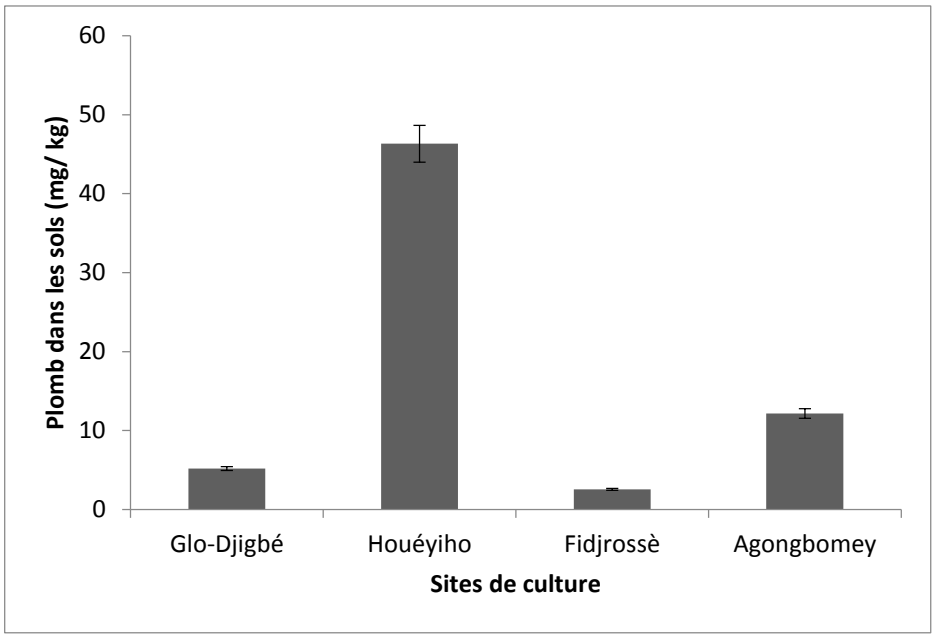


Figure 38. Teneur des sols maraîchers en plomb

3.1.3.1.3. Teneur des eaux d'arrosage en métaux lourds

Les eaux d'arrosage ont une faible teneur en plomb avec des moyennes comprises entre 0,017 et 0,038 mg/l (Tableau XVII). Le cadmium n'a pas été détecté dans les échantillons d'eaux d'arrosage.

Tableau XVII : Teneur en plomb des eaux d'arrosage

Sites	Moyenne (mg/l)	Ecart-type
G	0,017a	0,002
H	0,025a	0,004
F	0,038a	0,002
A	0,024a	0

G = Glo-Djigbé, H = Houéyiho, F = Fidjrossè et A = Agongbomey. Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de significativité α = 0,05.

3.1.3.1.4. Teneur des feuilles de S. macrocarpon en plomb

Les moyennes obtenues en mg/kg sont exposées par la figure 39 : 0,936 ± 0,070 à Glo-Djigbé, 0,416±0,050 à Agongbomey, 1,178±0,250 à Houéyiho et 1,195±0,050 à Fidjrossè.

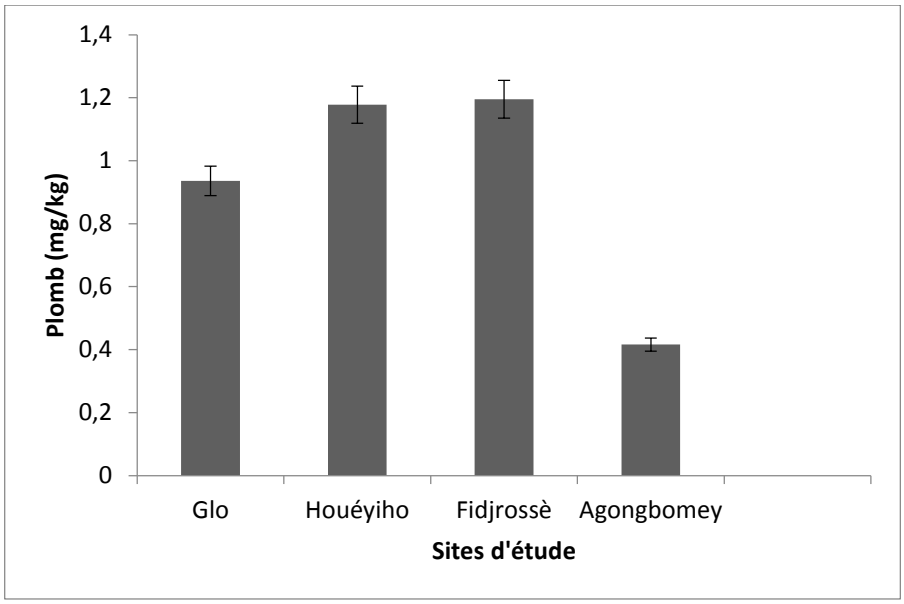


Figure 39. Teneur des feuilles de *S. macrocarpon* en plomb

3.1.3.2. Impact de l'utilisation des fientes compostées sur la qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon* cultivé

3.1.3.2.1. Teneur en métaux toxiques et valeur amendante des sols de culture et des fientes avant compostage

Concernant la teneur en métaux lourds, les fientes contiennent moins de plomb (2,39±0,02 mg/kg) que les sols [(6,01±0,66 mg/kg) (Figure 39)]. Le cadmium n'a été détecté dans aucun échantillon (Figure 40).

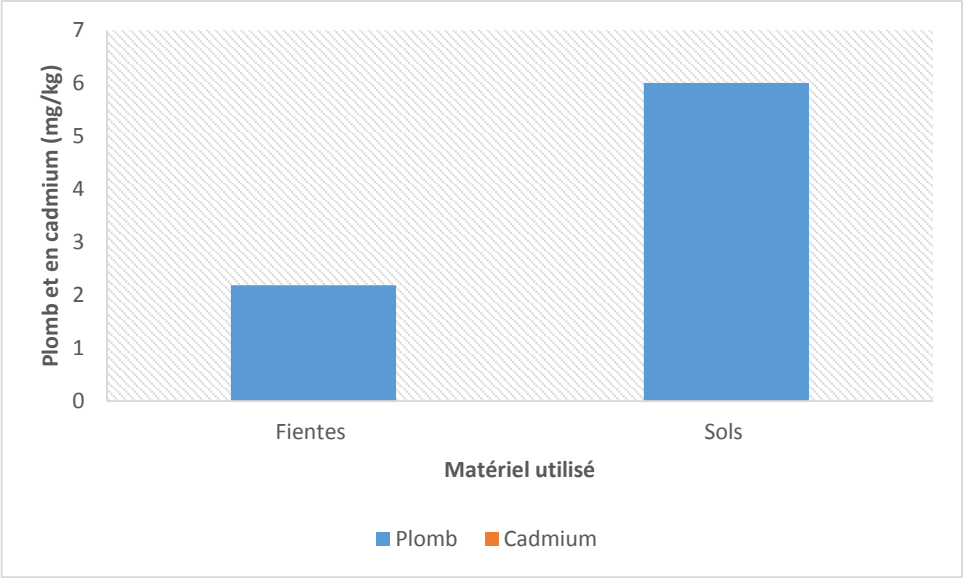


Figure 40. Teneur des fientes et des sols de culture en plomb et en cadmium

La figure 41 montre que les fientes de poulets ont une teneur plus élevée en phosphores totaux (20200±1365,65 mg/kg), en phosphores assimilables (2013,20±249,02 mg/kg) et en azote total (18900±1307,67 mg/kg) que les sols (1016,20±143,50 mg/kg pour les phosphores totaux, 121,86±17,43 mg/kg pour les phosphores assimilables et 1095±139,50 mg/kg pour l'azote total).

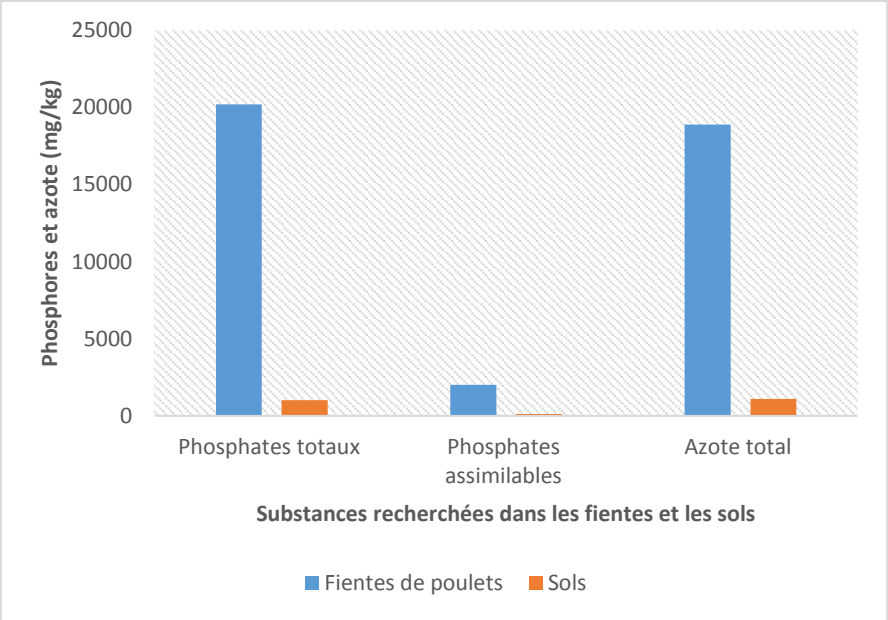


Figure 41. Valeur amendante des fientes de poulets et des sols de culture

3.1.3.2.2. Effet de la digestion en anaérobiose sur la valeur amendante et la teneur en métaux toxiques des fientes de poulets

Comme le présente la figure 41, la teneur en plomb a fortement diminué dans les fientes de poulets, passant de 2,39±0,02 mg/kg à 0,204±0,01 mg/kg. La présence de cadmium n'a pas été notée (Figure 42).

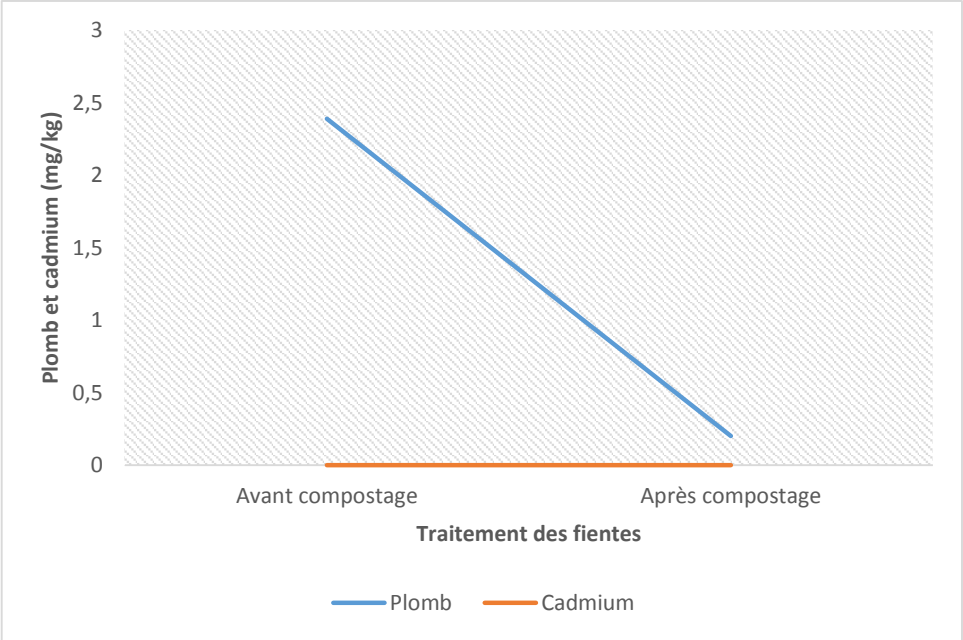
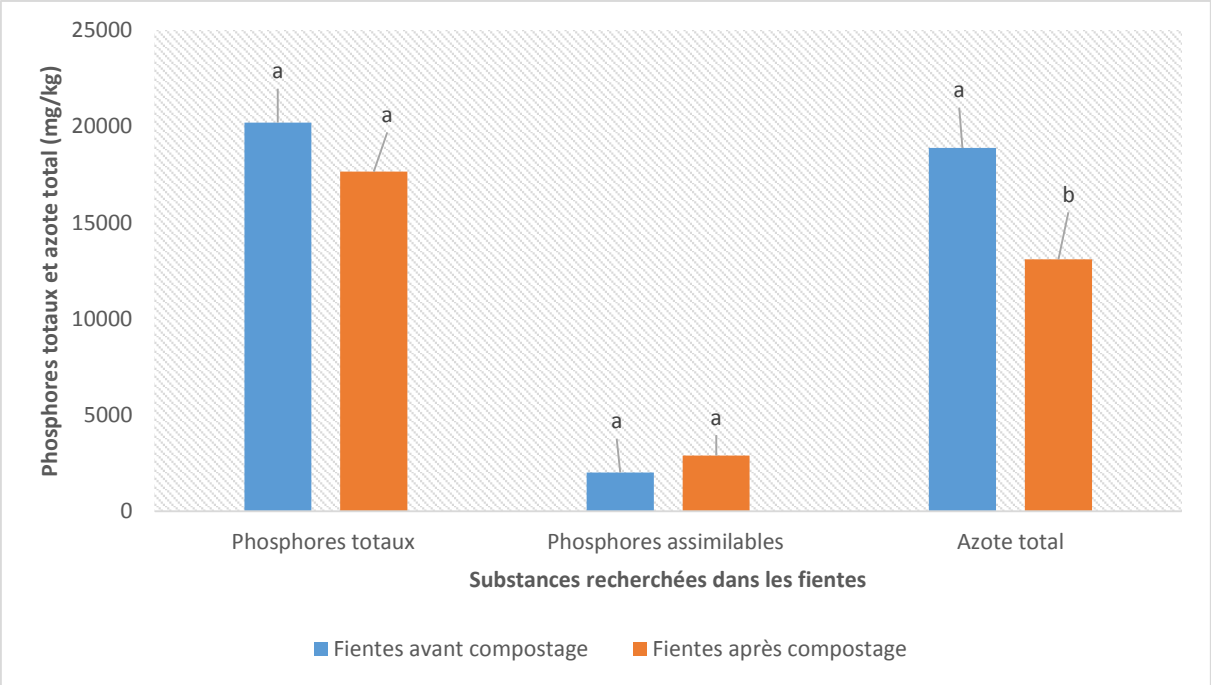


Figure 42. Evolution de la teneur des métaux toxiques dans les fientes de poulets

La digestion en anaérobiose des fientes de poulets n'a nullement entamé la valeur amendante du compost obtenu. En effet, ce dernier a conservé une teneur élevée en phosphores totaux (17652,33±1171 mg/kg) et en phosphores assimilables [(2896,46±143,56 mg/kg) (Figures 43 et 44)]. Mieux, le pourcentage des phosphores assimilables est passé de 9,96 % à 16,40 % et la teneur en azote total a connu une réduction significative [($p<0,05$) (Figures 43 et 44)].



Les moyennes portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes au seuil de significativité de 5% (p>0,05).

Figure 43. Teneur des fientes en éléments fertilisants avant et après compostage

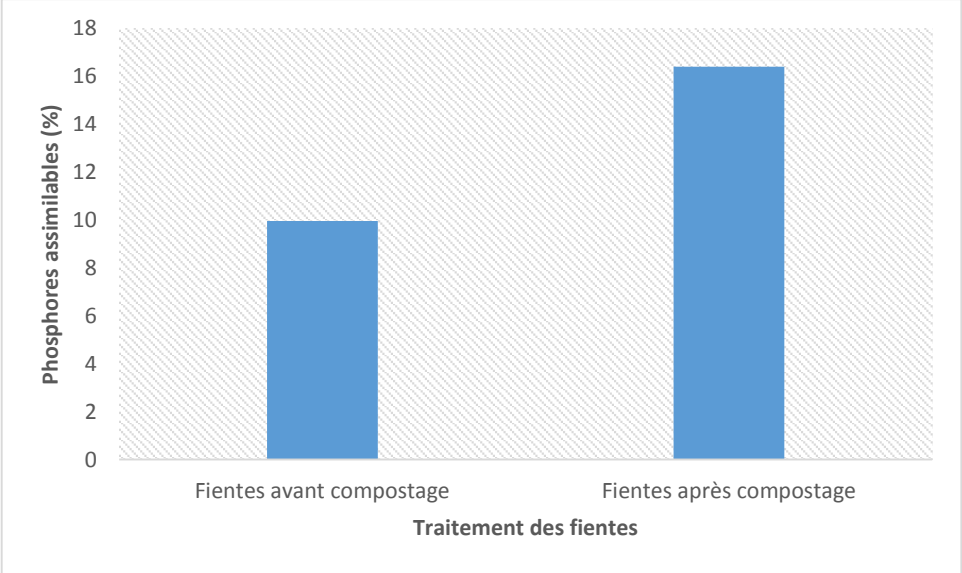


Figure 44. Teneur des fientes en phosphores assimilables avant et après compostage

3.1.3.2.3. Culture de S. macrocarpon avec les fientes compostées et qualité toxicologique des feuilles obtenues

L'utilisation des fientes de poulets compostées a permis de produire des légumes avec des teneurs en plomb (0,4±0,002 mg/kg) en-dessous de celles des légumes cultivés avec des fientes non compostées (1,1±0,005 mg/kg) comme indiqué par la figure 45.

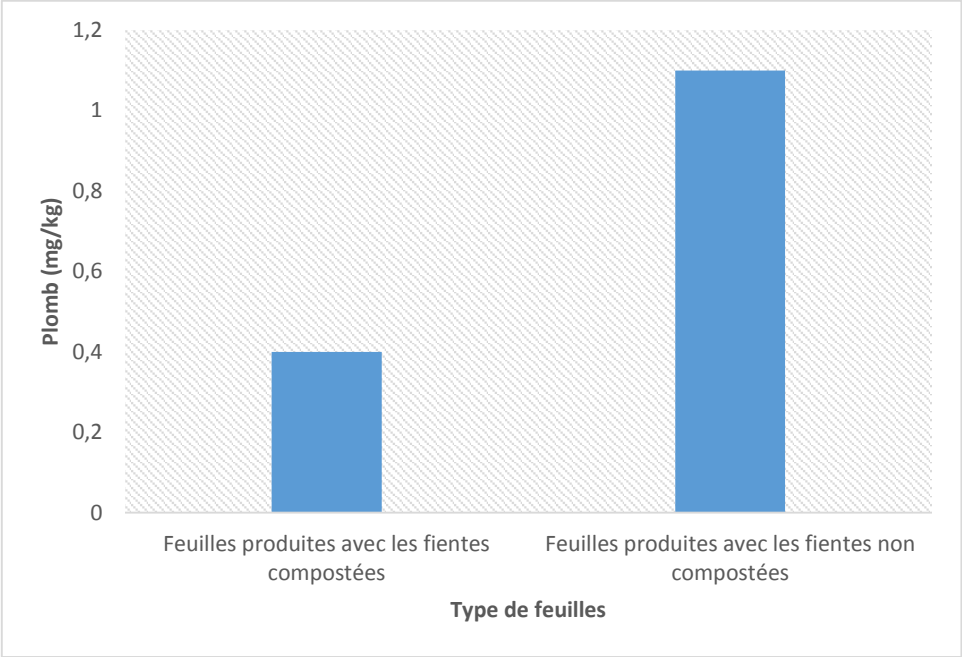


Figure 45. Teneur en plomb des feuilles de *S. macrocarpon*

3.2. Discussion

3.2.1. Propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*

3.2.1.1. Criblage phytochimique

La détermination de composés chimiques dans les poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* a montré la présence de tanins que ce soit dans les feuilles (tanins galliques) comme dans les fruits (tanins totaux). L'intérêt de cette étude était d'évaluer le risque encouru par les consommateurs de ce légume. Ainsi, selon Shils *et al*. (2006), les tanins hydrolysables présents dans de nombreux aliments d'origine végétale ont été identifiés comme étant responsables, à forte dose, de la diminution du taux de croissance et de la digestibilité des protéines chez des animaux de laboratoire. L'incidence de certains cancers dont le cancer de l'œsophage est liée à la consommation d'aliments riches en tanins (Shils *et al*., 2006). Toutefois, la faible présence de cette substance antinutritionnelle dans les feuilles de *S. macrocarpon* révélée par la présente étude peut autoriser sa consommation sans danger. Certains auteurs ont indiqué que la faible concentration d'un légume en tanins est associée à des effets positifs sur la digestion (Guimarães-Beelen *et al*., 2006, Emebu et Anyika, 2011). Les fruits de *S. macrocarpon* contiennent des tanins hydrolysables dans une proportion modérée. Ces résultats corroborent les travaux de Chinedu *et al*. (2011) au Nigéria. Cette proportion modérée des fruits de *S. macrocarpon* en tanins hydrolysables a un rôle physiologique dans le traitement des blessures (Sodipo *et al*., 2012). Contrairement aux feuilles, les fruits renferment en quantité modérée un type de tanins non hydrolysables appelés tanins cathéchiques. La présence de ces tanins cathéchiques associée à celle des tanins galliques dans les fruits recommande une consommation modérée de cette partie du légume.

Cette étude a révélé que les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* ont une composition chimique différente. Les feuilles renferment des alcaloïdes, des mucilages, des composés réducteurs et des saponosides.

La présence d'alcaloïdes en faible proportion dans les feuilles et en forte quantité dans les fruits laisse entrevoir des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et de résistance aux maladies et au stress (Gupta, 1994). Les alcaloïdes retrouvés dans cette plante seraient responsables de son activité hypolipidémiante. Cela expliquerait la préférence des fruits aux feuilles dans le traitement des troubles cholestérolémiques au Nigéria (Olaniyi *et al*., 1998 ; Sodipo *et al*., 2012). Cependant, compte-tenu de la toxicité de ces composés chimiques (Olaniyi *et al*., 1998), l'utilisation abusive des fruits en nutrition doit être évitée (Olaniyi *et al*., 1998).

Les mucilages sont des substances végétales composées de polysaccharides qui interviennent dans le processus d'anti-oxydation des organismes qui en contiennent (Lin *et al*., 2005). La forte présence de ces composés aussi bien dans les feuilles que dans les fruits permet de dire que *S. macrocarpon* présenterait des propriétés antioxydantes.

Les feuilles et fruits de *S. macrocarpon* sont riches en composés réducteurs. Les résultats de la présente étude confirment les travaux rapportés par Sodipo *et al*. (2012) qui ont révélé la présence de sucres réducteurs dans les fruits de ce légume. Ces sucres réducteurs sont des monosaccharides et des disaccharides (Bruneton, 1999 ; Otshudi *et al*., 2000). Les légumes, pour la plupart, renferment suffisamment de composés réducteurs. C'est pour cela qu'il est conseillé d'avoir une alimentation riche en légumes.

Les feuilles de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou ont une quantité modérée de saponosides. Ces composés chimiques sont d'importantes réserves diététiques et nutritionnelles (Chinedu *et al*., 2011). Ce sont des molécules de nature glycosidique (Sodipo *et al*., 2008). Elles ont une action expectorante utile dans la gestion des infections des voies respiratoires supérieures. Selon Cheek (1971), les saponosides sont impliqués dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Toutefois, la présente étude n'a pas révélé leur présence dans les fruits. Ce résultat diffère de ceux de Chinedu *et al*. (2011) et Sodipo *et al*. (2012) qui y ont respectivement trouvé une forte quantité et une quantité modérée. Ces différences pourraient s'expliquer par la variation des sites de culture. De plus, la présente étude a pris en compte des fruits matures ; ce qui n'est pas le cas des autres études.

Les fruits de *S. macrocarpon* renferment une quantité modérée de coumarines contrairement aux feuilles qui n'en ont pas. Cette présence relativement importante de coumarines dans les fruits leur confère des propriétés anticoagulantes et antimicrobiennes (Ladiguina *et al*., 1983). De plus, selon Lazureskii *et al*. (1966), le test de détection des coumarines permet aussi de mettre en évidence les flavonoïdes et les quinones. Si ce test est positif en absence de flavonoïdes et de quinones, comme c'est le cas dans la présente étude, alors la détection de coumarines est confirmée.

L'absence de stéroïdes dans les fruits et feuilles de *S. macrocarpon* confirme les résultats de Chinedu *et al*. (2011) relatifs aux fruits de *S. macrocarpon* cultivé au Nigéria. Ces auteurs ont retrouvé des flavonoïdes dans les fruits contrairement à la présente étude. La provenance géographique des échantillons et les méthodes utilisées peuvent expliquer la différence observée. Les travaux de Sodipo *et al*. (2012) ont donné des résultats conformes à ceux de la présente étude.

3.2.1.2. Valeur nutritive des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

Plusieurs éléments traces essentiels ont des effets sur les fonctions des organismes (Sodipo *et al*., 2012). Cette étude a montré que les feuilles de *S. macrocarpon* sont plus riches en sodium, potassium, calcium, magnésium, fer, cuivre, zinc et protéines que les fruits qui ont une teneur en phosphores plus élevée ($p<0,05$). Le calcium régule un certain nombre de processus physiologiques et biochimiques (Roberts *et al*., 2000). Les éléments comme le potassium, le sodium, le magnésium et le fer jouent des rôles essentiels dans le maintien de la santé humaine (Schroeder, 1976 ; Moses *et al*., 2002 ; Abdulrahman, 2004 ; Karumi, 2005). Le cuivre intervient dans le maintien de la santé cardiovasculaire, le métabolisme du glucose et du cholestérol (Sandstead *et al*., 1998). Le zinc est très utile dans la synthèse des protéines, la division cellulaire, la maturation cellulaire, l'immunité et les fonctions sexuelles (Sandstead *et al*., 1998).

La valeur du sodium contenue dans les fruits de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou (1370,33 mg/kg) est nettement inférieure à celle des fruits du même légume (6238,5 mg/kg) cultivé au Nigéria (Sodipo *et al*., 2012). Il en est de même pour les valeurs de potassium, de fer, de cuivre et de zinc.

Toutefois, une autre étude réalisée par Chinedu *et al*. (2011) toujours au Nigéria a montré que les fruits de *S. macrocarpon* renferment moins de fer que ceux de la présente étude. Ces différences observées s'expliqueraient par le fait que les fruits proviennent d'horizons géologiques différents et que les conditions de culture n'ont pas été identiques. Les résultats de la présente étude montrent que les fruits produits à Cotonou contiennent plus de magnésium, de calcium, de protéines et de phosphores que ceux du Nigéria.

Les divers éléments contenus dans les fruits sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. Il est alors plus juste d'apprécier la valeur de cet aliment de manière globale et non en considérant chaque élément de façon isolée (Chinedu *et al*., 2011). Ainsi, les fruits de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou ont une valeur nutritive élevée comparable à celle des fruits produits au Nigéria (Chinedu *et al*., 2011 ; Sodipo *et al*., 2012). Quant aux feuilles de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou, elles ont une valeur nutritive aussi élevée que de nombreux légumes cultivés dans le monde notamment *Talinum triangulare* et *Momordica charantia* au Cameroun (Tchiégang et Aissatou, 2004), *Crotalaria semperflorens* en Inde (Kathirvel, 2012), *Piliostigma thonningii* (Ighodaro *et al*., 2012) et *Solanum melongena* (Agoreyo *et al*., 2012) au Nigéria. La quantité de protéines présente dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* est élevée. La teneur en eau des fruits de *S. macrocarpon* est comparable à celle révélée par Sodipo *et al*. (2012) au Nigéria. Cette richesse en eau des fruits est pratiquement égale à celle des feuilles qui contiennent, par ailleurs, plus de vitamines A. Cependant, les feuilles sont moins riches en vitamines K_1 que les fruits. Il est important de souligner que la forte teneur en eau et la faible quantité de lipides contenue dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* assurent des propriétés préventives contre la constipation et le cancer du côlon (Showemimo et Olarewaju, 2004). Bien qu'il y ait une différence théorique entre la quantité de vitamines C présente dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*, il est à noter que ce légume en renferme beaucoup. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chinedu *et al*. (2011) qui ont trouvé une forte présence de vitamines C dans les fruits de *S. macrocarpon* au Nigéria, sans toutefois la quantifier. La teneur de *S. macrocarpon* en vitamines C est supérieure à celle du poivre vert (2500 mg/kg) comme l'a indiqué Györi (1999), d'où les propriétés antioxydantes attribuées à ce légume (Dias, 2012).

Le potentiel nutritionnel des feuilles de *S. macrocarpon* est semblable à celui des feuilles de *Moringa oleifera* (de Saint Sauveur et Broin, 2010), une plante utilisée dans la récupération nutritionnelle des enfants malnutris ou des personnes vivant avec le VIH. Les éléments nutritifs présents dans *S. macrocarpon* couvrent entièrement les besoins énergétiques des enfants (Goyens, 2009).

3.2.1.3. Métaux toxiques dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*

Le plomb et le cadmium ont été mis en évidence dans les feuilles et dans les fruits. Les valeurs des deux métaux lourds relevées pour les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* dépassent celles imposées par la norme AFNOR U44-041 qui sont de 0,3 mg/kg à 0,5 mg/kg pour le plomb et 0,1 mg/kg pour le cadmium (Ctifl, 2001). *S. macrocarpon* est plus contaminé par le plomb que le cadmium. Cela s'explique par le fait que le site de Houéyiho soit non industriel. Le plomb est plus spécifique à la pollution atmosphérique que le cadmium qui est un polluant industriel (Dougnon *et al*., 2012a). Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par Sodipo *et al*. (2012) qui n'ont détecté aucune trace de plomb et de cadmium dans les fruits de *S. macrocarpon* au Nigéria. Ce constat est lié au fait que ces fruits provenaient d'un site qui n'est ni minier ni d'une zone d'activité industrielle. Contrairement à cela, le site de Houéyiho est localisé au cœur de la ville de Cotonou soumis à un important trafic routier et aérien. Cela libère des métaux lourds dans l'atmosphère et contamine les légumes produits. De même, les importantes quantités de déchets organiques utilisés depuis des années ont contribué à contaminer ce sol et *de facto* les légumes qui y sont produits. Une étude menée 6 mois plus tôt sur le même site avec la Spectrophotométrie d'Absorption Atomique a montré le même niveau de contamination des feuilles (Dougnon, 2012). Cela témoigne de la pollution permanente des légumes de Houéyiho.

3.2.1.4. Cytotoxicité de *S. macrocarpon*

Plusieurs travaux ont prouvé la pertinence du test de toxicité larvaire dans les études préliminaires de toxicité (Quignard *et al*., 2003). Une corrélation positive a été même mis en évidence entre le test de toxicité larvaire et la dose orale létale de plantes médicinales chez des souris (Parra *et al*., 2001).

De plus, en tenant compte de la corrélation qui existe entre la toxicité larvaire et la toxicité sur les cellules, les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon* n'ont *a priori* aucun effet nocif sur certaines cellules humaines notamment les cellules 9 PS et 9 KB du carcinome nasopharygien humain d'une part (Pelka et *al.*, 2000), les cellules A-549 du carcinome pulmonaire et les cellules HT-29 du carcinome du côlon d'autre part (Carballo et *al.*, 2002). En somme, les organes étudiés pour ce légume peuvent être utilisés quotidiennement en alimentation de base sans risques toxiques à court et à moyen terme. La non-cytotoxicité de *S. macrocarpon* se justifie par sa consommation de par le monde.

S. macrocarpon présente une meilleure innocuité que *Tamarindus indica*, une plante de la famille des Leguminoseae utilisée aussi bien en nutrition qu'en médecine traditionnelle (Morton, 1987 ; Pamploma-Roger, 1999). En effet, utilisé à forte dose, ce légume présente une toxicité cellulaire (Nwodo, 2011). L'innocuité de *S. macrocarpon* est également meilleure à celle des plantes telles que *Lannea barteri* K & Gillet, *Sclerocaria birrea* A. Rich, *Annona senegalensis* Pers., *Kigelia africana* L. Benth et *Ananas comosus* L. Merr. Ces plantes sont utilisées dans le traitement du paludisme et de divers cancers au Nigéria (Adoum, 2009). Ce sont aussi les cas de *Muntingia calabura* utilisée pour ses propriétés antibactériennes au Brésil (Ramos *et al*., 2009), *Abroma augusta*, *Acanthus ilicifolius* employées en médecine traditionnelle au Bangladesh (Rahmatullah *et al*., 2010). Cette étude a permis de classer *S. macrocarpon* dans le groupe des légumes non cytotoxiques au même rang que *Amaranthus hybridus*, un légume consommé au Kenya (Orech *et al*., 2005).

3.2.1.5. Propriétés hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*

3.2.1.5.1. Toxicité in vivo des poudres des feuilles et fruits

a) DL_{50} des poudres des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*

Les poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* ont une DL_{50} supérieure ou égale à 5000 mg/kg (OCDE, 2001). Les plantes avec une DL_{50} au-delà de 1000 mg/kg par voie orale sont considérées comme étant non toxiques (Clarke et Clarke, 1977). Ces résultats confirment les travaux de Dougnon *et al*. (2013). La léthargie observée au niveau des rats pourrait être dû au stress imputable à la manipulation.

b) Effet des poudres de *S. macrocarpon* sur le poids des rats Wistar

La variation étant semblable selon les lots, le gain de poids n'est pas nécessairement dû à l'effet de la dose unique des poudres de *S. macrocarpon*. Cette étude a permis de prouver que ce légume ne provoque pas une perte de poids chez les rats Wistar. Le but du présent volet étant d'évaluer la toxicité *in vivo* des poudres, il serait intéressant d'explorer au cours d'une étude ultérieure, le rôle de ces poudres dans le gain de poids chez les enfants ou chez les personnes malnutries à l'image d'autres auteurs avec *M. oleifera* (Tété-Bénissan *et al*., 2012).

c) Paramètres biochimiques des rats Wistar

Les valeurs normales de l'ALAT de la présente étude oscillent autour de 100 UI/L. Elles diffèrent de celles de Kamdem *et al.* (1981) qui eux, ont trouvé 74,7±3,8 UI/L. Elles ne sont pas loin de celles établies par Dougnon (2009) qui lui, a proposé 130 UI/L comme valeur moyenne de l'ALAT chez des rats âgés de trois mois. Les différences observées peuvent être attribuées à l'âge des rats, à leur alimentation ou à leur physiologie. Etant donné qu'il n'y a eu aucune différence entre le lot témoin et les lots tests, les poudres de *S. macrocarpon* n'ont pas eu d'effets toxiques sur le foie des rats. Les valeurs normales de l'ASAT obtenues sont conformes à celles proposées par Kamdem *et al*. (1981) à savoir 178 ± 20,99 UI/L. Ces résultats sont par contre en discordance avec le taux de 42,9 ±10,1 UI/L établi par Kaneko (1989) et de 200 ± 26 UI/L proposé par Dougnon (2009). L'âge peut être également incriminé dans ces cas.

Au regard des valeurs de l'urémie et la créatininémie, il peut être déduit que les fruits de *S. macrocarpon* ont un meilleur effet sur la fonction rénale (Grubben et Denton, 2004 ; Sodipo *et al*., 2012). Les feuilles de *S. macrocarpon* ne régulent l'urémie qu'à partir d'une dose de 2000 mg/kg. De même, seule la poudre de feuilles de *S. macrocarpon* à 2000 mg/kg a provoqué la diminution de la créatininémie.

d) Paramètres hématologiques

L'augmentation des nombres des plaquettes et des globules blancs, preuve d'une possible trombocytose doublée d'une hyperleucocytose, s'explique par l'utilisation de la sonde gastrique métallique. Les lots tests ont été gavés alors que le lot témoin avait un accès libre à l'eau.

En effet, la sonde utilisée chez les rats des lots tests pourrait avoir agressé la paroi œsophagienne de ces animaux, occasionnant ainsi un syndrome inflammatoire aigüe. Les autres paramètres n'ayant connu aucune différence significative, cette hypothèse se trouve renforcée.

3.2.1.5.2. Potentiel hypocholestérolémiant de S. macrocarpon

Le cholestérol total est le paramètre de base du bilan lipidique. Il est en grande partie fabriqué par le foie et pour le reste, d'origine alimentaire. Son dosage permet de dépister une hypercholestérolémie isolée ou associée à une hypertriglycéridémie (Odou, 2013). Le pic observé au niveau du lot témoin positif est la preuve que le Triton X-100 a effectivement créé les troubles hypercholestérolémiques attendus. En effet, le Triton X-100 est un détergeant non ionique qui provoque l'élévation du cholestérol total et des triglycérides dans le sang par altération du métabolisme lipidique hépatique (Patel *et al*., 2012). C'est le même constat auquel avaient abouti plusieurs auteurs ayant suivi le même protocole à une dose unique de 150 mg/kg (Kothiyal et Gupta, 2011). D'autres auteurs l'ont utilisé à une dose unique de 100 mg/kg (Ghule *et al*., 2006 ; Keshetty *et al*., 2009 ; Sudha *et al*., 2011 ; Patel *et al*., 2012). Les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*, quelle que soit la dose employée, ont réduit significativement le taux de cholestérol total. L'utilisation traditionnelle des fruits de ce légume contre l'hypercholestérolémie au Nigéria (Sodipo *et al*., 2012) se trouve alors justifiée. Au-delà des résultats obtenus par Sodipo *et al*. (2012) sur les extraits de fruits cultivés au Nigéria, la présente étude a montré que les feuilles de ce légume produit au Bénin ont aussi une activité hypocholestérolémiante. Le lot traité par le médicament de référence ayant connu le même effet, on peut alors supposer que les poudres de *S. macrocarpon* agissent préférentiellement comme inhibitrices sélectives et concurrentielles de l'HMG-CoA réductase qui est une enzyme responsable de la synthèse du cholestérol par le foie. Cela aboutit à la réduction des taux de cholestérol et de triglycérides sanguins et donc à une réduction des risques cardiovasculaires. Une consommation régulière de ce légume est à recommander surtout qu'il renferme beaucoup de nutriments (Dougnon *et al*., 2012b). Ces résultats augurent de bonnes perspectives de traitement par un alicament dont les résultats rejoignent un certain nombre de végétaux efficaces dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

Il s'agit entre autres de *Ruellia tuberosa* Linn (Krishna *et al*., 2012) et de *Medohar vati* (Patel *et al*., 2012). Cette activité réductrice du cholestérol par *S. macrocarpon* est liée à la présence de composés chimiques comme les tanins retrouvés aussi bien dans les feuilles que dans les fruits. Ces composés favorisent la production de bile et par conséquent la digestion des lipides (Krishna *et al*., 2012). Les saponosides présents dans les feuilles (Dougnon *et al*., 2012b) agissent également comme hypocholestérolémiants en se liant au le cholestérol dans la lumière intestinale (Ghule *et al*., 2006) ; ce qui abaisse le taux de cholestérol circulant.

Le HDL-Cholestérol est la fraction du cholestérol contenue dans les lipoprotéines de type HDL. Il est admis que celui-ci constitue la fraction "protectrice" du cholestérol car il existe une relation inverse entre la concentration en HDL-cholestérol et la fréquence des complications cardiovasculaires (Kothiyal et Gupta, 2011). Les lipoprotéines de type HDL interviennent dans l'épuration du cholestérol (Odou, 2013). Les rats du lot témoin positif ont connu une diminution significative du HDL-Cholestérol suite à l'induction des troubles hypercholestérolémiques par le Triton X-100. Par contre, le lot traité par le médicament et ceux traités par les poudres de feuilles et de fruits ont connu une élévation du HDL-Cholestérol. Selon Sodipo *et al*. (2011), une élevation du HDL-Cholestérol est associée à une diminution du risque d'athérosclérose. Ainsi, la consommation de *S. macrocarpon* entraîne alors un amoindrissement du risque d'athérosclérose. Un meilleur effet a été observé avec le lot traité par les fruits en poudre de 800 mg/kg. Cet effet est dû à une augmentation de l'activité de la lécithine qui joue un rôle-clé dans l'incorporation du cholestérol libre dans les HDL puis vers les VLDL qui les ramènent à leur tour vers les cellules hépatiques (Kothiyal et Gupta, 2011). Il faut préciser que les HDL facilitent le transport du cholestérol des tissus périphériques au foie pour catabolisme (Venkatesham *et al.*, 2009).

Les poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon*, quelle que soit la dose ont provoqué la diminution du LDL-Cholestérol. La consommation de ce légume permettrait alors de réduire l'incidence des problèmes cardiovasculaires ou coronariens (Kothiyal et Gupta, 2011).

Les triglycérides sont des molécules lipidiques formées dans l'intestin grêle à partir de graisses consommées. Elles sont également produites dans le foie à partir de l'excès de sucre issu de l'alimentation. Les matières grasses n'étant pas solubles dans l'eau, les triglycérides ont besoin de s'associer aux lipoprotéines pour être transportés dans l'organisme. Il existe trois types de lipoprotéines contenant des triglycérides. Il s'agit des chylomicrons, produits par l'intestin grêle après les repas, des lipoprotéines de très basse densité produites par le foie à partir des sucres et des lipoprotéines de densité intermédiaire provenant de la conversion des lipoprotéines de très basse densité. L'intestin libère des chylomicrons et le foie des lipoprotéines de très basse densité. Ces lipoprotéines gagnent la circulation sanguine où un système de dégradation les transforme en acides gras libres qui sont à leur tour utilisés par les tissus comme source d'énergie (Bruckert, 2013). L'excès est entreposé comme réserve énergétique dans les cellules graisseuses appelées adipocytes. L'élevation des triglycérides favorise la formation de plaques d'athéromes qui augmentent les risques cardiovasculaires et thrombotiques, surtout en présence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypertension, la sédentarité ou l'obésité (Bruckert, 2013). Les poudres de feuilles et de fruits de *S. macrocarpon* ont provoqué une réduction des triglycérides et des lipoprotéines de très basse densité ; ce qui conforte l'invite à consommer ce légume pour lutter les troubles lipidiques. Tous ces résultats biochimiques ont été soutenus par une étude histologique du foie. La réparation tissulaire observée est imputable au processus ci-dessus décrit.

3.2.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*

3.2.2.1. Qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers

3.2.2.1.1. Charge des eaux d'arrosage et des feuilles de S. macrocarpon en coliformes thermotolérants

Les coliformes thermotolérants dont *E. coli* ont été recherchés dans les eaux d'arrosage et les feuilles de *S. macrocarpon.* Leur présence dans les légumes peut être une indication de la présence de microorganismes entéropathogènes (Zmirou *et al*., 1987). *E. coli* se développe près des racines des plantes et peut contaminer la culture des jeunes pousses. Il peut vivre pendant des semaines autour des racines des plantes et être transféré vers les parties comestibles (Habteselassie *et al*., 2010). D'une manière générale, les eaux d'arrosage utilisées sur les sites maraîchers sont contaminées par les coliformes thermotolérants à l'exception du site témoin de Glo-Djigbé. L'origine de l'eau utilisée pour l'arrosage est la base de la différence observée. En effet, sur le site témoin de Glo-Djigbé, les maraîchers se servent de l'eau d'alimentation alors que sur les autres sites, l'eau provient des systèmes de terre de marécage creusée et de forage.

Les eaux d'arrosage de Houéyiho sont plus polluées par les coliformes thermotolérants que celles d'Agongbomey et de Fidjrossè. La comparaison des logarithmes décimaux a montré que la pollution par *E. coli* des eaux superficielles de marécage est proche de celles des eaux de forage. Cela est dû à la profondeur insuffisante des forages. Les résultats de la présente étude sont en concordance avec ceux d'Akodogbo (2005) qui avait souligné que l'eau de forage est moins polluée que celle des terres creusées de marécage à condition que le forage soit profond, c'est-à-dire à plus de 10 mètres. Cet auteur a fait observer par ailleurs que la plupart des cours d'eau, des puits et des forages de Cotonou sont envahis par les coliformes à cause de la contamination tellurique. La présence d'*E.coli* dans les eaux des sites d'étude excepté celles de Glo-Djigbé confirme bien que ces eaux d'arrosage ont connu une contamination fécale récente. Ceci est confirmé par l'insalubrité de ces sites.

La profondeur des puits est un facteur très important car plus l'eau s'infiltre, plus elle se débarrasse de ses impuretés (Akodogbo, 2005). La plupart des sources d'arrosage des sites maraîchers sont situées dans des bas-fonds et ne sont pas profondes. Aucune des eaux d'arrosage, en dehors de celles du site de Glo-Djigbé ne répond aux normes proposées par Santé Canada (1991). Ces normes sont de 100 UFC/100 ml pour les coliformes et de 200 UFC/100 ml pour *E. coli*.

Les feuilles de *S. macrocarpon* ont été contaminées par les coliformes thermotolérants sur tous les sites d'étude. Cette contamination est due soit à la qualité microbiologique des eaux d'arrosage utilisées sur ces sites, soit aux fientes de poulets servant à l'amendement ou même aux deux sources. Les coliformes mis en évidence au niveau du site témoin de Glo-Djigbé ont pour origine les fientes de poulets non compostées utilisées pour l'amendement des légumes. Ce constat est en concordance avec les résultats de Florin *et al*. (2009). Ces auteurs ont observé que le taux de coliformes thermotolérants dans les légumes diminue considérablement si le compostage des fientes ayant servi à les amender est adéquat. Les feuilles en provenance de tous les sites présentent des valeurs supérieures à celles imposées par le Comité provincial du Canada sur l'uniformisation et l'interprétation des critères microbiologiques des aliments qui sont de $1{,}0.10^2$ UFC/g (Santé Canada, 1991).

