

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

**Evaluation des effets anti-ostéoporotiques de
l'extrait aqueux de l'écorce du tronc de *Pterocarpus
mildbraedii* Harms (Fabaceae) sur un modèle
d'ostéoporose induit par ovariectomie chez la rate
Wistar**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
des Organismes Animaux

Option : Physiologie animale

Par :

NGUEUKO TALLA Jude Ulrich

Licencié ès Sciences

Matricule : 17C2904



Directeur

MENGUE NGADENA

Yolande Sandrine

Chargée de Cours

Superviseur

DZEUFIET DJOMENI

Paul Désiré

Professeur

Année 2024

DEDICACE

A mes chers parents
M. Léopold TALLA
Et
Mme Elise MBA

REMERCIEMENTS

Je remercie l'**Eternel Dieu Tout-Puissant** qui a toujours veillé sur moi, renouvelé mon souffle de vie et a permis que j'achève ce travail dans de bonnes conditions.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à l'intervention de plusieurs personnes. Il me ravit d'exprimer mes sincères remerciements :

- au Professeur **DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré** pour avoir accepté de superviser ce travail je remercie particulièrement la rigueur dont il fait preuve à mon égard ;
- au Docteur **MENGUE NGADENA Yolande Sandrine** qui a dirigé ce travail, je remercie particulièrement la patience qu'elle a eu à mon égard ainsi que ses conseils avisés ;
- au Docteur **OWONA Pascal** qui m'a pris sous son aile et m'a accompagné de bout en bout dans l'achèvement de ce travail, je le remercie particulièrement pour m'avoir soutenu non pas seulement comme un aîné de laboratoire mais aussi comme un grand frère ;
- aux Docteurs **BIDINGHA Ronald et TCHEUTCHOUA Yannick** qui m'ont accompagné dans l'achèvement de ce travail ;
- à tous les enseignants du Département de Biologie et de Physiologie Animales de l'Université de Yaoundé I pour leurs encadrements et leurs encouragements ;
- à tous mes aînés académiques de laboratoire en particulier : **Mesdames et Messieurs AMBANI Jeanne, AMBOMO Florence, BIDJA Angèle, KAHOU Rivaldo, FIFEN Rodrigue et DJIENTCHEU Philippe** pour l'assistance lors des différentes manipulations ;
- à tous mes camarades de promotion : **Mesdames et Messieurs BINDZI Georges, MEULADJE Ferdinand, WAMBA Déliot, SAMBA Bérenger, WAGA Gaston, TCHIADJE Grace, DONFOUET Alvine, CHOUOLA Ashley et BOUGUEM Cynthia**, pour leur assistance ;
- à mon oncle **KENGNE GASTON** pour son immense soutien et ses conseils avisés ;
- à toute ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé ;
- à tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne figurent pas dans ce document.

SOMMAIRE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
RESUME	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCTION	10
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	3
I.1- Généralités sur la ménopause	3
I.1.1- Définition et étiologie	3
I.1.2- Physiopathologie et symptomatologie de la ménopause	3
I.2- Ménopause et ostéoporose ménopausique	4
I.2.1- Définition et caractéristiques	4
I.2.2- Epidémiologie	4
I.2.3- Physiopathologie.....	4
I.2.4- Signes cliniques	6
I.2.5- Model d'induction de l'ostéoporose ménopausique	6
I.3- Prise en charge de l'ostéoporose ménopausique	7
I.3.1- Mesures hygiéno-diététiques	7
I.3.2- Traitements hormonaux substitutifs	7
I.3.3- Traitements hormonaux complémentaires.....	8
I.3.4- Traitements pharmacologiques non hormonaux.....	8
I.3.5- Limites des différents traitements de l'ostéoporose ménopausique	9
I.3.6- Phytothérapie	9
I.4- La plante : <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	10
I.4.1- Position systématique	10

I.4.2- Présentation.....	10
I.4.3- Données ethnobotaniques et pharmacologiques	11
I.4.4- Phytochimie	11
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	3
II 1- Matériel	12
II.1.1- Matériel végétal	12
II.1.2- Matériel animal.....	12
II.2- Méthodes	12
II.2.1- Préparation de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	12
II.2.2- Réalisation de l'ovariectomie bilatérale	13
II.2.3- Evaluation des effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur l'ostéoporose ménopausique	13
II.2.4- Etude des propriétés anti-inflammatoires <i>in vitro</i> de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	23
II.2.5- Analyse UHPLC-MS de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	25
II.2.6- Réalisation de l'amarrage moléculaire <i>in silico</i> de quelques composés contenus dans l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	26
II.2.7- Analyses statistiques.....	26
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	34
III.1- Résultats	27
III.1.1- Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur l'ostéoporose ménopausique	27
III.1.2- Effets anti-inflammatoires <i>in vitro</i> de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	39
III.1.3- Identification des composés de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> par analyse UHPLC-MS	40
III.1.4- Amarrage moléculaire.....	42
CONCLUSION.....	48
REFERENCES	49
ANNEXES.....	xi

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les modèles d'induction de l'ostéoporose chez le rat	7
Figure 2: Photographie de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	11
Figure 3: Protocole d'extraction aqueuse de l'écorce de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	12
Figure 4: Schéma synoptique du protocole d'évaluation des effets de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur l'ostéoporose ménopausique.....	14
Figure 5: Courbe d'étalonnage du dosage des nitrites.	19
Figure 6: Courbe d'étalonnage du dosage de la catalase.	20
Figure 7: Courbe d'étalonnage du dosage des protéines.....	22
Figure 8: Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur la masse relative osseuse chez les rates ovariectomisées.....	27
Figure 9: Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur l'activité de la phosphatase alcaline chez les rates ovariectomisées.....	32
Figure 10: Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur le taux de protéine osseuse chez les rates ovariectomisées.	33
Figure 11: Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur la concentration de la créatinine dans l'urine et l'index d'ostéolyse chez les rates ovariectomisées.....	34
Figure 12: Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur quelques paramètres du statut oxydant chez les rates ovariectomisées.	35
Figure 13: Microphotographie présentant les effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur la structure du fémur, du tibia et de la vertèbre lombaire 3 chez les rates chez les rates ovariectomisées.	37
Figure 14: Microphotographie montrant les effets de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur l'expression du collagène dans l'os trabéculaire du fémur et de la vertèbre lombaire 3 chez les rates ovariectomisées.....	38
Figure 15: Chromatogramme LC-MS et temps de rétention de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i>	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Protocole du dosage de la phosphatase alcaline sérique et osseuse	16
Tableau II: Protocole du dosage du calcium	17
Tableau III: Protocole du dosage des nitrites	19
Tableau IV: Protocole du dosage de la catalase	20
Tableau V: Protocole du dosage des protéines totales	21
Tableau VI: Protocole du dosage de la créatinine	22
Tableau VII: Effets du traitement de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur la densité minérale osseuse du fémur et du tibia chez les rates ovariectomisées.	28
Tableau VIII: Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur quelques éléments figurés du sang chez les rates ovariectomisées	30
Tableau IX: Effets du traitement à l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur la concentration osseuse, sérique et urinaire en calcium chez les rates ovariectomisées.	31
Tableau X: Effets des extraits aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur les activités de la phosphatase alcaline et de la 5-lipooxygénase	39
Tableau XI: Effets des extraits aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> sur la production de l'oxyde nitrique et la dénaturation de l'albumine	40
Tableau XII: Composés identifiés de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus milbraedii</i> et leurs masses spectrales	41
Tableau XIII: Interactions 2D et 3D par liaison hydrogène des composés de l'extrait aqueux de <i>Pterocarpus mildbraedii</i> avec les enzymes phosphatase acide et "Human Matrix Metalloproteinase 2"	43