3.2.2.1.2. Contamination de l'environnement de culture de S. macrocarpon par Salmonella

Salmonella n'a pas été retrouvé dans l'environnement de culture de *S. macrocarpon*. L'absence de ces germes dans l'eau d'arrosage, le sol et les feuilles de *S. macrocarpon* pourrait signifier la non contamination des fientes utilisées pour l'amendement de cette culture. Des résultats similaires avaient été rapportés par Araba et Hachana (2000) qui ont recherché *Salmonella* dans neuf échantillons de fientes de poulets. En effet, les entérobactéries sont naturellement présentes dans l'intestin grêle des animaux et leur présence dans un milieu a toujours une origine fécale (Pilet, 1981).

Cependant, Rose *et al*. (1999) ont identifié des facteurs de risque relatifs à la contamination à 70% par *Salmonella* dans les fientes de poulets. Cette différence pourrait être liée aux prélèvements de fientes fraîchement recueillies par ces auteurs au niveau des poulaillers contrairement à la méthode de collecte de fientes adoptée au cours de la présente étude. En effet, les fientes de poulets ont été obtenues après transport et stockage durant plusieurs jours avant leur utilisation. Le stockage a notamment pour objectif d'assainir le fumier, par l'échauffement qui s'y produit. Kwak *et al*. (2005) ont à cet effet, évalué les effets d'un traitement en pile profonde de la litière de poulet. Ils ont ainsi suggéré que la litière de volaille correctement empilée, avec ou sans aération, assure l'élimination des entérobactéries pathogènes en 8 jours. De plus, Araba et Hachana (2000) ont lié l'absence de *Salmonella* dans leur étude au stockage réalisé au niveau des fermes précédant les examens microbiologiques. Toutefois, il se pourrait que les fientes utilisées pour cette étude soient issues de fermes indemnes de salmonelloses aviaires.

3.2.2.2. Rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets dans la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* cultivé

La charge bactérienne importante des fientes de poulets comparativement aux sols est due au fait qu'il s'agit ici des rejets d'animaux. Les microorganismes hébergés par les poulets sont donc présents dans leurs déjections (Bouedo *et al*., 1993). La présence d'*E. coli* dans les fientes est une évidence (Bouedo *et al*., 1993). Par contre, sa présence dans les légumes est un problème.

Les salmonelles isolées des sols de culture tiennent leur origine de l'utilisation faite du terrain dans le passé. En effet, il s'agit d'un terrain vague qui, bien que clôturé, était un dépotoir de déchets de tous ordres. Il a fallu un travail de sensibilisation des populations environnantes pour amoindrir cette pollution. Le transfert de *Salmonella* dans les légumes est à surveiller, bien que la zone contaminée ait été évitée lors de la culture. L'absence de *Salmonella* dans les fientes est due au type de traitement dont font l'objet les poulets des fermes parcourues. Suivis par des vétérinaires, ces poulets sont régulièrement vaccinés et traités périodiquement (Dougnon *et al*., 2012). Il ne faut pas perdre de vue l'hypothèse que *Salmonella* pourrait ne pas résister hors de l'organisme.

C'est à la même conclusion qu'ont abouti El Jalil *et al*. (2003) au terme d'une étude sur la biotransformation des déchets de volailles en vue de leur valorisation dans l'industrie de l'alimentation animale.

La digestion en anaérobiose des fientes réalisée dans le cadre de la présente étude a eu un impact destructif sur la charge bactérienne. Ces résultats corroborent ceux de Couturier (2002) qui souligne que la digestion en anaérobiose vise à réduire l'exposition par élimination ou par inactivation des organismes pathogènes. Les principaux paramètres d'élimination des agents pathogènes sont le temps et la température. Globalement, la digestion mésophile classique permet d'éliminer 99 % des germes pathogènes comme ce fut le cas dans la présente étude. Pour Couturier (2002), une digestion en anaérobiose pendant 24 heures suffit à réduire la charge bactérienne contrairement aux trois semaines réalisées. Le taux de réduction dépend de nombreux autres paramètres intervenant dans la pratique. Il s'agit de la concentration initiale en agents pathogènes, du mode d'alimentation du digesteur et de la compétition avec les autres microorganismes (Couturier, 2002).

La digestion en anaérobiose présente donc plusieurs atouts fondamentaux liés à la puissance des mécanismes biologiques mis en jeu pour assurer un taux de dégradation élevé de la matière organique, aux conditions chimiques particulières de l'anaérobiose (ADEME, 2001).

Staphylococcus à coagulase positive n'a pas totalement disparu des fientes traitées pour la raison que ces bactéries supportent mal la concurrence avec les streptocoques et les entérobactéries (Arnal, 2003). La quasi-disparition de ces deux derniers groupes de bactéries dans le milieu expliquerait alors la présence de *Staphylococcus*. C'est ce constat qui a soutenu la recherche de cette bactérie dans les légumes produits avec les fientes compostées.

L'absence de *Salmonella* dans les feuilles de *S. macrocarpon* en provenance des deux zones d'amendement signifie qu'il n'y a pas eu un transfert de cette bactérie du sol aux légumes. Il est vrai que les régions où la contamination par les *Salmonella* avait été détectée, ont été évitées lors des semis mais le risque de pollution liée au transport par le vent était à craindre.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Florin *et al*. (2009) qui ont prouvé que *Salmonella* a tendance à vite disparaître du milieu extérieur. La forte diminution de la charge bactérienne remarquée au niveau des feuilles de la zone amendée par les fientes de poulets compostées montre à quel point le processus d'hygiénisation de ces matières premières en agriculture urbaine (Assogba-Komlan *et al*., 2007) est à prendre au sérieux. La canalisation des eaux d'arrosage en remplacement des eaux de marécage alliée à cette hygiénisation permet de produire des légumes peu contaminés par les bactéries.

3.2.3. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*

3.2.3.1. Qualité toxicologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers

Les fientes ayant servi à l'amendement des différents sites d'étude sont toutes contaminées par le plomb. Ces résultats sont conformes aux résultats de Gupta et Charles (1999). De même, Kouassi *et al*. (2008) ont trouvé que les fientes épandues sur les sols maraîchers d'Abidjan sont riches en plomb. Toutefois, les teneurs enregistrées sont faibles par rapport à la valeur seuil AFNOR qui est de 180 mg/kg (Kouassi *et al*., 2008). Ces indices de contamination sont significativement différents au niveau du site de Glo-Djigbé comparé aux autres sites. Cela peut être dû aux origines diverses des fientes de poulets utilisées.

La forte teneur en plomb des fientes du site témoin de Glo-Djigbé est signe que le compostage a joué un rôle important dans la capacité de rétention de métaux lourds. En effet, des fientes humides et compactes retiendraient mieux le plomb que des fientes sèches. Il en est de même pour les sols lourds (Chidikofan, 2010).

Ces fientes ont été également contaminées par le cadmium même si les valeurs sont inférieures à la norme AFNOR qui est de 3 mg/kg (Kouassi *et al.*, 2008). Les sols des sites maraîchers sont tous contaminés par le plomb. Le site de Houéyiho a été le plus touché. Ces résultats rejoignent ceux de Chidikofan (2010) qui avait estimé que le sol de Houéyiho est fortement contaminé par les métaux lourds.

En effet, Houéyiho est localisé au cœur de la ville de Cotonou où le site est soumis à un important trafic aérien et routier ; ce qui libère des Eléments Traces Métalliques dans l'air. Une fois dans l'atmosphère, ces métaux lourds s'associent aux particules puis sont ramenés au sol par des précipitations. D'autres particules peuvent aussi être emportées par le vent et se déposer au sol (Ramade, 1991). La pollution du sol du site témoin montre à quel point la pollution atmosphérique n'a pas de limites. Ainsi, il ne suffit pas de mettre des remparts autour d'une parcelle pour estimer qu'elle sera exempte de contamination par les métaux lourds. Il ne faut néanmoins pas exclure le fait que les grandes quantités de fientes de volaille et de déchets organiques utilisés sur les sites maraîchers depuis des années pourraient avoir contaminé ces sols en plomb (Chidikofan, 2010).

Les échantillons d'eaux d'arrosage contiennent des résidus de plomb à des taux inférieurs aux normes recommandées par la FAO pour servir d'eau d'arrosage. Cette norme est de 5 mg/l (Ayers et Westcost, 1989). Chidikofan (2010) qui a travaillé sur le site de Houéyiho avait abouti aux mêmes conclusions. Les échantillons d'eau d'arrosage ne sont pas contaminés par le cadmium. Le cadmium est un métal lourd extrêmement toxique largement utilisé dans l'exploitation minière et l'exploitation métallurgique (Osman *et al*., 2000). On peut alors dire que les eaux d'arrosage des sites d'étude, malgré quelques traces de plomb, ne présentent pas de risques toxicologiques majeurs. La comparaison des teneurs moyennes en plomb a montré que les eaux superficielles de marécage d'Agongbomey sont plus polluées que les eaux de forage ou d'alimentation des autres sites. Ces résultats confirment les travaux d'Edorh *et al*. (2007) qui ont abouti à la conclusion selon laquelle les eaux de forage et de puits proviennent des nappes souterraines, résultat de l'infiltration des eaux superficielles et de pluie. L'utilisation de forages bien entretenus semble alors mieux adaptée que les terres creusées de marécage. Cette pollution des eaux d'arrosage pourrait affecter la qualité des légumes et la santé des populations. Cette hypothèse a été vérifiée par les enquêtes sociales réalisées par Ladikpo (2009) et révélant que les eaux utilisées pour l'arrosage des légumes en zone urbaine contiennent des agents pathogènes pour les consommateurs de ces cultures.

Les feuilles de *S. macrocarpon* de tous les sites d'étude présentent une toxicité en plomb au-delà des normes définies par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Sur le site témoin de Glo-Djigbé, le taux de plomb est 9 fois supérieur à la valeur limite qui est de 0,1 mg/kg (FAO et OMS, 2001). Ce taux a été estimé à près de onze fois supérieur à la valeur normale sur les sites de Houéyiho et de Fidjrossè et 4 fois sur le site d'Agongbomey. Nous pouvons alors déduire que la pollution des feuilles de *S. macrocarpon* par le plomb provient de la contamination des sols et des fientes par ce métal lourd. C'est ce qu'ont souligné Kozlowski et Baraniecki (1997) en affirmant que généralement la présence de métaux lourds dans les feuilles de légumes est liée à celle de métaux dans le sol. Les fortes teneurs en plomb des sols de maraîchage expliquent leur accumulation dans les végétaux (Gnandi *et al*., 2008). L'amendement des sols par les fientes non compostées de façon correcte a tendance à rendre disponibles les métaux dans le sol (Mustin, 1987), d'où leur transfert vers les végétaux.

3.2.3.2. Rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets dans la qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*

Les sols de culture sont plus riches en plomb que les fientes. Cette situation est normale puisque les sols subissent une pollution plus forte (Mench et Baize, 2004). Les éléments traces métalliques sont introduits dans l'alimentation des poulets soit involontairement par le biais des aliments contaminés, soit volontairement comme additifs alimentaires, médicaments vétérinaires ou promoteurs de croissance (Gerber *et al*., 2008). Ces substances se retrouvent ensuite dans leurs déjections. La teneur en plomb a chuté après la digestion en anaérobiose des fientes de poulets. La toxicité des métaux, et notamment des métaux lourds, est liée non seulement à leur concentration, mais aussi et surtout à leur spéciation. Seule la forme libre du métal comporte un risque de toxicité, et la concentration en métaux solubles n'est généralement que de 0,5 à 4 % de la concentration totale en métaux. La digestion en anaérobiose ne détruit pas les métaux mais elle modifie leur spéciation par différents mécanismes chimiques et surtout biologiques : adsorption par chimiesorption, précipitation chimique ou biologique, complexation intracellulaire ou extracellulaire sur des composés organiques ou inorganiques (Couturier, 2002).

La matière organique forme ainsi des complexes avec les métaux. L'adsorption des métaux à la surface des cellules serait due à un mécanisme de chimiesorption par des groupements fonctionnels d'acides organiques. Son importance est liée à la quantité de matière solide présente et au degré d'affinité de chaque métal (Couturier, 2002).

Les micropolluants métalliques ne sont pas nécessairement éliminés mais fixés dans la fraction solide sous une forme non biodisponible (Couturier, 2002). Il faut souligner que les fientes de poulets ont des teneurs inférieures à celles de la norme NF U 44-051 [(180 mg/kg pour le plomb et 3 mg/kg pour le cadmium) (Leclerc, 2012)]. Le cadmium non détecté aussi bien dans les sols que dans les fientes n'a plus fait l'objet de recherche dans les feuilles de *S. macrocarpon* produit. Zhang *et al*. (2012) ne l'ont pas détecté non plus lors de l'évaluation de l'état toxicologique des fientes de poulets en Chine.

Les matières organiques ont une présence plus élevée dans les fientes que dans les sols, ce qui explique pourquoi l'amendement par les fientes est une nécessité depuis quelques décennies sur les sites maraîchers. La teneur en azote total, très élevée avant compostage a significativement diminué et a atteint une valeur comprise entre 10 et 16 mg/kg, proche de celle recommandée par les normes (ADEME, 2001). En effet, une teneur trop élevée en azote provoque une surchauffe du compost, ce qui aboutit à la mort des jeunes pousses. Cette diminution de l'azote est due au processus de méthanisation lié à la digestion en anaérobiose (Couturier, 2002). Cette action réductrice permet donc d'obtenir des fientes compostées qui sont prêtes pour l'amendement direct des légumes.

Bien qu'il n'y ait eu aucune différence significative relative à la teneur en phosphores totaux des fientes avant et après compostage, le pourcentage de phosphores assimilables a néanmoins connu une forte augmentation. Ce détail est assez important car c'est la forme disponible du phosphore pour la plante qui détermine la valeur d'un compost (ADEME, 2001). Le volet agronomique n'ayant pas fait l'objet de ce travail, il serait intéressant que des travaux en agronomie se fassent sur ce modèle de compostage afin que ses bienfaits culturaux soient établis en dehors de l'intérêt sanitaire prouvé par la présente étude. En effet, les résultats ont montré que la culture de *S. macrocarpon* avec des fientes ainsi compostées permet de produire des légumes sains du point de vue toxicologique.

Les valeurs obtenues suggèrent, lorsqu'elles sont comparées aux normes de référence [(0,5 mg/kg pour les Normes du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) et 0,3 mg/kg pour les Normes de la Commission Européenne (Dan-Badjo *et al*., 2013)], que les feuilles produites avec les fientes compostées n'ont pas beaucoup accumulé le plomb contrairement à celles produites avec les fientes sans compostage. La faible teneur remarquée dans ces feuilles montre que les métaux lourds à zéro pourcentage dans les légumes est utopique à cause du transfert sol-plantes et aussi de l'environnement (Gnandi *et al*., 2008). La réduction de cette pollution liée à l'usage de la présente technologie est donc un avantage en maraîchage urbain et périurbain afin de canaliser tout au moins la pollution en provenance des fientes de poulets.

Conclusion

Les légumes sont très utiles pour le bien-être des populations. Avec l'essor de l'agriculture urbaine, de nombreuses cultures maraîchères sont disponibles à Cotonou. Parmi celles-ci, *S. macrocarpon* occupe une place importante. La présente étude a permis de montrer que les feuilles et les fruits de ce légume sont riches en micronutriments, en macronutriments. De même, il a été prouvé qu'ils ont une action réductrice du cholestérol total, du LDL Cholestérol et des triglycérides tout en élevant le taux de HDL Cholestérol. Les tests de toxicité effectués ont suggéré une consommation sans risques toxiques. L'étude a également permis de se rendre compte que les fientes de poulets de plus en plus utilisées en substitution des engrais chimiques trop chers et les eaux d'arrosage des sites maraîchers contribuent à la contamination des légumes cultivés. Ces travaux ont aussi montré que les eaux de forage présentent des risques moindres, d'où leur promotion au détriment des eaux de marécage.

Pour trouver une alternative au défaut de compostage des fientes, véritable source de pollution, l'évaluation d' une technique a été proposée. Les résultats ont montré que le compostage des fientes pendant quatre semaines conduit à la diminution du taux de métaux lourds dans les sédiments obtenus ainsi qu'à une chute de la charge bactérienne dans le compost. C'est un processus de digestion en anaérobiose qui conserve les propriétés amendantes du compost en rendant disponibles les phosphores au profit des légumes. L' hygiénisation du compost a conduit à la production de légumes peu contaminés au regard des normes internationales régissant les contaminations microbiologiques et chimiques des denrées alimentaires. A l'issue de ces travaux, nous recommandons de :

- Restituer les résultats aux maraîchers et de les accompagner financièrement afin que chaque site maraîcher soit doté du modèle de digesteur évalué. Un projet est en cours de rédaction à ce propos.

- Mettre sur pied un 'Programme Cultures Maraîchères' en vue de gérer cette thématique. Le rôle de l'Approche Ecosystémique de la Santé dans le processus revêt une importance capitale.

Les consommateurs ne doivent pas être exclus de cette démarche. Loin de les effrayer, cette étude a été menée en vue de permettre la production de légumes exempts de polluants divers. Les règles minimales d'hygiène (lavage des mains, désinfection des produits maraîchers à consommer crus, cuisson correcte des aliments) ne doivent pas pour autant être occultées.

Perspectives de recherche

Les résultats de la présente étude constituent un véritable socle pour des recherches ultérieures. En effet, technicien de laboratoire de formation, le caractère multidisciplinaire de plus en plus prôné par les chercheurs a été appliqué. Ainsi, les domaines de la microbiologie, de la biochimie ont été alliés à ceux de la pharmacologie, de la nutrition et de la toxicologie. Plusieurs perspectives s'offrent à la jeune carrière scientifique enclenchée et seront assurées à travers l'encadrement d'étudiants en Master ou en thèse et ce, avec l'aide des chercheurs confirmés représentés par nos Directeurs de Recherche. A ce propos, des projets de recherche à soumettre à des bailleurs de fonds comme l'Union Économique et Monétaire Ouest-Africaine (UEMOA) à travers le Projet d'Appui à l'Enseignement Supérieur (PAES) et l'Organisation Ouest Africaine de la Santé (OOAS) sont en cours de rédaction pour certains et de finalisation pour d'autres.

- **Axe de recherche 1 : Evaluation de la qualité hygiénique de divers légumes dans la sous-région africaine et leurs impacts probables sur la santé des populations**

Il s'agira de rechercher certaines bactéries spécifiques (*E. coli* O148, O151, O152, O153, clostridies telluriques et fécales, etc.) qui ne font pas l'objet d'une détermination systématique à ce jour et ce, dans les cultures maraîchères. De nombreux cas de diarrhées et de toxi-infections alimentaires ont été signalés en Europe et un peu partout dans le monde. Il ne serait pas inutile de proposer des méthodes simples de recherche bactériologique afin d'assurer un bien-être des populations sans oublier l'adoption de comportements hygiéniques. De même, l'effet des métaux lourds sur les divers organismes sera apprécié à travers des tests sur des rats de souche Wistar. A ce titre, les métaux lourds comme l'arsenic, le cuivre, le plomb et l'aluminium seront utilisés pour apprécier le potentiel détox de quelques plantes comme *S. macrocarpon*, *Zingiber officinale*, etc.

- **Axe de recherche 2 : Propriétés antimicrobiennes de *S. macrocarpon* et de quelques légumes d'intérêt thérapeutique au Bénin**

Les composés chimiques présents dans les feuilles et fruits de *S. macrocarpon* suggèrent une activité antimicrobienne qu'il serait nécessaire d'explorer au laboratoire. Ainsi, la sensibilité de certaines espèces bactériennes sera testée à des extraits de feuilles et fruits de *S. macrocarpon* et à d'autres légumes comme *Vernonia amygdalina.*

- **Axe de recherche 3 : Promotion du compostage en anaérobiose**

N'étant pas agronome, une collaboration plus franche sera nouée avec des ingénieurs du domaine. Il s'agira d'évaluer la valeur fertilisante du compostage réalisé dans ces conditions et surtout d'accompagner la promotion de ce modèle créé sur tous les sites maraîchers du pays. Un projet sera initié à cet effet afin d'assurer un développement durable efficace surtout que le coût de ce matériel est à la portée des maraîchers.

- **Axe de recherche 4 : Recensement et évaluation des plantes utilisées dans le traitement des hyperlipidémies en Afrique de l'Ouest**

Cet axe permettra d'extraire les principes actifs responsables de cette activité de *S. macrocarpon* et d'autres plantes. Ainsi, la suite des travaux sera axée sur l'extraction et les essais sur les principes actifs à isoler en vue de la mise à disposition des populations, de Médicaments Traditionnels Améliorés répondant aux normes internationales.

Références bibliographiques

Abbott W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

Abdulrahman F.I. 2004. Studies in the chemical contents and pharmacological activities of the root-bark extract of *Vitex doniana* (Black Plum). Ph.D. Thesis, University of Maiduguri, Maiduguri, Nigeria, 108p.

Adandotohou R. 2009. Risques biologiques liés à la manipulation des produits de pêche dans les maquis de Cotonou. Mémoire de D.E.S.S, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 58p.

ADEME. 2001. Dossier documentaire « Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture », réf. 3832, ISBN 2-86817-561-9, disponible sur www.ademe.fr, consulté le 15 mars 2012 à 14 heures 30 minutes.

Adoum O.A. 2009. Determination of toxicity levels of some savannah plants using Brine Shrimp Test (BST). Bajopas, 2(1): 135-138.

Agbo C.U., Chukwudi P.U., Ogbu A.N. 2012. Effects of rates and frequency of application of organic manure on growth, yield and biochemical composition of *Solanum melongena* L. (cv. 'Ngwa local') fruits. Journal of Animal & Plant Sciences, 14(2): 1952-1960.

Agoreyo B.O., Obansa E.S., Obanor E.O. 2012. Comparative nutritional and phytochemical analyses of two varieties of *Solanum melongena*. Science World Journal, 7(1): 5-8.

Agosto M. 1995. Valorisation agricole des déchets et risques sanitaires. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, France, 127p.

Akodogbo H. 2005. Contribution à l'amélioration de la qualité de l'eau à usage domestique dans le 5ème arrondissement de la commune de Porto-Novo au Bénin. Mémoire de Maîtrise Professionnelle, Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 65p.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edition, Washington DC, Association of Official Analytical Chemists, Section 923.03 and 962.09.

Araba A., Hachana Y. 2000. Caractérisation chimique et microbiologique des fientes de volaille en vue de leur utilisation en alimentation des ruminants. Actes Institut Agronomique et Vétérinaire du Maroc, 20(2): 83-88.

Arnal P.B.G. 2003. Sources et caractère entérotoxinogène des staphylocoques en élevage ovin laitier. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, France, 57p.

Arod E. 2007. BioDossier : Les causes des troubles chimiques. Biocontact, pp. 22-28, disponible sur http://www.hyperactif.net/images/BC170arod.pdf, consulté le 27 octobre 2013 à 17 heures 08 minutes.

Assogba-Komlan F., Anihouvi P., Achigan E., Sikirou R., Boko A., Adje C., Ahle V., Vodouhè R., Assa A. 2007. Pratiques culturales et teneur en éléments antinutritionnels (nitrates et pesticides) du *Solanum macrocarpum* au Sud du Bénin. African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development, 7(4): 1-21.

Atidégla S.C.C. 2011. Effets des différentes doses d'engrais minéraux et de la fiente de volaille sur l'accumulation de biocontaminants et polluants (germes fécaux, composés azotés et phosphorés, métaux lourds) dans les eaux, les sols et les légumes de Grand-Popo au Bénin. Thèse de doctorat unique, Ecole Doctorale Pluridisciplinaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 316p.

Audigié D., Dupont G., Zonszain T. 1978. Manipulation d'Analyse Biochimique. Doin Editeurs, Paris, pp. 27-74.

Ayers R., Westcost D. 1989. Water quality for agriculture. FAO irrigation drainage paper 29 (revised). FAO, Rome, Italy, 158p.

Badiaga M. 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de Doctorat, Université de Bamako (Mali) et Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (France), 183p.

Bouedo A., Bertru M., Guiziou F., Bertrand M. 1993. Etude du risque de contamination fécale des eaux après épandage de lisier, hors série octobre 1993, informations techniques, Editions CEMAGREF, France, 55p.

Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. 1996. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité alimentaire et de la qualité des aliments.- *In* : Microbiologie Alimentaire, Ed. Lavoisier TEC & DOC, France, pp. 106-119.

Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., De Buyser M.L., Collette C., Garin-Bastuji B., Thorel M.F. 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 16(2): 452-471.

Bruckert E. 2013. Les hypertriglycéridémies: 10 questions pratiques. Médecine Clinique, Endocrinologie et Diabète, 62: 45-50.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes Médicinales. 3rd Édition, Éditions Tec & Doc et Médicales Internationales, Cachan, France, 1120p.

Callias C. 2007. Les alicaments dans la lutte contre l'hypercholestérolémie. Bulletin de la Société des Enseignants Neuchâtelois de Sciences, 30: 1-18.

Cap Sciences. 2004. La nutrition. Dossier Enseignant « A Table », 23p, disponible sur http://www.cap-sciences.net/upload/nutrition_nutriments.pdf, consulté le 11 novembre 2012 à 16 heures 30 minutes.

Carballo J.L., Hernández-Inda Z.L., Pérez P., García-Grávalos M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology, 2: 17-22.

CERPADEC-ONG. 2008. Manuel de l'apprenant en techniques de conduite et de production de cultures maraîchères, Ed. Tundé, République du Bénin, 20p.

Chaubeau-Duffour C. 1992. Toxi-infections alimentaires d'origine staphylococcique. Le Point Vétérinaire, 24(148): 33-40.

Cheek P.R. 1971. Nutritional and physiological implications of saponins: a review. Canadian Journal of Animal Science, 51(3): 621-632. doi:10.4141/cjas71-082.

Chidikofan G. 2010. Contribution à l'amélioration de la qualité des cultures maraîchères du site de Houéyiho à Cotonou au Bénin : cas de la laitue (*Lactuca sativa* L.). Mémoire de Master, 2IE Ouagadougou, Burkina-Faso, 56p.

Chinedu S.N., Olasumbo A.C., Eboji O.K., Emiloju O.C., Arinola O.K., Dania D.I. 2011. Proximate and phytochemical analyses of *Solanum aethiopicum* L. and *Solanum macrocarpon* L. fruits. Research Journal of Chemical Sciences, 1(3): 63-71.

CISMeF. 2007. Dépistage du saturnisme infantile en France entre 1995 et 2007. Environnement, Risques et Santé, 6(6): 425-432.

Clarke E.G.C., Clarke M.L. 1977. Veterinary Toxicology. Cassel and Collier Macmillan Publishers, London, pp. 268-277.

Codo R. 2012. Performance de l'apposition placentaire comme technique de diagnostic du paludisme placentaire à l'accouchement en zone de transmission stable. Mémoire de Master Professionnel, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 103p.

Couturier C. 2002. Effets de la digestion anaérobie sur les micropolluants et germes pathogènes. Solagro, 1-5.

Ctifl. 2001. Le Point sur la Maîtrise de la Qualité Hygiénique des Salades. Imprimerie Centr'Imprim, France, 4p.

Cuq J.L. 1991. Microbiologie alimentaire- Contrôle microbiologique des aliments. Livre pédagogique, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, 116p.

Dan-Badjo T.A., Guéro Y., Dan Lamso N., Baragé M., Abdourahamane B., Sterckeman Thibault, Ech Evarria G., Feidt C. 2013. Évaluation de contamination en traces métalliques de laitue et chou dans la vallée de Gounti, Niamey. Journal of Applied Biosciences, 67: 5326-5335.

Dao T.H., Zhang H. 2007. Rapid composition and source screening of heterogeneous poultry litter by X-ray fluorescence spectrometry. Annals of Environmental Science, 1: 69-79.

Daoust-Boisvert A. 2005. Des métaux lourds qui menacent la santé humaine et environnementale. UQAM Sciences Express du 11 avril 2005, Québec, Canada, 4p. disponible sur www.sciences.uqam.ca, consulté le 28 août 2013 à 10 heures 15 minutes.

De Buyser M.L. 1996. Les staphylocoques coagulase positifs.- *In* : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Ed. Lavoisier, chapitre 6, pp. 305-312.

Derel R., Aubert C. 2008. Evolution de la qualité microbiologique de fientes de poules pondeuses après séchage et au cours du stockage. TeMA, 7: 4-11.

de Saint Sauveur A., Broin M. 2010. Produire et transformer les feuilles de Moringa. Moringanews, Moringa Association of Ghana, Editions CTA, CDE; Horizon Gémeno, France, 69p.

Devi R., Sharma D.K. 2004. Hypolipidemic effect of different extracts of *Clerodendron colebrookianum* Walp in normal and high-fat diet fed rats. Journal of Ethnopharmacology, 90(1): 63-68.

Deweerdt L., Later R. 2009. Mise en place d'un laboratoire de biologie médicale autonome dans un pays en développement. Biologie tropicale, disponible sur http://www.bioltrop.fr/spip.php?article138#3.3.6, consulté le 17/05/2013 à 8 heures 30 minutes.

Dias J.S. 2012. Nutritional quality and health benefits of vegetables: A review. Food and Nutrition Sciences, 3(10): 1354-1374. doi:10.4236/fns.2012.310179.

Djamel K. 2009. Etude du polymorphisme de l'apoprotéine E dans la population constantinoise et dans les maladies. Thèse de doctorat d'état, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine, Algérie, 218p.

Dougnon J.T., Edorh A.P., Bankole H.S., Sezonlin M., Guedenon P., Kpodekon M., Gbeassor M. 2012. Bacteriological study of the fishmeal used in feed for imported chicken in Atlantic department. International Journal of Animal and Veterinary Advances, 4(1): 53-57.

Dougnon T.J. 2009. Effets de l'ananas, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), variété «Pain de sucre » sur le foie et les reins du rat Wistar intoxiqué au paracétamol. Thèse de doctorat unique, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 282p.

Dougnon T.V. 2012. Utilisation des fientes de poulets, des eaux de marécage en agriculture urbaine et qualité sanitaire de *Solanum macrocarpum L.* : Etude réalisée à Cotonou (République du Bénin). Editions Universitaires Européennes, France, 148p.

Dougnon T.V., Edorh P.A., Bankolé H.S., Dougnon T.J., Salifou S., Koumolou L., Montcho S.A., Boko M. 2012a. Evaluation of the toxicological quality of chicken's droppings used for the culture of *Solanum macrocarpum* L. in Cotonou (Republic of Benin), International Journal of Advanced Biological Research, 2(1): 91-94.

Dougnon T.V., Bankolé, H.S., Johnson R.C., Klotoé J.R., Dougnon G., Gbaguidi F., Assogba F., Gbénou J., Sahidou S., Atègbo J-M., Rihn B.H., Loko F., Boko M., Edorh A.P. 2012b. Phytochemical, nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin). Food and Nutrition Sciences, 3(11): 1595-1603.

Dougnon T.V., Bankolé H.S., Edorh A.P., Dougnon T.J., Klotoé J.R., Loko F., Boko M. 2013. Cytotoxicity of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) against shrimp larvae *(Artemia salina* Leach*)*. Research Journal of Recent Sciences, 2(5): 6-9.

Edberg C., Rice W., Karlin J., Allen M.J. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology, 88: 106-116.

Edorh A.P., Gnandi K., Elégbédé B., Enonhedo S.F., Boko M. 2007. Qualité de l'eau des nappes et son impact sur la santé des populations à Kérou. Climat et Développement, 4: 27-37.

Emebu P.K., Anyika J.U. 2011. Vitamin and antinutrient composition of kale (*Brassica oleracea*) grown in Delta State, Nigeria. Pakistan Journal of Nutrition, 10(1): 76-79.

El Jalil M.-H., Faid M., Elyachioui M. 2003. Biotransformation des déchets de volailles et essai de valorisation dans l'industrie de l'alimentation animale. Cahiers Agricultures, 12(3): 175-180.

E.P.S.I.C. 1999. Nutriments et énergie. Menu de la chimie: démonstrations disponibles et Travaux Pratiques (TP), Chapitre 7, pp. 1-6, disponible sur www.epsic.ch/branches/chimie/denrees/27valnu.pdf, consulté le 25 octobre 2013 à 16 heures 58 minutes.

FAO. 1999. Urban and peri-urban agriculture: for the consideration of the FAO Committee on Agriculture. Rome, Italy, 20p.

FAO, OMS. 2001. Report on the 32nd session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, ALINORM 01/12, Beijing, People's Republic of China, 20–24 March 2000. Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, 24th Session, 2–7 July, Geneva, Switzerland.

FFBA. 2012. Règlement médical, La nutrition. Document technique, 4p.

Florin N.H., Maddocks A.R., Wood S., Harris A.T. 2009. High-temperature thermal destruction of poultry derived wastes for energy recovery in Australia. Waste Management, 29(4): 1399-1408.

Fourmond D. 1982. Les fientes de volailles déshydratées dans l'alimentation des ruminants. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, France, 203p.

Franzluebbers A.J., Schomberg H.H., Endale D.M. 2007. Surface-soil responses to paraplowing of long-term no-tillage cropland in the Southern Piedmont USA. Soil and Tillage Research, 96(1-2): 303-315.

Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clinical Chemistry, 18: 499-502.

Gabada L. 2010. Pollution des eaux de boisson en milieux urbains par les métaux toxiques (Cu, Ni, Fe, Pb, Cd) : Cas de Kpalimè au Togo. Mémoire de Master, Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 74p.

Gbaguidi A.F. 2005. Identification, purification, isolement et quantifications de principes actifs de *Mitracarpus scaber* Zucc. et évaluation de leurs activités antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*. Thèse de doctorat Unique, Université d'Abomey-Calavi (Bénin) et Université Catholique de Louvain (Belgique), 176p.

Gerber P., Opio C., Steinfeld H. 2008. Poultry production and the environment – a review. Poultry in the 21st Century, 6: 1-27.

Ghule B.V., Ghante M.H., Saoji A.N., Yeole P.G. 2006. Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects of *Lagenaria siceraria* (Mol.) fruit extracts. Indian Journal of Experimental Biology, 44: 905-909.

Giri R.K., Kanungo S.K., Tripathi N.K. 2012. Hypolipidemic Activity of *Spinacia oleracea* L. in atherogenic diet induced hyperlipidemic rats. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research, 1(1): 39-43.

Gnandi K., Tozo K., Edorh P., Abi H., Agbeko K., Amouzouvi K., Baba G., Tchangbedji G., Killi K., Bouchet P., Akpagana K. 2008. Bioaccumulation de certains éléments métalliques dans les produits maraîchers cultivés sur les sols urbains le long de l'autoroute Lomé-Aného, Sud Togo. Acta Botanica Gallica, 155(3): 415-426.

Gobat J.M., Aragno M., Matthey W. 1998. Le sol vivant. Bases de la pédologie. Biologie des sols. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Collection Gérer l'Environnement N° 14, Lausanne, Suisse, 519p.

Goyens P. 2009. Besoins nutritionnels. In Enfant et nutrition : Guide à l'usage des professionnels. Edition Office de la Naissance et de l'Enfance (ONE), Benoît Parmentier -Chaussée de Charleroi, 95 - 1060 Bruxelles, pp 13-32, D/2009/74.80/11.

Grubben G.J.H., Denton O.A. 2004. Plant Resources of Tropical Africa Vegetables, Ponennad Looijenhv, Wageningen, Netherlands, 667p.

Guidi S.M.2007. Analyse socio-économique de la consommation des légumes à Cotonou: contraintes, attitudes et opportunités. Thèse de diplôme d'ingénieur agronome, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 111p.

Guimarães-Beelen P.M., Berchielli T.T., Beelen R., Filho J.A., de Oliveira S.G. 2006. Characterization of condensed tannins from native legumes of the Brazilian-northeastern semi-arid. Scientia Agricola, 63(6): 522-528.

Guo M., Qiu G., Song W. 2009. Poultry litter-based activated carbon for removing heavy metal ions in water, Waste Management, 30(2): 308-315.

Gupta G., Charles S. 1999. Trace elements in soils fertilized with poultry litter. Poultry science, 78: 1695-1698.

Gupta S.S. 1994. Prospects and perspective of natural plant products. Indian Journal of Pharmacology, 26(1): 1-12.

Györi Z. 1999. Crop quality as influenced by nutrient supply. (In Hungarian). In: Füleky Gy. (ed.) Nutrient economy. Mezôgazda, Budapest, Hungary, pp. 560-673.

Habteselassie Y., Bischoff M., Applegate B., Reuhs B., Ronald F. 2010. Understanding the role of agricultural practices in the potential colonization and contamination by *Escherichia coli* in the rhizospheres of fresh produce. Journal of Food Protection, 73: 2001-2009.

Hach. 1999. Digesdahl digestion apparatus: Instruction manual for models 23130-20-21. Hach, United States of America, 95p.

Hafner D., Heinen E., Noack E. 1977. Mathematical analysis of concentration-response relationships. Method for the evaluation of the ED_{50} and the number of binding sites per receptor molecule using the logit transformation. Arzneimittelforschung, 10:1871-1873.

Haggard B., Moore P.A.J., Chaubey I., Stanley E.H. 2003. Nitrogen and phosphorus concentrations and export from an Ozark Plateau catchment in the United States. Biosystems Engineering, 86(1): 75-85.

Hamidi A. 2013. Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Mémoire de Magister, Faculté des Sciences et de la Technologie et Sciences de la Matière, Université Kasdi Merbah Ouargla, République Algérienne Démocratique et Populaire, 111p.

Henk Z. 2000. L'agriculture urbaine et péri-urbaine, la santé et l'environnement urbain. Conférence électronique de la FAO-ETC/ RUAF sur l'agriculture urbaine et péri-urbaine, 11p.

Houghton P.J., Raman A. 1998. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Chapman and Hall, New York, United States of America, pp. 130-207. doi:10.1007/978-1-4615-5809-5.

Ighodaro O.M., Agunbiade S.O., Omole J.O., Kuti O.A. 2012. Evaluation of the chemical, nutritional, antimicrobial and antioxidant-vitamin profiles of *Piliostigma thonningii* leaves (Nigerian species). Research Journal of Medicinal Plant, 6(7): 537-543. doi:10.3923/rjmp.2012.537.543.

Kamdem L., Magdalou J., Biest G. 1981. Effect of aflatoxin B1 on the activity of drug-metabolizing enzymes in rat liver. Toxicology and Applied Pharmacology, 60(3): 570-578.

Kaneko J.J. 1989. Chemical biochemistry of domestic animals. California: academic press Inc. 4th edition, United States of America, 932p.

Karumi Y. 2005. Chemical and pharmacological studies of *Momordica balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. Ph.D. Thesis, University of Maiduguri, Maiduguri, Nigeria, 96p.

Kathirvel P. 2012. A Study on the proximate and mineral composition of *Crotalaria semperflorens* Vent. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 3(1): 64-66.

Kelleher B.P., Leahy J.J., Henihan A.M., O'Dwyer T.F., Sutton D., Leahy M.J. 2002. Advances in poultry litter disposal technology. Bioresource Technology, 83(1): 27-36.

Keshetty V., Pabba S., Gudipati R., Kandukuri J.M., Allenki V. 2009. Antihyperlipidemic Activity of methanolic extract of Garlic (*Allium sativum* L.) in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. Journal of Pharmacy Research, 2(5): 777-780.

Kim H.Y., Jeong da M., Jung H.J., Jung Y.J., Yokozawa T., Choi J.S. 2008. Hypolipidemic effects of *Sophora flavescens* and its constituents in poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 31(1): 73-78.

Klotoé JR.2013. Etude ethnobotanique et propriétés hémostatiques de quelques plantes médicinales du Sud-Bénin. Thèse de doctorat Unique, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 217p.

Kothiyal P., Gupta A.K. 2011. Antihyperlipidemic activity of aqueous and ethanolic extracts of fruits of *Kigelia africana* (Lam.) Benth. in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. Pharmacologyonline, 3: 386-395.

Kouassi J., Bekro Y., Ahou E., Baize D., Denezon O., Moussa B., Fatiha Z., Macaigne P. 2008. Diagnostic d'une contamination par les éléments traces métalliques de l'épinard (*Spinacia oleracea*) cultivé sur des sols maraîchers. European Journal of Scientific Research, 21(3): 471-487.

Kozlowski R., Baraniecki P. 1997. Culture du chanvre dans les zones polluées de Poznan (Pologne). Les échos du chanvre, 7: 6-8.

Krishna C.B., Ravindra B.S., Jayasree V., Alekhya R., Diana V.A., Jaji S. 2012. Antihyperlipidemic of *Ruellia tuberosa* Linn in triton induced hyperlipidemic rats. International Journal of Pharmacy, 2(4): 740-745.

Kwak W.S., Huh J.W., Maccaskey T.A. 2005. Effect of processing time on enteric bacteria survival and on temperature and chemical composition of broiler poultry litter processed by two methods. Bioresource Technology, 96(14): 1529-1536.

Ladiguina E.Y., Safronich L.N., Otriacheva V.E., Balandina I.A., Grinkevich N.I., Sorokina A.A., Glizin V.I., Molodojnikova L.M., Mitin Y.S., Samilina I.A., Ermakova V.A. 1983. Khimicheskii analiz lekarstvenii rastenii, Moskva Vischaya Chkola, p. 172.

Ladikpo A. 2009. Contribution au développement du maraîchage dans la commune de Porto-Novo, Mémoire de DESS, Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 96 p.

Lazureskii G.V., Terenteva I.V., Chamchurin A.A. 1966. Praticheskii raboti po khimii soedinienii, Edition Vischaya Chkola, Moscou, 334 p.

Lecesve L. 2008. Fabrication d'un biodigesteur familial. Rapport d'atelier, Hybrid Energies, 5p. disponible sur www.hybridenergies.org, consulté le 15 février 2012 à 20 heures 15 minutes.

Leclerc B. 2012. Compost de biodéchets des ménages. CRA PACA- Maison des Agriculteurs- 22 rue Henri Pontier 13626 Aix-en-Provence Cedex 1, 2p.

Leclerc H. 2008. Nitrates de l'eau d'alimentation et risques pour la santé. Notes de l'Académie de l'Agriculture de France, 4p, disponible sur www.inst.elevage.asso.fr, consulté le 11 mars 2012 à 14 heures 20 minutes.

Leclerc H., Mossel D.A.A., Edberg S.C., Struijk C.B. 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annual Review of Microbiology, 55: 201-234.

Lenntech. 2009. Note sur "Mercure, propriétés chimiques, effets sur la santé et l'environnement". Purification et traitement de l'eau, Holding B.V. Rotterdamseweg 402 M, 2629 HH Delft, Pays-Bas, 3p, disponible sur www.lenntech.fr, consulté le 26 février 2012 à 10 heures 32 minutes.

Lin S.-Y., Liu H.-Y., Lu Y.-L., Hou W.-C. 2005. Antioxidant activities of mucilages from different Taiwanese yam cultivars. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 46: 183-188.

Marly J., Vallet A., Pardon P. 1995. Evolution et maîtrise des contaminations des lisiers bovins par les salmonelles. Rencontres Recherche Ruminants, 2 : 307-310.

Mench M., Baize D. 2004. Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en traces. Mesures pour réduire l'exposition. Courrier de l'environnement de l'INRA, 52 : 31-56.

Métras R. 2003. Utilisations et dangers sanitaires microbiologiques liés aux effluents d'élevage, Thèse de doctorat unique de médecine vétérinaire, Université Claude Bernard, France, 150p.

Michael A.S., Thompson C.G., Abramovitz M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay, Science, 123: 464.

Misra R.V., Roy R.N., Hiraoka H. 2005. Méthodes de compostage au niveau de l'exploitation agricole, Documents de travail sur les terres et les eaux, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture, Genève, 48p.

Morton J. 1987. Tamarind In: Fruits of Warm Climates. Creative Resources Systems, Inc.: Miami, FL, USA, 115-121.

Moses E.A., Ogugbuaja V.O., Ogarawu V.C. 2002. Enrichment of element of Nigerian bituminous coal fly ash and their effects on haematological parameters of exposed rabbits. Nigerian Journal of Experimental and Applied Biology, 3(1): 95-100.

Mousseux M. 1995. Test de toxicité sur les larves de *Artemia salina* et entretien d'un élevage de balanes, Rapport de stage de 2ème année. DEUST Aquaculture; Centre Universitaire de Nouvelle-Calédonie, France, 20p.

Mustin M. 1987. Le compost : gestion de la matière organique. Edit. François Dubusc, France, 954p.

MVAD. 2003. Les matières organiques produites à la Réunion, chapitre 5, Guide d'informations, Base de données de la MVAD, Chambre d'Agriculture de la Réunion, 63p. disponible sur www.daf974.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Atlas_cle043584.pdf, consulté le 11 décembre 2011 à 16 heures 20 minutes.

Nwodo U.U., Ngene A.A., Anaga A.O., Chigor V.N., Henrietta I.I., Okoh A.I. 2011. Acute toxicity and hepatotoxicokinetic studies of *Tamarindus indica* Extract. Molecules, 16: 7415-7427.

OCDE. 2001. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Norme 423 adoptée le 17 décembre 2001, 14p.