LISTE DES ABREVIATIONS

ATP: Adénosine triphosphate	NO: "Nitric oxide"
CAT: Catalase	OMS: Organisation mondiale de la santé
DMEM: "Dulbecco's minimal essential medium"	OVX: Ovariectomisées
DMO: Densité minérale osseuse	<i>P. mildbraedii:</i> <i>Pterocarpus mildbraedii</i>
DPPH: "2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl"	PAC: Phosphatase acide
EDTA: Ethylène diamine tétraacétique	PAL: Phosphatase alcaline
FOXO: "Fork head box o"	RANK-L: "Receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand"
FPP: Farnésyl pyrophosphate	ROS: "Reactive oxygen species"
FSH: "Follicular stimulating hormone"	SOD: Super oxyde dismutase
GSH: Gutathion réduit	SREM: "Selective receptor of estrogen modulator"
H-E: Hématoxyline-eosine	TGF: "Transforming growth factor"
HMP2: "Human matrix metalloproteinase 2"	THM: Traitement hormonal de la ménopause
IL: Interleukine	THS: Traitement hormonal substitutif
IMC: Indice de masse corporelle	TNF: "Tumor necrosis factor"
LC-MS: "Liquid chromatography mass spectrometry"	UHPLC: "Ultra high-performance liquid chromatography"
LH: "Luteinizing hormone"	VL: Vertèbre lombaire
MDA: Malondialdehyde	WHI: "Women health initiative"
NF-κB: "Nuclear Factor kappa B"	ΔG: Energie de liaison

L'ostéoporose est un désordre systémique associé à une diminution de la densité minérale osseuse (DMO) et à la détérioration de la microarchitecture du tissu osseux, entraînant une fragilité de l'os accompagné d'une augmentation subséquente du risque de fracture. L'ostéoporose post-ménopausique est due à la déficience œstrogénique ; celle-ci étant fortement associée à une inflammation du tissu osseux. Les effets secondaires associés à l'utilisation du traitement hormonal substitutif de la ménopause ont donné lieu à l'utilisation des phytoœstrogènes comme alternative thérapeutique à l'ostéoporose post-ménopausique par leurs effets œstrogéniques, modulateurs sélectifs, antioxydants et anti-inflammatoires. L'objectif général de cette étude a été d'évaluer les effets anti-ostéoporotiques de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* (Fabaceae) sur un modèle d'ostéoporose induit par ovariectomie. Pour ce faire, les effets anti-ostéoporotiques de *Pterocarpus mildbraedii* (*P. mildbraedii*) ont été évalués *in vivo* sur un modèle de rates ovariectomisées (Ovx) de 84 jours. Le potentiel anti-inflammatoire de *P. mildbraedii* a été évalué *in vitro* sur la 5-lipoxygénase, la production de l'oxyde nitrique (NO) et l'activité de la phosphatase alcaline (PAL). Une UHPLC-MS a été réalisée pour identifier les principaux métabolites secondaires retrouvés dans l'extrait. L'amarrage moléculaire des constituants de l'extrait avec la phosphatase acide (PAC) et la "Human Matrix Metalloprotein 2" (HMP2) a été réalisé *via* le logiciel "Molegro Virtual Docker". Les rates Ovx ont été réparties en cinq lots de cinq rates chacun et ont été traitées pendant 28 jours respectivement avec : de l'eau distillée ; du valérate d'œstradiol (1mg/kg) et à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses de 62,5, 125 et de 250 mg/kg. Un lot *sham operated* recevant de l'eau distillée a servi de témoin normal. A la fin de la période de traitement, tous les rates ont été placées dans des cages métaboliques pour le recueillement de l'urine. A la fin du traitement, tous les animaux ont été sacrifiés. Le sang artérioveineux a été recueilli dans des tubes EDTA et secs pour l'évaluation de quelques paramètres hématologiques et biochimiques. Les organes tels que le fémur, le tibia, la mandibule et la 3ⁱ-ème vertèbre lombaire ont été prélevés et utilisés pour des analyses histologiques. La masse relative et la densité minérale osseuse (DMO) du fémur et du tibia ont été déterminées. Les homogénats du fémur et du tibia ont été utilisés pour évaluer quelques marqueurs de l'ostéoporose et du statut oxydant. L'Ovx a entraîné *in vivo* une baisse de la DMO ($p < 0,05$), du taux de calcium, de glutathion réduit (GSH) ($p < 0.001$) et de l'activité de la PAL ($p < 0.001$) sérique et tissulaire ainsi qu'une augmentation ($p < 0,001$) du calcium urinaire et du taux de malon dialdéhyde (MDA) dans le fémur et le tibia. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a corrigé ces altérations osseuses chez les rats Ovx sur les plans anthropométriques, biochimiques et histologiques. *P. mildbraedii* a montré des effets anti-inflammatoires *in vitro* caractérisés par l'inhibition de l'activité de la 5-lipoxygénase et la production du NO. Le profil LC-MS souligne la présence de la liquiritigénine, de l'acide caféique, du pterocarpriol et du pteromarsurpone dans l'extrait. Ces molécules se lient à la PAC et à la HMP2 et inhiberaient leurs activités. *P. mildbraedii* induit des effets anti-ostéoporotiques chez les rates Ovx par ses effets anti-inflammatoires, antioxydants et œstrogéniques, justifiant ainsi l'utilisation traditionnelle de l'extrait à base de cette plante pour le traitement des troubles liés à la ménopause dont l'ostéoporose ménopausique.

Mots clés : Ostéoporose, Désordre post ménopause, *P. mildbraedii*, Amarrage moléculaire, UHPLC-MS, Rate.

Osteoporosis is a systemic disorder associated with a decrease in bone mineral density (BMD) and deterioration in the microarchitecture of bone tissue, leading to bone fragility and a subsequent increase in the risk of fracture. Post-menopausal osteoporosis is due to oestrogen deficiency, which is strongly associated with inflammation of bone tissue. The side effects associated with the use of hormone replacement therapy in the menopause have led to the use of phytoestrogens as a therapeutic alternative for post-menopausal osteoporosis, as well for their oestrogenic, selective modulating, antioxidant and anti-inflammatory effects. The general objective of this study was to evaluate the anti-osteoporotic effects of the aqueous extract of *Pterocarpus mildbraedii* (Fabaceae) on a model of osteoporosis induced by ovariectomy. To this end, the anti-osteoporotic effects of *Pterocarpus mildbraedii* (*P. mildbraedii*) were assessed *in vivo* in an 84-day-old ovariectomised (Ovx) rat model. The anti-inflammatory potential of *P. mildbraedii* was assessed *in vitro* on 5-lipoxygenase, nitric oxide (NO) production and alkaline phosphatase (PAL) activity. UHPLC-MS was performed to identify the main secondary metabolites found in the extract. Molecular docking of the extract's constituents with acid phosphatase (PAC) and "Human Matrix Metalloprotein 2" (HMP2) was performed via "Molegro Virtual Docker" software. Ovx rats were divided into five groups of five rats each and were treated for 28 days respectively with: distilled water; oestradiol valerate (1mg/kg) and aqueous extract of *P. mildbraedii* at doses of 62.5, 125 and 250 mg/kg. A sham operated group receiving distilled water served as a normal control. At the end of the treatment period, all rats were placed in metabolic cages for urine collection. Arteriovenous blood was collected in EDTA tubes and dried for evaluation of some haematological and biochemical parameters. Organs such as the femur, tibia, mandible and 3rd lumbar vertebra were removed and used for histological analysis. Relative mass and bone mineral density (BMD) of the femur and tibia were determined. Homogenates from the femur and tibia were used to assess a number of markers of osteoporosis and oxidative status. *In vivo*, Ovx decreased BMD ($p < 0.05$), calcium, reduced glutathione (GSH) ($p < 0.001$) and serum and tissue PAL activity ($p < 0.001$), as well as increasing ($p < 0.001$) urinary calcium and malon dialdehyde (MDA) levels in the femur and tibia. Aqueous extract of *P. mildbraedii* corrected these bone alterations in Ovx rats anthropometrically, biochemically and histologically. *P. mildbraedii* showed anti-inflammatory effects *in vitro*, characterised by inhibition of 5-lipoxygenase activity and NO production. The LC-MS profile highlights the presence of liquiritigenin, caffeic acid, pterocarprtriol and pterocarprtriol and pteromarsurpone in the extract. These molecules bind to PAC and HMP2 and inhibit their activities. *P. mildbraedii* induces anti-osteoporotic effects in Ovx rats through its anti-inflammatory, antioxidant and oestrogenic effects, thus justifying the traditional use of the extract of this plant for the treatment of menopausal disorders, including osteoporosis menopausal osteoporosis.

Keywords: Osteoporosis, Post-menopausal disorder, *P. mildbraedii*, Molecular docking, UHPLC-MS, Rat.



INTRODUCTION

. L'ostéoporose est une maladie caractérisée par un désordre systémique associé à une diminution de la masse osseuse et à la détérioration de la microarchitecture du tissu osseux causant une fragilité excessive de l'os (Owona *et al.*, 2021) augmentant ainsi le risque de fracture. Il existe deux formes d'ostéoporose. D'une part l'ostéoporose primaire qui fait suite à la ménopause et qui est dû à la baisse du taux d'œstrogènes circulant (Michael *et al.*, 2020). D'autre part l'ostéoporose secondaire qui est due à la consommation de certains médicaments tels que les corticoïdes. L'ostéoporose affecte 30 à 40 % des femmes ménopausées de plus de 50 ans en occident (Lippuner *et al.*, 2005). Au Cameroun, une étude menée par Singwe et Nko'o (2008) a montré que chez les femmes âgées dont l'âge moyen était de 52 ans, la plupart d'entre elles étaient ménopausées parmi lesquelles 18 % présentaient une ostéoporose. Selon ces auteurs, l'ostéoporose est aussi fréquente au Cameroun qu'en occident (Singwe et Nko'o 2008). Cette pathologie réduit la qualité de vie des femmes ménopausées constituant de ce fait un véritable problème de santé publique (Singwe et Nko'o 2008). La "Women Health Initiative" (WHI) a montré que le Traitement Hormonal Substitutif (THS) était le traitement le plus utilisé par les femmes pour traiter les troubles ménopausiques. Toutefois, l'usage du THS est associé à des effets secondaires comme l'augmentation du risque d'accidents vasculaires cérébraux et des cancers hormonodépendants (Dessapt et Gourdy, 2012). La médecine alternative notamment la phytothérapie sont des recours assez courant pour atténuer ou corriger les troubles ménopausiques (WHI, 2002). La phytothérapie basée sur l'administration des phyto-œstrogènes constitue une alternative thérapeutique de choix surtout à cause des activités tissu-dépendant des phytoestrogènes (Njamen *et al.*, 2008, Djiogue *et al.*, 2014, Dzeufiet *et al.*, 2015).

Selon l'OMS, environ 80% de la population utilise la médecine alternative pour leurs soins de santé primaires (OMS, 2008). Au sein du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé 1, plusieurs plantes de la pharmacopée camerounaise ont montré des activités œstrogéniques et des potentiels thérapeutiques sur les troubles ménopausiques à l'instar de *Millettia macrophylla* (Zingue *et al.*, 2014), *Gouania longipetala* (Dzeufiet *et al.*, 2015), *Anthocleista schweinfurthii* (Ngoungoure *et al.*, 2017, 2019) et *Mammea africana* (Mengue *et al.*, 2023). Certaines de ces plantes ont montré des effets bénéfiques sur l'ostéoporose ménopausique dont *Pterocarpus soyauxii* (Owona *et al.*, 2021). *Pterocarpus mildbraedii* qui a fait l'objet de cette étude est une plante appartenant à la famille des Fabaceae. Des études ont décelé la présence de molécules aux effets œstrogéniques dans cette plante (Ezekwesili *et al.*, 2016 ; Adegbite et Ezekwesili, 2017). Les travaux de Bindzi en 2024 ont également mis en évidence le potentiel "œstrogen-like" de l'extrait aqueux de l'écorce de *P. mildbraedii*. Par ailleurs, *P. mildbraedii* est utilisé empiriquement au Cameroun pour traiter les troubles ménopausiques telles que les bouffées de chaleur, l'anxiété, l'irritabilité, la sécheresse vaginale, l'atrophie des organes uro-génitaux (vessie, utérus, vagin et sein), les maladies cardiovasculaires (Camporez *et al.*, 2013). Toutefois, à notre connaissance, aucune étude scientifique n'a encore montré les activités de *Pterocarpus mildbraedii* dans la prise en charge de l'ostéoporose ménopausique. La présente étude a eu pour objectif l'évaluation des effets anti-