Odou M.-F. 2013. Dossier Les analyses médicales. disponible sur http://www.doctissimo.fr/html/sante/analyses/ana_lipidique04.htm, consulté le 06 juillet 2013 à 13 heures 06 minutes.

Olaniyi A.A., Ayim J.S.K., Ogundaini A.O., Olugbade T.A. 1998. Essential inorganic and organic chemistry. Omoade Printing Press, Ibadan, Nigeria, 582p.

Omeira N., Barbour E.K., Nehme P.A., Hamadeh S.K., Zurayk R., Bashour I. 2006. Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. Science of The Total Environment, 367(1): 156-162.

Onana Onana L.G. 2006. Pratiques de fertilisation et caractéristiques des sols en zone maraîchère périurbaine de Yaoundé : cas des bas-fonds de Nkolondom. Mémoire de fin d'étude, Université de Dschang, Cameroun, 73p.

OPECST. 2001. Rapport sur le traitement de l'eau et métaux lourds. Lenntech, Rapport n° 261, France, pp 1-3.

Orech F.O., Akenga T., Ochora J., Friis H., Aagaard-Hansen J. 2005. Potential toxicity of some traditional leafy vegetables consumed in Nyang'oma division, Western Kenya. African Journal of Food and Nutritional Sciences, 5(1): 1-14.

Osman K., Åkesson A., Berglund M., Bremme K., Schütz A., Ask K., Vahter M. 2000. Toxic and essential elements in Placentas of Swedish women. Clinical Biochemistry, 33: 131-138.

Otshudi A.L., Vercruysse A., Foriers A. 2000. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomola area, Democratic Republic of Congo (RDC). Journal of Ethnopharmacology, 71(3): 411-423. doi:10.1016/S0378-8741(00)00167-7.

Ouali Alami F.-Z., El Abidi A., Mouhir L., Fekhaoui M., Serghini A., El Morhit M. 2013. Évaluation de la contamination par le cadmium, le zinc et le plomb du sol de la région de Rabat-Salé-Zemmour-Zaêr(Maroc). ScienceLib Editions Mersenne, 5(130305): 1-11.

Pamploma-Roger G.D. 1999. Encyclopaedia of Medicinal Plants. Education and Health Library: Madrid, Spain, 536p.

Parra A.L., Yhebra R.S., Sardinas I.G., Buela L.I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD_{50} value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine, 8: 395-400.

Patel J.S., Setty S.K., Chakraborty M., Kamath J.V. 2012. Antihyperlipidemic activity of Medohar Vati in triton x-100 induced hyperlipidemic rats. International Journal of Pharmaceutical Research and Development, 4(6): 125-130.

Pelka M., Distler W., Petschelt A., Dent J. 2000. A new screening test toxicity testing of dental materials. Journal of Dentistry, 28: 341-345.

Pilet C., Bourdon L., Toma B., Marchal N., Balbastre C. 1981. Bactériologie médicale et vétérinaire, systématique bactérienne, Doin éditeurs-Paris ; 2e édition, 2ème tirage, 431p.

Priyadarsan S., Annamalai K., Sweeten J.M., Holtzapple M.T., Mukhtar S. 2005. Co-gasification of blended coal with feedlot and chicken litter biomass. Proceedings of the Combustion Institute, 30: 2973-2980.

Qiu G., Guo M. 2010. Quality of poultry litter-derived granular activated carbon. Bioresource Technology, 101(1): 379–386.

Quignard E.L., Pohlit A.M., Nunomura S.M., Pinto A.C., Santos E.V., Morais S.K. 2003. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp, Acta Amazonica, 33: 93-104.

Rachid S., Hassan T. 2007. Cholestérol, lipoprotéine et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. Les technologies de laboratoire, 2: 4-11.

Rahmatullah M., Sadeak S.M.I., Bachar S.C., Hossain M.T., Mamun A., Jahan N. 2010. Brine shrimp toxicity study of different Bangladeshi medicinal plants. Advances in Natural and Applied Sciences, 4(2): 163-173.

Ramade F. 1991. Eléments d'écologie, écologie appliquée, action de l'homme sur la biosphère. McGraw-Hill, 4ème édition, Paris, 558p.

Ramos S.C.S., de Oliveira J.C.S., da Câmara C.A.G., Castelar I., Carvalho A.F.F.U, Lima-Filho J.V. 2009. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 19(2A): 376-381.

Riché D. 1998.Guide nutritionnel des sports d'endurance. 2è edition, Editions Vigot, France, 368p.

Roberts K.M., Daryl K.G., Peter A.M., Victor W.K. 2000. Harper's Biochemistry, 25th Edition, Lange Medical Book, Appleton and Lange, pp. 209-210.

Rodier J., Bazin C., Proutin J.P., Chambon P., Champsaur H., Rodi L. 1996. L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer, 8ème édition, DUNOD, Paris, 1384p.

Rose N., Beaudreau F., Drouin P., Toux JY., Colin RP. 1999. Risk factors for *Salmonella enterica sub sp. enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Preventive Veterinary Medicine, 39(4): 265-277.

Sandstead H.H., Penland J.G., Alcock N.W., Dayal H.H., Chen X.C., Li J.S., Zhao F., Yang J. J. 1998. Effects of repletion with zinc and other micronutrients on neuropsychologic performance and growth of Chinese children. The American Society for Clinical Nutrition, 68(2): 470S-475S.

Sanny S. 2002. Etude des biocontaminants et migration des agents toxiques dans les cultures maraîchères : cas du périmètre maraîcher de Houéyiho. Mémoire de Diplôme d'Ingénieur des Travaux, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 102p.

Santé Canada. 1991. La qualité bactériologique. Document de support aux «recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada». Disponible sur www.hc-sc.gc.ca/ehp/dhm/dpc_eau_qualite/eauguide.htm, Consulté le 22 septembre 2011 à 06 heures 25 minutes.

Santé Canada. 2006. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique, Ottawa (Ontario), Canada, 35p.

Schroeder H.A. 1976. Trace element and nutrition. Faber, London, pp. 30-46.

Shils M.E., Shike M., Ross A.C., Caballero B., Cousings R.J. 2006. Modern Nutrition in Health and Disease. 10th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, A Wolters Klumer Company, United Kingdom, pp. 280-281.

Showemimo F.A., Olarewaju J.D. 2004. Agro-nutritional determinants of some garden varieties (*Solanum gilo* L.). Journal of Food and Technology, 2(3): 172-175.

Sinha N.K. 2011. Handbook of vegetables and vegetables processing, Blackwell Publishing Ltd, England, 788p.

Sistani K.R., Brink G.E., Mcgowen S.L., Rowe D.E., Oldham J.L. 2003. Characterization of broiler cake and broiler litter, the by-products of two management practices. Bioresource Technology, 90(1): 27-32.

Sleet R.B., Brendel K. 1983. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology, Ecotoxicology and Environmental Safety, 7: 435- 446.

Solis P.N., Wright C.W., Anderson M.M., Gupta M.P., Phillipson J.D. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. Plant Medicine, 59: 250-252.

Sodipo O.A., Abdulrahman F.I., Akan J.C., Akinniyi J.A. 2008. Phytochemical screening and elemental constituents of the fruit of *Solanum macrocarpum* Linn. Continental Journal of Applied Sciences, 3: 85-94.

Sodipo O.A., Abdulrahman F.I., Sandabe U.K. and Akinniyi J.A. 2011. Drug therapy for hyperlipidaemia (dyslipidaemia)-A review. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(6): 01-06.

Sodipo O.A., Abdulrahman F.I., Alemika T.E., Gulani I.A. 2012. Chemical composition and biological properties of the petroleum ether extract of *Solanum macrocarpum* L. (Local Name: Gorongo). British Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 108- 128.

Sudha S.S., Karthic R., Naveen J.R. 2011. Anti hyperlipidemic activity of *Spirulina platensis* in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. Hygeia: Journal for Drugs and Medicines, 3(2): 32-37.

Su Y.C., Lee Wong A.C. 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. Journal of Food Protection, 60(2): 195-202.

Tchiégang C., Aissatou K. 2004. Données ethnonutritionnelles et caractéristiques physico-chimiques des légumes-feuilles consommés dans la savane de l'Adamaoua (Cameroun). Tropicultura, 22(1): 11- 18.

Tété-Bénissan A., Lawson-Evi K.A., Kokou K., Gbéassor M. 2012. Effet de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* Lam. sur l'évolution du profil de l'hémogramme des enfants malnutris au Togo: évaluation chez les sujets HIV positifs. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development. 12(2), 6007-6026.

Tewolde H., Shankle M., Adeli A., Sistani K.R., Rowe D.E. 2009. Macronutrient concentration in plant parts of cotton fertilized with broiler litter in a marginal upland soil. Soil and Tillage Research, 105(1): 1-11.

Ukpabi C.F., Akubugwo E.I., Agbafor K.N., Lebe N.A., Nwaulari N.J., Nneka E.D. 2012. Appraisal of heavy metal contents in commercial inorganic fertilizers blended and marketed in Nigeria. American Journal of Chemistry, 2(4): 228-233.

Ullah M.S, Islam M.S., Islam M.A., Hague T. 2008. Effects of organic manures and chemical fertilizers on the yield of brinjal and soil properties. Journal of the Bangladesh Agricultural University, 6(2): 271-276.

Vallet A., Marly J. 1997. Prévention du risque salmonellose : maîtrise des effluents contenant des déjections bovines, Groupement technique vétérinaire, 2 : 81-90.

Vanhaecke P., Persoone G., Claus C., Sorgeloos P. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 5: 382-387.

Venkatesham A., Vasu K., Srinivas P., Rajyalakshmi G., Jagan M.K. 2009. Antihyperlipidemic activity of methanolic extract of Garlic (*Allium sativum* L.) in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. Journal of Pharmacy Research, 2: 777-780.

Zhang F., Li Y., Yang M., Li W. 2012. Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in Northeast China. International Journal of Environmental Research and Public Health, 9: 2658-2668; doi:10.3390/ijerph9082658.

Zmirou D., Ferley J.P., Collin J.F., Charrel M., Berlin J. 1987. A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. American Journal of Public Health, 77: 582-584.

Znaïdi A. 2002. Etude et évaluation du compostage de différents types de matières organiques et des effets des jus de composts biologiques sur les maladies des plantes. Master of Sciences, Bari Mediterranean Organic Agriculture, CIHEAM Mediterranean Agronomic Institute, Italie, 94p.

Table des matières

Introduction……	1
Première partie : Synthèse bibliographique……	**5**
1.1. *Solanum macrocarpon*……	6
1.1.1. Botanique et culture de *S. macrocarpon*……	6
1.1.2. Ecologie de *S. macrocarpon*……	6
1.1.3. Maladies et parasites de *S. macrocarpon*……	7
1.2. Nutrition et substances impliquées……	7
1.2.1. Macro-nutrition……	7
1.2.1.1. Glucides……	7
1.2.1.2. Lipides……	8
1.2.1.3. Protides……	8
1.2.2. Micro-nutrition……	8
1.2.2.1. Vitamines……	9
1.2.2.2. Sels minéraux……	9
1.2.3. Autres substances intervenant dans la nutrition……	10
1.3. Troubles hypercholestérolémiques……	11
1.3.1. Cholestérol……	11
1.3.1.1. Définition du cholestérol……	11
1.3.1.2. Structure et rôle du cholestérol……	12
1.3.1.3. Double origine et transport du cholestérol par LDL et HDL……	13
1.3.1.3.1. Double origine du cholestérol……	13

1.3.1.3.2. Transport du cholestérol par LDL et HDL……..……	13
1.3.2. Hypercholestérolémie et ses causes…….…….....……	15
1.3.2.1. Hypercholestérolémie…….…….……..…..	15
1.3.2.2. Causes de l'hypercholestérolémie……..…….……	16
1.4. Fientes de poulets, agriculture urbaine et polluants…….……..	17
1.4.1. Caractéristiques des fientes de poulets……...……...	17
1.4.1.1. Composition chimique des fientes de poulets..……..……..	18
1.4.1.2. Concentration en éléments traces des fientes de poulets……...	18
1.4.1.3. Composition microbiologique des fientes……..……..…….....	20
1.4.1.4. Utilité des fientes de poulets dans le maraîchage……....	21
1.4.2. Agriculture urbaine……..	24
1.4.3. Etude de quelques polluants…….…….……..	24
1.4.3.1. Bactéries…….…….……..	24
1.4.3.1.1. Germes aérobies mésophiles ou flore totale……....	25
1.4.3.1.2. Coliformes thermotolérants…….……	25
1.4.3.1.3. *Salmonella*……..……...	26
1.4.3.1.4. *Enterococcus*…….……..……	27
1.4.3.1.5. *Staphylococcus* à coagulase positive…….……..	27
1.4.3.2. Métaux lourds…….……..……...	30
1.4.3.2.1. Plomb…….……	30
1.4.3.2.2. Cadmium…….……....	31

Deuxième partie : Matériel et Méthodes……..……..…….	**34**
2.1. Propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou…….……..	35
2.1.1. Cadre……...……..…..……	35
2.1.2. Matériel…….……..	35
2.1.3. Méthodes……..……...……..	36
2.1.3.1. Identification et authentification des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*…….	36
2.1.3.2. Traitement des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*…….….	36
2.1.3.3. Obtention de la poudre des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*…….	37
2.1.3.4. Tests phytochimiques……..……..……..……..	38
2.1.3.4.1. Recherche des alcaloïdes……	38
2.1.3.4.2. Recherche des composés polyphénoliques…….……	38
2.1.3.4.3. Recherche des dérivés quinoniques…….……..	39
2.1.3.4.4. Recherche des saponosides…….……...	39
2.1.3.4.5. Recherche des triterpénoïdes, des stéroïdes et des cardénolides……..	40
2.1.3.4.6. Recherche des dérivés cyanogéniques…….	41
2.1.3.4.7. Recherche des mucilages……..……..	41
2.1.3.4.8. Recherche des coumarines……..……...	41

2.1.3.4.9. Recherche des composés réducteurs……	42
2.1.3.4.10. Recherche des dérivés anthracéniques……	42
2.1.3.5. Dosage des éléments minéraux nutritionnels……	43
2.1.3.5.1. Sodium, potassium, calcium et magnésium……	44
2.1.3.5.2. Protéines……	44
2.1.3.5.3. Fer, cuivre, zinc et phosphores……	45
2.1.3.5.4. Dosage des lipides, cendres totales, teneur en eau, glucides et vitamines……	45
2.1.3.6. Dosage des éléments minéraux toxiques……	49
2.1.3.7. Test de cytotoxicité sur les larves de crevettes……	49
2.1.3.8. Evaluation des propriétés hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*……	51
2.1.3.8.1. Tests exploratoires de toxicité *in vivo* des poudres des feuilles et fruits……	51
2.1.3.8.2. Potentiel hypocholestérolémiant des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*……	54
2.1.3.9. Analyses statistiques……	57
2.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*……	58
2.2.1. Cadre……	58
2.2.2. Matériel……	59
2.2.3. Méthodes……	59

2.2.3.1. Détermination de la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers……..….	59
2.2.3.1.1. Technique de prélèvement des feuilles de *S. macrocarpon*……..	60
2.2.3.1.2. Technique de prélèvement des échantillons de sol et d'eaux…….	60
2.2.3.1.3. Protocole de dénombrement des coliformes thermotolérants et d' *E. coli*……..…	60
2.2.3.1.4. Protocole de recherche de *Salmonella*……..	61
2.2.3.2. Evaluation du rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets sur la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*……..……	62
2.2.3.2.1. Collecte des fientes de poulets et tests préliminaires……..	62
2.2.3.2.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets……..….	64
2.2.3.2.3. Mise en place des zones de culture sur le site expérimental……..	66
2.2.3.2.4. Evaluation de la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*…….……	68
2.2.3.2.5. Analyses statistiques…….……	68
2.3. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*…..…….……..….	69
2.3.1. Cadre ……..……..……..……	69
2.3.2. Matériel ……..……..…..	69

2.3.3. Méthodes ……..……..	70
2.3.3.1. Détermination de la qualité toxicologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers……..……...…….	70
2.3.3.2. Evaluation du rôle de la digestion en anaérobiose des fientes dans la qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*.....	70
2.3.3.2.1. Mise en place des zones de culture sur le site expérimental……..	71
2.3.3.2.2. Prélèvement des échantillons et tests toxicologiques……..	72
2.3.3.2.3. Analyses statistiques…….……	72
Troisième partie : Résultats et Discussion…….……	**73**
3.1. Résultats……..……..…..……	74
3.1.1. Propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon* cultivé à Cotonou …….....	74
3.1.1.1. Criblage phytochimique des feuilles et fruits de *S. macrocarpon*…….....	74
3.1.1.2. Profil nutritionnel des feuilles et des fruits de *S. macrocarpon*…….	75
3.1.1.3. Eléments toxiques présents dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*…….....	77
3.1.1.4. Cytotoxicité des feuilles et fruits de *S. macrocarpon*……..	77
3.1.1.5. Propriétés hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*……..…	79
3.1.1.5.1. Tests de toxicité *in vivo* des poudres des feuilles et fruits……..…..	79

3.1.1.5.2. Potentiel hypocholestérolémiant de *S. macrocarpon*……..	84
3.1.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*……	96
3.1.2.1. Qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers……..….	96
3.1.2.1.1. Charge des eaux d'arrosage et des feuilles de *S. macrocarpon* en coliformes thermotolérants……	96
3.1.2.1.2. Contamination de l'environnement de culture de *S. macrocarpon* par *Salmonella*…….……..	99
3.1.2.2. Rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets dans la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* cultivé.....…….	99
3.1.2.2.1. Teneur en bactéries des sols de culture et des fientes avant compostage…….….	99
3.1.2.2.2. Impact de la digestion en anaérobiose sur la charge bactérienne des fientes de poulets……..……	101
3.1.2.2.3. Culture de *S. macrocarpon* avec les fientes compostées et qualité microbiologique des feuilles…….……	101
3.1.3. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*…..……..…….	103
3.1.3.1. Qualité toxicologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers…….……	103
3.1.3.1.1. Teneur des fientes de poulets en métaux lourds…….	103

3.1.3.1.2. Teneur des sols maraîchers en plomb…….…..	104
3.1.3.1.3. Teneur des eaux d'arrosage en métaux lourds……..…	105
3.1.3.1.4. Teneur des feuilles de *S. macrocarpon* en plomb……..…	106
3.1.3.2. Impact de l'utilisation des fientes compostées sur la qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon* cultivé…….……..….	106
3.1.3.2.1. Teneur en métaux toxiques et valeur amendante des sols de culture et des fientes avant compostage……	106
3.1.3.2.2. Effet de la digestion en anaérobiose sur la valeur amendante et la teneur en métaux toxiques des fientes de poulets……..	108
3.1.3.2.3. Culture de *S. macrocarpon* avec les fientes compostées et qualité toxicologique des feuilles obtenues…….	111
3.2. Discussion……..……..……	112
3.2.1. Propriétés nutritionnelles et hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*……..……	112
3.2.1.1. Criblage phytochimique……..…….	112
3.2.1.2. Valeur nutritive des feuilles et fruits de *S. macrocarpon*……..	114
3.2.1.3. Métaux toxiques dans les feuilles et les fruits de *S. macrocarpon*…….……..……..……	116
3.2.1.4. Cytotoxicité de *S. macrocarpon*…….	116
3.2.1.5. Propriétés hypocholestérolémiantes de *S. macrocarpon*……...	117
3.2.1.5.1. Toxicité *in vivo* des poudres des feuilles et fruits……..….	117

3.2.1.5.2. Potentiel hypocholestérolémiant de *S. macrocarpon*……...	119
3.2.2. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon*…….….	122
3.2.2.1. Qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers…….	122
3.2.2.1.1. Charge des eaux d'arrosage et des feuilles de *S. macrocarpon* en coliformes thermotolérants……..……	122
3.2.2.1.2. Contamination de l'environnement de culture de *S. macrocarpon* par *Salmonella*…….……..	123
3.2.2.2. Rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets dans la qualité microbiologique des feuilles de *S. macrocarpon* cultivé……...	124
3.2.3. Digestion en anaérobiose des fientes de poulets et qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*……..……..…….	126
3.2.3.1. Qualité toxicologique des feuilles de *S. macrocarpon* sur les sites maraîchers…….…….	126
3.2.3.2. Rôle de la digestion en anaérobiose des fientes de poulets dans la qualité chimique des feuilles de *S. macrocarpon*……..	128
Conclusion……..……..…….……..……..	131
Perspectives de recherche…….…….	134
Références bibliographiques……..…….……	137
Table des matières…….……..……....	156

Annexes

Annexe 1 : Certificat d'identification de *S. macrocarpon*

Université d'Abomey-Calavi

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

HERBIER NATIONAL DU BENIN
---
01 B.P 4521 – Tél. 21 36 00 74 POSTE 127
COTONOU (R. Bénin)

CERTIFICAT D'IDENTIFICATION

Le Directeur de l'Herbier National du Bénin, soussigné, certifie que la plante récoltée par Monsieur **DOUGNON T. Victorien**, dans le cadre de ses travaux de recherche au Laboratoire de Toxicologie et de Santé Environnementale du CIFRED et au Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée de l'EPAC, est identifiée sous :

N° Identification	Nom scientifique	Famille
AA 6423/HNB	*Solanum macrocarpon* L.	Solanaceae

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

Abomey-Calavi, le 31 juillet 2012

Le Directeur,

Herbier National du Bénin – Le Directeur

Professeur Akpovi AKOEGNINOU.-

Annexe 2 : Techniques histologiques utilisées

Après dissection des rats et prélèvement des organes (foie), ils ont été conservés dans du formol à 10 %. Plusieurs étapes ont été suivies :

1. Mise en cassette des pièces

A partir des prélèvements réalisés, une pièce (1 x 1 x 0,5 cm) a été coupée à l'aide d'une lame de bistouri. Elle a été mise dans un support plastique appelé cassette d'inclusion.

2. Circulation

Cette étape a consisté à remplacer toute l'eau contenue dans le tissu par de la paraffine afin de faciliter les coupes. Trois opérations ont été réalisées à cette étape : la déshydratation, la clarification ou éclaircissement et l'imprégnation par la paraffine.

2.1. Déshydratation

Elle a consisté à plonger le tissu en cassette successivement dans 6 bains de méthanol de concentration progressivement croissante (70°, 85°, 95° et 100° x 3) à raison d'une heure par bain.

2.2. Clarification

Elle a été faite en plongeant les prélèvements dans deux bains de toluène d'une durée d'une heure chacun.

2.3. Imprégnation

Cette opération s'est effectuée dans la paraffine fondue à une température légèrement supérieure à son point de fusion (50°C et 60°C). A cette étape terminale de la circulation, les pièces ont été passées successivement dans deux bains de paraffine à raison d'une heure par bain.

3. Enrobage des pièces

L'enrobage a pour but d'inclure la pièce dans la paraffine afin de conférer à l'ensemble pièce et paraffine, une consistance homogène identique à celle de la paraffine solide. Le tissu après circulation a été introduit dans un moule métallique. La face sur laquelle la coupe a été réalisée est orientée vers le fond du moule. La paraffine fondue a été coulée sur le tissu centré dans le moule servant de support au bloc avant sa solidification. Le moule a été ensuite surmonté de la cassette d'inclusion par la face postérieure de sa base. La paraffine liquide a été complétée jusqu'au remplissage de l'ensemble moule/pièce/cassette. La solidification de la paraffine s'est faite sur platine refroidisseur. Après solidification de la paraffine, le moule a été retiré et le bloc a été obtenu.

4. Coupe des blocs (confection des rubans)

La coupe s'est faite au microtome, lequel possède un porte-bloc où se place l'ensemble cassette/paraffine solidifiée/tissu. Pour obtenir les rubans, le porte-bloc a été orienté à l'aide des vis moletées afin que les surfaces inférieure et supérieure du bloc soient strictement parallèles au tranchant du rasoir et que la surface du bloc soit en même temps verticale. La mince couche de paraffine qui recouvre le tissu a été enlevée par rabotage. De minces coupes de tissu de 5 microns d'épaisseur sont obtenues grâce à l'action rotationnelle qu'exerce le technicien sur la manivelle du microtome. Chaque section réalisée adhère à la suivante et on obtient à la fin un ruban.

5. Etalement des rubans

Sur une lame porte-objet recouverte d'une couche de liquide d'étalement (albumine glycérinée + eau préparée à 1volume pour 5) destinée à favoriser l'adhérence du tissu sur la lame, les segments du ruban de tissu précédemment obtenus ont été déposés. L'ensemble a été placé sur une plaque chauffante réglée à une température de 45°C environ : la solution d'albumine glycérinée s'échauffe et le segment du ruban s'étale progressivement. Les quelques plis qui persistent ont été éliminés en tirant délicatement à l'aide de deux lancettes sur les bords du ruban.

Après étalement, la préparation a été retirée de la plaque puis ramenée à la verticale sur du papier buvard pour enlever l'excès d'albumine glycérinée. La lame a été ensuite séchée pendant environ une heure à l'étuve à 45°C.

6. Coloration et montage des lames

Le processus de la coloration comporte quatre grandes étapes qui sont : l'étape préparatoire à la coloration, l'étape de la coloration proprement dite et l'étape préparatoire au montage.

Les coupes histologiques ont été enfin observées sur un microscope photonique de marque Olympus BX 41 muni d'une caméra (JVC, ½ pouces). Les observations ont été faites au grossissement X10 et les images enregistrées au format JPEG sur un ordinateur.

Annexe 3 : Protocole de recherche du plomb et du cadmium par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA)

Les poudres ont été incinérées au four à moufle à 550°C pendant 24 heures. La cendre ainsi obtenue a été dissoute dans 2 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 6N qui a été évaporé sur plaque chauffante à 125°C. Le reliquat plus ou moins visqueux obtenu a été à nouveau dissous et récupéré à l'aide d'acide nitrique (HNO_3) 0,1M dans une fiole de 100 ml. La solution ainsi obtenue a été utilisée pour doser le plomb par Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA). Les échantillons de sol ont été pré-attaqués à l'aide d'une solution de trois acides à savoir l'acide perchlorique ($HClO_4$) + l'acide chlorhydrique (HCl) + l'acide nitrique (HNO_3) puis chauffé pendant trois heures à 125°C ; après quoi on y a ajouté 2 ml de HNO3 puis 25 ml d'eau déminéralisée et filtrée dans une fiole de 100 ml. La solution ainsi obtenue a été utilisée pour doser les métaux par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA).

Principe de fonctionnement du SAA :

A une longueur d'onde spécifique, une partie de l'énergie lumineuse émise par la lampe à cathode creuse est absorbée par la solution de l'échantillon. Cette quantité d'énergie est utilisée par l'élément pour passer de son état « fondamental » à un état « excité métastable » : c'est l'énergie d'excitation. Elle est proportionnelle à la concentration en élément de la solution. Ainsi connaissant la quantité d'énergie absorbée par une solution échantillon, on déduit la concentration. Pour ce faire, on recourt à chaque fois à des solutions étalons (solutions préparées ou acquises dans le commerce) de concentration connue avec précision. Pour une gamme d'étalons, le dispositif optique de l'appareil calcule un paramètre (absorbance) pour chaque étalon. Il réalise alors une régression paramétrique qui lui permet de déterminer la concentration de chaque échantillon à partir de ce même paramètre déterminé et d'une courbe de régression pour l'échantillon. Pour permettre aux atomes de l'élément à l'essai d'être exposés uniformément à la source lumineuse, la solution de dosage est aspirée à travers un très fin capillaire puis pulvérisée dans la flamme alimentée par un mélange d'air et d'acétylène.

Les atomes ainsi libérés peuvent alors absorber une partie de l'énergie émise par la lampe à cathode creuse et permettre ainsi de déterminer l'absorption. Pour assurer la manipulation des signaux, le système optique est doté de détecteurs et amplificateurs précis et puissants.

Dans la pratique, on recourt chaque fois à des solutions étalons (solutions préparées ou acquises dans le commerce) de concentration connue avec précision. Pour une gamme d'étalons, le dispositif optique de l'appareil calcule un paramètre (absorbance) pour chaque étalon. Il réalise alors une régression paramétrique qui lui permet de déterminer la concentration de chaque échantillon à partir de ce même paramètre déterminé et de la courbe de régression. Pour le système flamme, les limites de détection de l'instrument se présentent comme suit :

- Pour le Plomb, 0,0100 ppm
- Pour le Cadmium, 0,0020 ppm ou 0,0005 ppm selon le SAA

Annexe 4 : Articles parus dans des revues scientifiques internationales dans le cadre des travaux de thèse (N=09)

Les travaux de la présente thèse ont permis de publier **09 articles** parus dans des revues scientifiques avec **Facteur d'Impact (03)**, des revues **indexées (04)** et des revues à **comité de lecture international seulement (02)** :

1- **Dougnon V**., Edorh P., Bankolé H., Dougnon J., Klotoé JR., Loko F., Creppy E.E., Boko M. **2013**. Présence du plomb dans les feuilles de *Solanum macrocarpon* Linn cultivé à Cotonou (Bénin) : rôle des fientes de poulets mal compostées. **Comptes Rendus Biologie, 336(5-6) : 261-264** (**Revue avec Facteur d'Impact = 1,915)**.

2- **Dougnon T.V.**, Bankolé H.S., Johnson R.C., Klotoé J.R., Dougnon G., Gbaguidi F., Assogba F., Gbénou J., Sahidou S., Atègbo J-M.**,** Rihn B.H., Loko F., Boko M., Edorh A.P. **2012**. Phytochemical screening, nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin). **Food and Nutrition Sciences**, **3(11)**: 1595-1603 **(Revue avec Facteur d'Impact = 0,24).**

3- **Dougnon V.T.**, Bankolé H.S., Edorh P.A., Dougnon J.T., Gouissi M., Hounkpatin A., Montcho S., Azonhè H., Klotoé J-R., Boko M. **2012.** Evaluation of the microbiological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum* L. cultivated with the chicken's droppings and water of marsh in Cotonou (Republic of Benin). **International Journal of Biosciences, 2(2)**: 45-52 **(Revue avec Facteur d'Impact = 0,076).**

4- **Dougnon V**., Bankolé H., Edorh P., Klotoé JR., Dougnon J., Fah L., Loko F., Boko M. **2013**. Acute toxicity of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) on Wistar rats: study about leaves and fruits. **American Journal of Biochemistry**, **3(3):** 84-88 **(Revue indexée).**

5- **Dougnon T.V**., Bankolé H.S., Klotoé JR., Sènou M., Fah L., Koudokpon H., Akpovi C., Dougnon T.J., Addo P., Loko F., Edorh A.P., Boko M. **2013**. Treatment of hypercholesterolemia: screening of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) as medicinal plant in Benin? **Biochemistry Research International,** *in press* **(Revue indexée).**

6- **Dougnon T.V.**, Bankolé H.S., Edorh A.P., Dougnon T.J., Klotoé J.R., Loko F., Boko M. **2013**. Cytotoxicity of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) against shrimp larvae (*Artemia salina* Leach). **Research Journal of Recent Sciences, 2(5)**: 6-9 (**Revue indexée).**

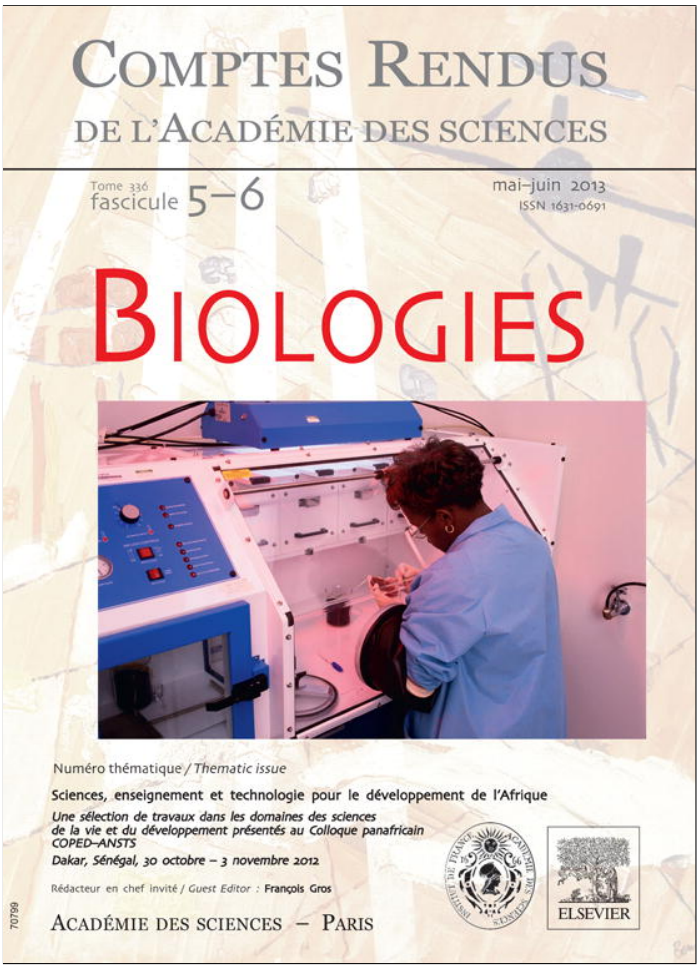
7- **Dougnon T.V**., Edorh P.A., Bankolé H.S., Dougnon T.J., Salifou S., Koumolou L., Montcho S.A**.,** Boko M. **2012.** Evaluation of the toxicological quality of chicken's droppings used for the culture of *Solanum macrocarpum* L. in Cotonou (Republic of Benin). **International Journal of Advanced Biological Research, 2(1)**: 91-94 **(Revue indexée).**

8- **Dougnon T.V.,** Dougnon T.J., Edorh P.A., Klotoé J.R., Sahidou S., Guédénon P., Sossou B., Boko M., Creppy E.E. **2012**. Microbiological and toxicological qualities of the water of watering used in urban agriculture in Cotonou (Republic of Benin). **International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 2(3)**: 19-23 **(Revue à comité de lecture international seulement).**

9- **Dougnon T.V**., Edorh P.A., Bankolé H.S., Dougnon T.J., Montcho S.A., Hounkpatin A., Gouissi M., Sossou B., Boko M., Creppy E.E. **2012.** Evaluation of the toxicological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum* L. cultivated with the chicken's droppings and water of marsh at Cotonou (Benin). **Journal of Research in Environmental Science and Toxicology**, **1(1)**: 001-006 **(Revue à comité de lecture international seulement).**

Article 1

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/authorsrights

Author's personal copy

C. R. Biologies 336 (2013) 261–264

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Comptes Rendus Biologies

www.sciencedirect.com

Colloque panafricain/Panafrican colloquium (Dakar 2012)

Présence du plomb dans les feuilles de *Solanum macrocarpon* Linn cultivé à Cotonou (Bénin) : rôle des fientes de poulets mal compostées

Presence of lead in leaves of Solanum macrocarpon *cultivated in Cotonou (Benin): Role of poorly composted poultry manure*

Victorien Dougnon [a,b,*], Patrick Edorh [a,c], Honoré Bankolé [b], Jacques Dougnon [b], Jean Robert Klotoé [b], Fréderic Loko [b], Edmond E. Creppy [d], Michel Boko [a]

[a] *Laboratoire de toxicologie et de santé environnementale, centre interfacultaire de formation et de recherche en environnement pour le développement durable (CIFRED), université d'Abomey-Calavi, 01 BP 1463 Cotonou, Bénin*
[b] *Laboratoire de recherche en biologie appliquée (LARBA), école polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin*
[c] *Département de biochimie et de biologie cellulaire, faculté des sciences et techniques (FAST), université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin*
[d] *Laboratoire de toxicologie et d'hygiène appliquée, unité de formation et de recherche en sciences pharmaceutiques, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 16 juillet 2013

Mots clés :
Fientes de poulets
S. macrocarpon
Plomb
Compostage

RÉSUMÉ

Le présent travail évalue l'impact de l'utilisation de fientes de poulets et d'eaux d'arrosage sur la qualité toxicologique de *Solanum macrocarpon*, un légume hautement apprécié. Un site témoin à Glo-Djigbé, des sites maraîchers de Houéyiho, de Fidjrossè et d'Agongbomey ont été inclus dans l'étude ; le plomb y a été recherché par spectrophotométrie d'absorption atomique. En ce qui concerne la teneur en plomb dans les fientes, ce métal y a été détecté selon des valeurs comprises entre 0,696 et 3,618 mg/kg. Le sol de Houéyiho (46,320 ± 0,651 mg/kg) est davantage contaminé par le plomb que les autres sites. Les eaux d'arrosage utilisées sur les sites d'étude sont légèrement contaminées par le plomb, avec des valeurs comprises entre 0,038 et 0,017 mg/L. Les feuilles de *S. macrocarpon* sont contaminées par le plomb selon des valeurs nettement supérieures à celles imposées par la FAO (0,1 mg/kg). Leur consommation sans précautions pourrait exposer les populations à des maladies liées à l'accumulation de ce métal.

© 2013 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Chicken droppings
S. macrocarpon
Lead
Compost

ABSTRACT

This work assesses the impact of the use of chicken manure and irrigation water on the toxicological quality of *Solanum macrocarpon*, a highly appreciated vegetable. A control site in Glo-Djigbé, gardeners' sites at Houéyiho, Fidjrossè, and Agongbomey were included in the study. Lead has been sought in the environment of *S. macrocarpon* culture by Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS). Regarding the content of lead in the droppings, the averages in mg/kg varied between 0.696 and 3.618. The soil of Houéyiho (46.320 ± 0.651 mg/kg) was more contaminated with lead than that of the other sites. The irrigation water used in the study sites was slightly contaminated with lead with values ranging between 0.038 and 0.017 mg/L. Leaves taken from the control site, Glo-Djigbé were contaminated with lead with a value of 0.936 ± 0.070 mg/kg compared to those of Agongbomey, Houéyiho and Fidjrossè. The leaves of *S. macrocarpon* were contaminated with lead at significantly values higher than those

* Auteur correspondant. Laboratoire de toxicologie et de santé environnementale, centre interfacultaire de formation et de recherche en environnement pour le développement durable (Cifred), université d'Abomey-Calavi, 01 BP 1463 Cotonou, Bénin.
Adresse e-mail : victorien88@hotmail.com (V. Dougnon).

1631-0691/$ – see front matter © 2013 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2013.04.006

Author's personal copy

imposed by the FAO (0.1 mg/kg). Consumption without precautions could expose people to diseases related to the accumulation of this metal.
© 2013 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

L'agriculture urbaine est devenue à travers le monde entier, et spécifiquement dans les pays en développement, l'une des activités nécessaires pour assurer la sécurité alimentaire des citadins. Les travaux de Smith et al. [1], de Niang [2], d'Akinbamijo et al. [3] et de Koc et al. [4] ont montré que l'agriculture urbaine est socialement importante. Le Bénin a connu un développement de l'agriculture urbaine, avec un fort usage d'intrants. Ainsi, la population a développé une stratégie locale de production maraîchère qui s'est traduite par l'utilisation des fientes de poulets et d'eaux des marécages pour amender et arroser les produits maraîchers. Mais la présence d'éléments traces dans les fientes représente une contrainte majeure envers son utilisation en agriculture. Cela pourrait être à l'origine d'intoxications alimentaires au niveau des consommateurs de légumes frais. Ayant donc remarqué qu'un nombre croissant de maraîchers préfèrent cette utilisation, ce travail a évalué les impacts que cette pratique pourrait avoir sur la qualité toxicologique de *Solanum macrocarpon*. Pour cela, l'étude a pris en compte le plomb. Des travaux ultérieurs s'étaient intéressés au cadmium et avaient fait l'objet de publications.

2. Cadre, matériel et méthodes d'étude

2.1. Cadre d'étude

Quatre sites ont été inclus dans l'étude, à savoir un site témoin à Glo-Djigbé, mis en place uniquement pour les besoins de l'étude, et trois sites maraîchers à Houéyiho, Fidjrossè et Agongbomey. Tous les maraîchers de ces sites utilisent les fientes de poules pondeuses pour amender les différentes cultures produites. Seul un site, celui de Glo-Djigbé n'a pas connu de compostage de fientes avant amendement des cultures. En effet, aucun compostage n'y a été réalisé, alors que sur les autres sites, les fientes sont laissées au séchage pendant trois jours à deux semaines environ. Deux systèmes d'arrosage, à savoir le forage et la terre creusée du marécage, sont pratiqués sur deux sites. Les deux autres sites d'étude connaissent un seul système d'arrosage : terre creusée de marécage pour le site d'Agongbomey et robinet pour celui de Glo-Djigbé.

2.2. Matériel d'étude

Des sachets blancs étiquetés avec des *markers*, des gants stériles, une glacière, etc. ont été utilisés pour les prélèvements. Un spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) et de la verrerie ont été utilisés pour les tests.

2.3. Méthodes d'étude

Il s'est agi d'une étude transversale qui s'est déroulée à Cotonou de novembre 2011 à janvier 2012, sur quatre sites de culture de *S. macrocarpon*. Sur chaque site, des prélèvements de sols, d'eaux d'arrosage, de feuilles de *S. macrocarpon* et de fientes ont été réalisés chez deux maraîchers choisis de façon aléatoire. Le plomb a été dosé au laboratoire des sciences du sol, eaux et environnement de l'Inrab au Bénin, selon la méthodologie décrite par Dougnon et al. [5]. Les moyennes et écarts-types ont été calculés et le test de Student appliqué avec un seuil de signification de 0,05 avec XL Stat 2011.

3. Résultats et discussion

3.1. Contamination des fientes de poulets

Les moyennes obtenues, en mg/kg, pour les fientes de poulets sont présentées sur la Fig. 1. On note un pic de contamination au niveau du site de Glo-Djigbé.

Les fientes ayant servi à l'amendement des différents sites d'étude sont toutes contaminées par le plomb. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Gupta et Charles [6], qui ont trouvé des valeurs inférieures à 35 mg/kg dans des échantillons de fientes. De même, Kouassi et al. [7] ont trouvé que les fientes épandues sur les sols maraîchers d'Abidjan sont riches en plomb. Cependant, elles demeurent faibles par rapport à la valeur seuil Afnor, qui est 180 mg/kg [7]. Ces indices de contamination sont significativement différents au niveau du site de Glo-Djigbé comparé aux autres sites. Cela serait certainement dû au fait que les fientes de poulets proviennent de divers poulaillers. Toutefois, la présence d'une forte concentration de plomb dans les fientes du site témoin de Glo-Djigbé n'ayant connu aucun compostage pourrait signifier que le compostage joue un rôle assez important dans la capacité de rétention de métaux lourds des fientes. En effet, des fientes humides et compactes retiendraient mieux le plomb que des fientes sèches, de la même manière que les sols lourds en retiennent [8].

3.2. Contamination des sols de maraîchage

Les moyennes obtenues sont présentées sur la Fig. 2. On remarque un pic de contamination du sol de Houéyiho par le plomb (Fig. 2).

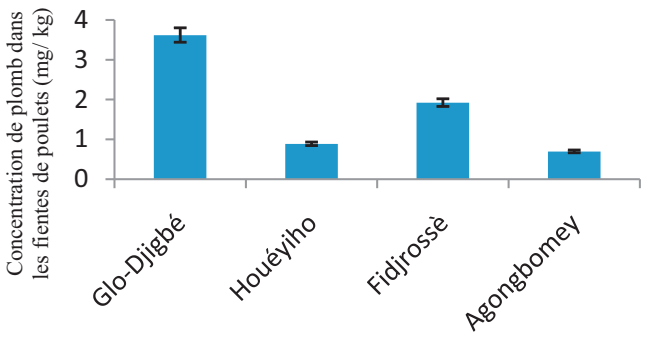


Fig. 1. Contamination des fientes par le plomb.

Author's personal copy

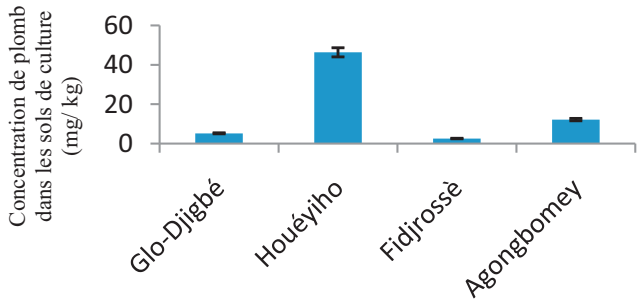


Fig. 2. Contamination des sols maraîchers par le plomb.

Les sols des sites maraîchers sont tous contaminés par le plomb. Ces résultats sont vérifiés par les travaux de Chidikofan [8], qui a souligné que le sol de Houéyiho était fortement contaminé par les métaux lourds. Cela pourrait s'expliquer par la situation géographique du site, au cœur du trafic routier. Toutefois, la pollution du sol du site témoin montre à quel point la pollution atmosphérique n'a pas de limites. Il ne faut néanmoins pas exclure le fait que les grandes quantités de fientes de poulets et de déchets organiques utilisés sur les sites maraîchers depuis des années pourraient avoir contaminé ces sols en plomb [8].

3.3. Contamination des eaux d'arrosage

Les eaux sont peu contaminées par le plomb, avec des moyennes comprises entre 0,017 et 0,038 mg/L. Elles contiennent donc des résidus de plomb à des taux inférieurs à la norme recommandée par la FAO. Cette norme est de 5 mg/L [9]. Chidikofan, qui avait travaillé sur le site de Houéyiho, a abouti aux mêmes conclusions [8]. On pourrait alors dire que les eaux d'arrosage des sites d'étude, malgré quelques traces de plomb, ne présentent pas de risques toxicologiques majeurs.