ostéoporotiques de l'extrait aqueux de l'écorce du tronc de *Pterocarpus mildbraedii* (Fabaceae) sur un modèle de ménopause induit par ovariectomie chez la rate Wistar. De manière spécifique, il s'est agi de :

- évaluer *in vivo* les effets de l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* sur la densité minérale et quelques marqueurs biochimiques du métabolisme osseux et du statut oxydant ;
- évaluer *in vitro* les effets anti-inflammatoires de l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* et prédire *in silico* l'interactions des composées identifiées avec quelques enzymes impliquées dans le métabolisme osseux;
- évaluer les effets de *P. mildbraedii* sur l'architecture du fémur, du tibia, de la mandibule et de la vertèbre lombaire 3 des rates ovariectomisées.



**CHAPITRE I :
REVUE DE LA
LITTÉRATURE**

I.1- Généralités sur la ménopause

I.1.1- Définition et étiologie

La ménopause est un état physiologique inéluctable dans la vie génitale d'une femme. Elle correspond à un arrêt définitif du fonctionnement des ovaires sur sa production en follicules ovariens. Elle apparaît en moyenne à l'âge de 51 ans. En ce qui concerne son diagnostic, il est clinique et se traduit par l'absence rétrospective des menstruations sur une période de 1 ans (Lopes et Tremollières, 2015). La ménopause est précédée d'une période appelée préménopause, d'une durée moyenne d'environ 4 ans au cours de laquelle les caractéristiques physiologique et cliniques de l'évolution de la fonction ovarienne changent puis se suit la phase ménopausique au cours de laquelle le taux d'œstradiol sérique atteint son seuil le plus bas après quoi la phase de post ménopause demeure. Cet état est associé à des modifications physiologiques conduisant à des atteintes physiopathologiques dans l'organisme (Clabaut, 2021).

I.1.2- Physiopathologie et symptomatologie de la ménopause

I.1.2.1- Physiopathologie

La ménopause s'installe lorsque le nombre de follicules atteint le seuil critique d'environ 1000 jusqu'à son épuisement total et l'âge de survenue de ce phénomène est de 51 ans en moyenne. Au niveau hormonal, on constate que les taux de "*follicular stimulating hormone*" (FSH) et "*luteinizing hormone*" (LH) sont élevés en regard de l'atrophie folliculaire et de la chute de la production d'inhibine et d'œstrogènes. En effet, les taux de FH sont dix fois supérieurs à ceux d'une femme en activité génitale et les taux de LH trois fois supérieurs. D'où l'altération des organes œstrogénodépendant comme l'os (Kuttann et Souberbielle, 2006).

I.1.2.2- Symptomatologie

La plupart des symptômes liés à la ménopause sont observés chez les femmes âgées durant leurs phases de péri-ménopause. Ces symptômes sont dus à une carence en œstrogènes circulant dans l'organisme. D'une part, les troubles vasomoteurs qui correspondent aux bouffées de chaleur et aux crises sudorales diurnes et/ou nocturnes, leurs fréquences sont variables et durent en général moins de 5 minutes (Freeman *et al.*, 2014). D'autre part, le syndrome génito-urinaire regroupant les symptômes vulvo-vaginaux, sexuels et urinaires dont le plus fréquent est la sécheresse vaginale associée ou non à des dyspareunies, qui tend à se majorer dans les années post-ménopausiques (Sturdee et Panay, 2010). Enfin la prise de poids : A l'approche de la ménopause il est fréquemment observé une prise de poids (Proietto, 2017), mais surtout une modification de la répartition des graisses due à deux facteurs : une accumulation de graisse aux niveaux fessier et abdominal et une diminution de l'activité lipolytique empêchant sa destruction (Ko et Kim, 2020).

I.2- Ménopause et ostéoporose ménopausique

I.2.1- Définition et caractéristiques

L'ostéoporose ménopausique se définit comme une diminution de la masse minérale osseuse associée à une détérioration micro architecturale du tissu osseux touchant les femmes de 50 à 70 ans et entraînant une fragilité excessive de l'os augmentant ainsi le risque de fracture. Elle affecte essentiellement les os trabéculaires, c'est à dire les os spongieux du squelette. Les localisations principales de ce phénomène sont les vertèbres, fémur, tibia et l'extrémité inférieure du radius. L'ostéoporose post ménopausique est la conséquence de la carence en œstrogènes apparaissant à cette période de la vie féminine (Lopes et Tremollières, 2001 ; Choi *et al.*, 2021).

I.2.2- Epidémiologie

L'ostéoporose atteint 30 à 40% des femmes ménopausées de plus de 50 ans en occident (Lippuner *et al.*, 2005). Au Cameroun, l'étude de la densité minérale osseuse par Singwe et Nko'o en 2008 sur 367 femmes âgées dont l'âge moyen était de 52 ans a révélé que la plupart étaient ménopausées dont 18 % présentaient une ostéoporose. Ces travaux ont montré que l'ostéoporose chez la femme camerounaise urbaine semble être aussi fréquente qu'en occident et est comparable à celle d'autres femmes dans le monde (Singwe et Nko'o, 2008).

I.2.3- Physiopathologie

La physiopathologie de l'ostéoporose est due à des modifications de l'activité des cellules osseuses. Dans le mécanisme physiopathologique de l'ostéoporose post-ménopausique, la carence œstrogénique induit une augmentation de la résorption osseuse mais également de la formation. Cependant, l'accélération de la résorption est plus importante, créant ainsi un déséquilibre et donc une perte osseuse (Agidigbi et Kim, 2019). Plusieurs facteurs tels que l'inflammation et le statut oxydant avec l'augmentation du taux malondialdéhyde (MDA) et la réduction du taux de glutathion réduit (GSH) peuvent entre autres participer à l'installation de cette pathologie (Owona *et al.*, 2021).