3.4. Contamination des feuilles de S. macrocarpon

Les moyennes obtenues sont présentées sur la Fig. 3. Les feuilles issues de tous les sites dépassent les normes fixées par la FAO en matière de contamination de légumes par le plomb.

Sur le site témoin de Glo-Djigbé, le taux de plomb est neuf fois supérieur à la valeur limite, qui est de 0,1 mg/kg [10]. Il a atteint près de 11 fois cette valeur sur les sites de Houéyiho et de Fidjrossè, et quatre fois sur le site

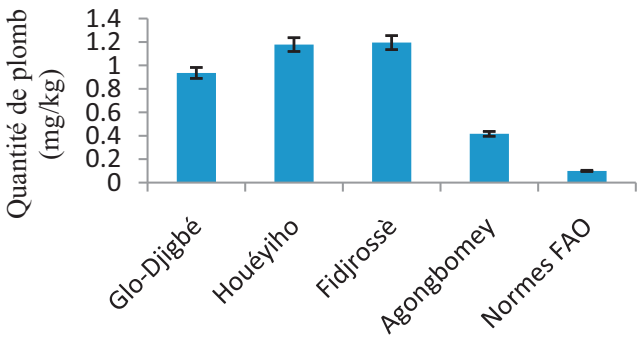


Fig. 3. Contamination des feuilles de *Solanum macrocarpon* par le plomb.

d'Agongbomey. La pollution de ces feuilles par le plomb serait alors due, soit à la contamination des sols par ce métal, soit à celle des fientes. C'est ce que soulignent Kozlowski et Baraniecki [11] en affirmant que, généralement, la présence de métaux lourds dans les feuilles de légumes est liée à celle de métaux dans le sol. L'amendement des sols par les fientes non compostées de façon correcte a tendance à rendre disponibles les métaux dans le sol [12]. Les fortes teneurs en plomb des sols de maraîchage devraient donc expliquer leur accumulation dans les végétaux [13]. Par ailleurs, le plomb peut aussi s'accumuler dans d'autres substances, telles que la viande d'escargot géant (*Achatina achatina*), comme l'ont notifié Edorh et al. [14]. Il ressort de ces travaux que les escargots ont accumulé des teneurs moyennes en plomb de 8,56 mg/kg. L'étude a considéré ces escargots comme des bio-indicateurs de la contamination par le plomb, ce qui n'est pas forcément le cas du légume étudié.

4. Conclusion

Des contaminations des fientes de poulets, des eaux d'arrosage, des sols et des feuilles de *S. macrocarpon* par le plomb ont été détectées sur tous les sites d'étude, avec des valeurs parfois supérieures aux normes recommandées par la FAO. La présence de métaux lourds dans les légumes des différents sites d'étude pourrait être à l'origine d'intoxications et nuisances alimentaires. Le compostage des fientes de poulets avant leur application sur les légumes fait partie des mesures atténuantes.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

[1] J. Smit, A. Ratta, J. Bernstein, Urban agriculture: an opportunity for environmentally sustainable development in sub-Saharan Africa, Washington (DC,), Banque mondiale, Environmentally Sustainable Division, African Technical Department. Post-UNCED Series, Building Blocks for Africa 2025, 1996.
[2] S. Niang, Utilisation des eaux usées domestiques en maraîchage périurbain à Dakar (Sénégal), Sécheresse 3 (1996) 217–223.
[3] O.O. Akinbamijo, S.T. Fall, O.B. Smith, Advances in crop-livestock integration in West African cities, ITC/ISRA/CRDI, Dakar, 2002.
[4] M. Koc, R. Macrae, J.A. Mougeot, J. Welsh, Armer les villes contre la faim : systèmes alimentaires urbains durables, CRDI, Sénégal, 2000.
[5] T.V. Dougnon, P.A. Edorh, H.S. Bankolé, T.J. Dougnon, S.A. Montcho, A. Hounkpatin, M. Gouissi, B. Sossou, M. Boko, E.E. Creppy, Evaluation of the toxicological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum L.* cultivated with the chicken's droppings and water of marsh at Cotonou (Benin), J. Res. Environ. Sci. Toxicol. 1 (1) (2012) 001–006.
[6] G. Gupta, S. Charles, Trace elements in soils fertilized with poultry litter, Poultry Sci. 78 (1999) 1695–1698.
[7] J. Kouassi, Y. Bekro, E. Ahou, D. Baize, O. Denezon, B. Moussa, Z. Fatiha, P. Macaigne, Diagnostic d'une contamination par les éléments traces métalliques de l'épinard (*Spinacia Oleracea*) cultivé sur des sols maraîchers, Eur. J. Sci. Res. 21 (3) (2008) 471–487.
[8] G. Chidikofan, Contribution à l'amélioration de la qualité des cultures maraîchères du site de Houéyiho à Cotonou au BENIN : cas de la laitue (*Lactuca sativa L.*), Mémoire de Master, 2IE, Ouagadougou, 2010.
[9] R. Ayers, D. Westcost, Water quality for agriculture. FAO irrigation drainage paper 29 (revised), FAO, Rome, Italy, 1989.
[10] F.A.O., Report on the 32nd session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, ALINORM 01/12, Beijing, People's Republic of China, 20-24 March 2000, in : Joint FAO/WHO Food Standard

Author's personal copy

Programme, Codex Alimentarius Commission, 24th Session, 2–7 July, Geneva, Switzerland, 2001.
[11] R. Kozlowski, P. Baraniecki, Culture du chanvre dans les zones polluées de Poznan (Pologne), Les échos du chanvre, 7, 1997, 6–8.
[12] M. Mustin, Le compost : gestion de la matière organique, Éditions François Dubusc, Paris, 1987.
[13] K. Gnandi, K. Tozo, P. Edorh, H. Abi, K. Agbeko, K. Amouzouvi, G. Baba, G. Tchangbedji, K. Killi, P. Bouchet, K. Akpagana, Bioaccumulation de certains éléments métalliques dans les produits maraîchers cultivés sur les sols urbains le long de l'autoroute Lomé–Aného, Sud Togo. Acta Bot. Gallica 155 (3) (2008) 415–426.
[14] A.P. Edorh, E. Agonkpahoun, K. Gnandi, P. Guédénon, L. Koumolou, C. Amoussou, A. Ayédoun, M. Boko, M. Gbeassor, H. Rihn, E. Creppy, An assessment of the contamination of *Achatina achatina* by toxic metals in Okpara village, Int. J. Biol. Chem. Sci. 3 (6) (2009) 1428–1436.

Article 2

Food and Nutrition Sciences, **2012, 3, 1595-1603**
doi:10.4236/fns.2012.311208 Published Online November 2012 (http://www.SciRP.org/journal/fns)

Phytochemical Screening, Nutritional and Toxicological Analyses of Leaves and Fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin)

Tamègnon Victorien Dougnon[1,2*], Honoré Sourou Bankolé[2], Roch Christian Johnson[1], Jean Robert Klotoé[2], Godfried Dougnon[3], Fernand Gbaguidi[4], Fidèle Assogba[5], Joachim Gbénou[5], Salifou Sahidou[2], Jean-Marc Atègbo[6], Bertrand Henri Rihn[7], Frédéric Loko[2], Michel Boko[1], Aléodjrodo Patrick Edorh[1,8]

[1]Laboratory of Toxicology and Environmental Health, Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, University of Abomey-Calavi (UAC), Cotonou, Benin; [2]Research Laboratory in Applied Biology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Benin; [3]Unit of Training and Research in Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Champ de Foire, Cotonou, Benin; [4]National Laboratory of Pharmacognosy, Benin Center of Scientific and Technical Research, and Essential Oils, Porto-Novo, Benin; [5]Laboratory of Pharmacognosy and Essentials Oils, Institute of Applied Biomedical Sciences, Champ de Foire, Cotonou, Benin; [6]Department of Animal Physiology, Faculty of Science and Technology, University of Abomey-Calavi (UAC), Cotonou, Benin; [7]CITHéFOR, Université de Lorraine, Nancy, France; [8]Department of Biochemistry and Cellular Biology, Faculty of Science and Technology, University of Abomey-Calavi (UAC), Cotonou, Benin.
Email: *victorien88@hotmail.com

Received September 15th, 2012; revised October 15th, 2012; accepted October 22nd, 2012

ABSTRACT

Vegetables are very important sources of protein and minerals. Some of them even have medicinal properties recognized traditionally. Despite the large number of studies carried out on various vegetables and vegetable crops, very few have scientifically explored the usefulness of *S. macrocarpon*. This study identified the main groups of chemicals and mineral elements to explain any medicinal or nutritional value. It has also identified some toxic elements contained in this vegetable. Phytochemical screening was carried out on the leaves and fruits of *S. macrocarpon*. Some mineral elements were determined by Atomic Absorption Spectrophotometry (sodium, potassium, calcium, magnesium) while protein, phosphorous, iron, copper, zinc and toxic metals (lead, cadmium) were determined by Molecular Absorption Spectrophotometry. Fat, ash, moisture and vitamins were sought. The study showed that the leaves of *S. macrocarpon* were more nutritious than fruits ($P < 0.05$). The high protein content of the leaves and fruit suggests an interesting nutritive property. The presence of chemical groups and toxic elements (lead, cadmium) in *S. macrocarpon* require that the consumption of vegetables should be as varied as possible and that the fruit may be consumed with caution. In addition, constraints about vegetable cultivation in Cotonou could lead to research findings that could help provide techniques for producing healthy vegetables.Vitamins A and K1 were found in both parts of this vegetable very rich in water while vitamin E has not been detected. *S. macrocarpon* also contains lipids at various levels.

Keywords: *S. macrocarpon*; Nutrients; Minerals; Lead; Cadmium; Cotonou

1. Introduction

S. macrocarpon is a vegetable commonly called "Gboma" in the local language (Fon) in Benin. It is a plant of the family Solanaceae like tomato, pepper and eggplant [1]. The botanical genus includes herbaceous plants or shrubs; leaves are usually alternate, sometimes opposite. The inflorescence is a cyme, usually single seed. The flowers are hermaphrodite, with star-shaped corolla with five petals often returned back. The protruding stamens form a cone around the gynoecium. The ovary is superior. Worldwide, there are about 1500 species of the genus Solanum [2]. The choice of *S. macrocarpon* by this study is justified by the fact that whereas its nutritional properties as a vegetable are appreciated by consumers [3], this plant seems to be of interest in traditional medicine [4]. Indeed, in Sierra Leone, heated leaves are chewed to treat throat problems [2]. In Nigeria, the fruits are eaten as laxatives and are used in the treatment of heart disease while the flowers and fruits are chewed for cleaning the teeth [2]. The leaves and young fruits are prepared and eaten as a vegetable [4]. In Kenya, the juice of boiled roots is drunk to get rid of hookworms

*Corresponding author.

Copyright © 2012 SciRes.

while the crushed leaves are used to treat stomach disorders [2]. In addition, *S. macrocarpon* has laxative and hypotensive properties [5]. The aqueous extract of fruits showed hypolipidemic activities and hepatoprotective effects [2]. Having noticed that all parts of this plant (fruits, leaves, etc.) are used either in the diet or in the treatment of several diseases, this study is proposed as a first step to make a comparative phytochemical screening between the leaves and fruits of *S. macrocarpon*. It then sought the nutritional value of these two parts of the plant. Despite these virtues ascribed to this vegetable, its conditions of production in Cotonou have several problems. Indeed, preliminary studies showed that the use of chicken manure for cultivation of vegetables, increasingly adopted by gardeners, infected the leaves by heavy toxic metals (lead, cadmium) and enterobacteria such as *Escherichia coli* [6]. This is why the study explored in a third time the toxicological properties of these two parts of this vegetable product by nearly 95% of market gardeners in Benin [7]. Despite the existence of recent studies on the fruits of *S. macrocarpon* [5,7], no study has really looked at the leaves of this vegetable. In addition, fruits studied by these authors were not necessarily the same variety as those of the present study. In Benin, no data of this kind about the leaves and fruits of *S. macrocarpon* existed.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The mature leaves and fruit of *S. macrocarpon* (**Figure 1**) were used in this study. They were purchased in July 2012 from the garden site of Houéyiho locatedat 6˚21'20" North latitude and 2˚21'35" East longitude in the Republic of Benin. The plant was identified and authenticated by the National Herbarium of Benin under No. 6423 AA/HNB of 31st July 2012.



Figure 1. Mature leaves and fruits of *S. macrocarpon* grown in Cotonou.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of the Plant for Testing

The leaves were dried at 16˚C in the Research Laboratory in Applied Biology, University of Abomey-Calavi for 17 days while the fruits were finely cut into small pieces and dried for 9 days. The leaves and dried fruits were ground for ten minutes using a SAYONA MOULINEX commercially purchased. The powders obtained were sieved using two sieves of 0.2 mm (mesh size) and stored in sterile containers until needed.

2.2.2. Phytochemical Screening

These tests were made on the basis of differential reactions (coloration and precipitation) of the major groups of chemical compounds contained in the plant according to the method of Houghton et Rama [8] reviewed and adapted to the conditions of the Laboratory of Pharmacognosy and Essential Oils of Institute of Applied Biomedical Sciences (Benin). Powders of the leaves and fruits were used and various chemical compounds were investigated (**Table 1**).

2.2.3. Determination of Nutrients

The first step was to mineralize powders of the leaves and fruits by the procedure described by Hach [9]. Sodium, potassium, calcium and magnesium were assayed both in leaves and fruits by Atomic Absorption Spectrophotometry (Atomic Absorption Spectrophotometer VARIAN SPECTRA 110 with flame) in Laboratory of Soil Science, Water and Environment/Research Center of Agonkanmey/National Institute for Agricultural Research of Benin while phosphorus, protein, iron, copper and zinc were determined by Absorption Molecular Spectrophotometry (Spectrophotometer DR 2800) in Quality Control of Water and Food Laboratory (Ministry of Health, Benin).

2.2.3.1. Determination of Sodium, Potassium, Calcium and Magnesium

Powders of the leaves and fruits were incinerated in a muffle furnace at 550˚C for 24 hours. The ash thus obtained was dissolved in 2 mL of hydrochloric acid (HCl) 6N which was evaporated on a hot plate at 125˚C. The more or less viscous remaining obtained was again dissolved and recovered using nitric acid (HNO_3) 0.1 M in a 100 mL flask. The solution obtained was used, either diluted or not, to assay components in accordance with EN 14082 reference standards.

Copyright © 2012 SciRes.

Table 1. Chemical groupspresent in theleaves and fruits of *S. macrocarpon*.

Chemical groups	Leaves of *S. macrocarpon*	Observations on leaves	Fruits of *S. macrocarpon*	Observations on fruits
Alkaloids (mayer's test)	+	Fishyprecipitate	+++	Fishyprecipitate
Quinone derivatives (born-trager reaction)	-	No pink or purplish red coloration	-	No pink or purplish red coloration
Tannins (ferric chloride test)	++	Black coloration	++	Black coloration
Cathetic tannins (stiasny test)	-	No precipitate	++	No precipitate
Gallic tannins (ferric chloride test after saturation with sodium acetate)	+	Slight blue tint	++	Blue tint
Flavonoids (shinoda test and magnesium powder)	-	No coloration	-	No coloration
Cyanogenic derivatives (picric acid test)	-	No brown coloration on paper soaked in picric acid	-	No brown coloration on paper soaked in picric acid
Triterpenoids (acetic acid test + mixture of acetic an hydride and sulfuric acid)	-	No blue color, green or purple	-	No blue color, green or purple
Steroids (kedde reaction)	-	No red color purple	-	No red color purple
Cardenolides (raymond reaction)	-	No blue coloration	-	No blue coloration
Saponins (test index foam)	++	Presence of foam greater than 1 cm	-	Negligible presence of foam
Anthocyanins (test with hydrochloric acid and ammonia diluted to half)	-	No coloration	-	No coloration
Leucoanthocyanes (shinoda test)	-	No coloration	-	No coloration
Mucilage (test of absolute alcohol)	+++	Flocculent precipitate	+++	Flocculent precipitate caked
Reducing compounds (test with fehling's solution)	+++	Red precipitate	+++	Red precipitate
Coumarins (test with ether andammonia)	-	No fluorescence	++	Presence of florescence
Free anthracene derivatives (test with chloroform andammonia)	-	No red color	-	No red color
Combined anthracene derivatives (test with chloro form andammonia)	-	No staining	-	No staining

+ = Weak presence; - = Absence; ++ = Moderate presence; +++ = High presence.

2.2.3.2. Protein Assay

This was determined according to Kjeldahl method, which consisted of sampling 10 mL of the mineralized solution to which 1/10 of potassium hydroxide (KOH) 12 N was added. Respectively 3 drops of mineral stabilizer and polyvinyl alcohol were made to blend. After up to 25 ml in reading tub with distilled water, 1 mL of NESSLER reagent was added before reading against distilled water treated in the same manner. This method yielded Kjeldahl nitrogen (TKN) by the following formula:

$$\mathrm{TKN}(\mathrm{mg/kg}) = 75 \times \mathrm{A}/\mathrm{B} \times \mathrm{C}$$

with A = value read in mg/L, B = weight committed during mineralization and C = Volume collected for analysis The detection limit of the apparatus is 1 mg/L and the protein rate was obtained by multiplying the previous results by a factor of 6.25 [9].

2.2.3.3. Determination of Iron, Copper, Zinc and Phosphorus

A known volume was neutralized (pH between 4 and 5) by addition of sodium hydroxide (NaOH) 5 N. The final volume was adjusted with distilled water in a known proportion. The reagents used for the assay were those recommended by [9]. Methods to Ferrozine (Method 8147) for the iron, to Bicinchoninate (Method 8026) for copper, ZINCOVER (Method 8009) for zinc and ascorbic acid (Method 8048) for phosphorus were used in accordance with instructions of Hach [9].

The following formulae were used to obtain the various results:

$$\mathrm{mg/kg(Fe,Cu,P)} = \mathrm{A} \times 2500/\mathrm{B} \times \mathrm{C}$$

$$\mathrm{mg/kg(Zn)} = \mathrm{A} \times 2500/\mathrm{B} \times \mathrm{C}$$

with A = value read on the apparatus in mg/L; B =

Copyright © 2012 SciRes.

weight committed during mineralization and C = Volume collected for analysis

2.2.3.4. Determination of Fat, Ash, Moisture and Vitamins

Determination of fat, ash and water content

Lipids were measured in both the leaves and fruits using the methodology described by Gbaguidi [10]. Ash and fiber have been investigated by the methods of the Association of Official Analytical Chemists namely section 923.03 for ash [11]. The water content of leaves and fruits of *S. macrocarpon* was assessed according to the methodology of Audigie *et al.* [12].

Determination of fat-soluble vitamins

Vitamins A, E and K1 were determined by HPLC using the method described below:

Preparation of stationary phase

It consists of a washing of the plate which is put vertically in a tank containing 50 mL of isopropanol for one hour. Then, the plate was removed and dried at 120˚C in an oven for 30 minutes.

Preparation of standard solution of vitamin

This was a methanolic solution of 1mg/ml prepared by dissolving retinol, α-tocopherol and vitamins A, E, K1 standard in methanol.

Preparation of sample

After weighing 2 g of sample into a 50 mL flask, add 10 mL of n-hexane on the test and leave for one hour with continuous stirring and then sonicate the whole for 30 min at ultrasound. Decant and collect 5 mL of filtrate into a 12 mL vial covered with aluminum foil and then evaporate together until dry. Take the dry residue in the flask with 5 mL of methanol and sonicate for 5 min. Filter the resulting solution in a small vial of 3 mL.

Analysis by HPTLC-D

1 mL of each sample extract and the standard solution was introduced into vials of apparatus which deposits on a stationary phase consisting of HPTLC Silica gel 60 F254s 20 × 10 (Merck) plate. Deposed volumes were 2, 3 and 5 L of retinol for the standard and 1, 2, 3, 5 L for standard α-tocopherol and vitamins and 10 µL for samples. Deposits were bands of 6 mm long and spaced by 11.2 mm. After deposition, the plate was removed, dried in air for 10 minutes and developed in a conventional tank of dimension 20 × 20 cm with the mobile phase consisting of the mixture acetone-methanol in the proportions 8:2 v/v. The saturation time of the plate was 15 minutes. Migration distance was 80 mm.

The plate was then removed from the tank, dried and observed at UV and placed in the Camag TLC Scanner III densitometer and read at 254 nm. Then the data were acquired and processed by the software winCATS 1.2.4.

Based on the amount deposited on the plate and the extraction volume, we determined the expression of the vitamin content given by the relation:

$$T(\mu g/100\ g) = 5.10^4 q$$

with q the quantity (µg) of vitamin in10 µL filed.

2.2.4. Toxicological Tests

Lead and cadmium were detected by Molecular Absorption Spectrophotometry (Spectrophotometer DR 2800) with dithizone [9]. After the mineralization phase, 20 mL of the mineral deposit were taken and made up to 250 mL with distilled water in a separating funnel fitted with taps, following the procedure for the extraction of cadmium and lead in pure chloroform recta [9]. A comparative reading with chloroform on the molecular absorption spectrophotometer DR 2800 was made.

The detection limits of the apparatus were 1 mg/L for lead and 0.2 mg/L for cadmium. The results were obtained by applying the following formula:

$$Cd(mg/kg) = 25 \times A/B \times C$$

$$Pb(mg/kg) = 25 \times A/B \times C$$

with A = value read on the apparatus in mg/L; B = weight committed during mineralization and C = Volume collected for analysis

2.2.5. Statistical Tests

Mann Whitney test which is a nonparametric test of comparing two by two averages was used. Assays for each parameter were repeated three times and the software Stat XL 2011 was used to compare the different values obtained for the leaves and fruit. A significance level of α = 0.05 was set. The results are presented as Mean ± Standard Deviation (SD) for nutrients and toxic values.

3. Results and Discussion

3.1. Results

3.1.1. Phytochemical Screening of the Leaves and Fruits of *S. macrocarpon*

Chemical groups present in both the leaves and fruits of this plant are presented in **Table 1**. The leaves of *S. macrocarpon* contain alkaloids, gallic (hydrolysable) tannins, mucilages, saponins and reducing compounds while the fruits contain alkaloids, cathetic (non-hydrolysable) and gallic (hydrolysable) tannins, mucilages, reducing compounds and coumarins.

3.1.2. Nutritional Analyses of the Leaves and Fruits of *S. macrocarpon*

The leaves of *S. macrocarpon* contain amounts of so-

Copyright © 2012 SciRes.

dium, potassium, calcium, magnesium, iron, copper, zinc and protein greater than those contained in the fruit ($P < 0.05$) (**Table 2**). On the other side, fruits contain more phosphorus (5100 ± 1 mg/kg) than leaves (4300 ± 2 mg/kg) ($P < 0.05$). The leaves and fruit of this vegetable contain lipid at respectively levels of 21,670 ± 71 mg/kg and 16,470 ± 19 mg/kg. The leaves and fruits are rich in water (respectively 88.6% and 92.9%). The total ash content ranged from 90.23% for fruits to 92.58% for the leaves. In addition, vitamin A was detected in both leaves (3530 mg/kg) and fruit (3680 mg/kg). It is the same for vitamins K1 found at varied levels in fruit (1320 mg/kg) and leaves (55 mg/kg). There was no presence of vitamin E in *S. macrocarpon* (**Table 2**).

3.1.3. Toxicological Tests

The leaves and fruits of *S. macrocarpon* were contaminated by lead and cadmium. The leaves (1.2 ± 0.1 mg/kg) were less contaminated by lead than fruits (1.6 ± 0.1 mg/kg) ($P < 0.05$) while there was no significant difference between the leaves (0.4 ± 0.01 mg/kg) and fruits (0.4 ± 0.03 mg/kg) with respect to the level of contamination by cadmium (**Figure 2**).

3.2. Discussion

3.2.1. Phytochemical Screening

This study found that the leaves and fruits of *S. macrocarpon* have a different chemical composition. The

Table 2. Nutritional value of the leaves and fruits of *S. macrocarpon*.

Parameters sought	Quantity in leaves (mg/kg)	Quantity in fruits (mg/kg)
Sodium	1760.33 ± 1.52 a	1370.33 ± 1.52 b
Potassium	45,960 ± 1.00 a	37,410 ± 1.00 b
Calcium	19,650 ± 1.00 a	3770 ± 1.00 b
Magnesium	5960 ± 1.00 a	2430 ± 1.00 b
Iron	251 ± 1.00 a	203 ± 1.00 b
Copper	40 ± 1.00 a	34 ± 1.00 b
Zinc	220 ± 1.00 a	156 ± 1.00 b
Protein	271,600 ± 1.00 a	147,000 ± 1.00 b
Phosphorus	4300 ± 2.00 a	5100 ± 1.00 b
Fat	21,670±71 a	16,470±19 a
Water content	88.6%	92.9%
Ash	92.58%	90.23%
Vitamin A	3530	3680
Vitamin K1	55	1320
Vitamin E	-	-

Means with different letters in different columns are significantly different at significance level $\alpha = 0.05$.

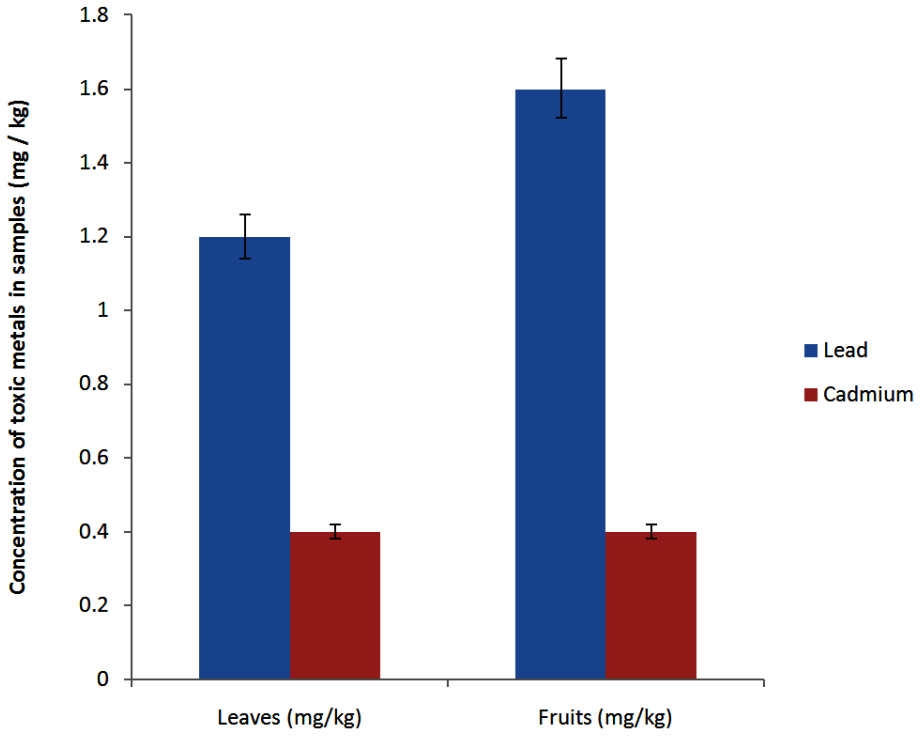


Figure 2. Contamination level of the leaves and fruits of *S. macrocarpon* by lead and cadmium.

Copyright © 2012 SciRes.

leaves contain alkaloids, gallic tannins (hydrolysable), mucilages, saponins and reducing compounds. The interest of this part of the study is that such investigation on leaves of this vegetable has never been made so far to determine whether the consumption of *S. macrocarpon* is actually free from hazard or not. Thus, according to the work of [13], tannins (especially hydrolysable) present in many plant foods have been identified as being responseble, in large doses, in decreasing in the rate of growth, protein digestibility in laboratory animals. The incidence of some cancers, such as esophageal cancer, has been linked to the consumption of foods rich in tannins, suggesting that tannins may be carcinogenic [13]. Nevertheless, the low presence of this antinutritional substance in the leaves of *S. macrocarpon* revealed by this study allows consumption. [14] for this purpose, revealed that the low concentration of tannins in vegetable is associated with positive effects on digestion. However, excessive daily consumption of this vegetable should be avoided as far as possible. The same suggestion was made by [15] who found traces of tannins in high consumption vegetable in Nigeria (*Brassica oleracea*). The fruits of *S. macrocarpon* contain hydrolysable tannins in a moderate proportion. These results are confirmed by the work of [5] in Nigeria who emphasized astringent properties of tannins and their physiological role in the treatment of injuries, which is not beneficial when compared to the harm that their strong presence in a vegetable can cause. Similarly, [16] have identified a moderate proportion of tannins in the fruits of *S. macrocarpon* in Nigeria. Unlike the leaves, these fruits contain a moderate amount of another type of non-hydrolysable tannins called cathetic tannins. The presence of total tannins (gallic + cathetic) in fruits suggests moderate consumption of this part of the vegetable. This situation explains why the leaves are widely consumed more than the fruits in Benin. The presence of alkaloids in the leaves (in small amount) and fruits (high proportion) suggests analgesic, anti-inflammatory properties and an increase in the potential for disease resistance and stress [17]. *S. macrocarpon* contains solanidine and solasodine which are toxic alkaloids [18]. The alkaloids found in this plant are responsible for its lipid-lowering activity. This explains why fruits are preferred to leaves in the treatment of cholesterol disorders in Nigeria [5,18]. However, because of the presence of toxic principles, the consumption of fruit must be strictly controlled. Until then, only the consumption of unripe fruit has been reported by a scientific study [18]. Mucilages are polysaccharides reported as antioxidants [19]. The strong presence of these compounds in the leaves as well as in the fruit probably implies that *S. macrocarpon* could present interesting antioxidant properties, which is important from a research perspective. The leaves and fruits of *S. macrocarpon* are rich in reducing compounds. The results of this study are confirmed by the work reported by [5] which revealed the presence of reducing sugars in the fruits of this vegetable. These reducing sugars are monosaccharides and disaccharides [20,21]. Vegetables mostly contain enough carbohydrates and reducing compounds. This is why it is advisable to have a varied diet rich in vegetables. The leaves of *S. macrocarpon* grown in Cotonou have a moderate amount of saponins. These chemicals are important dietary and nutritional reserves [16]. Saponins are glycolsidic in nature [5]. They have an expectorant action useful in the management of upper respiratory tract infections. According to [22], saponins are involved in the treatment of hypercholesterolemia. However, this study did not reveal their presence in the fruit. This result differs from those of [5] and [16] who have respectively found a moderate amount and a large quantity. These differences may be explained by the fact that our study was conducted in Cotonou (Benin), while others were carried out in two different regions of Nigeria. In addition, this study took into account the mature fruit, which is not necessarily the case in other studies. The fruits of *S. macrocarpon* contain a moderate amount of coumarins unlike leaves. This presence of coumarins in the fruit could make them exhibit anticoagulant, antimicrobial and spasmodic effects, a set of pharmacological properties recognized for coumarins [23]. Moreover, according to [24], testing for coumarins also highlights flavonoids and quinones. If this test is positive in the absence of flavonoids and quinones, as in the case in our study, the detection of coumarins is confirmed. The absence of steroids in fruits and leaves of *S. macrocarpon* was confirmed by the work of [16] on the fruits of *S. macrocarpon* grown in Nigeria. These authors also found flavonoids in the fruits, which is not the case in this study. The geographical origin of the samples could explain this difference, but the work done by [5] gave negative results consistent with those of the present study using the same method of Shinoda. The difference would then come from the method used by [16], which did not show, in addition, a strong presence of flavonoids in fruits of *S. macrocarpon*.

3.2.2. Nutritional Value of the Leaves and Fruits of *S. macrocarpon*

Several essential trace elements have some effects on various functions of people depending on their physiological or toxic concentrations [5]. The present study showed that the leaves of *S. macrocarpon* are richer in sodium, potassium, calcium, magnesium, iron, copper, zinc and protein when compared to the fruits that have a higher content of phosphorus ($P < 0.05$). However, the

Copyright © 2012 SciRes.

levels of these elements are quite high in these two parts of the plant. Calcium regulates a great number of physiological and biochemical functions [25]. Elements such as potassium, sodium, magnesium, iron, etc. play essential roles in maintaining human health [26-29]. Copper is involved in maintaining cardiovascular health, glucose and cholesterol metabolism [30]. Zinc is very useful in protein synthesis, cell division and maturation, immunity and sexual function [30]. The value of sodium contained in the fruits of *S. macrocarpon* grown in Cotonou (1370.33 mg/kg) was significantly lower than that of the fruit (6238.5 mg/kg) grown in Nigeria [5]. The same remark applies to the values of potassium, iron, copper and zinc. However, another study reported by [16] showed still in Nigeria that the fruits of *S. macrocarpon* studied contain less iron than those of the present study. These differences could easily be explained by the fact that the fruits do not come from the same soil. They come from different geological horizons and growing conditions are not necessarily the same. The results of this study also suggest that the fruit produced in Cotonou contain more magnesium, calcium, protein and phosphorus than those of Nigeria. Because the various elements contained in fruits are the products of secondary metabolism of plants, the value of this food should be appreciated in general and not considering each factor in isolation. To this end, we can say that the fruits of *S. macrocarpon* grown in Cotonou have interesting nutriational value, such as stated by [5] and [16] for those products in Nigeria. The leaves of *S. macrocarpon* produced in Cotonou are very nutritious as many vegetables grown in the world such as *Thalinum triangulare*, *Momordica charantia*, *Moringa oleifera* in Cameroon [31]; *Crotalaria semperflorens* in India [32]; *Piliostigma thonningii* [33] and *Solanum melongena* [34] in Nigeria. The amount of protein present in the leaves and fruits of *S. macrocarpon* is quite high and explains why it is so much appreciated by consumers. The water content of the fruits of *S. macrocarpon* is comparable to that found by [5] in Nigeria. This richness of fruits comparable to that of the leaves, which contain so much vitamins A. However, leaves are less rich invitaminK1than fruit. In addition, the high water content, low fat content of *S. macrocarpon* would favor preventive properties against constipation, colon cancer, etc. [35]. Sodipo *et al*. [5] have found similar results about ash content in the fruits of *S. macrocarpon*.

3.2.3. Toxic Metals in Leaves and Fruits of *S. Macrocarpon*

Lead and cadmium were detected at different values in the leaves and fruits. Although the leaves are less contaminated than the fruit by lead, it remains true that the values recorded for the two parts of the plant beyond those imposed by the AFNOR U44-041 which are 0.1 mg/kg for cadmium, 0.3 mg/kg and 0.5 mg/kg for lead [36]. In addition, *S. macrocarpon* is more contaminated by lead than cadmium. This is justified because the site of Houéyiho is not an industrial site and is only subject to heavy air pollution. Lead is more specific to air pollution than cadmium which is more industrial pollutant [37]. These results differ from those reported by [5] who detected no trace of lead or cadmium in fruits of *S. macrocarpon* in Nigeria. This difference is explained by the fact that the site of the Nigerian study was not a mining site or an area of industrial activity and atmospheric pollution. Contrary to this, the site of Houéyiho where the fruits and leaves were acquired is located in the heart of Cotonou and subjected to a major road and air traffic. This releases heavy metals into the atmosphere, contaminating vegetable products. Similarly, the large quantities of chicken manure and organic waste used contrib.-ute to contaminating the soil directly and vegetables indirectly. A study conducted six months earlier at the same site showed almost the same level of contamination of the leaves, even though it was atomic absorption spectrophotometry which was used [3]. This highlights the fact that vegetable pollution in Houéyiho is permanent and that no matter of which spectrophotometry is used (atomic or molecular), the results appear to be similar.

The leaves and fruits of *S. macrocarpon* contain chemical groups that give them interesting nutritional and medicinal properties. Despite these advantages, moderate consumption, especially of the fruit is recommended. In addition, the presence of toxic metals due to growing conditions in Cotonou requires the variation in the consumption of vegetables to avoid poisoning due to the accumulation of lead and cadmium.

4. Acknowledgements

Authors sincerely thank Mr. Elias POGNON, Chemical Engineer at the Laboratory for Quality Control of Water and Food (Ministry of Health) in Benin for the care. We sincerely appreciate Doctors Jacques DOUGNON and Olufunke SODIPO, M. Sika HOUNGNIHIN, Misters Alain AISSI, Alban HOUNGBEME, Mrs. Tatiana GOHOUN and Sabine MONTCHO for their various contributions.

REFERENCES

[1] CERPADEC-ONG, "Manuel de l'Apprenant en Techniques de Conduite et de Production de Cultures Maraîchères," 2008, p. 20.

[2] G. J. H. Grubben and O. A. Denton, "Plant Resources of Tropical Africa Vegetables," Ponennad Looijenhv,

Copyright © 2012 SciRes.

Wageningen, 2004, p. 667.

[3] T. V. Dougnon, P. A. Edorh, H. S. Bankolé, T. J. Dougnon, S. A. Montcho, A. Hounkpatin, M. Gouissi, B. Sossou, M. Boko and E. E. Creppy, "Evaluation of the Toxicological Quality of the Leaves of *Solanum macrocarpum* L. Cultivated with the Chicken's Droppings and Water of Marsh at Cotonou (Benin)," *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, Vol. 1, No. 1, 2012a, pp. 1-6.

[4] O. A. Sodipo, F. I. Abdulrahman, T. E. Alemika and I. A. Gulani, "Chemical Composition and Biological Properties of the Petroleum Ether Extract of *Solanum macrocarpum* L. (Local Name: Gorongo)," *British Journal of Pharmaceutical Research*, Vol. 2, No. 2, 2012, pp. 108-128.

[5] O. A. Sodipo, F. I. Abdulrahman, J. C. Akan and J. A. Akinniyi, "Phytochemical Screening and Elemental Constituents of the Fruit of *Solanum macrocarpum* Linn," *Continental Journal of Applied Sciences*, Vol. 3, 2008, pp. 85-94.

[6] V. T. Dougnon, H. S. Bankolé, P. A. Edorh, J. T. Dougnon, M. Gouissi, A. Hounkpatin, S. Montcho, H. Azonhè, J.-R. Klotoé and M. Boko, "Evaluation of the Microbiological Quality of the Leaves of *Solanum macrocarpum* L. Cultivated with the Chicken's Droppings and Water of Marsh in Cotonou (Republic of Benin)," *International Journal of Biosciences*, Vol. 2, No. 2, 2012b, pp. 45-52.

[7] F. Assogba-Komlan and P. Anihouvi, "Pratiques Culturales et Teneur en Eléments Anti Nutritionnels (Nitrates et Pesticides) du *Solanum macrocarpum* au Sud du Bénin," *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, Vol. 7, No. 4, 2007, pp. 1-21.

[8] P. J. Houghton and A. Raman, "Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts," Chapman and Hall, New York, 1998, pp. 130-207. doi:10.1007/978-1-4615-5809-5

[9] Hach, "Digesdahl Digestion Apparatus: Instruction Manual for Models 23130-20-21," Hach USA, 1999, p. 95.

[10] A. F. Gbaguidi, "Identification, Purification, Isolement et Quantifications de Principes Actifs de *Mitracarpus scaber* Zucc. et Evaluation de Leurs Activités Antimicrobiennes sur *Dermatophilus congolensis*," Thèse de Doctorat, Université d'Abomey-Calavi (Benin) et Université Catholique de Louvain (Belgique), 2005, p.176.

[11] AOAC, "Official Methods of Analysis (Section 923.03 and 962.09)," 15th Edition, Washington DC, Association of Official Analytical Chemists, 1990.

[12] D. Audigié, G. Dupont and T. Zonszain, "Manipulation d'Analyse Biochimique, " Doin., Paris, 1978. pp. 27-74.

[13] M. E. Shils, M. Shike, A. C. Ross, B. Caballero and R. J. Cousings, "Modern Nutrition in Health and Disease," 10th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, A Wolters Klumer Company, UK, 2006, pp. 280-281

[14] P. M. Guimarães-Beelen, T. T. Berchielli, R. Beelen, J. A. Filho and S. G. de Oliveira, "Characterization of Condensed Tannins from Native Legumes of the Brazilian-northeastern Semi-Arid," *Scientia Agricola*, Vol. 63, No. 6, 2006, pp. 522-528.

[15] P. K. Emebu and J. U. Anyika, "Vitamin and Antinutrient Composition of Kale (*Brassica oleracea*) Grown in Delta State, Nigeria," *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol. 10, No. 1, 2011, pp. 76-79.

[16] S. N. Chinedu, A. C. Olasumbo, O. K. Eboji, O. C. Emiloju, O. K. Arinola and D. I. Dania, "Proximate and Phytochemical Analyses of *Solanum aethiopicum* L. and *Solanum macrocarpon* L. Fruits," *Research Journal of Chemical Sciences*, Vol. 1, No. 3, 2011, pp. 63-71.

[17] S. S. Gupta, "Prospects and Perspective of Natural Plant Products," *Indian Journal of Pharmacology*, Vol. 26, No. 1, 1994, pp. 1-12.

[18] A. A. Olaniyi, J. S. K. Ayim, A. O. Ogundaini and T. A. Olugbade, "Essential Inorganic and Organic Chemistry," Omoade Printing Press, Ibadan, 1998, p. 582.

[19] S.-Y. Lin, H.-Y. Liu, Y.-L. Lu and W.-C. Hou, "Antioxidant Activities of Mucilages from Different Taiwanese Yam Cultivars," *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Vol. 46, 2005, pp. 183-188.

[20] J. Bruneton, "Parmacognosie-Phytochimie-Plantes Médicinales, 3rd Édition, Éditions Tec & Doc et Médicales Internationales, Cachan, Paris, 1999, p. 1120.

[21] A. L. Otshudi, A. Vercruysse and A. Foriers, "Contribution to the Ethnobotanical, Phytochemical and Pharmacological Studies of Traditionally Used Medicinal Plants in the Treatment of Dysentery and Diarrhoea in Lomola Area, Democratic Republic of Congo (RDC)," *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 71, No. 3, 2000, pp. 411-423. doi:10.1016/S0378-8741(00)00167-7

[22] P. R. Cheek, "Nutritional and Physiological Implications of Saponins: A Review," *Canadian Journal of Animal Science*, Vol. 51, No. 3, 1971, pp. 621-632. doi:10.4141/cjas71-082

[23] E. Y. Ladiguina, L. N. Safronich, V. E. Otriacheva, I. A. Balandina, N. I. Grinkevich, A. A. Sorokina, V. I. Glizin, L. M. Molodojnikova, Y. S. Mitin, I. A. Samilina and V. A. Ermakova, "Khimicheskii Analiz Lekarstvenii Rastenii," Moskva Vischaya Chkola, 1983, p. 172.

[24] G. V. Lazureskii, I. V. Terenteva and A. A. Chamchurin, "Praticheskii Raboti po Khimii Soedinienii," Édition Vischaya Chkola, Moscou, 1966, p. 334.

[25] K. M. Roberts, K. G. Daryl, A. M. Peter and W. K. Victor, "Harper's Biochemistry," 25th Edition, Lange Medical Book, Appleton and Lange, 2000, pp. 209-210.

[26] H. A. Schroeder, "Trace Element and Nutrition," Faber, London, 1976, pp. 30-46.

[27] E. A. Moses, V. O. Ogugbuaja and V. C. Ogarawu, "Enrichment of Element of Nigerian Bituminous Coal Fly Ash and Their Effects on Haematological Parameters of Exposed Rabbits," *Nigerian Journal of Experimental and Applied Biology*, Vol. 3, No. 1, 2002, pp. 95-100.

[28] F. I. Abdulrahman, "Studies in the Chemical Contents and Pharmacological Activities of the Root-Bark Extract of *Vitex doniana* (Black Plum)," Ph.D. Thesis, University of Maiduguri, Maiduguri, 2004, pp. 55-82.

[29] Y. Karumi, "Chemical and Pharmacological Studies of

Copyright © 2012 SciRes.

Momordica balsamina (Balsam Apple) Leaf Extract," Ph.D. Thesis, University of Maiduguri, Maiduguri, 2005, pp. 58-96.

[30] H. H. Sandstead, J. G. Penland, N. W. Alcock, H. H. Dayal, X. C. Chen, J. S. Li, F. Zhao and J. J. Yang, "Effects of Repletion with Zinc and Other Micronutrients on Neuropsychologic Performance and Growth of Chinese Children," *The American Society for Clinical Nutrition*, Vol. 68, No. 2, pp. 470S-475S.

[31] C. Tchiégang and K. Aissatou, "Données Ethnonutritionnelles et Caractéristiques Physico-Chimiques des Légumes-Feuilles Consommés Dans la Savane de l'Adamaoua (Cameroun), *Tropicultura*, Vol. 22, No. 1, 2004, pp. 11-18.

[32] P. Kathirvel, "A Study on the Proximate and Mineral Composition of *Crotalaria semperflorens* Vent," *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, Vol. 3, No. 1, 2012, pp. 64-66.

[33] O. M. Ighodaro, S. O. Agunbiade, J. O. Omole and O. A. Kuti, "Evaluation of the Chemical, Nutritional, Antimicrobial and Antioxidant-Vitamin Profiles of *Piliostigma thonningii* Leaves (Nigerian species)," *Research Journal of Medicinal Plant*, Vol. 6, No 7, 2012, pp. 537-543. doi:10.3923/rjmp.2012.537.543

[34] B. O. Agoreyo, E. S. Obansa and E. O. Obanor, "Comparative Nutritional and Phytochemical analyses of Two Varieties of *Solanum melongena*," *Science World Journal*, Vol. 7, No. 1, 2012, pp. 5-8.