I.2.3.1- Inflammation et ostéoporose ménopausique

L'ostéoporose ménopausique fait suite à une résorption osseuse et à la décalcification ; tous deux sont liés à la déficience œstrogénique. Elle s'accompagne de l'augmentation de la production de la 5-Lipo-oxygénase qui est à l'origine d'une résorption osseuse. En effet, des études *in vitro* ont montré que la 5-lipo-oxygénase stimulerait l'activité des ostéoclastes (Gaskell *et al.*, 1993). De plus, selon l'absence de lipo-oxygénase dans le tissu osseux augmente considérablement la formation osseuse laisse penser qu'*in vivo*, la 5 lipo-oxygénase agit comme inhibiteur de la formation osseuse. Le processus inflammatoire se caractérise également par l'augmentation des cytokines pro-ostéoclastique comme le *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) et le *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa Beta Ligand* (RANK-L) qui augmentent fortement l'activité et la durée de vie des ostéoclastes (Seeman, 2003 ; Cenci *et al.*, 2003) qui

sont les cellules sollicitées lors de la résorption osseuse (Negushi-koga et Takayanagi, 2009). Plusieurs études indiquent que le RANK-L et le *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) assurent la production et la différenciation des ostéoclastes (Takayanagi *et al.*, 2007 ; Takahashi *et al.*, 2003). Ce processus passe par la formation du complexe RANK-TRAF (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor*) induisant ainsi une formation ostéoclastique par la voie de signalisation *Mitogen-Activator Protein Kinase* (MAPK) (Matsumoto *et al.*, 2000 ; hotokezaka *et al.*, 2002). De plus sous l'effet de la carence en œstrogènes, les macrophage et monocytes synthétisent plus d'interleukines I (IL₁) au niveau sérique qui augmentent la différenciation ostéoclastique (Salamanna *et al.*, 2021). Cette différenciation serait aussi liée à l'intervention d'autres facteurs de croissances comme l'*insulin like growth factor* (IGF) de type I et II ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires (Cenci *et al.*, 2000).

I.2.3.2- Stress oxydant et ostéoporose ménopausique

Les espèces réactives de l'oxygène sont largement impliquées dans les complications associées au vieillissement (Krause, 2007) dont l'ostéoporose (Banfi *et al.*, 2008, Salha, 2016). En effet, une augmentation du stress oxydant est associée à la perte osseuse ; ainsi l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est connue à la fois pour activer la différenciation des ostéoclastes et inhiber celle des ostéoblastes (Wauquier *et al.*, 2009). L'augmentation du taux de phosphatase acide (PAC) serai capable d'induire une stimulation des espèces réactives de l'oxygène (Vaaraniemi *et al.*, 2004). Chez la femme ménopausée, l'ostéopénie est associée à l'augmentation du stress oxydant et à la diminution de la capacité antioxydante (Ozgoçmen et Kaya, 2007a ; Ozgoçmen et Kaya, 2007b ; Altindag et Erel, 2008). Les ROS et les autres produits issus du stress oxydant atténuent l'ostéoblastogenèse, diminuent la durée de vie des ostéoblastes et des ostéocytes tout en stimulant la régénération, la fonction et la survie des ostéoclastes (Khosla et Oursler, 2012). Le stress oxydant active le facteur "forkhead box O" (FOXO) qui se lie à la β -catenin, inhibant ainsi la voie des "*Wingless-related integration site*" (Wnt) et donc la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Manolagas et Almeida, 2007).

I.2.3.3- Absorption intestinal du Ca²⁺ et ostéoporose ménopausique

Un peu plus de 99% du calcium de l'organisme réside dans le squelette. La perte osseuse peut être associé à des changements du métabolisme calcique (Oganov *et al.*, 1992). L'ostéoporose ne peut être dissocié du microbiome intestinal, lequel peut réguler le métabolisme osseux en influençant le système immunitaire, l'absorption en nutriment et la perméabilité intestinale (Sire *et al.*, 2022). Une mauvaise absorption intestinale en calcium peut être relié à une ostéoporose (Xuimei *et al.*, 2024). Il existe un lien direct entre le taux de certaines espèces bactériennes dans la flore intestinale et l'ostéoporose tel que *g-Ruminococcus* dont la présence abondante dans le microbiote limite l'installation de l'ostéoporose (Ning *et al.*, 2024). Une diminution du taux de *lactococcus* et de *bifidobacterium* dans la flore intestinale peut accentuer la perte osseuse lié à une déficience œstrogénique car selon certains auteurs, ces bactéries sont capables de prévenir la perte osseuse (Collins *et al.*, 2019 ; Huidrom *et al.*, 2021).

I.2.4- Signes cliniques

I.2.4.1- Signes biochimiques

L'analyse de plusieurs paramètres biochimiques permettent de statuer sur la santé du tissu osseux dont la phosphatase alcaline (PAL) d'une part, qui est une enzyme synthétisée notamment par les ostéoblastes. Au niveau du tissu osseux, son rôle biologique n'est pas encore clairement établi, mais il semblerait qu'elle joue un rôle prépondérant dans les processus de minéralisation osseuse. La baisse de sa concentration sérique pourrait être un bon indicateur clinique de l'ostéoporose (Machu-Prestaux *et al.*, 1996 ; Meunier, 2005). D'autre part la phosphatase acide (PAC) synthétisée par les ostéoclastes au niveau de l'os. Son rôle dans la mise en place de l'ostéoporose est l'hydrolyse des phosphates organiques et la dégradation du collagène (Ek-Rylander et Andersson, 2010), fragilisant davantage le tissu osseux. Ensuite la *Human Matrix Metalloproteinase 2* (HMP2) de la famille des endopeptidases dépendant du zinc, elle est capable de dégrader la matrice protéique du tissu osseux jouant un rôle prépondérant dans la mise en place de l'ostéoporose (Fatemi *et al.*, 2020). La concentration urinaire en minéraux notamment le calcium est un bon indicateur d'ostéoporose car selon certains auteurs, la perte osseuse s'accompagne d'une déminéralisation de l'os entraînant l'augmentation de ces minéraux dans l'urine (Oumarou *et al.*, 2017 ; Owona *et al.*, 2021).

I.2.4.2- Signes histopathologiques

L'ostéoporose se définit sur le plan histologique comme l'altération de la microarchitecture du tissu osseux. Cette altération est principalement caractérisée par la discontinuité de l'os trabéculaire, la présence des lacunes de résorption, des nécroses cellulaires (Owona *et al.*, 2021) et une diminution du taux collagène osseux (Oumarou *et al.*, 2017).

I.2.5- Model d'induction de l'ostéoporose ménopausique

Il existe de nombreux modèles animaux de perte osseuse. Les modèles de rat disponibles ont fait l'objet d'une revue dans laquelle 3 catégories sont distinguées : les interventions hormonales, les manipulations nutritionnelles et les immobilisations (Figure 3). Le taux de perte osseuse, ainsi que son site cortical ou trabéculaire est très dépendant de la méthode utilisée pour induire l'ostéoporose (Jee et Yao, 2001). De plus, la reproductibilité, le but de l'étude, le site osseux et l'âge des animaux sont essentiels dans la sélection du modèle (Lelovas et Xanthos, 2008). En effet, chez le rat le pic de masse osseuse est atteint vers 9 mois, qui est donc l'âge de la maturité osseuse chez ces animaux (Jee et Yao, 2001). L'ovariectomie des rats dont le squelette est mature reproduit la perte osseuse de la femme ménopausée avec une augmentation du renouvellement osseux, la résorption excédant la formation, une phase initiale rapide suivie d'une phase plus lente et une perte d'os trabéculaire plus importante que la perte d'os cortical (Kalu, 1991 ; Jee et Yao, 2001). Ainsi, la rate ovariectomisée est le modèle le plus utilisé dans la recherche sur l'ostéoporose post ménopausique (Lelovas et Xanthos, 2008). L'utilisation de la souris est aussi très

courante (Hayashi et Fotovati, 2002). Ainsi les différentes voies d'inductions de l'ostéoporose peuvent être résumé dans la figure 1 (Lelovas et Xanthos, 2008).

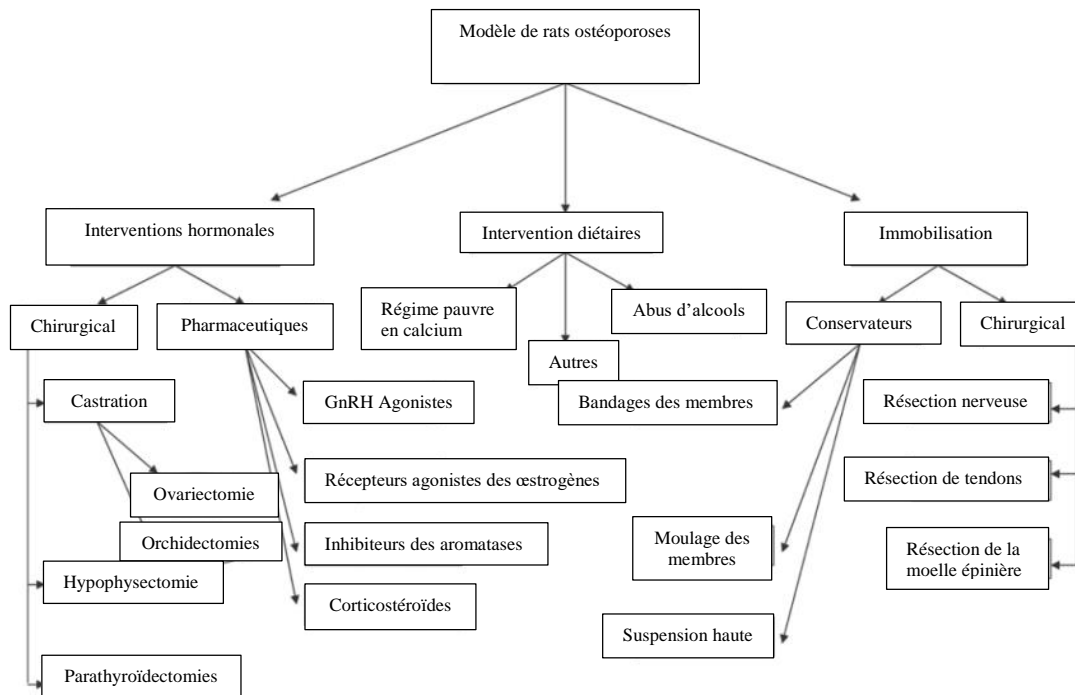


Figure 1 : Les modèles d'induction de l'ostéoporose chez le rat (Lelovas et Xanthos, 2008).

I.3- Prise en charge de l'ostéoporose ménopausique

I.3.1- Mesures hygiéno-diététiques

Les règles hygiéno-diététiques des femmes ménopausées ont un rôle important dans la prévention des complications ostéoporotiques. Une activité physique régulière participe à la prévention des chutes et au maintien du capital osseux. Dans la même lancée, le sevrage tabagique et la diminution de la consommation d'alcool ainsi que le maintien d'un indice de masse corporelle (IMC) normal concourent à une augmentation efficace de l'activité anti-ostéoporotique (Cofer, 2011). Un ajout supplémentaire de calcium, de vitamine D et de phosphore dans la l'alimentation chez la femme ménopausée induit une réduction de l'ostéoporose ménopausique (Nicolaysen, 1937).

I.3.2- Traitements hormonaux substitutifs

Le Traitement Hormonal Substitutif (THS) ou encore le Traitement Hormonal de la Ménopause (THM) consiste en l'administration d'hormones féminines à la suite de la ménopause. Ce traitement constitué d'œstrogènes, plus précisément par la 17- β -œstradiol ; prescrits sous diverses formes galéniques (gélules, comprimés, transdermiques, gels) et des progestatifs. Il a pour but d'atténuer le déficit et l'arrêt des sécrétions hormonales ovariennes. Il s'agit donc d'un traitement de remplacement (Jupin, 2014). Le THM permet de corriger la symptomatologie fonctionnelle du climatère (bouffées de chaleur, sécheresse vaginale, troubles de l'humeur et du sommeil entre autres) et de prévenir les conséquences à moyen et long

terme de la carence œstrogénique (ostéoporose, maladies cardiovasculaires, et la dégradation des fonctions cognitives) (Chen *et al.*, 2006).

I.3.3- Traitements hormonaux complémentaires

I.3.3.1- Calcitonine

Les préparations à base de calcitonine sont des dérivés de la calcitonine humaine, également utilisée pour traiter l'ostéoporose post-ménopausique. La calcitonine est une hormone peptidique produite par la glande thyroïde. Elle a la capacité d'inhiber l'activité des ostéoclastes, réduisant ainsi la perte de densité minérale osseuse et contribuant à réduire le risque de fractures ostéoporotiques (Mc Laughlin *et al.*, 2023).