[35] F. A. Showemimo and J. D. Olarewaju, "Agro-Nutritional Determinants of Some Garden Varieties (*Solanum gilo* L.)," *Journal of Food and Technology*, Vol. 2, No. 3, 2004, pp. 172-175.

[36] Ctifl, "Le Point sur la Maîtrise de la Qualité Hygiénique des Salades, " Imprimerie Centr'Imprim, France, 2001, p. 4.

[37] T. V. Dougnon, P. A. Edorh, H. S. Bankolé, T. J. Dougnon, S. Salifou, L. Koumolou, S. A**.** Montcho and M. Boko, "Evaluation of the Toxicological Quality of Chicken's Droppings Used for the Culture of *Solanum macrocarpum* L. in Cotonou (Republic of Benin)," *International Journal of Advanced Biological Research*, Vol. 2, No. 1, 2012c, pp. 91-94.

Copyright © 2012 SciRes.

Article 3

International Journal of Biosciences (IJB)
ISSN: 2220-6655 (Print) 2222-5234 (Online)
Vol. 2, No. 2, p. 45-52, 2012
http://www.innspub.net

RESEARCH PAPER OPEN ACCESS

Evaluation of the microbiological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum L.* cultivated with the chicken's droppings and water of marsh in Cotonou (Republic of Benin)

Victorien T. Dougnon[1,3,*], Honoré S. Bankolé[3], Patrick A. Edorh[1,2], Jacques T. Dougnon[4], Modeste Gouissi[1], Armelle Hounkpatin[1], Sabine Montcho[1], Hervé Azonhè[5], Jean-Robert Klotoé[3], Michel Boko[1]

[1]*Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, Laboratory of Toxicology and Environmental Health, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463 Cotonou, Benin*

[2]*Faculty of Science and Technology, Department of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou, Benin*

[3]*Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Human Biology, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin*

[4]*Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Animal Production and Health, Research Laboratory in Applied Biology , University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin*

[5]*Faculty of Arts and Social Sciences, Department of Geography, University of Abomey-Calavi, Benin*

Received: 29 December 2012
Revised: 02 February 2012
Accepted: 03 February 2012

Key words: *Escherichia coli*, salmonellas, coliforms, microbiology.

Abstract

This study has evaluated the microbiological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum L.* cultivated with chicken's droppings and water of watering. A pilot site at Glo and market-gardening sites of Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey were used as sites of study. The salmonellas and fecal coliforms whose *Escherichia coli* were required in the environment of culture of *Solanum macrocarpum L.* Eight samples resulting respectively from water of watering; soils and leaves were analyzed. No salmonella was detected on these samples. Water of watering of the pilot site of Glo is not contaminated by *Escherichia coli* compared to those of the sites of Houeyiho ($1.8.10^4 \pm 28.42$ UFC/100 ml) ; Fidjrosse ($0.95.10^4 \pm 70.10$ UFC/100 ml) ; Agongbomey (5545 ± 77.53 UFC/100 ml) ($p<0.05$). The leaves of *Solanum macrocarpum L.* were contaminated by *Escherichia coli* with different degrees according to the site: Glo ($35.65.10^4 \pm 457.08$ UFC/g); Houeyiho ($0,95.10^3 \pm 70.71$ UFC/g); Fidjrosse ($1.10^3 \pm 0$ UFC/g) ; Agongbomey ($0.9.10^3 \pm 0$ UFC/g) ($p<0.05$). In addition, *Escherichia coli* have strongly developed on the leaves of *Solanum macrocarpum L.* from the pilot site of Glo with a neutral pH (7.305 ± 0.064) compared to the other sites: 6.550 at Houeyiho; 6.480 at Fidjrosse and 6.445 at Agongbomey ($p<0.05$). The study has shown that the leaves of *Solanum macrocarpum L.* are contaminated by the enterobacteria and their consumption may expose the populations to some risks of enteric diseases.

*Corresponding Author: Dougnon Tamègnon Victorien ✉ victorien88@hotmail.com

Introduction

Urban agriculture became throughout the whole world and specifically in the developing countries, one of the activities necessary to ensure the food safety of the townsmen and to get financial resources with the unemployed persons of the cities. Mougeot (2006) reported that between 2015 and 2020, more half of the world population will live in urban or perish-urban zone. The role of urban agriculture is fully justified when taking into consideration this demographic explosion on a worldwide scale. Its contribution with the food production on a world level which was at 15 % in 1993 can have exceeded 33 % as from the year 2005 (Niang, 1996).

Smit *et al.* (1996) revealed that this activity is practiced in at least 90 towns of 31 countries of the Southeast Asia, of the Middle East, of Europa, of Sub-Saharan Africa, Antilles and North, Center, South America. In addition, 800 million people practice this activity on a worldwide scale (Koc *et al.*, 2000). The problems of urban agriculture and in West Africa were the subject resulted in the use of the chicken's droppings and water of the marshes to amend and sprinkle the market-gardening products. These poultry's droppings, as the many waste used in agriculture, contains organic matter and biogenic salts which constitute a contribution interesting for the soils of culture (Legret *et al.*, 1988). But the presence of pathogenic in the droppings represents a major constraint with its use in agriculture. Indeed, in the event of use of animals waste on the market gardenings (whose leaves are consumed), some pathogenic micro-organisms could pass in the excreta of the people infected to find itself in water of the marshes being used for watering of the cultures. The enterobacteria could be contained in these droppings and contaminate the plants which they are used to amend (Métras, 2003). This situation could induce medical problems with the fresh vegetable consumers.

Therefore, the conditions of production of the vegetable-leaves on the market-gardening soils at Cotonou do not guarantee their sanitary quality. As of several publications which show well its importance in cities (Akinbamijo *et al.*, 2002). Urban agriculture is thus socially very significant. The activities of production, transformation and marketing offer employment opportunities for a significant mass of the urban population in situation of chronic unemployment and the rural ones in seasonal migration.

Benin, like many African countries, experienced these last years a development of urban agriculture. In Cotonou, the market-gardening production and more precisely that of the vegetable-leaves is a reality impossible to circumvent. It contributes to the provisioning of the markets of the city in food products. The modernization and the intensification of the systems of production induce a stronger use of manures and comparable. The producers answer this request by the recycling of various types of waste (Akinbamijo *et al.*, 2002).

Thus, inside the city, the population developed a local strategy of market-gardening production which remarked that more and more market-gardeners prefer to use the droppings of chickens and water of marsh to amend and sprinkle their cultures, the study evaluated that practice's impact on the microbiological quality of *Solanum macrocarpum L.*, a vegetable highly appreciated at Cotonou (MVAD, 2003). It is then about a contribution in favor of food safety in Republic of Benin.

Materials and methods

Localization of the sites of study

Our survey took in account a witness site at Glo (6° 56 ' Northern latitude and 2°30' Eastern longitude) and market-gardening sites of Houeyiho (6° 21' 20" Northern latitude and 2° 21' 35" Eastern longitude), of Fidjrosse (6° 22' Northern latitude and 2° 24' Eastern longitude); of Agongbomey (6° 21' Northern latitude and 2° 24' 45" Eastern longitude) (Fig. 1).



Fig. 1. Localization of sites included in the survey.

Sampling

It has been used among others of the white sachets labeled to collect samples, of sterile gloves for withdrawals, an icebox for the transportation of samples. For exams to the laboratory, we used surroundings of culture as Rapid *E.coli*, some serological pipettes, drying ovens, the crushers.

On each site, we carried out in two different market-gardeners, some samples of soils; water of watering; leaves of *Solanum macrocarpum L.* 500 grams of fresh leaves were collected on the vegetable seedlings then introduced into hermetically tied plastic sachets. 500 grams of soils were taken with a depth ranging between 0 and 15 centimeters and put in plastic sachets. The samples of the water of watering were directly taken in sterile sachets at a rate of 0.5 liter. All the samples were transported in a refrigerator towards the laboratory in a one hour interval after the taking away where they were preserved at once at a temperature of 4° C. The microbiological analyses were carried out in the 24 hours following the test sample selections. The research for pH was made by the two weeks.

Methods of analysis

Microbiological analyses

The microbiological analyses were carried out in the Hygiene Section of Water and Food at the Service of the Biomedical Analyses Laboratories (Benin). The purpose of the microbiological analyses are to highlight the presence or not of fecal coliforms, specifically *Escherichia coli (E.coli)* and salmonellas in the samples of water, soils and leaves of *Solanum macrocarpum L.* The fecal coliforms and especially *Escherichia coli* were required because they are pilot presence of pathogenic microorganisms.

Research of fecal coliforms and *E.coli* on the leaves of *Solanum macrocarpum L.*

After having weighed 25 grams of the samples, we add Peptoned Plug Water (EPT) until the limit of 250 grams. That's what we call pre-enrichment. Then we carry out successive dilutions from 10^{-2} to 10^{-4} starting from pre-enrichment before sow by incorporation 1 ml of the dilutions of 10^{-3} and 10^{-4} on the medium Rapid *E.coli*. It has been incubated with 44°C during 24 hours ± 2 hours. All the colonies *of E.coli* appeared as violet and those of the fecal coliforms were blue.

Research of fecal coliforms and *E.coli* on the samples of water of marsh

It has been taken 1 ml of the sample and carried out successive dilutions with 10^{-1} and 10^{-2}. Then it has been taken 1ml of dilution with 10^{-2} and sow by incorporation on the medium Rapid *E.coli*. After incubating with 44°C during 24 hours ± 2 hours, the colonies *of E.coli* appeared as violets and those of the fecal coliforms were blue.

Research of fecal coliforms and *E.coli* on the samples of water of tap

We had to filter the sample and to deposit the filtrated membrane on the medium Rapid *E.coli* and incubate it with 44°C during 24 hours ± 2. The colonies *of E.coli* appeared as violets and those of the fecal coliforms were blue.

Research of salmonellas on the samples of leaves, soils and water

Either it is a sample of soils, water or leaf, the procedure is the same one. Indeed, it is necessary to weigh 25 grams of the sample, to supplement to 250 grams with Peptoned Plug Water (EPT), to incubate with 37°C during 18 hours, to sow 0,1 ml of this pre-

enrichment in 10 ml of medium Rappaport Vasiliadis and 2 ml of the same pre-enrichment in 20 ml of medium Kaufman, to incubate with 37°C during 24 hours ± 4, to insulate the colonies resulting from this enrichment on mediums Xylose Lysine Decarboxylase (XLD) and Hektoen, to incubate with 37°C during 24 hours ± 4, to select the characteristic colonies of salmonellas, to carry out the test of discrimination by sowing the urea medium and waiting for two hours. The salmonellas don't have urease.

Physicochemical analyses

The physicochemical analyses were carried out in the Analysis Laboratory of the Soils of the Agronomic Faculty of Science, in Republic of the Benin. It was about the determination of the pH. The measurement of the pH of the soils and the droppings informs about their degree of acidity or of alkalinity. With this intention, and in accordance with the standard of reference NF ISO 10390: 1994, the samples were filtered with a sieve of mesh 0,2 mm. Twenty grams of each sample were weighed in bechers and we add it 50 ml of distilled water which and agitated during 15 minutes using an agitator. The solution obtained was left at rest during thirty minutes. The reading of the pH was made using a pH-meter of straw mattress CG 825. For the water samples, the determination was done directly using the pH-meter of straw mattress CG 825 of manner in conformity with the standard of reference NF T 90-008: 2001.

Statistical analyses

It was calculated the averages and the standard deviations. Multiple comparisons consisting in comparing the averages using the test of Student p (T>t) = 0.05 were made. The softwares used are Microsoft Excel 2010 and XL Stat 2011.

Results

Presence of fecal coliforms in the culture's environment of Solanum macrocarpum L.

Water of watering

Water of watering of the witness site of Glo is not contaminated by fecal coliforms (0 UFC/100ml) whereas those of Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey are it respectively with $14.5.10^4 \pm 70.06$ UFC/100 ml; $8.5.10^4 \pm 106.01$ UFC/100 ml and $1.05.10^5 \pm 70.06$ UFC/100 ml. *Escherichia coli* misses on the witness site of Glo contrary with Houeyiho ($1.8.10^4 \pm 28.42$ UFC/100 ml), with Fidjrosse ($0.95.10^4 \pm 70.10$ UFC/100 ml) and with Agongbomey (5545 ± 77.53 UFC/100 ml) (Fig. 2). These differences prove to be significant since it is about total absence on the site of Glo and presence of coliforms on the other sites ($p < 0.05$).

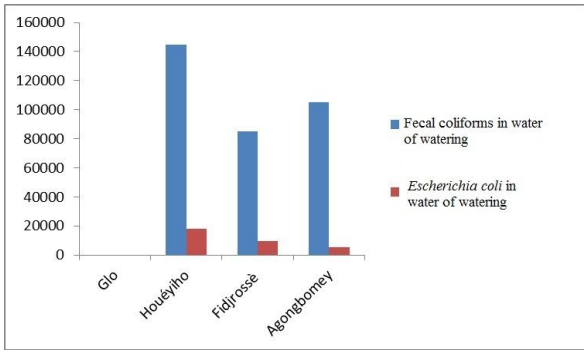


Fig. 2. Presence of fecal coliforms in water of watering.

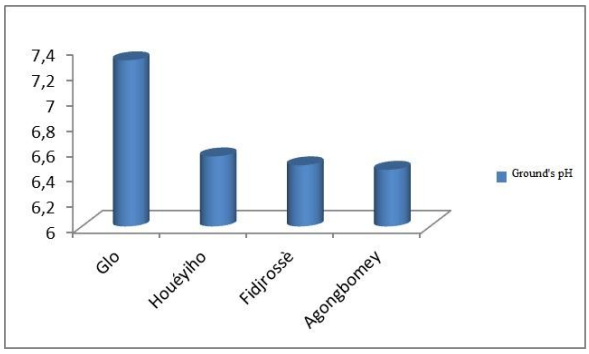


Fig.3. Variation of the soils pH according to site.

Vegetable leaves

The leaves of *Solanum macrocarpum L.* of the witness site of Glo are contaminated by fecal coliforms ($6.05.10^5 \pm 219.10$ UFC/g) whereas those of Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey are it respectively at a rate of $0.95.10^3 \pm 70.71$ UFC/g; $3.5.10^3 \pm 21.32$ UFC/g and $182.10^3 \pm 25.01$ UFC/g (Table 1).

Table 1. Presence of fecal coliforms in the leaves of *Solanum macrocarpum L.* according to sites.

Sites	G	H	F	A
Samples of *S.macrocarpum* leaves (UFC/g)	$4.5.10^5$	1.10^3	5.10^3	4.10^3
	$7.6.10^5$	$0.9.10^3$	2.10^3	$3.6.10^5$
Average	**$6.05.10^5$**	**$0.95.10^3$**	**$3,5.10^3$**	**182.10^3**
±Standard deviation	219.10a	70.71a	21.32a	25.01a

G, H, F and A are respectively the initials of Glo, Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey. The averages carrying the same letters are not significantly different with the threshold from significance $\alpha = 0.05$.

Table 2. Presence of *Escherichia coli* in the leaves of *Solanum macrocarpum L.* according to sites.

	Escherichia coli (UFC/g)			
Sites	G	H	F	A
Samples of leaves	$3.3.10^4$	1.10^3	1.10^3	$0.9.10^3$
	$6.8.10^5$	$0.9.10^3$	1.10^3	$0.9.10^3$
Average	**$35.65.10^4$**a	**$0.95.10^3$**a	**1.10^3**b	**$0.9.10^3$**b
± Standard deviation	457,08	70,71	0	0

G, H, F and A are respectively the initials of Glo, Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey. The averages carrying the same letters are not significantly different with the threshold from significance $\alpha = 0.05$.

The contamination of the leaves of *Solanum macrocarpum L.* by *Escherichia coli* is of $35.65.10^4 \pm 457.08$ UFC/g on the witness site of Glo whereas it is respectively of $0.95.10^3 \pm 70.71$ UFC/g; $1.10^3 \pm 0$ UFC/g and $0.9.10^3 \pm 0$ UFC/g on the sites of Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey. The statistical analyses revealed that the difference between the averages of Glo and Houeyiho is not significant with the threshold of significance $\alpha = 0.05$. On the other hand, it is it with the same threshold between the averages of Glo and Fidjrosse then Glo and Agongbomey (Table 2).

Contamination by the salmonellas of the environment of culture of Solanum macrocarpum L.

The salmonellas were not detected in the environment of culture of *Solanum macrocarpum L.* Indeed, it was observed 0 UFC/100 ml in all the samples of soils, of water of watering and the leaves of *Solanum macrocarpum L.* resulting from the sites of study.

Variation of the soils pH

With regard to the pH, the averages obtained are as follows: Glo (7.305 ± 0.064); Houeyiho (6.550 ± 0.014); Agongbomey (6.445 ± 0.120) ($p < 0.05$); Fidjrosse (6.480 ± 0.311) (Fig. 3).

Discussion

Presence of fecal coliforms in the environment of culture of Solanum macrocarpum L.

It was required the fecal coliforms whose *Escherichia coli* in water of watering and the leaves of *Solanum macrocarpum L.* because these bacteria are produced in the intestine of the animals. Soils also constitutes according to Pilet (1981) their natural habitat. But their presence in vegetables is abnormal and accounts for the sanitary quality of this food. The presence of fecal coliforms brought by our results can be an indication of the presence of micro-organisms like one notified Zmirou *et al.* (1987). Moreover, the presence of *Escherichia coli* confirms the effective presence of the fecal coliforms. Also, Habteselassie-Mussie *et al.* (2010) stress that *Escherichia coli* develops close to the roots of the plants and can contaminate the culture of the young growths. It can live during weeks around the roots of the plants and be transferred towards the edible parts.

Generally, the water of watering used on the market-gardening sites is contaminated by the fecal coliforms except for the witness site of Glo. This difference could be explained by the system of watering used. Indeed, on the site of Glo, the market-gardeners use the tap of

the National Company of Water of Benin whereas on the other sites, the soils systems of marsh dug (Houeyiho and Agongbomey) and of drilling (Fidjrosse) are adopted. Water of watering of Houeyiho is polluted in fecal coliforms than those of Agongbomey and Fidjrosse. The results of this study are in agreement with those of Akodogbo (2005) which stress that the water of drilling is polluted than that of the wells (soils dug of marsh). This author remarked in addition that the majority of the well rivers and drilling of Cotonou are invaded by the coliforms.

It is the same for *Escherichia coli* absent on the site of Glo but present on the other market-gardening sites. That confirms well this water of watering knew a recent fecal contamination. This is possible insofar as the majority of the aforesaid sites have a considerable insalubrity (human excrements and other waste). The depth of the wells is also a factor very significant because more water infiltrates, more it gets rid of its impurities; however the majority of the sources of watering of the market-gardening sites are located in hollows and are not deep. None water of watering, put besides those of the site of Glo meets the standards varying between 100 and 200 UFC/100 ml for the coliforms and *Escherichia coli*, proposed by Santé Canada (1991).

The leaves of *Solanum macrocarpum L.*, indeed, are contaminated by the fecal coliforms on all the sites of study. This contamination would be certainly due either to the microbiological quality of the water of watering used on these sites, or with the chicken dropping being used for the amendment. The presence of coliforms on the witness site of Glo, amended by the chicken dropping and where water of watering is those of tap could accuse the droppings of chickens like principal source of contamination. Indeed, the vegetable leaves resulting from the pilot site showed a strong rate of contamination by the fecal coliforms because the droppings used did not know any composting before the amendment of the seedlings. It confirms the results of Florin *et al.* (2009) which affirmed that the fecal rate of coliforms in vegetables decreases considerably if the composting of the droppings used to amend them is adequate. In addition, the leaves coming from all the sites present values higher than those imposed by the provincial Committee of Canada on the standardization and the interpretation of the microbiological criteria in the food which is of $1,0.10^2$ UFC/g (Santé Canada, 1991).

Presence of the salmonellas in the culture's environment of Solanum macrocarpum L.

Generally, no salmonella was found in the environment of culture of *Solanum macrocarpum*. The absence of these germs in the water of watering, the soils and the leaves of *Solanum macrocarpum L.* could mean there's no contamination of the droppings used for the amendment of this culture. Similar results were reported by Araba *et al.* (2000) which sought the salmonellas in nine samples of chicken droppings. Indeed, the enterobacteria are naturally present in the small intestine of the animals; their presence in a medium always has a fecal origin (Pilet, 1981).

However, Rose *et al.* (1999) identified factors of risk relating to the contamination at 70% by Salmonella in the chicken droppings. This difference could be related to the taking away of droppings coldly collected by these authors on the level of the hen houses contrary to the method of collection adopted during the present study. Indeed, the chicken droppings were obtained after transport and storage during several weeks before their use. Storage aims in particular to cleanse the manure, by the heating which produced there. Kwak *et al.* (2005) have for this purpose, evaluated the effects of an in core treatment deep of the chicken litter. They thus suggested that the correctly piled up poultry litter, with or without ventilation, ensures the elimination of the pathogenic enterobacteria in 8 days. Moreover, Araba *et al.* (2000) bound the absence of salmonellas in their study with storage carried out at the level of the farms preceding the microbiological examinations.

However, it could be that the droppings used for the present study results from farms which were free of salmonella's contamination.

The pH and Escherichia coli

Within the framework of this study, the soils of the witness site of Glo has a pH of 7,305, very near to neutrality. It is noticed that *Escherichia coli* strongly developed on the leaves resulting from this site contrary to the other sites whose pH is basic. Enterobacteria such that *Escherichia coli* develop with an optimum pH near to the neutrality which varies between 7, 2 and 7, 4 like remarked by Delahaye (2009). In addition, the alkalinity of the soils of Houeyiho and Agongbomey compared to that of the other sites could be explained by the seniority of the site; exploitation of the sites of Glo and Fidjrosse being more recent.

Conclusion

The results of this study indicate that no risk of contamination of the leaves of *Solanum macrocarpum L.* by the salmonellas was detected on the sites of production. On the other hand, some risks of contamination of water of watering by the fecal coliforms whose *Escherichia coli* were identified on the market-gardening sites except that of Glo on the one hand and some risks of contamination of the leaves of *Solanum macrocarpum L.* by the fecal coliforms and *Escherichia coli* were detected on all the studied sites on the other hand. The presence of pathogenic micro-organisms on vegetables of the various sites can be at the origin of food poisonings; this forecasts new prospects for research in order to cleanse vegetables consumed by the populations of Cotonou.

References

Akinbamijo OO., Fall ST., Smith OB. 2002. Advances in crop-livestock integration in West African cities. Dakar: ITC/ISRA/CRDI, p. 213.

Akodogbo H. 2005. Contribution à l'amélioration de la qualité de l'eau à usage domestique dans le 5ème arrondissement de la commune de Porto-Novo au Bénin, Mémoire de Maîtrise Professionnelle en Environnement et Santé, FLASH/UAC, p. 65.

Araba A, Hachana Y. 2000. Caractérisation chimique et microbiologique des fientes de volaille en vue de leur utilisation en alimentation des ruminants, Actes Institut Agronomique et Vétérinaire du Maroc, **20(2),** 83-88

Chidikofan G. 2010. Contribution à l'amélioration de la qualité des cultures maraîchères du site de Houéyiho à Cotonou au BENIN : cas de la laitue (*Lactuca sativa L.*), Mémoire de Master, 2IE Ouagadougou, p. 56.

Delahaye A. 2009. La famille des entérobactéries, disponible sur http://www.arnobio.com, Consulté le 18/07/2011

Florin NH., Maddocks AR., Wood S., Harris AT. 2009. High-temperature thermal destruction of poultry derived wastes for energy recovery in Australia. Waste Management **29(4),** 1399-1408

Habteselassie-Mussie Y, Bischoff M, Applegate B, Reuhs B, Turco Ronald F. 2010. Understanding the role of Agricultural Practices in the Potential Colonization and Contamination by Escherichia coli in the rhizospheres of Fresh Produce. Journal of Food Protection **73,** 2001-2009.

Koc M, Macrae R, Mougeot JAL, Welsh J. 2000. Armer les villes contre la faim: systèmes alimentaires urbains durables. CRDI p. 243.

Kwak WS, Huh JW, Maccaskey TA. 2005. Effect of processing time on enteric bacteria survival and on temperature and chemical composition of broiler

poultry litter processed by two methods. Bioresource Technology **96(14),** 1529-1536.

Legret M, Divet L, Juste C. 1988. Migration et spéciation des métaux lourds dans un sol soumis à des épandages boues de station d'épuration à très forte charge en Cd et Ni. Wat. Res. **22(8),** 953-959.

Métras R. 2003. Utilisations et dangers sanitaires microbiologiques liés aux effluents d'élevage, Thèse de doctorat unique, Université Claude Bernard p. 150.

Mougeot J. 2006. Focus: cultiver de meilleures villes. Agriculture urbaine et développement durable, CRDI, 136p.

MVAD. 2003. Les matières organiques produites à la Réunion, chapitre 5, p. 63.

Niang S. 1996. Utilisation des eaux usées domestiques en maraîchage périurbain à Dakar (Sénégal). Sécheresse **3,** 217-23

Pilet C, Bourdon L, Toma B, Marchal N, Balbastre C. 1981. Bactériologie médicale et vétérinaire, systématique bactérienne, Doin éditeurs-Paris ; 2ème édition, 2ème tirage, p. 431.

Rose N, Beaudreau F, Drouin P, Toux JY, Colin RP. 1999. Risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Preventive Veterinary Medicine **39(4),** 265-277.

Santé C. 1991. La qualité bactériologique. Document de support aux « recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada ». Accessible à : www.hc-sc.gc.ca/ehp/dhm/dpc_eau_qualite/eauguide.htm

Smit J, Ratta A, Bernstein J. 1996. Urban agriculture: an opportunity for environmentally sustainable development in sub-Saharan Africa, Washington (DC, E.-U.), Banque mondiale, Environmentally Sustainable Division, African Technical Department. Post-UNCED Series, Building Blocks for Africa 2025, Paper No. 11.

Zmirou D, Ferley JP, Collin JF, Charrel M, Berlin J. 1987. A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. American Journal of Public Health **77,** 582-584.

Article 4

American Journal of Biochemistry 2013, 3(3): 84-88
DOI: 10.5923/j.ajb.20130303.04

Acute Toxicity of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) on Wistar Rats: Study about Leaves and Fruits

Victorien Dougnon[1,2,*], Honoré Bankolé[2], Patrick Edorh[1,3], Jean Robert Klotoé[2], Jacques Dougnon[2], Lauris Fah[2], Frédéric Loko[2], Michel Boko[1]

[1]Laboratory of Toxicology and Environmental Health, Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463 Cotonou, Benin
[2]Laboratory of Research in Applied Biology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin
[3]Department of Biochemistry and Cellular Biology, Faculty of Science and Technology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou, Benin

Abstract *S. macrocarpon* is a highly consumed vegetable in Benin with values recognized by herbal medicine. The objective of this study was to assess its acute toxicity on Wistar rats. Fruits and leaves were shade dried, powdered, boiled and filtered. The powders obtained from leaves and fruits were orally administered to randomly selected animals divided into five groups treated with saline, 300 mg/kg and 2000 mg/kg of powders. The anomals were observed along 14 days focusing attention on different behavior manifestations. Body weight, hematological (Complete Blood Count) and biochemical analyses (urea, creatinine and transaminases) were conducted. About *S. macrocarpon*'s leaves, the dose of 300 mg/kg resulted in the death of no rat. No mortality was recorded at the dose of 2000 mg/kg. It was the same for the fruit powder. Powders of leaves and fruits of *S. macrocarpon* then have an LD_{50} greater than or equal to 5000 mg/kg. There was a significant increase in the weight of rats after administration of powders of *S. macrocarpon*. Powder of *S. macrocarpon* has not resulted in a weight loss of Wistar rats but weight gain is not due to the administration of a single dose of powders. No statistical difference was observed when comparing averages of different groups ($p > 0.05$) for both transaminases ALT and AST. Powders of *S. macrocarpon* induced a significant decrease in blood urea in groups II, III and IV. From the two parts used (leaves and fruits), only fruit had this effect regardless of dose. The hematological parameters were not significantly different between the groups. Biochemical and hematological assays showed that neither leaves nor fruit of this vegetable have toxicity on the rats. These results proved that fruits and leaves of *S. macrocarpon* can be safely consumed.

Keywords *S. macrocarpon*, Medicinal Plants, Food Security, Toxicity

1. Introduction

S. macrocarpon is a plant of the same family as tomatoes, peppers: eggplant family called Solanaceae[1]. The botanical genus includes herbaceous plants or shrubs leaves usually alternate, sometimes opposite. The inflorescence is a cyme, usually single seed. The flowers are hermaphrodite, with star-shaped corolla with five petals often reflected (back to back). The protruding stamens form a cone around the gynoecium. The ovary is superior. The fruits are berries[1]. Also called *S. macrocarpum*, it is used as a vegetable in many countries in West Africa[2-3]. *S. macrocarpon* is also used for its therapeutic properties. Despite this dual purpose, little scientific data on the knowledge of the plant species exist.

* Corresponding author:
victorien88@hotmail.com (Victorien Dougnon)
Published online at http://journal.sapub.org/ajb
Copyright © 2013 Scientific & Academic Publishing. All Rights Reserved

Although studies have been conducted on the aqueous extract of *S. macrocarpon*[2], no data on the toxicity of powders of leaves and fruits are available in Benin. Since there is in the world almost 1500 species belonging to the genus Solanum[4], preliminary studies have shown that the Benin variety of *S. macrocarpon* has a similar nutritional value to *Moringa oleifera*, a vegetable heavily used in the nutritional recovery of children and people with compromised immunity[5-6] in Benin. Unfortunately, the presence of certain chemical compounds such as alkaloids, especially in fruits, fears its promotion as a dietary supplement. That is why an earlier study was to evaluate the cytotoxicity at short and medium term of powders of leaves and fruits of *S. macrocarpon*[7]. The results suggested that the leaves and fruit vegetable showed no risk and that its consumption could be promoted. However, it is important to make more extensive toxicity studies on Wistar rats (model physiologically similar to humans) to investigate the effect of *S. macrocarpon* on hematological parameters, liver and kidney to further reassure the scientific world. This study is

then to complete cytotoxicity tests performed on larvae shrimp (*Artemia salina*) and will confirm or not the harmlessness of the empirical use of *S. macrocarpon* as food and medicine.

2. Material and Methods

2.1. Material

The mature leaves and fruits of *S. macrocarpon* were the plant material used in this study. It were purchased in July 2012 on the site of Houeyiho located at 6° 21' 20" North latitude and 2° 21' 35" East longitude in Benin. It is the biggest site of Benin and the soil is enough fertile[8].

Wistar albino rats were bred in the Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée (LARBA), University of Abomey-Calavi (Benin) at constant temperature of 22 ± 1°C with a cycle of 12 hours at light and 12 hours of darkness. They were fed with granulated provender and water *ad libitum*.

2.2. Methods

The leaves were thoroughly washed with distilled water (with a few drops of bleach) and then dried at laboratory temperature of 16°C in LARBA for 17 days while fruits were also washed and finely cut into small pieces before being dried for 09 days. Leaves and dried fruits were ground for ten minutes using a Moulinex Sayona. The powders were then sieved using sieves of 0.2 mm and stored in sterile containers until needed.

2.2.1. Toxicity Tests

The tests were performed according to OECD Guideline for testing of chemicals through the method 423 (OECD, 2001). The principle of this test is that, with only a sequential process, using a minimum number of animals per step, information on the acute toxicity of the substance are obtained and is sufficient for the purposes of classification. A fixed dose of the substance is orally administered to a group of animals.

The absence or presence of mortality related to the substance in a group will determine the next step, ie:

– Stopping test

– Administration of the same dose to three additional animals,

– Administration of the dose immediately above or below to three additional animals.

At the beginning of the test, the rats aged of 12 weeks and weighing between 140 and 170 grams were randomly selected, marked to permit individual identification, and kept in their cages for acclimatization to the laboratory conditions for five days before the experiment. Powders of leaves and fruits were dissolved in physiological saline and administered to rats at doses of 1 ml / 100 g of body weight. It were given in a single dose using a feeding tube. The rats were fasted overnight but with access to water. Each step required three animals. The initial level of 300 mg/kg was chosen. Since it is a vegetable which was used, from four doses proposed by the Directive 423, it is the one for which it might expect to observe mortality among some of the treated animals. Thus, the rats were divided into different lots. The control lot received no treatment while lots I and II were respectively given 300 mg/kg and 2000 mg/kg of powdered leaves. Lots III and IV were respectively given 300 mg/kg and 2000 mg/kg of fruit powders.

The animals were observed individually at least once during the first 30 minutes, periodically during the first 24 hours after treatment. Particular attention was observed for 14 days after administration of the substance. All observations were recorded systematically, individual records being maintained for each animal. Attention has focused in particular on the observation of the various manifestations of tremors, convulsions, salivation, diarrhea, lethargy, sleep and coma.

The following parameters were investigated:

– Body Weight

Individual weight of each rat was determined shortly before administration of the powders. At the end of the test, the animals were weighed and then sacrificed.

– Pathology

Blood samples were performed on all rats for Complete Blood Count and biochemical (urea, creatinine, transaminases) parameters in LARBA. The retro-orbital sampling was adopted. The Complete Blood Count was to determine the number of red blood cells (NGR), the number of white blood cells (WBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hte), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Mean Corpuscular Concentration in hemoglobin (MCHC) and platelet count. These tests were performed using a Sysmex KX-N21 according to the methodology of **Sodipo *et al.*[**2]. Urea, creatinine and transaminases were assayed by the kinetic method in accordance with the methodology of **Sodipo *et al.*[**2].

2.2.2. Statistical Analysis

Means and standard deviations were compared with a significance level of 5%. Using the nonparametric Mann-Whitney test, the average of the control lot were compared to those of Lots I, II, III and IV and those of lots I, II on the one hand and III, IV on the other hand were compared. XL Stat 2011 software was used for statistical tests while Microsoft Excel 2013 has permitted the creation of graphs.

3. Results and Discussion

3.1. Determination of LD_{50}

About *S. macrocarpon*'s leaves, the dose of 300 mg/kg resulted in the death of no rat. No mortality was recorded at the dose of 2000 mg/kg. It was the same for the fruit powder.

Powders of leaves and fruits of *S. macrocarpon* then have an LD_{50} greater than or equal to 5000 mg/kg[9]. Nevertheless, a certain lethargy was noted in treated rats. Plants with LD_{50} above 1000 mg/kg by oral route are safe or of low toxicity[10]. These results confirm previous work done on the same substances[7]. Lethargy observed in rats could be due to stress caused by handling.

3.2. Effect Powders of *S. macrocarpon* on Weight Gain in Wistar Rats

There was a significant increase in the weight of rats after administration of powders of *S. macrocarpon*. Powder of *S. macrocarpon* has not resulted in a weight loss of Wistar rats (Figure 1). However, the variation is similar between lots; so weight gain is not due to the administration of a single dose of powders. As the purpose of this study was just to evaluate the *in vivo* toxicity of powders, it would be interesting to explore the role of these powders on weight gain in malnourished children or people exactly as other authors did it on *Moringa oleifera*[5].

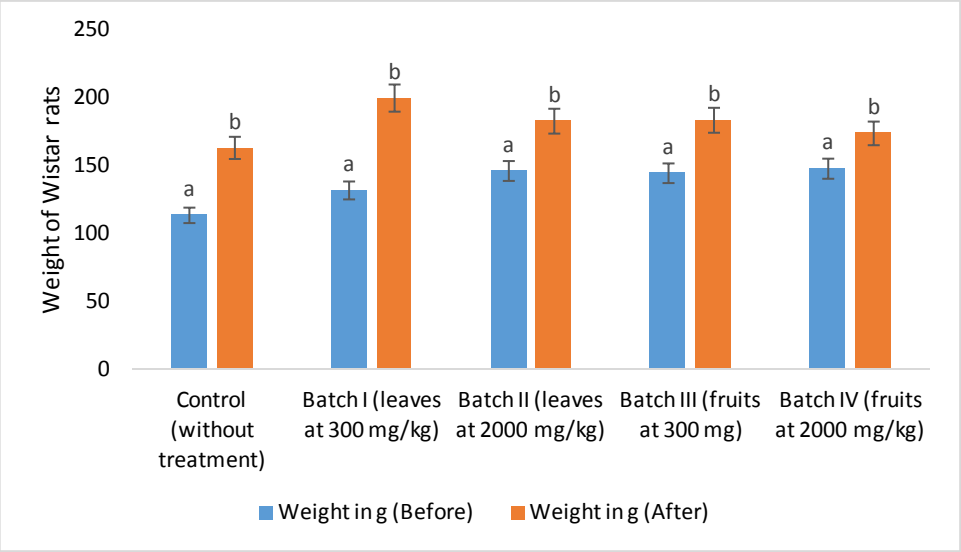
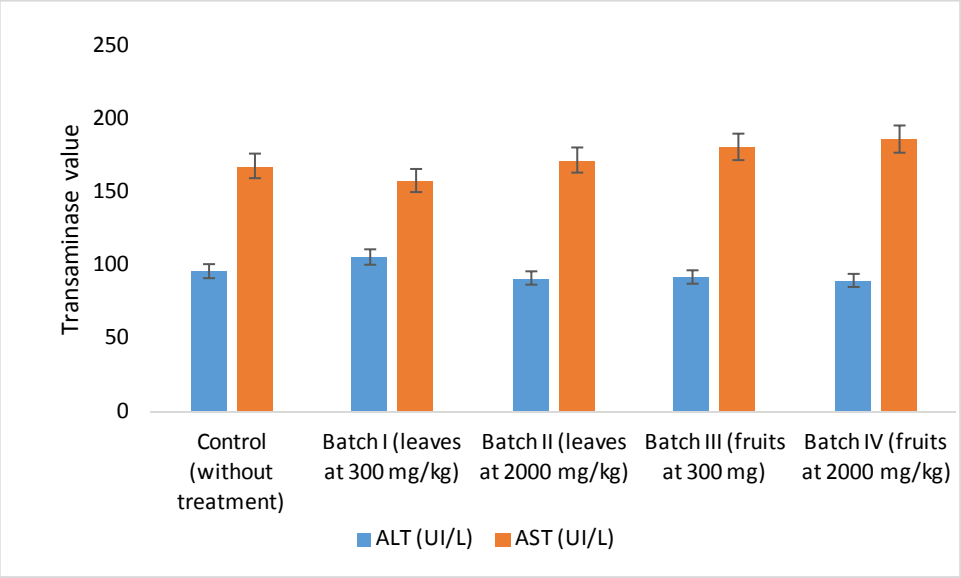


Figure 1. Weight's variation on Wistar rats

3.3. Exploration of Liver Damage

No statistical difference was observed when comparing averages of different groups ($p > 0.05$) for both transaminases ALT and AST (Figure 2).



Lot I and Lot II: $p > 0.05$; Control and Lot I: $p > 0.05$; Control and Lot II: $p > 0.05$; Lots III and IV: $p > 0.05$; Control and Lot III: $p > 0.05$; Control and Lot IV: $p > 0.05$.

Figure 2. Variation of transaminases on Wistar rats

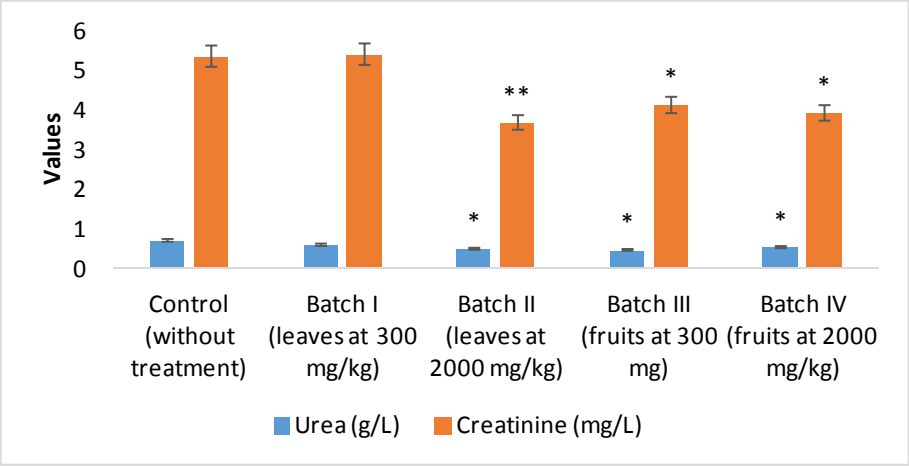
Normal values of ALT differ from those defined by Kamdem *et al*.[11] which was 74.7 ± 3.8 IU/L but are not far from those established by Vaissaire[12]. Indeed, this author proposed 130 IU/L as the average value of ALT in rats aged from three months, while the values in this study ranged around 100 IU/L. These differences between studies are due to the age of the rats, their diet and physiology[12]. As there was no difference between the control group and the test lots, powders of *S. macrocarpon* had no toxic effects on the liver of rats. Normal values of AST obtained are consistent with those proposed by Kamdem *et al*.[11] (178 ± 20.99 IU/L). These results are different from 42.9 ± 10.1 IU/L established by Kaneko[13] and 200 ± 26 IU / L established by Vaissaire[12]. The age factor could also be implicated in these cases.

3.4. Exploration of Renal Parameters

Powders of *S. macrocarpon* induced a significant decrease in blood urea in Lots II, III and IV. From the two parts used (leaves and fruits), only fruit had this effect regardless of dose (Figure 3). The fruits of *S. macrocarpon* therefore have a better effect on renal function[4],[2] than leaves that regulates urea until a dose of 2000 mg/kg. This situation was further tested in the assay of creatinine. Only leaves powder at 2000 mg/kg induced decrease in creatinine, especially when compared to the lot receiving leaves powder at 300 mg/kg.

3.5. Exploration of Hematological Parameters

White blood cells and platelets were significantly elevated (Table 1). From these two parameters, a possible witness trombocytose coupled with leukocytosis can be explained by the use of nasogastric tube metal. Indeed, rats of test group were overfed while the control group had free access to water. The material used to feed rats of test groups may have abused the esophageal wall of these animals, causing acute inflammatory syndrome. As the other parameters have been no significant difference, this explanation is reinforced.



*: Significant difference between treated Lot and Lot Control for the parameter considered ($p < 0.05$)
**: Significant difference between treated Lot and Control Lot on one hand and between the considered lot and the lot I on other hand ($p < 0.05$)

Figure 3. Variation of urea and creatinine on Wistar rats

Table 1. Hematological parameters in Wistar rats feed with *S. macrocarpon* powders

	WBC (G/L)	RBC (T/L)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Platelets (G/L)
Control (without treatment)	4.90 ± 0.26	6.74 ± 0.65	12.06 ± 0.77	40.26 ± 2.13	59.90 ± 2.70	17.93 ± 0.52	29.96 ± 0.63	507 ± 77.94
Lot I (leaves at 300 mg/kg)	6.06 ± 0.15*	6.20 ± 0.27	12.10 ± 0.69	40.63 ± 1.24	65.70 ± 4.65	19.50 ± 0.52	29.83 ± 2.27	513.66 ± 31.8*
Lot II (leaves at 2000 mg/kg)	7.03 ± 2.02*	7.02 ± 1.10	12.53 ± 0.25	42.83 ± 1.06	66.73 ± 0.56	19.56 ± 0.25	29.26 ± 0.41	865 ± 26.7*
Lot III (fruits at 300 mg)	6.80 ± 2.51*	6.36 ± 0.34	12.50 ± 0.40	41.96 ± 1.79	66.06 ± 4.82	19.66 ± 0.47	29.80 ± 1.55	895 ± 19.2*
Lot IV (fruits at 2000 mg/kg)	7.43 ± 2.49*	7.16 ± 0.33	13.60 ± 0.50	47.23 ± 2.37	65.96 ± 0.72	19 ± 0.36	28.80 ± 0.79	952 ± 12.2*

*: Significant difference between the treated Lot and Control Lot for the parameter considered ($p < 0.05$)

4. Conclusions

The present study revealed that leaves and fruits of *S. macrocarpon* has no toxicity on biological parameters. S. macrocarpon is safe for consumption, showing no liver or renal acute toxicity. Thus its medical properties should be explored and assessed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledged the valuable contributions of The National Program of Traditional Medicine and Pharmacopoeia of Benin which support this study.

REFERENCES

[1] CERPADEC-ONG. 2008. Manuel de l'apprenant en techniques de conduite et de production de cultures maraîchères, 20 p.

[2] SODIPO, O.A., ABDULRAHMAN, F.I., ALEMIKA, T.E., GULANI, I.A. 2012. Chemical composition and biological properties of the petroleum ether extract of *Solanum macrocarpum* L. (Local Name: Gorongo). *British Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2): 108-128.

[3] ASSOGBA-KOMLAN, F., ANIHOUVI, P., ACHIGAN, E., SIKIROU, R., BOKO, A., ADJE C., AHLE, V., VODOUHE, R., ASSA, A. 2007. Pratiques culturales et teneur en éléments anti nutritionnels (nitrates et pesticides) du *Solanum macrocarpum* au sud du Bénin. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 7(4), 01 – 21.