I.3.3.2- Analogues de l'hormone parathyroïdienne

Les principales préparations du groupe des analogues de l'hormone parathyroïdienne (PTH) comprennent le tériparatide, un analogue de la PTH et l'abaloparatide, un analogue du peptide lié à la PTH. Le principal mécanisme d'action des analogues de la PTH est la liaison du récepteur de la PTH (PTH1R), qui affecte la voie de signalisation protéine G/AMP et active la protéine kinase A (Martin *et al.*, 2021). En outre, lorsque le tériparatide et l'abaloparatide se lient au PTH1R, plusieurs voies de signalisation, Gq/phospholipase C/Ca²⁺ et β -arrestine/ERK, sont activées, ce qui entraîne l'activation des facteurs de transcription des gènes qui sous-tendent la réponse anabolique (Cupp *et al.*, 2013). Les analogues de la PTH favorisent la formation d'ostéoblastes, augmentant ainsi la densité osseuse, améliorant la solidité des os et réduisant le risque de fractures (Bandeira et Lewiecki, 2022).

I.3.4- Traitements pharmacologiques non hormonaux

I.3.4.1- Modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes

Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERM) sont une classe de médicament pouvant agir sur les récepteurs à œstrogène du fait de leur affinité chimique avec les œstrogènes comme agoniste ou antagoniste sur différents tissus. C'est le cas du raloxifène qui fait partie des premiers SERM ayant montré des effets significatifs contre l'ostéoporose ménopausique et les risques de fractures (Mendoza *et al.*, 2013). Le razedoxifène est parmi la troisième génération de SERM ayant une très grande affinité avec les récepteurs œstrogéniques de type alpha qui combiné à une molécule d'œstrogène peuvent prévenir les troubles vasomoteurs et prévenir l'ostéoporose (Palacios et Mejia, 2015).

I.3.4.2- Biphosphonates

Actuellement, les préparations de première intention pour le traitement de l'ostéoporose sont des médicaments antirésorptifs, en particulier les bisphosphonates, qui empêchent la résorption osseuse par les ostéoclastes, augmentant ainsi la densité osseuse et réduisant le risque de fractures (Sindel, 2023). Les préparations de ce groupe largement utilisé pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique sont des préparations de deuxième et troisième génération dont l'efficacité a été prouvée par

des études cliniques. Ce sont les médicaments tels que l'alendronate, l'ibandronate, le risédronate et l'acide zolédronique (Eastell *et al.*, 2019). Le mécanisme d'action de ces préparations est basé sur la liaison et l'inhibition de l'activité de la farnésyl pyrophosphate synthase (FPP), une enzyme clé dans la voie de l'acide mévalonique, qui est essentielle pour la production de cholestérol, d'autres stérols et de lipides isoprénoïdes. L'inhibition de la FPP entraîne la suppression des modifications post-traductionnelles des protéines qui jouent un rôle central dans le maintien du cytosquelette et la régulation de l'activité des ostéoclastes qui provoquent leur apoptose (Kavanagh *et al.*, 2006 ; Ebetino *et al.*, 2011). Ainsi, les bisphosphonates sont capables d'inhiber sélectivement l'activité des ostéoclastes et donc de ralentir la résorption osseuse, en particulier dans l'ostéoporose post-ménopausique (Drake *et al.*, 2008).

I.3.4.3- Inhibiteur du *Receptor activator of nuclear factor kappa beta*

La principale préparation du groupe d'inhibiteurs du RANKL approuvé et largement utilisé pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique est le denosumab, un anticorps monoclonal qui se lie au RANKL et empêche sa liaison au récepteur du RANK (Rinotas *et al.*, 2023). Le denosumab supprime la fonction ostéoclastique en inhibant l'ostéoclastogenèse et la transformation des ostéomorphes non-résorbables en ostéoclastes. Cependant, il a été démontré que des doses élevées d'inhibiteurs de RANKL peuvent transformer les ostéomorphes accumulés en ostéoclastes actifs qui conduisent à la résorption osseuse, laquelle s'accompagne de fractures (Zanchetta *et al.*, 2018).

I.3.5- Limites des différents traitements de l'ostéoporose ménopausique

Les effets secondaires liés à l'utilisation des THS sont multiples parmi lesquels l'augmentation la prévalence du cancer du sein et de l'endomètre. Les bisphosphonates peuvent causer des troubles digestifs tout comme le denosumab ainsi que des douleurs musculo-squelettiques sévères, une hypocalcémie et semblent être associés à une augmentation du risque de cancer de l'œsophage (Kennel et Drake, 2009 ; Crandall et Newberry, 2014). L'utilisation de la calcitonine a été limitée par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) en 2012 en raison du risque accru de cancer associé (Overman et Borse, 2013). Les analogues de la PTH malgré leurs grandes efficacités induisent à l'arrêt du traitement une réduction de la densité minérale osseuse et nécessite un nouveau traitement antirésorptif pour renforcer ou maintenir les effets obtenus (Dito *et al.*, 2023). L'importance des effets secondaires tend à limiter l'utilisation de ces traitements et à identifier de nouvelles stratégies de prévention de l'ostéoporose. La médecine alternative notamment la médecine chinoise et la phytothérapie sont des recours assez courant pour atténuer ou corriger les troubles ménopausiques (WHI, 2002). Selon l'OMS, environ 80% de la population utilise la médecine alternative pour leurs soins de santé primaires (OMS, 2008)

I.3.6- Phytothérapie

La phytothérapie est un domaine largement représenté en officine. Il s'agit d'une thérapeutique par les plantes et leurs formes dérivées qui repose souvent sur leurs utilisations empiriques. Les plantes sont

utilisées ainsi sous forme de tisanes, de poudres, d'extraits ou de teintures sans qu'elles n'aient subi d'étapes d'extraction ou d'hémisynthèse qui les rapprocheraient de la pharmacognosie. Il existe dans les plantes plusieurs variétés de biomolécules possédant des effets thérapeutiques bénéfiques, à l'exemple des phytoœstrogènes. Les phytoœstrogènes sont des métabolites secondaires de certains végétaux capables d'induire des effets œstrogéniques du simple fait de leur consommation. Pour être classées parmi les phytoœstrogènes, les molécules doivent répondre à deux critères : elles doivent répondre au test d'utéroprolifération caractérisé par l'augmentation en volume de l'utérus et la cornification du vagin et ce, pour des doses correspondant à un apport alimentaire relatif à une consommation ordinaire et non exagérée. Les effets bénéfiques des phytoœstrogènes tels les flavonoïdes (quercétine) et isoflavones dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose sont prouvés (Douart, 1994 ; Banfi *et al.*, 2008 ; Marie et Halbout, 2008 ; Al Hamdany *et al.*, 2019). Ainsi, plusieurs travaux ont montré l'incidence et l'évolution de l'ostéoporose avec la consommation d'aliments riches en polyphénols (Chisari *et al.*, 2019). *Pterocarpus mildbraedii* est une plante utilisée de la pharmacopée camerounaise pour traiter les troubles liés à la ménopause dans la localité de Mbankomo.