[4] GRUBBEN, G. J. H., DENTON, O. A. 2004. PROTA 2. Plant Resources of Tropical Africa Vegetables. Ponennad Looijenhv, Wageningen, Netherlands, 667 p.

[5] TÉTÉ-BÉNISSAN, A., LAWSON-EVI, K.A., KOKOU, K., GBÉASSOR, M. 2012. Effet de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* Lam. sur l'évolution du profil de l'hémogramme des enfants malnutris au Togo: évaluation chez les sujets HIV positifs. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 12(2), 6007-6026.

[6] DOUGNON, T.V., BANKOLÉ, H.S., JOHNSON, R.C., KLOTOÉ, J.R., DOUGNON, G., GBAGUIDI, F., ASSOGBA, F., GBÉNOU, J., SAHIDOU, S., ATÈGBO, J-M., RIHN, B.H., LOKO, F., BOKO, M., EDORH, A.P. 2012. Phytochemical, nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin). Food and Nutrition Sciences, 3(11), 1595-1603.

[7] DOUGNON, T.V., BANKOLÉ, H.S., EDORH, A.P., DOUGNON, T.J., KLOTOÉ, J.R., LOKO, F., BOKO, M. 2013. Cytotoxicity of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) against shrimp larvae (*Artemia salina* Leach). Research Journal of Recent Sciences, 2(5): 6-9.

[8] CHIDIKOFAN, G. 2010. Contribution à l'amélioration de la qualité des cultures maraîchères du site de Houéyiho à Cotonou au BENIN : cas de la laitue (*Lactuca sativa L.*), Mémoire de Master, 2IE Ouagadougou, Burkina Faso, 56 p.

[9] OCDE. 2001. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Norme 423 adoptée le 17 décembre 2001, 14 p.

[10] CLARKE, E.G.C., CLARKE, M.L. 1977. Veterinary Toxicology. Cassel and Collier Macmillan Publishers London. 268-277.

[11] KAMDEM, L., MAGDALOU, J., BIEST, G. 1981. Effect of aflatoxin B1 on the activity of drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60(3), 570-578.

[12] DOUGNON, T.J. 2009. Effets de l'ananas, *Ananas comosus (L.) Merr.* (Bromeliaceae), variété «Pain de sucre » sur le foie et les reins du rat Wistar intoxiqué au paracétamol. Thèse de doctorat unique. Faculté des Sciences et Techniques. Université d'Abomey-Calavi. Bénin, 282 p.

KANEKO, J. J.1989. Chemical biochemistry of domestic animals. California: academic press Inc. 4th edition. p932.

Article 5

Treatment of hypercholesterolemia: screening of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) as medicinal plant in Benin?

Dougnon[1,2] Tamègnon Victorien, Bankolé[2] Honoré Sourou, Klotoé[2] Jean Robert, Sènou[2] Maximin, Fah[2] Lauris, Koudokpon[2] Hornel, Akpovi[2] Casimir, Dougnon[2] Tossou Jacques, Addo[4] Phyllis, Loko[2] Frédéric, Edorh[1,3] Aléodjrodo Patrick, Boko[1] Michel.

[1]Laboratory of Toxicology and Environmental Health, Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 PO Box 1463 Cotonou, Benin.

[2]Laboratory of Research in Applied Biology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 PO Box 2009 Cotonou, Benin.

[3]Department of Biochemistry and Cellular Biology, Faculty of Science and Technology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 PO Box 526 Cotonou, Benin.

[4]Department of Animal Experimentation, Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR), University of Ghana, PO Box LG 581 Legon, Ghana

ABSTRACT

Background and objectives: Hypercholesterolemia is the greatest risk of cardiovascular disease. The present study is conducted to evaluate the lipid lowering activity of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon*, a vegetable, on Wistar rats experimentally rendered hypercholesterolemic by Triton X-100. Material and Methods: The leaves and fruits were administered (*per os*) for 7 days to rats at doses of 400 and 800 mg/kg of body weight. Atorvastatin was used as reference treatment drug. The data were analyzed by the Brown-Forsythe ANOVA, Dunnett's T3 multiple comparison test and Dunnett's t test all tests were done at the 5% significance level. Results: Administration of *S. macrocarpon* (fruits as well as leaves) resulted in a statistically significant decrease in total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triglycerides in the treated groups compared to the untreated hypercholesterolemic group, regardless of the administrated doses. A significant increase in HDL-cholesterol was observed in the treated groups. Conclusions and contents accuracy: This vegetable thus effectively suppresses experimental hypercholesterolemia in Wistar rats, suggesting a protective role in cardiovascular disease. Its use by individuals at risk should be promoted.

Keywords: Regulation, Cholesterolemia, *Solanum macrocarpon*, Feeding, Wistar Rats

INTRODUCTION

Despite remarkable advances in medicine and research, there is an increase in cardiovascular diseases (Callias, 2007). It is one of the leading causes of death worldwide. They are responsible each year for the death of over 17 million people, ie 30% of mortality in the world. About ¾ occur in countries with low and middle incomes. Twenty-five million deaths are expected in 2020 (Rasheed and Hassan, 2007). Hypercholesterolemia is a metabolic condition that determines the onset of chronic degenerative diseases such as atherosclerosis (Devi and Sharma, 2004; Kim *et al.*, 2008). It is characterized by the elevation of cholesterol and lipid parameters (LDL-cholesterol, triglycerides). It is estimated provoke about 4.4 million deaths (7.9%) in the world. Scientists often cite lifestyle: unhealthy diet, physical inactivity, lack of exercise, stress, smoking and obesity as predisposing factors (Callias, 2007). There is hypercholesterolemia when cholesterol (LDL) in the blood is higher than the actual needs. The excess not used by the cells then tend to settle against the vessel walls, causing, if not recovered and returned to the liver by HDL, obstruction of the arteries, leading to infarction (Callias, 2007). Triglycerides are lipid molecules formed in the small intestine from fat consumed. They are also produced in the liver from excess sugar diet. Fats are not soluble in water; triglycerides need to combine with other substances - lipoproteins - to be transported throughout the body. There are three types of these triglyceride-containing lipoproteins: chylomicrons produced by the small intestine after meals, very low density lipoprotein, or VLDL (Very Low Density Lipoproteins) produced by the liver from sugars, and lipoproteins intermediate density or IDL (Intermediate Density Lipoproteins) from the conversion of VLDL. The gut releases chylomicrons and VLDL liver. These lipoproteins spread into the bloodstream where degradation system turns them into free fatty acids, which are in turn used by tissues as an energy source (Bruckert, 2013). The excess is stored as energy reserves in fat cells called adipocytes. The elevation of triglycerides promotes the formation of atheroma that increase cardiovascular and thrombotic risks (clotting), especially in the presence of other cardiovascular risk factors such as hypertension, physical inactivity and obesity (Bruckert, 2013). Despite the difference in the distribution and lipoprotein metabolism between humans and laboratory rats, models of hypercholesterolemic Wistar rats are frequently used in lipid research (Kothiyal and Gupta, 2011). Many studies have been made to propose alternative treatment based on plant species (Kothiyal and Gupta, 2011; Reddy *et al.*, 2011; Patel *et al*., 2012; Sodipo *et al*., 2012, Ghorbani, 2013). In Benin, a vegetable (*S. macrocarpon*) is reported to have cholesterol-lowering properties.

The acute and medium toxicity assessment of *S. macrocarpon* revealed it is safe (Dougnon *et al*., 2013a-b) with 3000 mg/kg at least. *S. macrocarpon* is traditionally used in Nigeria to treat hypercholesterolemic disorders so its purported efficacy as an anti-hypercholesterolemic was evaluated in this study. The effects of powdered leaves and fruits of *S. macrocarpon* on hypercholesterolemia induced in Wistar rats were assessed and then compared with those of a reference chemical product: Atorvastatin.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Mature leaves and fruit of *S. macrocarpon* were the plant material used in this study. They were purchased in July 2012 at Houéyiho located 6°21'20" North Latitude and 2°21' 35" East Longitude in Benin. It is the largest vegetable site of Benin (Chidikofan, 2010). Albino Wistar rats were bred at the Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée (LARBA), University of Abomey-Calavi (UAC) at a constant temperature of 22 ± 1°C with a 12-hour cycle of light and 12 hours of darkness. They were fed with pelleted feed and water *ad libitum*. Their weight was between 160-200 grams and they were used to perform the *in vivo* tests.

The chemical Triton X-100 used to induce the disorder was obtained from Sigma Aldrich [CAS: 9002-93-1 $(C_2H_4O)_nC_{14}H_{22}O$], while the drug (Atorvastatin) was purchased at a pharmacy [Specialty name: Atorfit, B.No / No. Lot. CK0041, MFG / FAB.: 11/11, EXP.: 04/16, Manufactured by Ajanta Pharma (Mauritius) Limited, Digital Industrial Building, Goodlands, Mauritius]. Cyprex Diagnostics was the kit commercially available for measuring lipids.

METHODS

Powdered leaves and fruits of *S. macrocarpon*

Several samples of leaves and fruits were collected from twenty vegetable sites and pooled together in the laboratory. A specimen of the plant was identified and authenticated by the National Herbarium of Benin under No. AA 6423 / HNB July 31, 2012. The leaves were carefully washed with distilled water and then dried at ambient temperature of 16° C for 17 days in LARBA while fruits were washed and finely cut into small pieces before being dried for 09 days. Leaves and dried fruits were ground for ten minutes using a commercial Moulinex blender. The obtained powders were sieved and stored in sterile containers.

The leaves and fruits powders were dissolved in physiological saline for 24 hours and then stored until use (Giri *et al*., 2012).

Evaluation of cholesterol-lowering properties of powders of leaves and fruits of *S. macrocarpon*

The study was carried out in LARBA, University of Abomey-Calavi, Benin after an institutional approval. Before the implementation of the protocol, all rats were weighed. Six (6) groups of five (5) Wistar rats (1, 2, 3, 2 ', 3' and A) were treated with Triton X-100 (a substance used to induce hypercholesterolemia) at a single dose of 150 mg / kg body weight. The Triton X-100 was administered intraperitoneally and was chosen because of its convenience, availability, and especially the reproducibility of the animal model created (Kothiyal and Gupta, 2011). One (01) additional group of five (05) rats served as negative controls (group B); they received no treatment with Triton X-100 but physiological saline water. Overall, there were seven groups of 5 rats. Seventy-two hours (72 h) after induction of hypercholesterolemia with Triton X-100, the correction phase of its hypercholesterolemic effects was launched with the powdered fruits and leaves of *S. macrocarpon*.

Treatment of Wistar rats by fruits and leaves powders

Group 1 received no corrective treatment (positive control) while groups 2 and 3 received 400 and 800 mg/kg body weight respectively of powdered fruits of *S. macrocarpon*. The 2' and 3' respectively received 400 and 800 mg/kg body weight of powdered leaves of *S. macrocarpon*. Group A received a dose of standard drug (Atorvastatin 10 mg/kg body weight). The treatments were done orally every morning for 7 days. 24 hours after the last day of treatment (ie, the 8th day), biochemical parameters (total cholesterol, triglycerides, HDL-C, LDL-C, VLDL) were determined. By retro-orbital puncture, blood was collected in dry tubes. The determination of total cholesterol, HDL-C and triglycerides was performed endpoint according to the methodology described by Deweerdt and Later (2009). LDL-C was calculated by the Friedewald formula (Djamel, 2007):

$$\text{LDL-C} = \text{Total Cholesterol} - \text{HDL-C} - \text{VLDL}$$

VLDL cholesterol was estimated from the total serum triglycerides (Djamel, 2007):

$$\text{VLDL} = \text{Triglycerides} / 5$$

Two rats per group were dissected to assess liver histology according to the method used by Codo (2012). Histological tests were conducted at the Laboratoire d'Anatomie Pathologique et Cytopathologie (L.A.P.C).

Statistical analysis

The statistical package for the social sciences (SPSS), version 17 was used for data analysis. The data were initially examined for normality and homogeneity of variance by the explore procedure. Thereafter, the Brown-Forsythe ANOVA and Dunnett's T3 multiple comparison test were used to test for differences in the groups on one hand and identify the group(s) eliciting the difference(s) on another hand, respectively. Subsequently, Dunnett's t test was used to compare the controls to the treatment groups. All data were expressed as mean ± SD; P values < 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

RESULTS

Hypercholesterolemia was successfully established in all the groups treated with Triton X-100. All the hypercholesterolemic groups treated with Atorvastatin or *S. macrocarpon* showed a reduction in all hypercholesterolemia parameters (total cholesterol, LDL, VLDL and triglyceride) and an increase in HDL, as presented in table 1. The mean differences were all statistically significant (P<0.05) with the exception of LDL (p=0.157).

Table 1. Serum lipid profile of hypercholesterolemic rats after treatment with *S. macrocarpon*

Experimental Group	**Biochemical Parameter (Mean ± SD)**				
	Total Cholesterol (g/l)	**HDL (g/l)**	**LDL (g/l)**	**VLDL (g/l)**	**Triglycerides (g/l)**
Positive Control (not treated)	1.352±0.413	0.338±0.013	0.375±0.443	0.255±0.070	1.476±0.202
Negative Control (saline only)	0.718±0.137	0.544±0.046	0.026±0.017	0.153±0.072	0.726±0.312
Herb Treated (400mg Fruit)	0.784±0.148	0.664±0.105	0.022±0.020	0.118±0.036	0.588±0.181
Herb Treated (800mg Fruit)	0.860±0.778	0.686±0.117	0.095±0.076	0.079±0.006	0.396±0.031

Herb Treated (400mg Leaves)	0.698±0.068	0.610±0.088	0.034±0.028	0.063±0.010	0.316±0.048
Herb Treated (800mg Leaves)	0.726±0.066	0.620±0.485	0.056±0.027	0.050±0.007	0.252±0.034
Reference Drug Treated (Atorvastatin)	0.692±0.026	0.622±0.046	0.027±0.011	0.037±0.003	0.184±0.015

With regard to total cholesterol, a significant decrease ($p < 0.05$) was observed between the positive control and the other: the negative control, the batch treated with atorvastatin and those treated with powders of fruits and leaves (Figure 1). Compared to the negative control, the average of total cholesterol from batches treated with powders of fruits and leaves showed no significant difference ($p=0.981$ for fruits at 400 mg/kg; $p= 0.655$ for fruits at 800 mg/kg; $p= 1.000$ for leaves at 400 mg/kg and $p= 1.000$ for leaves at 800 mg/kg). No difference was noted when compared total cholesterol from batches treated with powders of fruits and leaves to Atorvastatin ($p>0.05$).

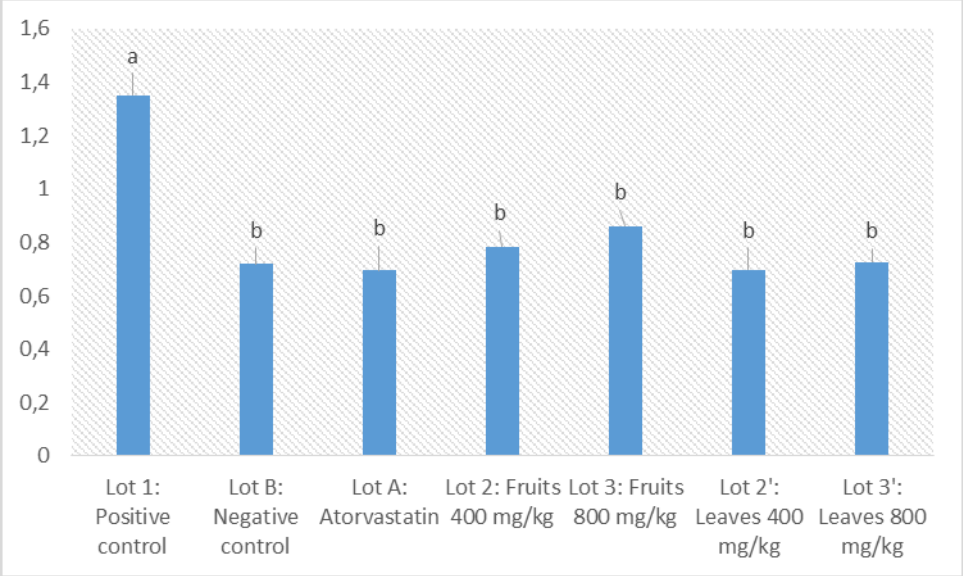


Figure 1. Changes in values of total cholesterol according to treatment groups (a = p >0.05 and b = p <0.05)

About HDL-cholesterol, a significant increase ($p<0.05$) was observed between the positive control and the other: the negative control, the batch treated with atorvastatin and those treated with powders of fruits and leaves (Figure 2). Compared to the negative control, the average of HDL-Cholesterol from batches treated with powders of fruits and leaves showed no significant difference ($p=0.069$ for fruits at 400 mg/kg; $p= 0.535$ for leaves at 400 mg/kg and $p= 0.397$ for leaves at 800 mg/kg). At 800 mg/kg, the lot treated with powdered fruits showed a significant increase ($p<0.05$). No difference was noted when compared total cholesterol from batches treated with powders of fruits and leaves to Atorvastatin ($p>0.05$).

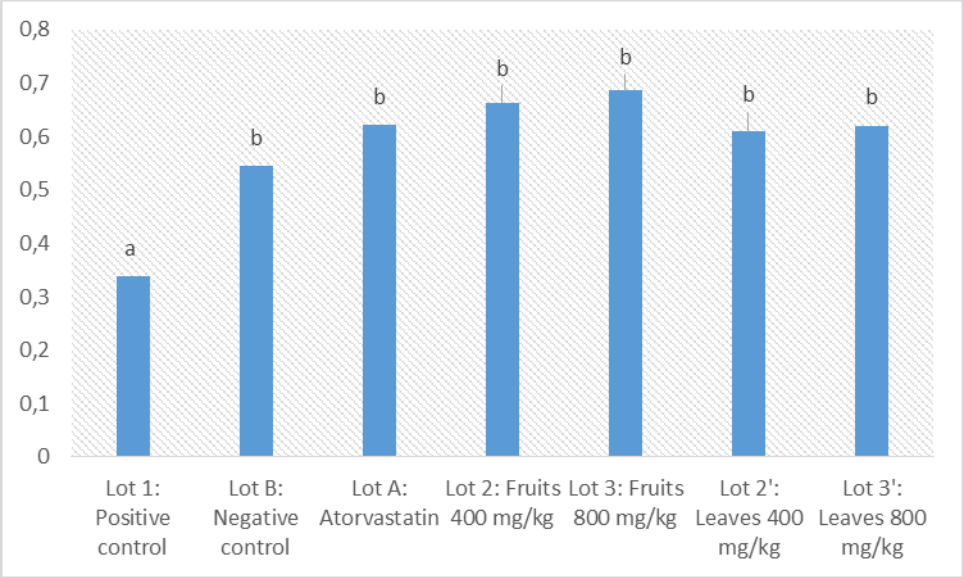


Figure 2. Changes in values of HDL-cholesterol according to batch (a = p >0.05 and b = p <0.05)

LDL-cholesterol peaked in positive control values compared to negative lot and treated groups [($p <0.05$) (Figure 3)]. Compared to the negative control, LDL-cholesterol of batches treated with powders of fruits and leaves showed no significant difference ($p= 1.000$ for fruits at 400 mg/kg; $p= 0.970$ for fruits at 800 mg/kg; $p= 1.000$ for leaves at 400 mg/kg and $p=1.000$ for leaves at 800 mg/kg). The same remark was made with reference lot ($p= 1.000$ for fruits at 400 mg/kg; $p= 0.972$ for fruits at 800 mg/kg; $p= 1.000$ for leaves at 400 mg/kg and $p=1.000$ for leaves at 800 mg/kg).

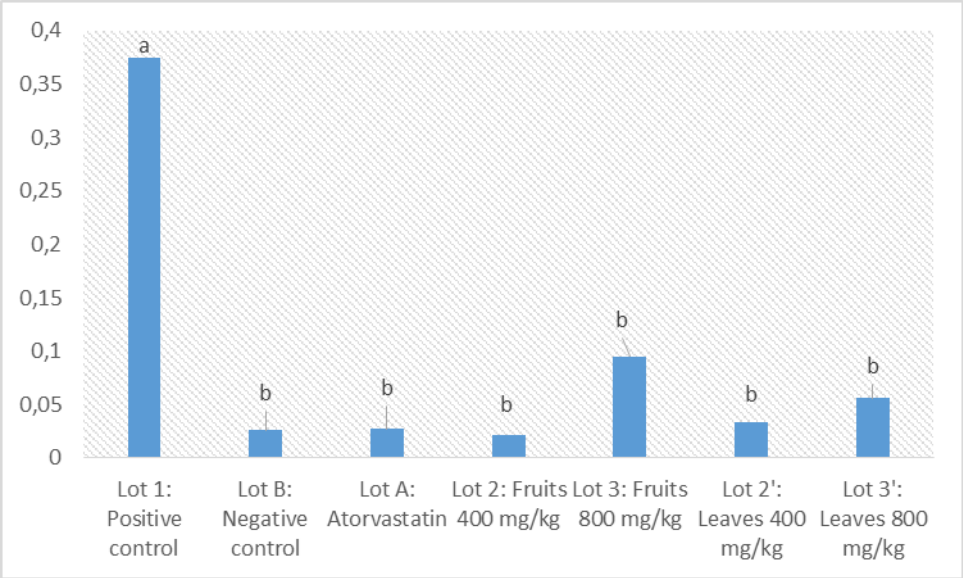


Figure 3. Changes in values of LDL-cholesterol according to batch (a = p >0.05 and b = p <0.05)

About VLDL-cholesterol, there was a peak in the positive control's group compared to other batches (p <0.05). A better decreasing was noted with to other groups when compared to negative control's group (p<0.05). Although it was not significant, a decreasing was observed with the dose of 400 mg/kg (p= 0.563 for powdered fruits). No significant difference was noted when compared reference's group to those of powdered fruits and leaves (Figure 4).

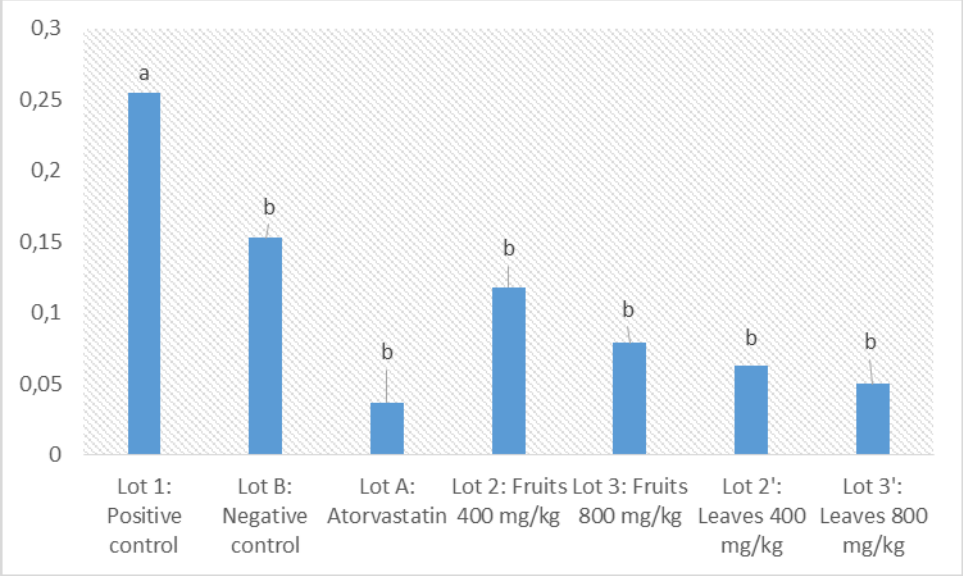


Figure 4. Changes in values of VLDL-cholesterol according to batch (a = p >0.05 and b = p <0.05)

About triglycerides, a significant decrease ($p < 0.05$) was observed between the positive control and the other: the negative control, the batch treated with atorvastatin and those treated with powders of fruits and leaves (Figure 5). Compared to the negative control, the average of triglycerides from batches treated with powders of fruits and leaves showed significant decreasing but group that received powdered fruits at 400 mg/kg ($p=0.563$). No difference was noted when compared triglycerides from batches treated with powders of fruits and leaves to Atorvastatin ($p>0.05$).

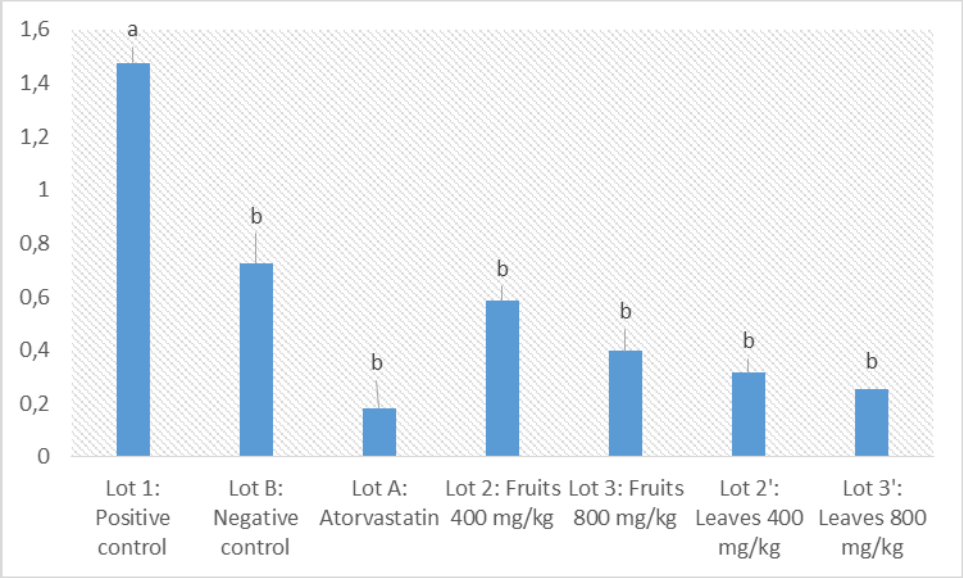


Figure 5. Changes in values of triglycerides according to batch (a = p >0.05 and b = p <0.05)

Histological findings in the liver are as follows:

Lot not intoxicated, Lot B (negative control)

These animals have normal liver typical structure organized into lobules. Each lobule is centered on a central vein. The lobule is composed of hepatocytes spans more or less radial organized around the central vein. Between the bays are venous sinusoids. Space door with vessels and bile ducts are found at the crossroads of several lobules (Figure 6a).

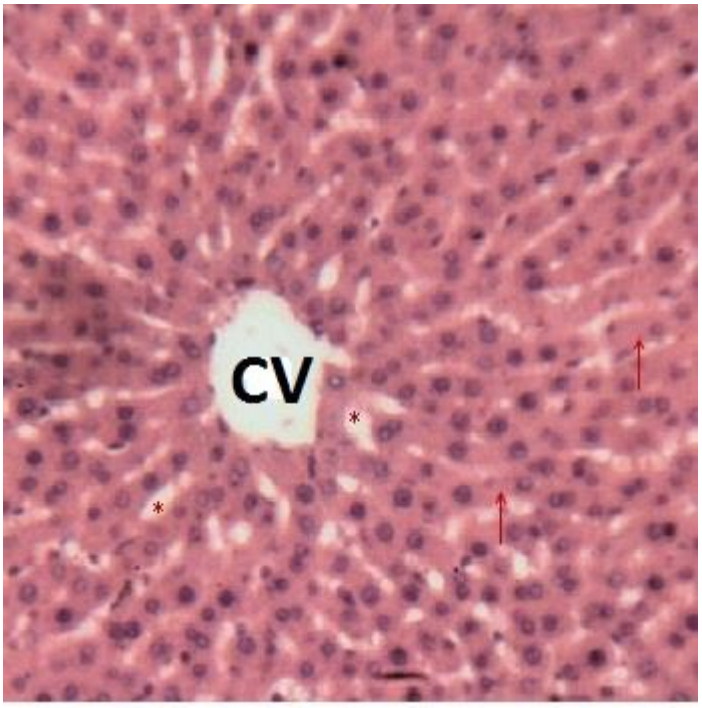


Figure 6a. Histological appearance of the liver of rats in the negative control lot

Legend: Typical lobular structure. In the center is the Central Vein (CV). Asterisks (*) indicate the sinusoids venous and arrows denote the hepatocyte spans. Image taken at 100x magnification.

Animals intoxicated with Triton X-100, Lot 1 (positive control)

The injection of Triton X-100 in Wistar rats resulted in a deterioration of the general architecture of the liver lobules, disruption of the sinusoids and reduced sinusoidal lights. Some hepatocytes are dropsy and micro-vacuoles degeneration appear in other (Figure 6b).

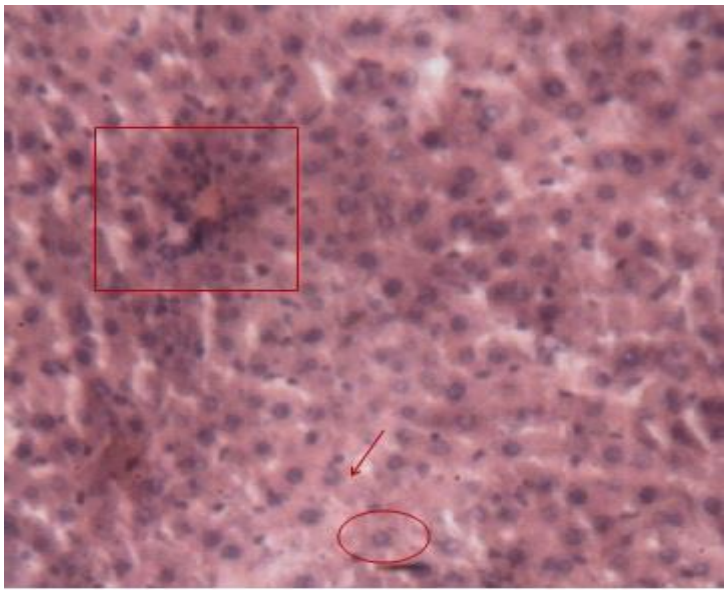


Figure 6b. Histological appearance of the liver of rats in the positive control lot

Legend: Disorganized lobular architecture. An hydropic cell degeneration was surrounded and intracellular vacuole is indicated by an arrow. Space door was still recognizable (box). Image taken at 100x magnification.

Animals treated with 400 mg/kg of leaves (Lot 2 ')

Treatment with 400 mg/kg of leaves restored the lobular structure. The sinusoids are back to normal and the radial arrangement of hepatic cords recovered. However, micro-vacuoles exist in several hepatocytes and indicate a persistent cellular damage (Figure 6c).

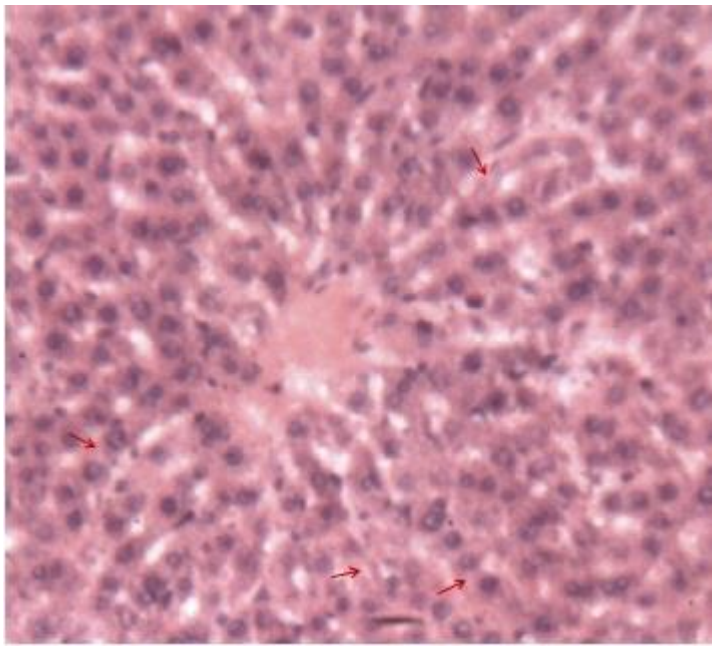


Figure 6c. Histological appearance of the liver of rats treated with the leaves of *S. macrocarpon* (400 mg / kg)

Legend: The arrows indicate the intracellular vacuoles. Image taken at 100x magnification

Animals treated with 800 mg/kg of leaves (Lot 3')

Treatment with 800 mg/kg of leaves restores lobular architecture and venous sinusoids. There are persistant vacuoles in rare hepatocytes (Figure 6d).

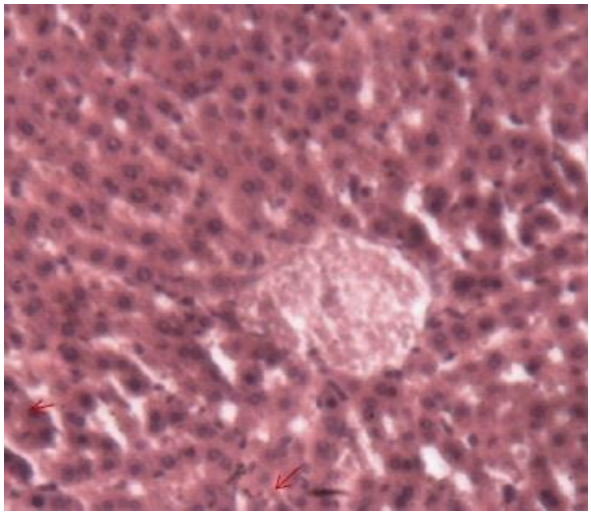


Figure 6d. Histological liver of the rats treated with leaves at a dose of 800 mg / kg

Legend: The arrows indicate the presence of vacuoles in rare hepatocytes. Image taken at 100x magnification

Animals treated with fruit at 400 mg/kg (Lot 2), 800 mg/kg (Lot 3) and Atorvastatin (Lot A)

In these different groups of rats, liver lobules are restored and resemble to those of negative control's lot. The vacuoles are very rare in hepatocytes and clearly visible sinusoidal lights are well placed. At the periphery of the lobules, spaces clearly identifiable doors are typical structure (Figures 6e, 6f, 6g and 6h).



Figure 6e. Histological liver of the rats treated with fruits at a dose of 400 mg/kg

Legend: near-normal lobular structure. Image taken at 100x magnification.

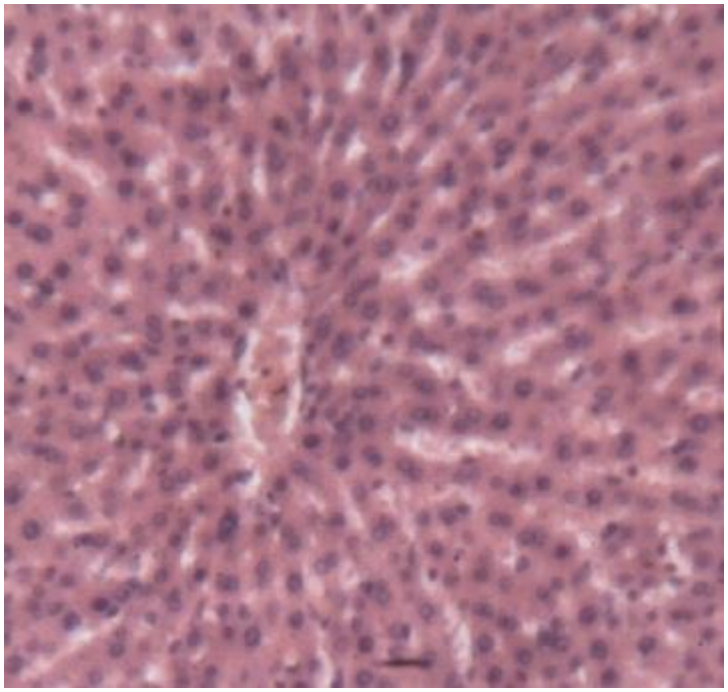


Figure 6f. Histological liver of the rats treated with fruits at a dose of 800 mg/kg

Legend: near-normal lobular structure. Image taken at 100x magnification.

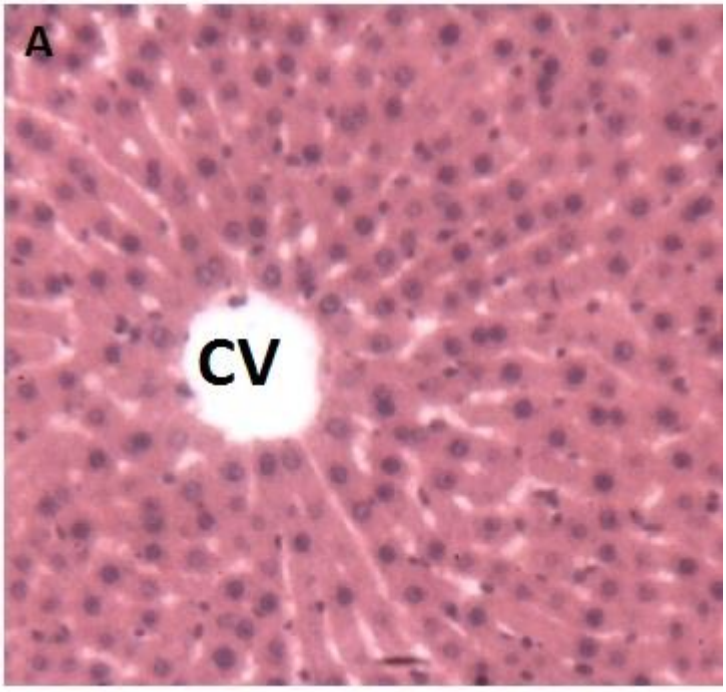


Figure 6g. Histological appearance of the liver of rats treated with the reference drug (Atorvastatin)

Legend: Almost normal lobular structure. A Central Vein (CV) is shown in Figure A. Image taken at 100x magnification.

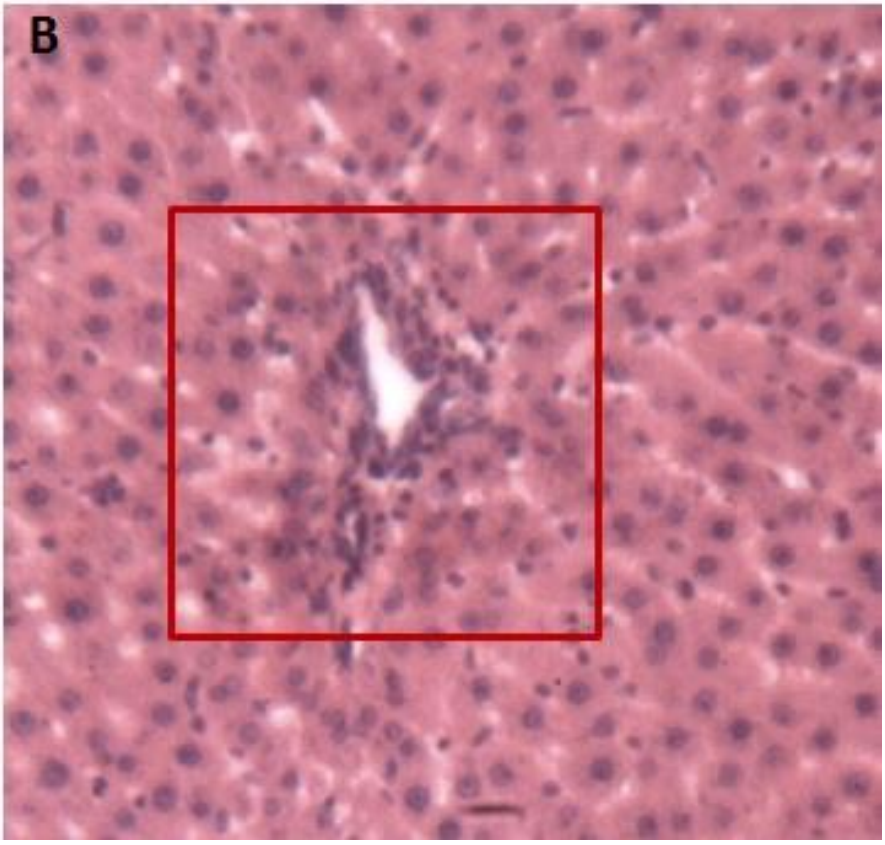


Figure 6h. Histological appearance of the liver of rats treated with the reference drug (Atorvastatin)

Legend: Almost normal lobular structure. Space door is framed in Figure B. Image taken at 100x magnification.

DISCUSSION

Total cholesterol is the basic parameter of the lipid's research. It is found in small proportion from foodborne and for the most part produced by the liver. Its assay can detect an isolated hypercholesterolemia or hypercholesterolemia associated with hypertriglyceridemia (Odou, 2013). The peak observed in the positive control group showed that Triton X-100 has created hypercholesterolemic disorders expected. This is the same conclusion which led several authors who performed the same protocol with a single dose of 150 mg / kg (Kothiyal and Gupta, 2011) while others use a single dose of 100 mg / kg (Ghule et al, 2006; Keshetty *et al*., 2009; Sudha *et al*., 2011; Patel *et al*., 2012). Indeed, Triton X-100 is a nonionic detergent that causes elevation of total cholesterol and triglycerides in the blood altering hepatic lipid metabolism (Patel *et al*., 2012).

Although a dose-related effect was not observed, leaves and fruits, whatever the dose used, have significantly reduced the total cholesterol. The traditional use of the fruits of this vegetable in Nigeria against hypercholesterolemia (Sodipo *et al*., 2012) is then justified. Beyond the work of Sodipo *et al*. (2012) on nigerian fruits of *S. macrocarpon*, this work proved that both the leaves and fruits of this vegetable produced in Benin have a cholesterol lowering effect. As the group treated with the reference drug having experienced the same effect, it can be assumed that the powder of *S. macrocarpon* as cholesterol-lowering agent, would be preferentially selective and competitive inhibitor of HMG-CoA reductase, which is responsible for the synthesis of cholesterol by the liver enzyme. This results in the reduction of cholesterol and triglycerides and thus a reduction in cardiovascular risk. Regular consumption of leaves especially (due to the low presence of some toxic compounds such as solasodine found in fruits and which is supposed to disappear at high cooking temperature) is recommended as this vegetable contains high levels of proteins (Dougnon et *al*., 2012). This results suggests good prospects for treatment by a pharmafood as many plants used for the treatment of hypercholesterolemia [*Ruellia tuberosa* Linn (Krishna *et al*., 2012), *Medohar vati* (Patel *et al*., 2012)]. This cholesterol reducing activity of *S. macrocarpon* is conferred by the presence of chemical compounds such as tannins found in the leaves as well as in fruits by promoting the production of bile and thus lipid digestion (Krishna *et al*., 2012; Dougnon *et al*., 2012). The saponins present in the leaves (Dougnon *et al*., 2012) also act as cholesterol lowering agents by binding with cholesterol in the intestinal lumen (Ghule *et al*., 2006); which lowers circulating cholesterol. HDL cholesterol is the fraction of cholesterol contained in HDL lipoproteins. It is recognized that it is the "protective" cholesterol fraction because there is an inverse relationship between the concentration of HDL-cholesterol and the incidence of cardiovascular complications. HDL lipoprotein is involved in the regulation of cholesterol (Odou, 2013). The rats in the control group experienced a significant decrease in HDL-cholesterol following induction of hypercholesterolemic disorders by Triton X-100. The group treated with the drug and those treated with the powder of leaves and fruits showed a high level of HDL cholesterol, which shows that consumption of *S. macrocarpon* is associated with a lessening of the risk of atherosclerosis. In fact, an elevation of HDL-cholesterol is associated with a decreased risk of atherosclerosis (Sodipo *et al*., 2011). A better effect was shown by the lot treated with powdered fruits at 800 mg/kg. This dose worked better than those of 400 mg/kg.

This effect is due to an increase in the activity of lecithin that plays a key role in the incorporation of free cholesterol in HDL and VLDL which turn them back to the liver cells (Kothiyal and Gupta, 2011). It should be noted that HDL facilitates the transport of cholesterol from peripheral tissues such as arteries to the liver for catabolism (Venkatesham *et al*., 2009). The powders of leaves and fruits of *S. macrocarpon* caused a decrease in LDL-Cholesterol. The consumption of this vegetable would then reduce the incidence of cardiovascular or coronary heart disease (Kothiyal and Gupta, 2011). The powders of leaves and fruits of *S. macrocarpon* induce reduction of triglycerides and VLDL, which reinforces the assertion that this vegetable should be promoted and consumed to naturally fight against lipid disorders. The dose of powdered fruits at 400 mg/kg seems to not work as those of 800 mg/kg or powdered leaves at 400 and 800 mg/kg. All these biochemical results are reinforced by histological study of the liver. Observed tissue repair is due to process described above and this confirms that the powder of leaves and fruits of *S. macrocarpon* are hypocholesterolemic.

CONCLUSION

S. macrocarpon, a vegetable strongly product at Cotonou has been evaluated for its cholesterol-lowering properties. The leaves and fruits were powdered and used to binge hypercholesterolemic rats created by peritoneal injection of Triton X-100. The results suggested the protective role of this plant against cardiovascular disease which significantly lowers the total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triglyceride levels while significantly increasing HDL cholesterol. This shows how the African flora is rich in natural substances with therapeutic range. A diet rich in vegetables such as *S. macrocarpon* should be recommended.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Carlos DANDJESSO (Msc) and Guillaume TOSSOU (Bachelor) for their technical support in carrying out this work. Thanks also to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Benin for the fellowship granted to the corresponding author of this study.

CONFLICT OF INTERESTS

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

REFERENCES

Callias C. 2007. Les alicaments dans la lutte contre l'hypercholestérolémie. Bulletin de la Société des Enseignants Neuchâtelois de Sciences, 30: 1-18.

Chidikofan G. 2010. Contribution à l'amélioration de la qualité des cultures maraîchères du site de Houéyiho à Cotonou au BENIN : cas de la laitue (*Lactuca sativa* L.), Mémoire de Master, 2IE Ouagadougou, 56 p.

Codo R. 2012. Performance de l'apposition placentaire comme technique de diagnostic du paludisme placentaire à l'accouchement en zone de transmission stable. Mémoire de Master Professionnel, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, 103p.

Devi R, Sharma DK. 2004. Hypolipidemic effect of different extracts of *Clerodendron colebrookianum* Walp in normal and high-fat diet fed rats. J Ethnopharmacol, 90(1):63-68.

Deweerdt L, Later R. 2009. Mise en place d'un laboratoire de biologie médicale autonome dans un pays en développement. Biologie tropicale, disponible sur http://www.bioltrop.fr/spip.php?article138#3.3.6, consulté le 17/05/2013 à 8 heures 30 minutes.

Djamel K. 2007. Etude du polymorphisme de l'apoprotéine E dans la population constantinoise et dans les maladies. Thèse de Doctorat d'état en génétique et biologie moléculaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine, Algérie, 218 p.

Dougnon TV, Bankolé HS, Edorh AP, Dougnon TJ, Klotoé JR, Loko F, Boko M. 2013a. Cytotoxicity of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) against shrimp larvae (*Artemia salina* Leach). Res J Recent Sci, 2(5): 6-9.

Dougnon V, Bankolé H, Edorh P, Klotoé JR, Dougnon J, Fah L, Loko F, Boko M. 2013b. Acute toxicity of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) on Wistar rats: study about leaves and fruits. American Journal of Biochemistry, 3(3): 84-88.

Dougnon TV, Bankolé HS, Johnson RC, Klotoé JR, Dougnon G, Gbaguidi F, Assogba F, Gbénou J, Sahidou S, Atègbo J-M, Rihn BH, Loko F, Boko M, Edorh AP. 2012c. Phytochemical, nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin). Food and Nutrition Sciences, 3(11): 1595-1603.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem, 18: 499-502.

Ghorbani A. 2013. Phytotherapy for diabetic dyslipidemia: evidence from clinical trials. Clin Lipidol, 8 (3): 311-319.

Ghule BV, Ghante MH, Saoji AN, Yeole PG. 2006. Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects of *Lagenaria siceraria* (Mol.) fruit extracts. Indian J Exp Biol, 44: 905-909.

Giri RK, Kanungo SK, Tripathi NK. 2012. Hypolipidemic Activity of *Spinacia Oleracea* L. in atherogenic diet induced hyperlipidemic rats. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research, 1 (1): 39-43.

Keshetty V, Pabba S, Gudipati R, Kandukuri JM, Allenki V. 2009. Antihyperlipidemic Activity of methanolic extract of Garlic (*Allium sativum* L.) in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. Journal of Pharmacy Research, 2(5):777-780.

Kim HY, Jeong da M, Jung HJ, Jung YJ, Yokozawa T, Choi JS. 2008. Hypolipidemic effects of *Sophora flavescens* and its constituents in poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. Biol Pharm Bull, 31(1):73-78.

Kothiyal P, Gupta AK. 2011. Antihyperlipidemic activity of aqueous and ethanolic extracts of fruits of *Kigelia africana* (Lam.) Benth. in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats, Pharmacologyonline, 3: 386-395.

Krishna CB, Ravindra BS, Jayasree V, Alekhya R, Diana VA, Jaji S. 2012. Antihyperlipidemic of *Ruellia tuberosa* Linn in triton induced hyperlipidemic rats. International Journal of Pharmacy, 2(4): 740-745.

Odou M.-F. 2013. Dossier Les analyses médicales. Document consulté le 06/07/2013 à 13 heures 06 minutes, disponible à http://www.doctissimo.fr/html/sante/analyses/ana_lipidique04.htm.

Patel JS, Setty SK, Chakraborty M, Kamath JV. 2011. Antihyperlipidemic activity of Medohar Vati in triton x-100 induced hyperlipidemic rats. International Journal of Pharmaceutical Research and Development, 4(6): 125 – 130.

Rachid S, Hassan T. 2007. Cholestérol, lipoprotéine et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. Les technologies de laboratoire, 2: 4-11.

Reddy DBS, Kumar PR, Bharavi K, Venkateswarlu U. 2011. Hypolipidemic activity of methanolic extract of *Terminalia arjuna* leaves in hyperlipidemic rat models. Research Journal of Medical Sciences, 5(3): 172-175.

Sodipo OA, Abdulrahman FI, Sandabe UK, Akinniyi JA. 2011. Drug therapy for hyperlipidaemia (dyslipidaemia) – A review. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1 (06): 01-06.

Sodipo OA, Abdulrahman FI, Sandabe UK. 2012. Biochemical kidney function with aqueous fruit extract of *Solanum macrocarpum* Linn. in albino rats chronically administered triton-X to induce hyperlipidemia. Journal of Medicine and Medical Sciences, 3(2): 093-098.

Sudha SS, Karthic R, Naveen JR. 2011. Anti hyperlipidemic activity of *Spirulina platensis* in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. Hygeia: Journal for Drugs and Medicines, 3 (2):32-37.

Venkatesham A, Vasu K, Srinivas P, Rajyalakshmi G, Jagan MK. 2009. Antihyperlipidemic activity of methanolic extract of Garlic (*Allium sativum* L.) in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. Journal of Pharmacy Research, 2: 777-780.

Article 6

Research Journal of Recent Sciences _____ ISSN 2277-2502
Vol. **2(5),** 6-9, May **(2013)** *Res. J. Recent Sci.*

Cytotoxicity of Leaves and Fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) against shrimp larvae (*Artemia salina* Leach)

Dougnon T.V.[1,2]*, Bankolé H.S.[2], Edorh A.P.[1,3], Dougnon T.J.[2], Klotoé J.R.[2], Loko F.[2], and Boko M.[1]
[1]Laboratory of Toxicology and Environmental Health, Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463 Cotonou, BENIN
[2]Laboratory of Research in Applied Biology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, BENIN
[3]Department of Biochemistry and Cellular Biology, Faculty of Science and Technology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou, BENIN

Available online at: www.isca.in
Received 3th October 2012, revised 5th November 2012, accepted 7th February 2013

Abstract

Traditional leafy vegetables are these plants whose leaves or aerial parts have been integrated in a community's culture for use as food over a long span of time. These vegetables are highly recommended due to their relatively high nutritional value compared to the introduced varieties, and are also important in food security. They are also used as medicines. This study aims to assess the potential cytotoxicity of S. macrocarpon, a vegetable highly used in Africa. After hatching shrimp larvae for 48 hours, they were brought into contact with aqueous dilutions of the leaves as well as fruit for 24 hours. The variation in larval mortality as a function of concentration has been translated by a curve and semi-lethal concentrations were determined. In addition, the values of the half-lethal concentration (LC50 = 1.33 mg / ml for leaves and 1.51 mg / ml for fruit) were all greater than 0.1 mg / ml, the upper limit of toxicity. It follows then that the leaves and fruits were not toxic on shrimp larvae for the range of explored concentrations. These parts of vegetable can therefore be used both in traditional medicine and nutrition without immediate or medium-term major risks.

Keywords: *S. macrocarpon*, cytotoxicity, LC_{50}, vegetable.

Introduction

Vegetables are excellent contributions enrichment and diversification of food. They are the primary source of mineral nutrients, vitamins and other compounds involved in the health and human nutrition[1]. In fact, vegetables are important in food security during periods of drought or crop failure and are also important sources of income. In addition to their nutritional value, vegetables are also sources of drugs[2-4]. In Benin, *S. macrocarpon* called "Gboma" in the local language Fon is grown by nearly of 95% of market gardeners[5]. This high production is justified by the high consumption of this vegetable by people[6]. Thus, the leaves and young fruits are prepared and eaten as a vegetable in several African countries[7]. In addition, this plant appears to have an interest in traditional medicine in the treatment of various disorders[7].

Despite the importance of the nutritional and medicinal vegetable, no scientific work to date, has provided scientific evidence that consumption of *S. macrocarpon* would have no effect on human cells. This is why the present study evaluated the cytotoxicity of leaves and fruits of S. *macrocarpon* against larvae of shrimp. It is justified by the fact that previous studies have revealed that the fruits of *S. macrocarpon* especially should be consumed with caution because of some chemical groups that phytochemical screening revealed[8-9]. This study is a contribution to a better understanding of this vegetable and to control possible risks associated with its use.

Material and Methods

Material: The leaves and mature fruit of *S. macrocarpon* (figure 1) were the plant material used in this study. They were purchased in July 2012 on the gardener site of Houéyiho at 6° 21' 20" North latitude and 2° 21' 35" East longitude in Benin. The plant was identified and authenticated by the National Herbarium of Benin under N° AA 6423/ HNB of 31 July 2012. Toxicity was evaluated at Laboratory of Pharmacognosy and Essential Oils with shrimp larvae whose eggs are marketed by the German Company JBL Gmbh & Co.KG.

Plant preparation: The leaves were dried at room temperature of 16°C in Research Laboratory in Applied Biology (University of Abomey-Calavi) for 17 days while fruits were finely cut into small pieces and dried for 09 days. Dried leaves and fruits were ground using a SAYONA Moulinex commercially purchased. The powders obtained were sieved using sieves of 0.2 mm and stored in sterile containers until needed.

Cytotoxicity test on shrimp larvae: This test is based on the survival of shrimp larvae in sea water in the presence of the test solution. Its interest lies in understanding the possible side effects that would result from consumption of fruits and leaves of *S. macrocarpon* on the body. It is a test of primary non-clinical toxicity proposed by Michael et al.[10] and later developed by Vanhaecke et al.[11], Sleet and Brendel[12]. This test is proposed

as a simple method of bioassay for preliminary assessment of toxicity in search of natural active products[13]. Eggs of *A. salina* were grown in an erlenmeyer containing sea water taken from the Atlantic Ocean and filtered before use. The mixture was left under stirring for 48 hours. Meanwhile, the eggs hatched to give birth to young larvae. Using a pipette, a colony of 16 live larvae was placed in contact with a series of solutions of graded concentrations of decoction of *S. macrocarpon*. These solutions and controls containing no solutions of *S. macrocarpon* were left stirring and read twenty-four hours later. In case of death in the control medium, the data are corrected by Abbott's formula[14]:

% Death = [(test-control) / control] × 100

The dose-response data were log-transformed and the Lethal Concentration 50 (LC_{50}) determined by a linear regression study[15].

To assess the degree of toxicity from LC_{50} values, the correlation table (table 1) established by Mousseux[16] was used.

Preparation of test solutions: A solution was prepared by moderate heating for 20 minutes the mixture of 1 g of powdered leaves and fruits of *S. macrocarpon* in 20 ml of distilled water. The concentration of 50 mg/ml was obtained. A range of ten successive dilutions were made with sea water from decoction. Concentration values expressed in mg/ml of the dilutions contained in test tubes were 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09, and 0.04.

Table-1
Correspondence between LC_{50} and toxicity

LC_{50}	Toxicité
$LC_{50} \geq 0.1$ mg/ ml	- (Non-toxic)
0.1 mg/ ml $> LC_{50} \geq$ 0.050 mg/ ml	+ (Low toxicity)
0.050 mg/ ml $> LC_{50} \geq$ 0.01 mg/ ml	++ (Moderate toxicity)
$LC_{50} < 0.01$ mg/ ml	+ + + (High toxicity)

Statistical analysis: For the toxicity study, *A. salina* larvae were exposed to different concentrations of powdered decoction of leaves and fruits to determine the concentration that will kill 50% of larvae in 24 hours. Probit analysis was used to analyze data from toxicity tests. LC_{50} values of tested powders were calculated with Microsoft Excel 2010. A confidence interval of 95% has been set.



Figure-1
Leaves and fruits of *S. macrocarpon*

Results and Discussion

Several studies have shown that larval toxicity test is an excellent method for preliminary investigations of toxicity[17]. Para et al.[18] have also demonstrated a positive correlation between larval toxicity test and the oral lethal dose of medicinal plants in mice. Shrimp larvae remained sensitive to leaves and fruits of *S. macrocarpon* with a threshold dose of mortality equal to 0.39 mg / ml (figures 2 and 3). Sensitivity curves showed that the death of the larval population increases with the concentration. This sensitivity thus followed a dose-response relationship.

In addition, the values of the half-lethal concentration (LC_{50} = 1.33 mg / ml for leaves and 1.51 mg / ml for fruit) were all greater than 0.1 mg / ml, the upper limit of toxicity[16]. We then deduce that the leaves and fruit are not safety on shrimp larvae for the range of concentrations explored. In addition, taking into account the correlation between larval toxicity and toxicity to cells, leaves and fruits of *S. macrocarpon* does not have harmful effects on human cells namely PS 9 and 9 KB (human carcinoma) on one hand[19]; A-549 cells of lung carcinoma and HT-29 cells of colon carcinoma on the other part[20]. In sum, the organs studied for this vegetable can be used for daily basic diet without exposure to adverse effects in short and medium term. This work reinforces the phytochemical study recently conducted by Dougnon et al[9] who showed the richness of fruits in secondary metabolites. The non-cytotoxicity of *S. macrocarpon* justifies that the leaves and fruits are widely consumed as a vegetable in Africa.

In addition, the medicinal properties of this plant recognized in Africa can be seriously explored, since there is no cellular toxicity associated with its use. *S. macrocarpon* has better harmlessness compared to *Tamarindus indica*, a plant of the family Leguminoseae, which is also used as food and in traditional medicine[21-23]. Indeed, *T. indica* used in high doses, seems to have a certain cell toxicity[24]. It is the same with plants as *Lannea barteri* (K & Gillet), *Sclerocaria birrea* A. Rich, *Annona senegalensis* Pers., *Kigelia africana* (Lam). Benth, *Ananas comosus* L. Merr., etc. used in the treatment of malaria and various cancers in Nigeria[25], *Muntingia calabura* used for its antibacterial properties in Brazil[26], *Abroma augusta*, *Acanthus ilicifolius* used in traditional medicine in Bangladesh[27]. This study classified *S. macrocarpon* among the non-cytotoxic vegetables such as *Amaranthus hybridus*, a highly consumed vegetable in Kenya[28].

Conclusion

The present study scientifically demonstrated that both leaves and fruits of *S. macrocarpon* grown in Benin can be eaten and used in traditional medicine in short and medium term without major risk. However, long-term use should be done with caution, since no scientific study has explored this aspect.

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interests.

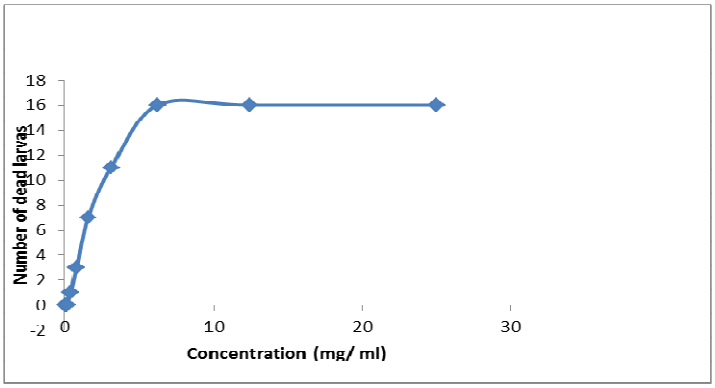


Figure-2
Sensivity curve of the decoction of leaves against shrimp larvae

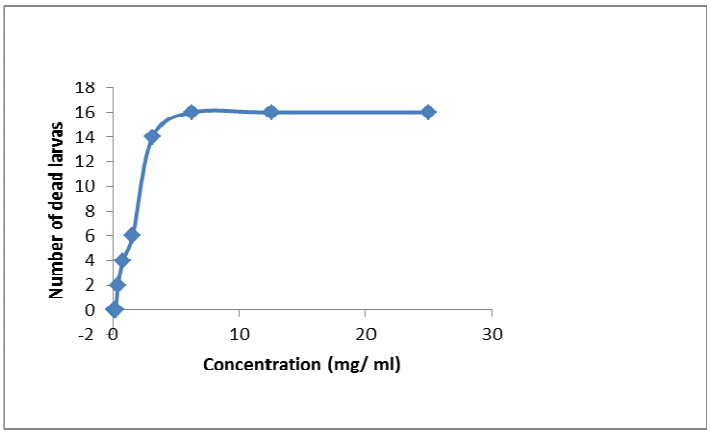


Figure-3
Sensivity curve of the decoction of fruits against shrimp larvae

Acknowledgment

We sincerely thank all the technicians of the Laboratory of Pharmacognosy and Essential Oils at Benin Center of Scientific and Technical Research for their various contributions. Authors also thank the National Program of Traditional Medicine and Pharmacopoeia of Benin for its support.

References

1. Sinha N.K., Handbook of vegetables and vegetables processing, Blackwell Publishing Ltd, England, 788, **(2011)**
2. Abbiw D.K., Diversity and traditional uses of African vegetables. In: Guarino L (Ed). Traditional African Vegetables: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Genetic Resources of Traditional Vegetables in Africa, Conservation and Use. ICRAFHQ, Nairobi, Rome: Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research: 29-30 **(1997)**
3. Okafor J.C., Conservation and use of traditional vegetables from woody forest species in southeastern Nigeria. In: Guarino L (Ed), Traditional African Vegetables:

Proceedings of the IPGRI International Workshop on Genetic Resources of Traditional Vegetables in Africa, Conservation and Use, ICRAF-HQ, Nairobi, Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Rome, 31-38 **(1997)**

4. Geissler P.W., Harris S.A., Prince R.J., Olsen A., Odhiambo R.A. and Oketch-Rabah H., Medicinal plants used by Luo mothers and children in Bondo District, Kenya, *J. Ethnopharma,* **83**, 39-54 **(2002)**

5. Assogba-Komlan F. and Anihouvi P., Pratiques culturales et teneur en éléments anti nutritionnels (nitrates et pesticides) du *Solanum macrocarpum* au sud du Bénin, *AFJAND*, **7(4),** 01 – 21 **(2007)**

6. Dougnon T.V., Edorh P.A., Bankolé H.S., Dougnon T.J., Montcho S.A., Hounkpatin A., Gouissi M., Sossou B., Boko M. and Creppy E.E., Evaluation of the toxicological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum* L. cultivated with the chicken's droppings and water of marsh at Cotonou (Benin), *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, **1(1)**, 001-006 **(2012a)**

7. Sodipo O.A., Abdulrahman F.I., Alemika T.E. and Gulani I.A., Chemical composition and biological properties of the petroleum ether extract of *Solanum macrocarpum* L. (Local Name: Gorongo), *British Journal of Pharmaceutical Research*, **2(2),** 108-128 **(2012)**

8. Olaniyi A.A., Ayim J.S.K., Ogundaini A.O. and Olugbade T.A., Essential inorganic and organic chemistry, Omoade Printing Press, Ibadan, Nigeria, 582 **(1998)**

9. Dougnon T.V., Bankolé H.S., Klotoé J.R., Dougnon G., Gbaguidi F., Assogba F., Gbénou J., Sahidou S., Atègbo J-M., Rhin B., Loko F. and Edorh A.P., Phytochemical, nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin), *Food and Nutrition Sciences*, **3(12),** 1595-1603 **(2012b)**

10. Michael A.S., Thompson C.G. and Abramovitz M., *Artemia salina* as a test organism for a bioassay, *Science*, **123**, 464 **(1956)**

11. Vanhaecke P., Persoone G., Claus C. and Sorgeloos P., Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*, *Ecotoxicol Env Safety,* **5,** 382-387 **(1981)**

12. Sleet R.B. and Brendel K., Improved methods for harvesting and Counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology, *Ecotoxicol Env Safety*, **7,** 435- 446 **(1983)**

13. Solis P.N., Wright C.W., Anderson M.M., Gupta M.P., Phillipson J.D., A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med*., **59,** 250-252 **(1993)**

14. Abbott W.S., A method of computing the effectiveness of an insecticide, *J. Econ. Entomol.,* **18**, 265 **(1925)**

15. Hafner E., Heiner E., Noack E. Arzn eim-Forsch., **27**, 1871 **(1977)**

16. Mousseux M., Test de toxicité sur les larves de *Artemia salina* et entretien d'un élevage de balanes, Rapport de stage de 2ème année. DEUST Aquaculture; Centre Universitaire de Nouvelle-Calédonie, France **(1995)**

17. Quignard E.L., Pohlit A.M., Nunomura S.M., Pinto A.C., Santos E.V. and Morais S.K., Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp, *Acta Amazon*., **33**, 93-104 **(2003)**

18. Parra A.L., Yhebra R.S., Sardinas I.G. and Buela L.I., Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts, *Phytomedicine*, **8,** 395-400 **(2001)**

19. Pelka M., Distler W., Petschelt A. and Dent J., A new screening test toxicity testing of dental materials, **28**, 341-345 **(2000)**

20. Carballo J.L., Hernández-Inda Z.L., Pérez P., García-Grávalos M.D., A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products, *BMC Biotechnology,* **2**, 17 **(2002)**

21. Anon B., The Useful Plants of India; CSIR: New Delhi, India **(1986)**

22. Morton J., Tamarind In: Fruits of Warm Climates; Creative Resources Systems, Inc.: Miami, FL, USA, 115-121 **(1987)**

23. Pamploma-Roger G.D., Encyclopaedia of Medicinal Plants; Education and Health Library: Madrid, Spain, **2,** 536 **(1999)**

24. Nwodo U.U., Ngene A.A., Anaga A.O., Chigor V.N., Henrietta I.I., Okoh A.I. Acute toxicity and hepatotoxicokinetic studies of *Tamarindus indica* Extract, *Molecules,* **16**, 7415-7427 **(2011)**

25. Adoum O.A., Determination of toxicity levels of some savannah plants using Brine Shrimp Test (BST) Bajopas**, 2(1),** 135-138 **(2009)**

26. Ramos S.C.S., de Oliveira J.C.S., da Câmara C.A.G., Castelar I., Carvalho A.F.F.U, Lima-Filho J.V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine, *Brazilian Journal of Pharmacognosy,* **19(2A)**, 376-381 **(2009)**

27. Rahmatullah M., Sadeak S.M.I., Bachar S.C., Hossain M.T., Mamun A. and Jahan N., Brine Shrimp Toxicity Study of Different Bangladeshi Medicinal Plants, *Advances in Natural and Applied Sciences*, **4(2)**, 163-173 **(2010)**

28. Orech F.O., Akenga T., Ochora J., Friis H., Aagaard-Hansen J., Potential toxicity of some traditional leafy vegetables consumed in Nyang'oma division, Western Kenya, *African Journal of Food and Nutritional Sciences*, **5(1)**, 1-14 **(2005)**

Article 7

I.J.A.B.R., VOL. 2(1) 2012:91-94 ISSN 2250 - 3579

INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED BIOLOGICAL RESEARCH

© 2004 - 2012 Society for Science and Nature (SFSN). All rights reserved

www.scienceandnature.org

EVALUATION OF THE TOXICOLOGICAL QUALITY OF CHICKEN'S DROPPINGS USED FOR THE CULTURE OF *SOLANUM MACROCARPUM L.* IN COTONOU (REPUBLIC OF BENIN)

[a,c]Dougnon,T.V., [a,b]Edorh, P.A., [c]Bankolé, H.S., [d]Dougnon, T.J., [d]Salifou, S., [a]Koumolou, L., [a]Montcho, S.A., [a]Boko, M.

[a]Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, Laboratory of Toxicology and Environmental Health, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463 Cotonou, Benin.

[b]Faculty of Science and Technology, Department of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou, Benin.

[c]Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Human Biology, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin.

[d]Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Animal Production and Health, Research Laboratory in Applied Biology , University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin.

ABSTRACT

The study evaluated the toxicological quality of the chicken's droppings used for the amendment of the seedlings of *Solanum macrocarpum L*. in Cotonou. A pilot site with Glo, the market-gardening sites of Houéyiho, Fidjrossè and Agongbomey were included in the study. The lead contents sought in eight samples of droppings at a rate of two per site are as follows: Glo-Djigbé (3.618 Mg/kg± 0.051); Houéyiho (0.887 mg/kg ± 0.017); Agongbomey (1.921 mg/kg ±0.079) Fidjrossè (0.696 mg/kg ± 0.048) ($p< 0.05$). Cadmium is present in the samples at the following rates: Glo-Djigbé (0.08±0.02 mg/kg); Houeyiho (0.04±0.01); Fidjrosse (0.05±0.01 mg/kg), Agongbomey (0.07±0.01). These results have shown the chicken's droppings used in Cotonou are contaminated by lead and cadmium; which could contribute to the contamination of *Solanum macrocarpum L*. leaves and other vegetable plants. The populations which consume these vegetables are exposed to diseases related to the intoxication by lead and cadmium.

KEYWORDS: Lead,cadmium, chicken's droppings, *Solanum macrocarpum* L.

INTRODUCTION

Urban agriculture became throughout the whole world and specifically in the developing countries, one of the activities necessary to ensure the food safety of the townsmen and to get financial resources with the unemployed persons of the cities. Its contribution with the food production on a world level which was at 15 % in 1993 can have exceeded 33 % as from the year 2005 (Niang, 1996). Smit *et al*. (1996) revealed that agriculture is practised in at least 90 towns of 31 countries of the Southeast Asia, Middle East, Europe, Subsaharian Africa, America and Antilles. In addition, 800 million people practise this activity on a worldwide scale (Koc *et al*. 2000). The problems of urban agriculture in West Africa were the subject of several publications which show well its importance in cities (Akinbamijo *et al*. 2002). Urban agriculture is thus socially significant. The activities of production, transformation and marketing offer employment opportunities for a mass of the urban population in situation of unemployment and the rural ones in seasonal migration. Benin, following the example of many african countries, experienced these last years a development of urban agriculture (Dougnon *et al*., 2012).

In the town of Cotonou, the market-gardening production and more precisely of the vegetable-sheets is a reality. It contributes to the provisioning of the markets of the city of food products (Afrique Conseil, 2006). The systems of production are much diversified in terms of speculations (vegetables, fruits, flowers, meat, eggs, etc.) and of economic profile of the owners (young people, little qualified populations, contractors). The modernization and the intensification of the systems of production induce a stronger use of agricultural inputs. The producers answer this request by the recycling of various types of waste (Akinbamijo *et al*,. 2002). Thus, inside the city, the population developed a local strategy of market-gardening production which resulted in the use of the chicken's droppings to amend the market-gardening products. These poultry's droppings, as many waste used in agriculture, contains organic matter and biogenic salts which constitute a contribution interesting for the grounds of culture (Legret *et al*., 1988). But the presence of elements traces in the droppings represents a major constraint with its use in agriculture because these elements can be brought in unstable and potentially biodisponibles forms (Legret, 1984). Indeed, in the event of use of waste of animals on the market gardenings (whose sheets are consumed), certain metals, like lead, accumulate preferentially in the foliar parts (Niang, 1996); which could be at the origin of food poisonings on the level of the fresh vegetable consumers. For that, we chose to study the lead which is one of the most toxic metals for the man. It involves more or less serious lesions and diseases (Testud, 2005).

Having thus noticed that an increasing number of market-gardeners prefer to use the chicken's droppings to amend their cultures, this study evaluated the toxicological

quality of these inputs which are used to amend different vegetables.

MATERIALS AND METHODS

Localization of the sites of study

Our survey took in account a witness site at Glo (6° 56 ' Northern latitude and 2°30' Eastern longitude) and market-gardening sites of Houeyiho (6° 21' 20" Northern latitude and 2° 21' 35" Eastern longitude), of Fidjrosse (6° 22' Northern latitude and 2° 24' Eastern longitude); of Agongbomey (6° 21' Northern latitude and 2° 24' 45" Eastern longitude) (Figure 1).

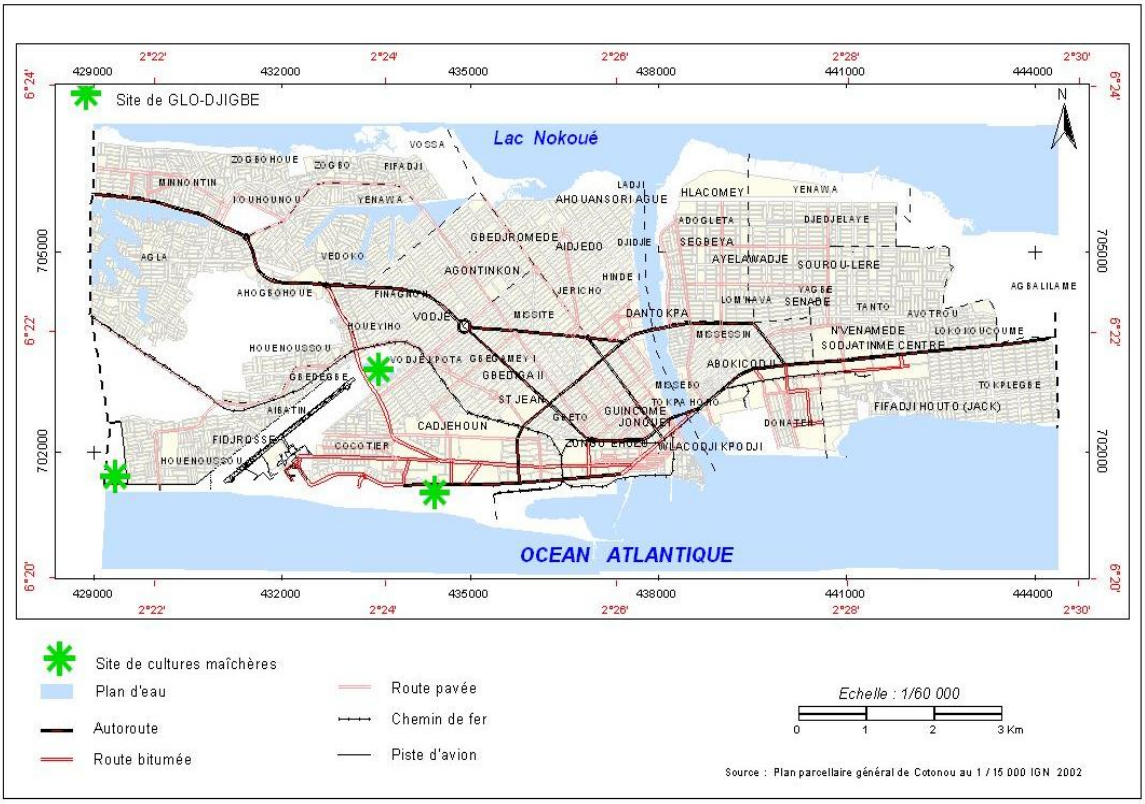


FIGURE 1: Localization of sites included in the survey

Sampling

It has been used among others of the white sachets labeled to collect samples, of the sterile gloves for withdrawals, an icebox for the transportation of samples. For exams to the laboratory, a balance of high degree of accuracy, a Spectrophotometer of Atomic Absorption (SAA) equipped with a system of correction of the background noise, with a burner air - acetylene and a gas supply adapted, a lamp with hollow cathode specific to the lead, a thermostated hotplate, a programmable furnace, quartz crucibles and glassmaking of laboratory (flasks, erlenmeyers).

On each site, we carried out in two different market-gardeners, some samples of droppings. 500 grams of chicken's droppings were collected on the sites and introduced into hermetically tied plastic sachets. All the samples were transported in a refrigerator towards the laboratory in a one hour interval after the taking away where they were preserved at once at a temperature of 4° C. The toxicological analyses were carried out in the 200 hours following the test sample selections.

Methods of analysis

Toxicological analyses

They were made at the Laboratory for Sciences Ground, Water and Environment of the National Institute of the Agronomic Research of Benin (INRAB) in Republic of the Benin. Lead and cadmium were required in the samples by reading with the Spectrophotometer of Atomic absorption (SAA) 110 with flame in accordance.

Droppings are incinerated with a muffle furnace with 550°C during 24 hours. Ash obtained is dissolved in 2 mL of hydrochloric acid (HCl) 6N which is evaporated on hotplate with 125°C. The viscous remainder obtained is again dissolves and recovered using nitric acid (HNO3) 0,1M in a flask of 100 mL. The solution obtained is used for lead and cadmium dosage by AAS.

With a specific wavelength, part of the luminous energy emitted by the lamp with hollow cathode is absorbed by the solution of the sample. This quantity of energy is used by the element to pass from its "fundamental" state to a metastable "excited" state: it is the energy of excitation. It is proportional to the concentration in suggestion for the solution. Thus knowing the quantity of energy absorptive by a solution sample, the concentration is deduced.

With this intention, it resorts each time at standard solutions (solutions prepared or acquired in the trade) of concentration known with precision. For a range of standards, the optical device of the apparatus calculates a parameter (absorbance) for each standard. It then carries out a parametric regression which enables it to determine the concentration of each sample starting from this same given parameter and of a curve of regression for the sample.

To make possible the uniformly exposition of element's atoms with the source of light, the solution of proportioning is aspired through a very fine capillary then

pulverized in the flame supplied with a mixture of air and acetylene. The atoms released can then absorb part of the energy emitted by the lamp with hollow cathode and make it possible to determine absorption.

To ensure the handling of the signals, the optical system is equipped with detectors and amplifying precise and powerful. For the system flame used, the limit of detection of the instrument for lead and cadmium are respectively of 0.0100 and 0.0200 ppm.

Statistical analyses

It was calculated the averages and the standard deviations. Multiple comparisons consisting in comparing the averages using the test of Student p (T>t) = 0.05 were made. The softwares used are Microsoft Excel 2010 and XL Stat 2011.

RESULTS AND DISCUSSION

With regard to the lead content in the droppings used for the amendment of the sites, the averages obtained are as follow: Glo-Djigbé (3.618 ± 0.051); Houeyiho (0.887 ± 0.017); Agongbomey (1.921±0.079) Fidjrosse (0.696 ± 0.048) ($p< 0.05$) (Figure 2).

The averages of cadmium contamination are as follow: Glo-Djigbé (0.08±0.02 mg/kg); Houeyiho (0.04±0.01); Fidjrosse (0.05±0.01 mg/kg), Agongbomey (0.07±0.01) (Figure 3)

The droppings used for the amendment of the various sites of study are all contaminated by lead. These results are confirmed by work of Gupta *et al*. (1999) which found values lower than 35 mg/kg in samples of droppings. In the same way, Kouassi *et al*. (2008) found that the droppings used on the market-gardening grounds of Abidjan are rich in lead. These droppings are also contaminated by cadmium. Lead's averages are more important than cadmium's one (figure 4). That difference could be explained by the fact that cadmium is an industrial heavy metal. It more concentrated around industrial installations (Dougnon *et al*., 2012).

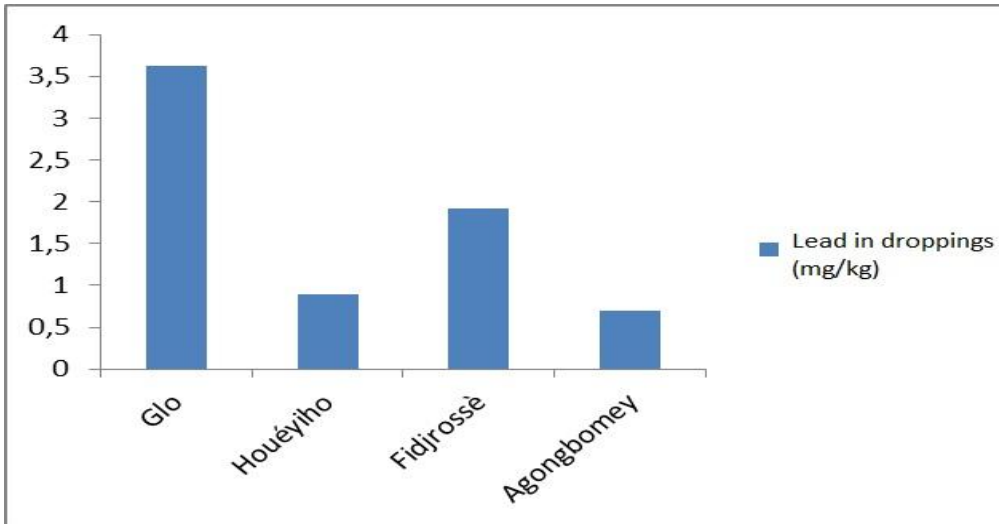


FIGURE 2: Contamination of chicken's droppings by lead

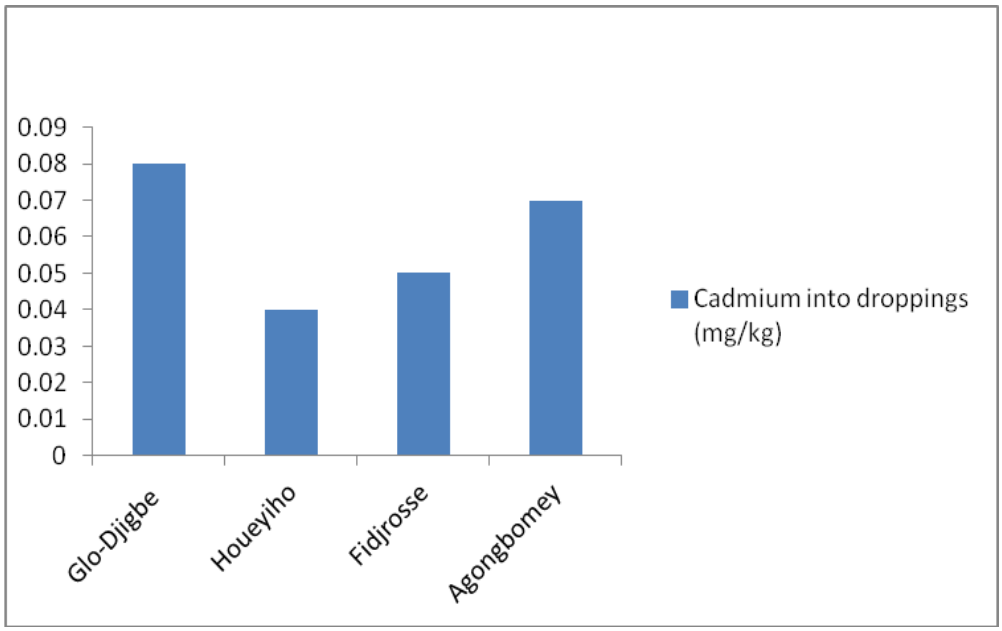


FIGURE 3: Contamination of chicken's droppings by cadmium

Chicken's droppings used for the culture of *solanum macrocarpum L.*

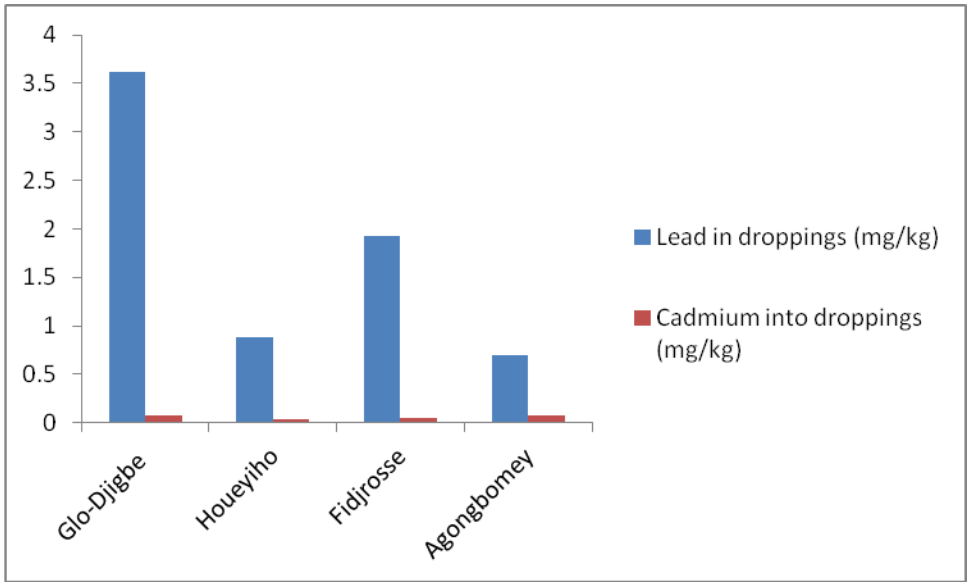


FIGURE 4: Contamination of droppings by lead and cadmium

However, it remain weak compared to the value threshold AFNOR (180 mg/kg) for lead and 3mg/kg for cadmium (Kouassi *et al*, 2008). These rates of contamination are significantly different on the level from the site of Glo compared with the other sites. That would be certainly due to the fact that the chicken's droppings used to amend these sites come from various hen houses. However, the presence of a strong lead concentration in the droppings of the pilot site of Glo (which not having known any composting) could mean that composting plays a rather significant role in the heavy metal holding capacity of the droppings. Indeed, it seems the wet and compact droppings would retain lead better than dry droppings as same manner that the heavy grounds retain some of it. (Chidikofan, 2010).

REFERENCES

Afrique Conseil. (2006) Monographie de la commune de Cotonou, 47 p.

Akinbamijo, O. O., Fall, S. T., Smith OB. (2002) Advances in crop-livestock integration in West African cities. Dakar: ITC/ISRA/CRDI, 213 p.

Chidikofan, G. (2010) Contribution à l'amélioration de la qualité des cultures maraîchères du site de Houéyiho à Cotonou au BENIN : cas de la laitue (*Lactuca sativa L.*), Mémoire de Master, 2IE Ouagadougou, 56 p.

Gupta, G. et Charles S. (1999) Trace elements in soils fertilized with poultry litter. Poultry science, 78: 1695-1698.

Juste, C., Chassin P., Gomez, A., Lineres, M., Mocquot B., Feix I., WIART J. (1995) Les micropolluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. ADEME Editions, Angers, 209 p.

Khader, V., Rama, S. (1998) Selected mineral content of common leafy vegetables consumed in India at different stages of maturity. Plant foods for Human Nutrition, 53: 71-81.

Koc, M., Macrae, R., Mougeot, J. A., Welsh, J. (2000) Armer les villes contre la faim: systèmes alimentaires urbains durables ». CRDI, 243 p.

Kouassi, J., Bekro, Y., Ahou, E., Baize, D., Denezon, O., Moussa, B., Fatiha, Z., Macaigne, P. (2008) Diagnostic d'une contamination par les éléments traces métalliques de l'épinard (*Spinacia Oleracea*) cultivé sur des sols maraîchers. European Journal of Scientific Research, 21 (3) : 471-487

Legret, M., Divet, L., Juste, C. (1988) Migration et spéciation des métaux lourds dans un sol soumis à des épandages boues de station d'épuration à très fortes charges en Cd et Ni. Wat. Res. 22 (8): 953-959.

Legret, M. (1984) Les métaux lourds dans les boues de station d'épuration. Valorisation agricole et extraction des métaux toxiques. Bull. Liais. Labs P. et Ch. 129 : 35-40.

MVAD. (2003) Les matières organiques produites à la réunion, chapitre 5, 63 p.

Niang, S. (1996) Utilisation des eaux usées domestiques en maraîchage périurbain à Dakar (Sénégal). Sécheresse; 3 : 217-23.

Smit J., Ratta A. et Bernstein, J. (1996) Urban agriculture: an opportunity for environmentally sustainable development in sub-Saharan Africa, Washington (DC, E.-U.), Banque mondiale, Environmentally Sustainable Division, African Technical Department. Post-UNCED Series, Building Blocks for Africa 2025, Paper No. 11.

Testud, F. (2005) Pathologie toxique professionnelle et environnement. 3ème éd, Eska, Paris, 672 p.

Article 8

International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)
ISSN: 2223-7054 (Print)
Vol. 2, No. 3, p. 19-23, 2012
http://www.innspub.net

RESEARCH PAPER OPEN ACCESS

Microbiological and toxicological qualities of the water of watering used in urban agriculture in Cotonou (Republic of Benin)

TV Dougnon[1,3*], TJ Dougnon[4], PA Edorh[1,2], JR Klotoé[3], S Sahidou[4], P Guédénon[1], B Sossou[1], M Boko[1], EE Creppy[5]

[1]*Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, Laboratory of Toxicology and Environmental Health, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463 Cotonou, Benin*

[2]*Faculty of Science and Technology, Department of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou, Benin*

[3]*Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Human Biology, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin.*

[4]*Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Animal Production and Health, Research Laboratory in Applied Biology , University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin.*

[5]*Laboratory of Toxicology and Applied Hygiene/UFR of Pharmaceutical Sciences, 146, Street Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex France*

Received: 21 January 2012
Revised: 25 February 2012
Accepted: 27 February 2012

Key words: *Escherichia coli*, cadmium, water of watering.

Abstract

This study has evaluated microbiological and toxicological qualities of water of watering in Cotonou. A pilot site at Glo-Djigbé, the market-gardening sites of Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey were included in the work. The salmonellas, *Escherichia coli* and cadmium were required in water of watering. On the whole, eight water samples of water were analyzed. Water of watering of the pilot site of Glo-Djigbé is not contaminated by *Escherichia coli* compared to those used at the sites of Houeyiho; Fidjrosse; Agongbomey. Cadmium is absent from all the samples. The study has showed that waters of watering used in urban agriculture in Cotonou are not good and could contaminate the culture, what could induce some diseases with populations.

*Corresponding Author: TV Dougnon ✉ victorien88@hotmail.com

Introduction

Urban agriculture became throughout the whole world and specifically in the developing countries, one of the activities necessary to ensure the food safety of the townsmen and to get financial resources with the unemployed persons of the cities. Mougeot (2006) reports that between 2015 and 2020, more half of the world population will live in urban or perish-urban zone. The role of urban agriculture is justified fully taking into consideration this demographic explosion on a worldwide scale. Its contribution with the food production on a world level which was at 15 % in 1993 can have exceeded 33 % as from the year 2005 (Mougeot, 2006).

Smit *et al.* (1996) revealed that this activity is practised in at least 90 towns of 31 countries of the Southeast Asia, of the Middle East, of Europe, of Subsaharian Africa, Antilles and North, Center, South America. In addition, 800 million people practice this activity on a worldwide scale (Koc *et al.*, 2000).The problems of urban agriculture and in West Africa were the subject of several publications which show well its importance in cities (Akinbamijo *et al.*, 2002). Urban agriculture is thus socially very significant. The activities of production, transformation and marketing offer employment opportunities for a significant mass of the urban population in situation of chronic unemployment and the rural ones in seasonal migration.

Benin, following the example of many African countries, experienced these last years, a development of urban agriculture. In the town of Cotonou, the market-gardening production and more precisely that of the vegetable-sheets is a reality impossible to circumvent. It contributes to the provisioning of the markets of the city of food products. The modernization and the intensification of the systems of production induce a stronger use of water of watering (Akodogbo, 2005).

Thus, inside the city, the population developed a local strategy of market-gardening production which resulted in the use of water of the marshes to sprinkle the market-gardening products.

Pathogenic micro-organisms pass in the excreta of the people infected to find itself in water of the marshes being used for watering of the cultures (Dougnon *et al.* (a)., 2012). In the same way, some heavy metals as lead and cadmium could contaminate this water, considering that they are not very deep. As shown by the works of Dougnon *et al.* (b), (2012), water of watering used at Cotonou accumulated lead. This could pose medical problems with the fresh vegetable consumers. As often, when lead is present, cadmium is too, this study proposed to evaluate microbiological and toxicological qualities of the water of watering used on the market-gardening sites of Cotonou.

Materials and methods

Presentation of the sites of study

The survey took into account a pilot site at Glo-Djigbé (6° 56 ' Northern latitude and 2°30' Eastern longitude) and market-gardening sites of Houeyiho (6° 21' 20" Northern latitude and 2° 21' 35" Eastern longitude), Fidjrosse (6° 22' Northern latitude and 2° 24' Eastern longitude); Agongbomey (6° 21' Northern latitude and 2° 24' 45" Eastern longitude) (Fig. 1).

Sampling

It has been used among others of the white sachets labeled to collect samples, of the sterile gloves for withdrawals, an icebox for the transportation of samples. For exams to the laboratory, we used surroundings of culture as Rapid *E.coli*, some serological pipettes, drying ovens, some crushers.

On each site, we carried out in two different market-gardeners, some samples of water of watering. The samples of the water of watering were directly taken in sterile sachets at a rate of 0.5 liter. All the samples were transported in a refrigerator towards the laboratory in a one hour interval after the taking away where they were preserved at once at a temperature of 4° C. The microbiological analyses were carried out in the 24 hours following the test

sample selections. The research for cadmium was made by the two weeks.



Fig. 1. Localisation of included sites.

Microbiological analyses

The microbiological analyses were carried out in the Section Hygiene of Water and Food of the National Laboratory of Public Health at Benin. The purpose of the microbiological analyses are to highlight the presence or not of *Escherichia coli* in the samples of water of watering.

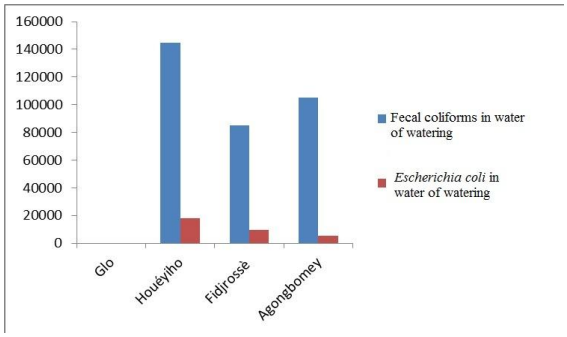


Fig. 2. Presence of fecal coliforms in water of watering.

Research of Escherichia coli

The fecal coliforms and especially *Escherichia coli* were required because they are pilot presence of pathogenic microorganisms. The analyses were made in accordance with the standards of reference NFV 08-053.

Toxicological analyses

They were made at the Laboratory for Sciences Ground, Water and Environment of the National Institute of the Agronomic Research of Benin (INRAB) in Republic of Benin. Cadmium was required in the samples by reading with Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) in accordance with the standards of reference NF ISO 1146 1995 and NF X 31-147 1996.

Statistical analyses

It was calculated the averages and the standard deviations. Multiple comparisons consisting in comparing the averages using the test of Student p (T>t) = 0.05 were made. The softwares used are Microsoft Excel 2010 and XL Stat 2011.

Results

Presence of *Escherichia coli* in the water of watering

Water of watering of the witness site of Glo-Djigbé is not contaminated by fecal coliforms (0 UFC/100ml) whereas those of Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey are it respectively with $14.5.10^4 \pm 70.06$ UFC/100 ml; $8.5.10^4 \pm 106.01$ UFC/100 ml and $1.05.10^5 \pm 70.06$ UFC/100 ml. *Escherichia coli* is absent on the witness site of Glo-Djigbé contrary with Houeyiho ($1.8.10^4 \pm 28.42$ UFC/100 ml), Fidjrosse ($0.95.10^4 \pm 70.10$ UFC/100 ml) and Agongbomey (5545 ± 77.53 UFC/100 ml) (figure 2). These differences prove to be significant because it is about total absence on the site of Glo-Djigbé and presence of coliforms on the other sites ($p< 0.05$).

Contamination of water of watering by cadmium

The averages obtained are consigned in table 1.

Discussion

Presence of fecal coliforms in the water of watering

It was required the fecal coliforms whose *Escherichia coli* in water of watering because these bacteria are produced in the intestine of the animals. When using chicken's droppings to amend cultures, the water can be contaminated. But their presence in vegetables is abnormal and accounts for the sanitary quality of this food. The presence of fecal coliforms brought by our results can be an indication of the presence of micro-organisms like notified by Zmirou *et al.* (1987). Moreover, the presence of *Escherichia coli* confirms the effective presence of the fecal coliforms. In addition, Habteselassie *et al.* (2010) stress that *Escherichia coli* develops close to the roots of the plants and can contaminate the culture of the young growths. It can

live during weeks around the roots of the plants and be transferred towards the edible parts.

Table 1. Presence of cadmium on the samples of water of watering.

Sites	G	H	F	A
Samples of watering water (mg/L)	0.000	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000	0.000
Average	**0.000a**	**0.000a**	**0.000a**	**0.000a**
± Standard deviation	0.000	0.000	0.000	0.000

Generally, water of watering used on the market-gardening sites are contaminated by the fecal coliforms except for the witness site of Glo-Djigbé This difference could be explained by the system of watering used. Indeed, on the site of Glo-Djigbé, the market-gardeners use the tap of the National Company of Water whereas on the other sites, the ground systems of marsh dug (Houeyiho and Agongbomey) and drilling (Fidjrosse) are adopted. Water of watering of Houeyiho is polluted by fecal coliforms than those of Agongbomey and Fidjrosse. The results of this study are in agreement with those of Akodogbo (2005) which stress that the water of drilling is polluted than that of the wells (grounds dug of marsh). This author remarked in addition that the majority of the well rivers and drilling of Cotonou are invaded by the coliforms.

It is the same for *Escherichiacoli* absent on the site of Glo-Djigbé but present on the other market-gardening sites. That confirms well this water of watering knew a recent fecal contamination. This is possible insofar as the majority of the aforesaid sites have a considerable insalubrity (human excrements and other waste). The depth of the wells is also a factor very significant because more water infiltrates, more it gets rid of its impurities; however the majority of the sources of watering of the market-gardening sites are located in hollows and are not deep. None water of watering, put besides those of the site of Glo-Djigbé meets the standards varying between 100 and 200 UFC/100 ml for the coliforms and *Escherichia coli*, proposed by Santé Canada (1991).

Contamination of the water of watering by cadmium

The water samples of watering are not contaminated by cadmium. It proves that without its contamination by lead, these water are free of cadmium. It seems water of watering of the sites of study does not present major risks while being used to sprinkle the seedlings. Cadmium is an extremely toxic heavy metal which is widely used in mining, metallurgical operation, electroplating industries manufacturing vinyl plastics, electrical contacts, metallic and plastic pipes (Osman *et al*., 2009). As the sites are not in industrial area, the results of our study prove that cadmium is really an industrial metal. However, with the presence of lead (Dougnon *et al*. (b)., 2012), some precautions must be taken in order to cleanse the environment of culture as well as possible. It has been proved by Edorh *et al*. (2009) that *Achatina achatina* accumulated heavy metals, near to the legumes washed. With this intention, the use of well-maintained drillings seems better adapted contrary to the grounds dug of marsh which are very quickly polluted.

Conclusion

The water of watering used in urban agriculture in Cotonou is contaminated by the fecal coliforms beyond the authorized standards. It should not be used for that or at least undergo a certain cleansing. In spite of the absence of cadmium in this water, it forecasts new prospects as regards medical quality for the market gardenings in Cotonou.

References

Akinbamijo OO, Fall ST, Smith OB. 2002. Advances in crop-livestock integration in West African cities. Dakar: ITC/ISRA/CRDI, 213 p.

Akodogbo H. 2005. Contribution à l'amélioration de la qualité de l'eau à usage domestique dans le 5ème arrondissement de la commune de Porto-Novo au Bénin, Mémoire de

Maîtrise Professionnelle en Environnement et Santé, FLASH/UAC, 65 p.

Dougnon TV, Honoré SB, Patrick AE, Jacques TD, Modeste G, Armelle H, Sabine Montcho, Hervé A, Jean-Robert K, Boko M. 2012. Evaluation of the microbiological quality of the leaves of Solanum macrocarpum L. cultivated with the chicken's droppings and water of marsh in Cotonou (Republic of Benin). International Journal of Biosciences (IJB), ISSN: 2220-6655 (Print) 2222-5234 (Online), 2:2, 45-52.

Dougnon TV, Edorh PA, Bankolé HS, Dougnon TJ, Montcho SA, Hounkpatin A, Gouissi M, Sossou B, Boko M, Creppy EE. 2012. Evaluation of the toxicological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum L.* cultivated with the chicken's droppings and water of marsh at Cotonou (Benin). Accepted on Journal of Research in Environmental Science and Toxicology, 1:1, 001-006

Edorh AP, Agonkpahoun E, Gnandi K, Guédénon P, Koumolou L, Amoussou O, Ayédoun A, Boko M, Gbeassor M, Rihn H, Creppy E. 2009. An assessment of the contamination of *Achatina achatina* by toxic metals in Okpara village, Int. J. Biol. Chem. Sci. 3(6): 1428-1436.

Habteselassie MY, Bischoff M, Applegate B, Reuhs B, Turco RF. 2010. Understanding the role of Agricultural Practices in the Potential Colonization and Contamination by Escherichia coli in the rhizospheres of Fresh Produce. Journal of Food Protection®, 73:11, 2001-2009.

Koc M, Macrae R, Mougeot JAL, Welsh J. 2000. Armer les villes contre la faim: systèmes alimentaires urbains durables ». CRDI, 243 p.

Mougeot J. 2006. Focus: cultiver de meilleures villes. Agriculture urbaine et développement durable, CRDI, 136p.

Osman AM, Taghreed B, Ibrahim AT, Derwa HIM. 2009. Field application of humic acid against the effect of cadmium pollution on cultured Tilapia Oreochromis niloticus, World Applied Sciences Journal **6(11),** 1569-1575.

Santé Canada. 1991. *La qualité bactériologique*. Document de support aux « recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada.

Smit J, Ratta A, Bernstein J. 1996. Urban agriculture: an opportunity for environmentally sustainable development in sub-Saharan Africa, Washington (DC, E.-U.), Banque mondiale, Environmentally Sustainable Division, African Technical Department. Post-UNCED Series, Building Blocks for Africa 2025, Paper No. 11.

Zmirou D, Ferley JP, Collin JF, Charrel M, Berlin J. **1987.** A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. American Journal of Public Health 77, 582-584.

Article 9

Journal of Research in Environmental Science and Toxicology Vol. 1(1) pp. 001-006 February 2012
Available online http://www.interesjournals.org/JREST
Copyright ©2012 International Research Journals

Full Length Research Paper

Evaluation of the toxicological quality of the leaves of *Solanum macrocarpum L*. cultivated with the chicken's droppings and water of marsh at Cotonou (Benin)

Dougnon[1,3] TV., Edorh[1,2] PA., Bankolé[3] HS., Dougnon[4] TJ., Montcho[1] SA., Hounkpatin[1] A., Gouissi[1] M., Sossou[1] B., Boko M[1]., Creppy[5] EE.

[1]Interfaculty Center of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development, Laboratory of Toxicology and Environmental Health, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463 Cotonou, Benin.
[2]Faculty of Science and Technology, Department of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 (Cotonou), Benin
[3]Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Human Biology, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin.
[4]Polytechnic School of Abomey-Calavi, Department of Animal Production and Health, Research Laboratory in Applied Biology, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin.
[5]Laboratory of Toxicology and Applied Hygiene/UFR of Pharmaceutical Sciences, 146, Street Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex France

Accepted 02 February, 2012

A pilot site at Glo, the market-gardening sites of Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey were included in this study. Lead was required in the environment of culture of vegetable. With regard to the lead content in the droppings used for the amendment of the sites, the averages obtained in mg/kg are as follows: Glo (3.618 ± 0. 051); Houeyiho (0. 887 ± 0.017); Fidjrosse (1.921±0.079); Agongbomey (0. 696 ± 0. 048) (p< 0.05). Ground of Houeyiho (46.320 ± 0. 651) is more contaminated by lead in mg/kg than the other sites: Glo (5.189 ± 0.058); Fidjrosse (2. 544 ± 0.158), Agongbomey (12.154 ± 0. 529) (p< 0.05). Water of watering of the sites of study are slightly contaminated by lead in mg/l: Glo (0.017±0.002); Houeyiho (0.025±0.004); Fidjrosse (0.038±0.002), Agongbomey (0.024±0). All this is not without consequences on the contamination of the leaves of *Solanum macrocarpum*. Indeed, those of the pilot site of Glo are contaminated by lead with a value of 0.936 ± 0. 070 mg/kg compared to those of the sites of Agongbomey (0. 416 ± 0. 050 mg/kg) (p< 0.05); Houeyiho (1.178 ± 0. 250 mg/kg); Fidjrosse (1. 195 ± 0. 050 mg/kg).

Keywords: Lead, droppings of chickens, contamination

INTRODUCTION

Urban agriculture became throughout the whole world and specifically in the developing countries, one of the activities necessary to ensure the food safety of the townsmen and to get financial resources with the unemployed persons of the cities. Mougeot (2006) reported that between 2015 and 2020, more half of the world population will live in urban or perish-urban zone. The role of urban agriculture is fully justified when taking into consideration this demographic explosion on a worldwide scale. Its contribution with the food production on a world level which was at 15 % in 1993 can have exceeded 33 % as from the year 2005 (Niang, 1996).

Smit et al. (1996) revealed that this activity is practiced in at least 90 towns of 31 countries of the Southeast Asia, the Middle East, Europe, Sub-Saharan Africa, Antilles and North, Center, South America. In addition, 800 million people practice this activity on a worldwide scale (Koc et al., 2000). The problems of urban agriculture and in West Africa were the subject of several publications which show well its importance in cities (Akinbamijo et al., 2002). Urban agriculture is thus socially very significant. The activities of production,

*Corresponding Author E-mail : victorien88@hotmail.com; dougnonv@yahoo.fr; Tel. 00 (229) 97 73 64 46

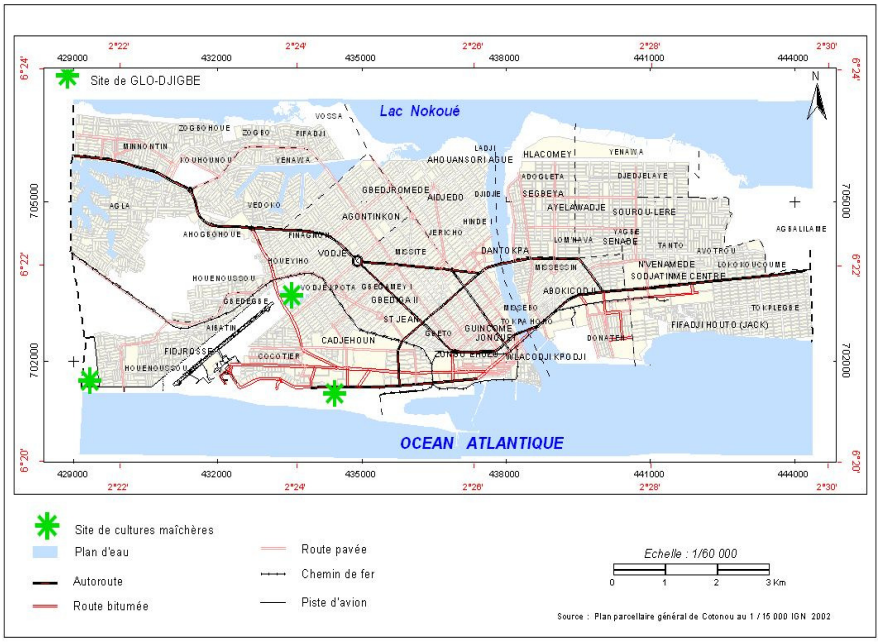


Figure 1. Localization of sites included in the survey

transformation and marketing offer employment opportunities for a significant mass of the urban population in situation of chronic unemployment and the rural ones in seasonal migration.

Benin, like many African countries, experienced these last years a development of urban agriculture. In the town of Cotonou, the market-gardening production and more precisely that of the vegetable-leaves is a reality impossible to circumvent. It contributes to the provisioning of the markets of the city in food products. The modernization and the intensification of the systems of production induce a stronger use of manures and comparable. The producers answer this request by the recycling of various types of waste (Akinbamijo et al., 2002).

Thus, inside the city, the population developed a local strategy of market-gardening production which resulted in the use of the chicken's droppings and water of the marshes to amend and sprinkle the market-gardening products. These poultry's droppings, as the many waste used in agriculture, contains organic matter and biogenic salts which constitute a contribution interesting for the grounds of culture (Legret et al., 1988). But the presence of traces elements in the droppings represents a major constraint with its use in agriculture because these elements can be brought in unstable and potentially biodisponibles forms (Legret, 1984). Indeed, in the event of use of waste of animals on the market gardenings (whose leaves are consumed), certain metals, like lead, are accumulate preferentially in the foliar parts (Niang, 1996).This situation could pose medical problems with the fresh vegetable consumers.

All things considered, the conditions of production of the vegetable-leaves on the market-gardening grounds at Cotonou do not guarantee their sanitary quality. Having thus noticed more and more market-gardeners prefer to use the droppings of chickens and water of marsh to amend and sprinkle their cultures, this study proposes to evaluate the impacts that this practice could have on the toxicological quality of *Solanum macrocarpum L.*, a vegetable highly appreciated at Cotonou. It is then about a contribution in favor of food safety in Republic of the Benin.

MATERIALS AND METHODS

Localization of the sites of study

Our survey took into account a witness site at Glo (6° 56 ' Northern latitude and 2°30' Eastern longitude) and market-gardening sites of Houeyiho (6° 21' 20" Northern latitude and 2° 21' 35" Eastern longitude), Fidjrosse (6° 22' Northern latitude and 2° 24' Eastern longitude); Agongbomey (6° 21' Northern latitude and 2° 24' 45" Eastern longitude) (Figure 1).

Sampling

It has been used among others of the white sachets labeled to collect samples, of the sterile gloves for withdrawals, an icebox for the transportation of samples. For exams to the laboratory, a balance of high degree of

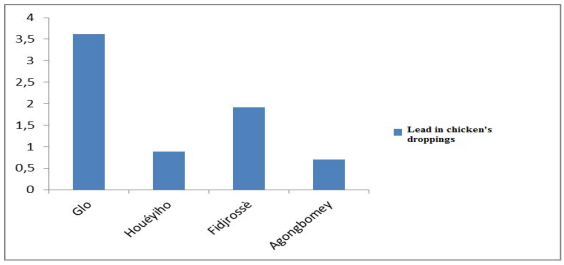


Figure 2. Presence of lead in the samples of droppings

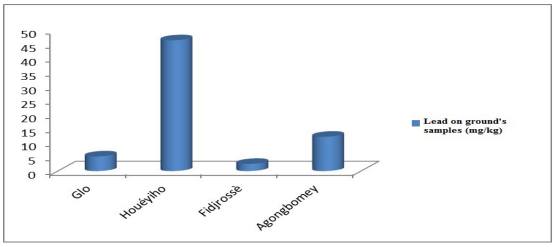


Figure 3. Presence of lead on the samples of ground

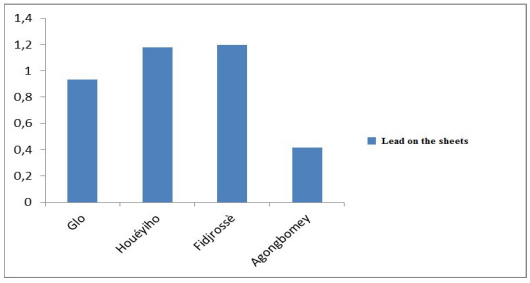


Figure 4.Presence of lead on the leaves of *Solanum macrocarpum L*.

Table 1. Presence of lead on the samples of water of watering

Sites		G	H	F	A
Samples of water of watering (mg/l)		0.018	0.028	0.036	0.0242
		0.015	0.022	0.039	0.0245
Average		**0.017a**	**0.025a**	**0.038a**	**0.024a**
± Standard deviation		0.002	0.004	0.002	0

G, H, F and A are respectively the initial ones of Glo, Houeyiho, Fidjrosse and Agongbomey. The averages carrying the same letters are not significantly different with the threshold from significance α = 0.05.

accuracy, a spectrophotometer of atomic absorption (AAS) equipped with a system of correction of the background noise, with a burner air - acetylene and a gas supply adapted, a lamp with hollow cathode specific to lead, a thermostated hotplate, a programmable furnace, quartz crucibles and glassmaking of laboratory (flasks, erlenmeyers).

On each site, we carried out in two different market-gardeners, some samples of droppings; ground; water of watering; leaves of *Solanum macrocarpum L*. 500 grams of fresh leaves were collected on the vegetable seedlings then introduced into hermetically tied plastic sachets. 500 grams of ground were taken with a depth ranging between 0 and 15 centimeters and put in plastic sachets. The samples of the water of watering of the seedlings of *Solanum macrocarpum L*. were directly taken in sterile sachets at a rate of 0, 5 liter. All the samples were transported in a refrigerator towards the laboratory in a one hour interval after the taking away where they were preserved at once at a temperature of 4° C. The toxicological analyses were carried out in the 200 hours following the test sample selections.

Methods of analysis

Toxicological analyses

Toxicological analyses were made at the Laboratory for Sciences Ground, Water and Environment of the National Institute of the Agronomic Research of Benin (INRAB) in Republic of the Benin. Lead was required in the samples by reading with the spectrophotometer of atomic absorption (AAS) 110 with flame in accordance with the standards of reference NF ISO 1146 1995 and NF X 31-147 1996.

Statistical analyses

It was calculated the averages and the standard deviations. Multiple comparisons consisting in comparing the averages using the test of Student p (T>t) = 0.05 were made. The softwares used are Microsoft Excel 2010 and XL Stat 2011.

RESULTS AND DISCUSSION

Results

Contamination of the chicken's droppings by lead

With regard to the lead content in the droppings used for the amendment of the sites, the averages obtained are as follows: Glo (3.618 ± 0.051); Houeyiho (0.887 ± 0.017); Fidjrosse (1.921 ± 0.079) Agongbomey (0.696±0.048) ($p< 0.05$) (Figure 2).

Contamination of the grounds of culture by lead

Concerning the lead's rate in the grounds of culture, the averages obtained are as follows: Glo (5.189 ± 0,058); Houeyiho (46.320 ± 0.651); Fidjrosse (2.544 ± 0.158) Agongbomey (12.154 ± 0.529) ($p< 0.05$) (Figure 3).

Contamination of water of watering by lead

The averages obtained are consigned in table 1.

Contamination of the leaves of *Solanum macrocarpum* by lead

Concerning the lead content in the leaves of *Solanum macrocarpum*, the averages obtained are as follows: Glo (0.936 ± 0.070); Agongbomey (0.416 ± 0.050) ($p< 0.05$); Houeyiho (1.178 ± 0.250); Fidjrosse (1.195 ± 0.050) (Figure 4).

Discussion

The droppings used for the amendment of the various sites of study are all contaminated by lead. These results are confirmed by work of Gupta et al. (1999) which found values lower than 35 mg/kg in samples of droppings. In the same way, Kouassi et al. (2008) found that the droppings used on the market-gardening grounds of Abidjan are rich in lead. However, they remain weak compared to the value threshold AFNOR (180 mg/kg) (Kouassi et al., 2008). These rates of contamination are significantly different on the level from the site of Glo compared with the other sites. That would be certainly due to the fact that the chicken's droppings used to amend these sites come from various hen houses. However, the presence of a strong lead concentration in the droppings of the pilot site of Glo (which not having known any composting) could mean that composting plays a rather significant role in the heavy metal holding capacity of the droppings. Indeed, it seems the wet and compact droppings would retain lead better than dry droppings as same manner that the heavy grounds retain some (Chidikofan, 2010).

The grounds of the market-gardening sites are all contaminated by lead. The ground of the site of Houeyiho is the most polluted by lead. These results are checked by work of Chidikofan (2010) which stressed that the ground of Houeyiho was strongly contaminated by heavy metals. That could be explained by the geographical situation of the site. Indeed, Houeyiho is localized in the heart of the town of Cotonou where the site is subjected to a significant air and road traffic; what releases from the MTE in the air. These heavy metals, once in the atmosphere, join the particles and can remain during

several weeks then are brought back on the ground by precipitations. Other particles can also be carried by the wind and to settle on the ground (Ramade, 1991). However, the pollution of the ground of the pilot site shows at which point the air pollution does not have limit. Thus, it is not enough to put ramparts around a piece to estimate that it will be free from contamination by heavy metals. In the same way, the great quantities of poultry's droppings and organic waste contribute to contaminate these grounds (Chidikofan, 2010).

The water samples of watering contain lead residues at rates lower than the standards recommended by FAO to be used as water of watering. This standard is 5 mg/l (Ayers et al., 1989). Chidikofan (2010) which had worked on the site of Houeyiho arrived at the same conclusions. One could then say that water of watering of the sites of study, in spite of some lead traces, does not present major risks while being used to sprinkle the seedlings. However, with the concept of bio-accumulation, some precautions must be taken in order to cleanse the environment of culture as well as possible. With this intention, the use of well-maintained drillings seems better adapted contrary to the grounds dug of marsh which are very quickly polluted.

These results are confirmed by work of Edorh et al. (2007) which found during their study that it was justified by the fact that water of drilling or well comes from the underground tablecloths. The use of well-maintained drillings then seems better adapted contrary to the grounds dug of marsh which are very quickly polluted. This water pollution of watering could affect the quality of vegetables and public health. This assumption is confirmed by the social investigations carried out by Ladikpo (2009) which reveal that the water used for the watering of vegetables in urban zone contains pathogenic agents for the consumers of these cultures. In addition to these studies on the foodstuffs that are the leaves of *Solanum macrocarpum L.*, others were carried out on food often present in the environment of truck farming. It arises from work of Edorh et al. (2009) on the snails (*Achatina achatina*) that it accumulated lead at the average of 8.56 mg/kg. They had concluded by regarding these snails as biological indicators from contamination by lead, which is not inevitably the case of the vegetable matter (*Solanum macrocarpum L.*).

The leaves of *Solanum macrocarpum* of all the sites of study had a lead toxicity beyond the standards defined by the Food and Agriculture Organization (FAO). On the pilot site of Glo, the lead rate exceeded nine times the limiting value which is of 0.1 mg/kg (FAO, 2001). It exceeded of almost eleven times this value on the sites of Houeyiho and Fidjrosse and four times on the site of Agongbomey. These results differ from those presented by Koumolou (2011) which found rates of contamination of the leaves of *Solanum macrocarpum* bordering 32 mg/kg on the site of Houeyiho. This difference could be explained by the fact that our seedlings of *Solanum macrocarpum* did not undergo any plant's health treatment before being taken. The pollution of these leaves by lead would be then due either to the contamination of the grounds by this heavy metal or with that of the droppings. It is what Kozlowski (1997) underlines by affirming that generally the presence of heavy metals in the vegetable leaves is related to that of metals in the ground. The amendment of the grounds by droppings in an incorrect way tends to make available metals in the ground (Mustin, 1987). It thus arises that the consumers of the leaves of *Solanum macrocarpum* cultivated on the market-gardening grounds of Houeyiho, Fidjrosse, Agongbomey and even on the pilot ground of Glo are exposed to a lead contamination because the contents of these metals exceed the recommended standards.

CONCLUSION

The results of this study indicate that some risks of contamination of water of watering, ground, droppings and leaves by lead. The presence of that substance on vegetables of the various sites can be at the origin of food poisonings; this forecasts new prospects for research in order to cleanse vegetables consumed by the populations of Cotonou.

REFERENCES

Akinbamijo OO, Fall ST, Smith OB (2002). Advances in crop-livestock integration in West African cities. Dakar: ITC/ISRA/CRDI, p 213 .

Ayers R, Westcost D (1989). Water quality for agriculture. FAO irrigation drainage paper 29 (revised). FAO, Rome, Italy. p 158.

Chidikofan G (2010). Contribution à l'amélioration de la qualité des cultures maraîchères du site de Houéyiho à Cotonou au BENIN : cas de la laitue (Lactuca sativa L.), Mémoire de Master, 2IE Ouagadougou, p 56.

Edorh AP, Gnandi K, Elégbédé B, Enonhedo SF, Boko M (2007). Qualité de l'eau des nappes et son impact sur la santé des populations à Kérou. Climat et Développement ; 4 : 27-37

Edorh AP, Agonkpahoun E, Gnandi K, Guédénon P, Koumolou L, Amoussou O, Ayédoun A, Boko M, Gbeassor M, Rihn H, Creppy E (2009). An assessment of the contamination of *Achatina achatina* by toxic metals in Okpara village, Int. J. Biol. Chem. Sci. 3(6): 1428-1436

FAO and WHO (2001). Report on the 32nd session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, ALINORM 01/12, Beijing, People's Republic of China, 20–24 March 2000. Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, 24th Session, 2–7 July, Geneva, Switzerland

Gupta G, Charles S (1999). Research notes – Trace elements in soils fertilized with poultry litter. Poultry science, 78: 1695-1698.

Koc M, Macrae R, Mougeot JAL, Welsh J (2000). Armer les villes contre la faim: systèmes alimentaires urbains durables ». CRDI, p 243.

Kouassi J, Bekro Y, Ahou E, Baize D, Denezon O, Moussa B, Fatiha Z, Macaigne P (2008). Diagnostic d'une contamination par les éléments traces métalliques de l'épinard (Spinacia Oleracea) cultivé sur des sols maraîchers. European Journal of Scientific Research, ISSN 1450-216X 21 (3), pp.471-487

Koumolou L, Edorh P, Elégbédé B, Aklikokou K (2011). Comparison of the toxic metals pollution in soil, water and vegetables on three major gardening sites of Benin. J.Environ. Chem. Ecotoxicol. under N° JECE-11-035 (In Press).

Kozlowski R, Baraniecki P (1997). Culture du chanvre dans les zones polluées de Poznan (Pologne). Les échos du chanvre. N°7 : 6-8
Legret M (1984). Les métaux lourds dans les boues de station d'épuration. Valorisation agricole et extraction des métaux toxiques. Bull. Liais. Labs P. et Ch. 129 : 35-40.
Legret M, Divet L, Juste C (1988). Migration et spéciation des métaux lourds dans un sol soumis à des épandages boues de station d'épuration à très forte charge en Cd et Ni. Wat. Res. 22 (8): 953-959.
Mougeot J (2006). Focus: cultiver de meilleures villes. Agriculture urbaine et développement durable, CRDI, p 136.
Mustin M (1987). Le compost : gestion de la matière organique. Edit. François Dubusc, p 954.
Niang S (1996). Utilisation des eaux usées domestiques en maraîchage périurbain à Dakar (Sénégal). Sécheresse; 3 : 217-23.
Ramade F (1991). Eléments d'écologie, écologie appliquée, action de l'homme sur la biosphère, 4ème édition. McGraw-Hill, Paris. p 558.
Smit J, Ratta A, Bernstein J (1996). Urban agriculture: an opportunity for environmentally sustainable development in sub-Saharan Africa, Washington (DC, E.-U.), Banque mondiale, Environmentally Sustainable Division, African Technical Department. Post-UNCED Series, Building Blocks for Africa 2025, Paper No. 11.

Annexe 5 : Liste des communications orales (Colloques, Conférences, Journées Scientifiques) présentées dans le cadre des travaux de thèse (N=7)

Les travaux de cette thèse ont été présentés lors de diverses rencontres scientifiques dans la sous-région et en Europe (Bénin, Côte d'Ivoire, Togo, Sénégal, Burkina-Faso, Espagne).

1- **Dougnon T. Victorien**, Klotoé Jean-Robert, Bankolé Honoré, Dougnon T. Jacques, Edorh Patrick, Loko Frédéric, Boko Michel. **01-05 octobre 2013**. Agriculture urbaine et contraintes culturales: utilité de la démarche EcoSanté dans la résolution des problèmes de pollution des cultures maraîchères à Cotonou (Bénin) ? **1st African Regional Conference of the International Association for Ecology and Health, Grand-Bassam, Côte d'Ivoire (Abstracts book).**

2- **V Dougnon**, H Bankolé, J Dougnon, J Klotoé, P Edorh, F Loko, M Boko. **15-20 Septembre 2013**. Nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin). **20th International Congress of Nutrition, Grenade, Espagne (Annals of Nutrition and Metabolism, 2013, 63 (S1): p.187, Revue à Facteur d'Impact = 2, 26).**

3- **Dougnon Victorien**, Edorh Patrick, Bankolé Honoré, Klotoé Jean Robert, Dougnon Jacques, Gbaguidi Fernand, Loko Frédéric, Boko Michel. **23-28 Septembre 2013**. Nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin). **IVème Colloque des Sciences, Cultures et Technologies, Université d'Abomey-Calavi (UAC), Cotonou, Bénin (Abstracts book).**

4- **Victorien T. Dougnon,** Honoré S. Bankolé, Patrick A. Edorh, Jacques T. Dougnon, Frédéric Loko, Boko Michel. **04-06 juin 2013**. Utilisation des déjections animales en agriculture urbaine : quels impacts sur la qualité microbiologique des feuilles de *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) cultivé à Cotonou (Bénin) ? **Première Conférence de Recherche Africaine sur l'Agriculture, l'Alimentation et la Nutrition, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire (Abstracts book).**

5- **Dougnon Victorien**, Edorh Patrick, Bankolé Honoré, Hounkpatin Armelle, Koumolou Luc, Montcho Sabine, Boko Michel. **05-07 mars 2013.** Qualité toxicologique des feuilles de *Solanum macrocarpum* L. cultivé à Cotonou (Bénin)**. Deuxième Conférence Scientifique du ROARES sur le thème : « Le rôle des systèmes de santé pour la lutte contre les maladies transmissibles et non transmissibles dans l'espace CEDEAO», Ouagadougou, Burkina-Faso (Abstracts book).**

6- **Dougnon Victorien**, Edorh Patrick, Bankolé Honoré, Hounkpatin Armelle, Koumolou Luc, Montcho Sabine, Boko Michel. **30 octobre-03 novembre 2012.** Qualité toxicologique des feuilles de *Solanum macrocarpum* L. cultivé à Cotonou. **Colloque Panafricain « Science, Enseignement et Technologie pour le Développement de l'Afrique », Dakar, Sénégal (Abstracts book).**

7- **Dougnon TV.,** Edorh P., Bankolé H., Montcho S., Hounkpatin A., Koumolou L., Boko M. **22-26 octobre 2012.** Qualité toxicologique des feuilles de *Solanum macrocarpum* L. cultivé avec des fientes de poulets et les eaux d'arrosage à Cotonou. **Journées Scientifiques Internationales de Lomé, Campus Universitaire de Lomé, Togo (Abstracts book).**

Communication 1

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

CSRS
Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire

COPES-AOC COPEH

Africa 2013
Ecosanté/Ecohealth



Certificate awarded to

Dougnon Victorien

for his effective participation with an oral presentation at the International Conference Africa 2013, held at NSA Hotel Grand Bassam, Côte d'Ivoire from 1 to 3 October 2013.

Theme of the conference:

Populations adaptations to global changes: The place of new approaches to behavioural changes

Prof. Bassirou Bonfoh
CSRS Managing Director and Chair of the organizing committee Africa 2013

Prof. Jakob Zinsstag
Président de l'Association International Ecohealth

Communication 2

IUNS 20th International Congress of Nutrition

GRANADA (SPAIN), SEPTEMBER 15-20, 2013

Oral Communication Certificate

We hereby certify that

V. Dougnon, H. Bankolé, P. Edorh, J. Dougnon, Jr. Klotoé, P. Edorh, F. Loko, M. Boko

have presented the paper entitled:

NUTRITIONAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSES OF LEAVES AND FRUITS OF SOLANUM MACROCARPON LINN (SOLANACEAE) IN COTONOU (BENIN)

as a O060 at the

IUNS 20th International Congress of Nutrition

held in Granada (Spain) from 15th to 20th September 2013

Angel Gil
President of the Organizing Committee

IUNS 20th International Congress of Nutrition

GRANADA (SPAIN), SEPTEMBER 15-20, 2013

Certificate of Attendance

We hereby certify that

Victorien Dougnon

has participated in the

IUNS 20th International Congress of Nutrition

which took place in

Granada (Spain) from 15th to 20th September 2013



Angel Gil
President of the Organizing Committee

Communication 3

UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI (UAC)

VICE-RECTORAT CHARGE DE LA RECHERCHE UNIVERSITAIRE

Abomey-Calavi – Bénin

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Je soussigné, Professeur **Maxime da CRUZ**, 1er Vice-Recteur, chargé des Affaires Académiques et de la Recherche Universitaire de l'Université d'Abomey-Calavi, atteste que Monsieur *Dougnon Victorien T.* du Bénin, a effectivement pris part au 4ème **Colloque de l'UAC des Sciences, Cultures et Technologies** qui a eu lieu du ***23 au 28 septembre 2013*** **sur le Campus Universitaire d'Abomey-Calavi** et a présenté une communication intitulée

«Nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Bénin)».

En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Abomey-Calavi, le 28 septembre 2013.

Le 1er Vice Recteur

Professeur Maxime da CRUZ

Communication 4

AGRAR 2013

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Cette attestation est établie pour

DOUGNON VICTORIEN

Pour avoir participé à la 1ère conférence de recherche africaine sur l'agriculture, l'alimentation et la nutrition (AGRAR) qui s'est tenue les 4, 5 et 6 Juin 2013 à l'Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT-BOIGNY de Yamoussoukro, en Côte d'Ivoire.

THEME : L'AGRICULTURE FACE AUX DEFIS DE L'ALIMENTATION ET DE LA NUTRITION EN AFRIQUE : QUELS APPORTS DE LA RECHERCHE EN ZONES COTONNIERES ?

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE Le Directeur de l'Ecole Supérieure d'Agronomie

Yamoussoukro, le 06/06/2013

Le Président du comité d'organisation de l'INP-HB

Dr. Siaka KONE

Communication 5

Réseau Ouest Africain de Recherche pour la Santé
West African Health Research Network
Rede Oeste Africana de Pesquisa para a Saúde
2ème Conférence Scientifique du ROARES

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Nous soussignés, attestons que :

DOUGNON VICTORIEN

A pris part à la 2ème Conférence Scientifique du Réseau Ouest Africain de Recherche pour la Santé (ROARES), du 5-7 Mars 2013, OUAGADOUGOU, BURKINA FASO.

En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Secrétaire Exécutif du ROARES

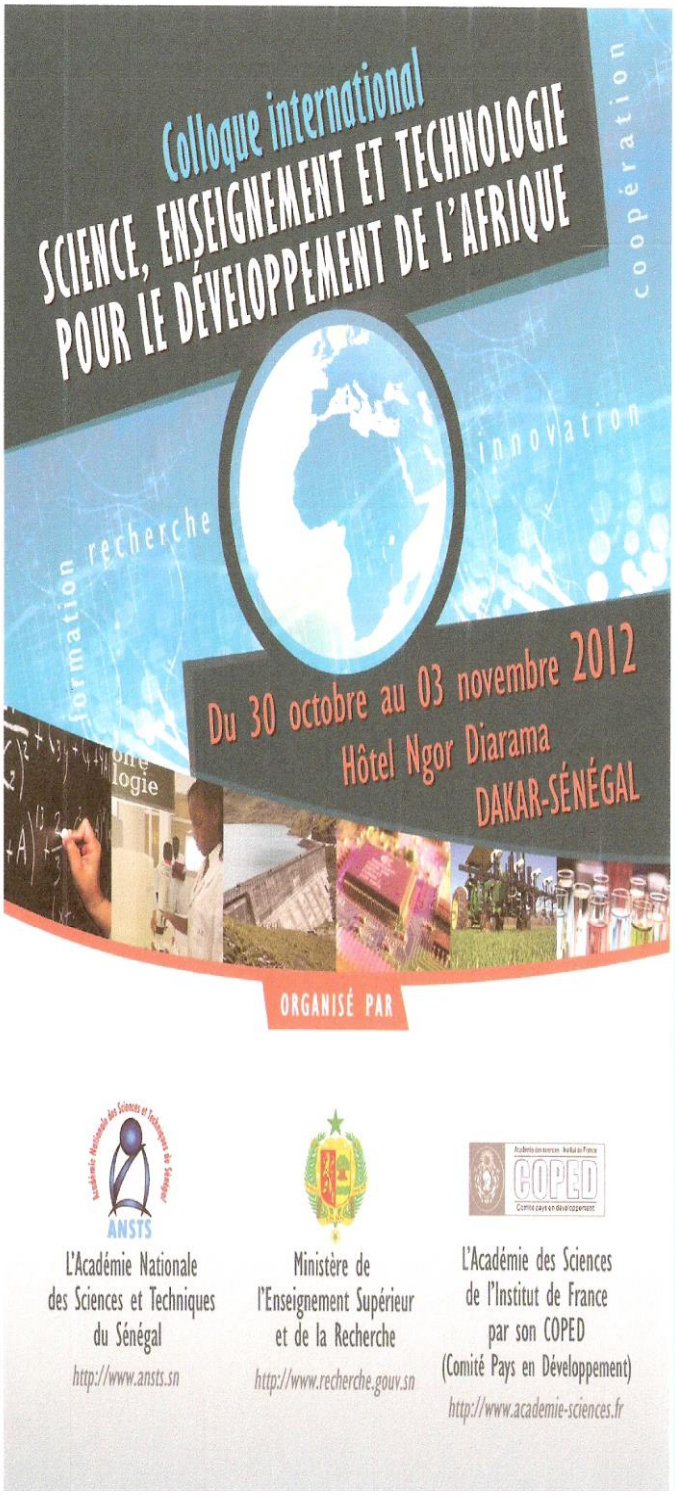
Pr Jean Bosco OUEDRAOGO

ROARES WAHRNET Executive Secretary ROAPS

Président du CSC

Pr Alex Uché OSUNKWO

Communication 6



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Cette attestation est délivrée à

Victorien DOUGNON

BENIN

pour sa participation à l'animation scientifique du Colloque.

Fait à Dakar, le 03 Novembre 2012

Professeur Ahmadou Lamine NDIAYE
Président ANSTS

Professeur François GROS
Président COPED

Communication 7

UNIVERSITE DE LOME

XVème EDITION DES JOURNEES SCIENTIFIQUES INTERNATIONALES DE LOME (JSIL 2012)

Thème :

LES DEFIS MAJEURS DE L'AFRIQUE ET DE LA SCIENCE AU XXIème SIECLE : PENURIES D'ENERGIE, PERTURBATIONS ENVIRONNEMENTALES ET CHANGEMENTS CLIMATIQUES

Campus Universitaire de Lomé, 22-26 Octobre 2012

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Je soussigné, Professeur Y. Mawuena D. GUMEDZOE, Directeur de la Recherche de l'Université de Lomé, atteste que ***DOUGNON T. Victorien*** , a pris part aux JSIL 2012.

En foi de quoi, cette attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Lomé, le 26 octobre 2012

Le Directeur de la Recherche

UNIVERSITE DE LOME Le Directeur Direction de la Recherche

Professeur Y. Mawuena D. GUMEDZOE