I.4- La plante : *Pterocarpus mildbraedii*

I.4.1- Position systématique

D'après l'*angiosperms Phylogeny Group* (APG III, 2009), la classification de *Pterocarpus mildbraedii* est la suivante :

Sous-règne	Tracheobionta
Super division	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Pterocarpus</i>
Espèce	<i>Pterocarpus mildbraedii</i>

I.4.2- Présentation

Pterocarpus mildbraedii (Figure 4) localement appelé Padouk blanc, *Oha Ojii* à l'Est du Nigeria, appartient à la famille des Fabaceae (Keay, 1989). C'est une plante à feuille semi caduque avec une couronne arrondie, elle peut croître jusqu'à 15-25m de haut avec un tronc d'environ 60 cm de rayon.

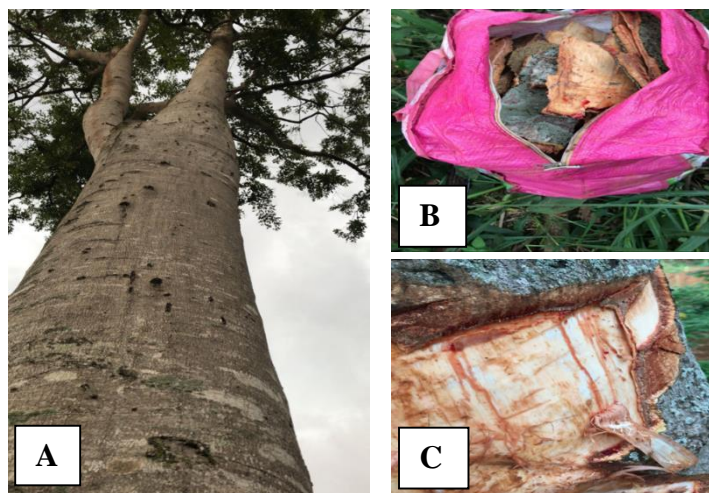


Figure 2 : Photographie de *Pterocarpus mildbraedii*. Prise en Octobre 2022 par NGUEUKO TALLA Jude à Mbankomo, région du Centre, Cameroun. A : tronc ; B : écorces récoltées ; C : exsudation du tronc après la récolte.

I.4.3- Données ethnobotaniques et pharmacologiques

P. mildbraedii est régulièrement utilisé en pharmacopée : des extractions à base de feuilles sont utilisé par certaines tribus de l'Est et du Sud du Nigéria pour traiter des maladies tels que la fièvre, les maux de tête, les convulsions, les problèmes respiratoires. Quant à l'écorce, ils l'utilisent comme un puissant analgésique (Ogukwe *et al.*, 2004 ; Akinyeye *et al.*, 2010). L'analyse au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) des feuilles de *P. mildbraedii* a montré que cette dernière posséderait une très forte activité antioxydantes (Usunobun et Igwe, 2016). Les travaux de Adegbite *et al.* (2015) ont montré d'une part que les feuilles de *P. mildbraedii* possèdent un effet antidiabétique sur les rats. D'autre part, que les feuilles de *P. mildbraedii* stimulent l'augmentation des cellules CD₄ du système immunitaire et que les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *P. mildbraedii* n'ont pas un effet toxique sur des cellules du foie et aux doses de 200 et 400 mg/kg (Adegbite *et al.*, 2015). Il a également montré en 2017 un effet hypocholestérolémique des feuilles de *P. mildbraedii* associé à une absence de toxicité sur les paramètres hématologiques de l'extrait aqueux et éthanolique aux doses de 200 et 400 mg/ kg (Adegbite et Ezekwesili, 2017).

I.4.4- Phytochimie

Les travaux de Usunobun et Igwe (2016) ont montré d'une part, par analyse phytochimique qualitative des feuilles de *P. mildbraedii* la présence des métabolites secondaires tels que les des alcaloïdes, flavonoïdes, tannins et saponines. D'autre part, l'analyse phytochimique quantitative par GC/MS de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. mildbraedii* a montré qu'il renferme (42,04 %) de lupéol, suivi par l'acide oléique (20,38 %), et l'acide palmitique (11,46 %). Cette plante renferme aussi comme constituants le 1,2,3,4 butanetetrol ou erythritol (5,73 %), N, N dimethyl-2-propyn-1- amine (4,46 %), 1,2-benzenediol (7,64 %), 4-hydroxypiperidine (8,28 %), et l'acide n-hexadécanoïque (11,46 %) (Rosemary *et al.*, 2015).



**CHAPITRE II:
MATÉRIEL ET
MÉTHODES**

II 1- Matériel

II.1.1- Matériel végétal

Les écorces du tronc de *Pterocarpus mildbraedii* Harms (Fabaceae) ont été récoltées aux environs de Mbankomo dans la région du centre Cameroun en octobre 2022. La plante a été authentifiée à l'Herbier National du Cameroun en comparaison à l'échantillon de la collection d'herbier N° 42210 HNC.

II.1.2- Matériel animal

Les animaux utilisés dans le présent travail étaient des rats de souche Wistar âgés de 8-10 semaines environ et pesant entre 130 et 150 g. Ils avaient été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I. Ces animaux étaient logés dans des cages en plastique, maintenus à température ambiante sous un cycle diurne/nocturne naturel et avaient un accès libre à l'eau de robinet et à la nourriture. La composition alimentaire pour un sac de 50 kg était de 60% de farine de maïs, 20% de farine de poisson, 10 % de farine de blé, 7 % farine de d'arachides, 3 % de farine d'os et de 0,04 % de complexe vitaminique.

II.2- Méthodes

II.2.1- Préparation de l'extrait aqueux de l'écorce de *Pterocarpus mildbraedii*

Des morceaux de l'écorce de *Pterocarpus mildbraedii* ont été découpés, séchés à l'ombre pendant 21 jours et broyés à l'aide d'un "blender" pour obtenir une poudre. Quatre cents grammes de cette poudre ont été portés à ébullition dans 5L d'eau de robinet pendant 30 min selon les recommandations du tradithérapeute. Le décoctât obtenu a été filtré à l'aide du papier Whatman N° 3 et le filtrat obtenu a été séché à l'étuve à 45°C. Ce protocole a permis d'obtenir 28,8 g d'extrait brut, soit un rendement de 7,2 % (Figure 3).

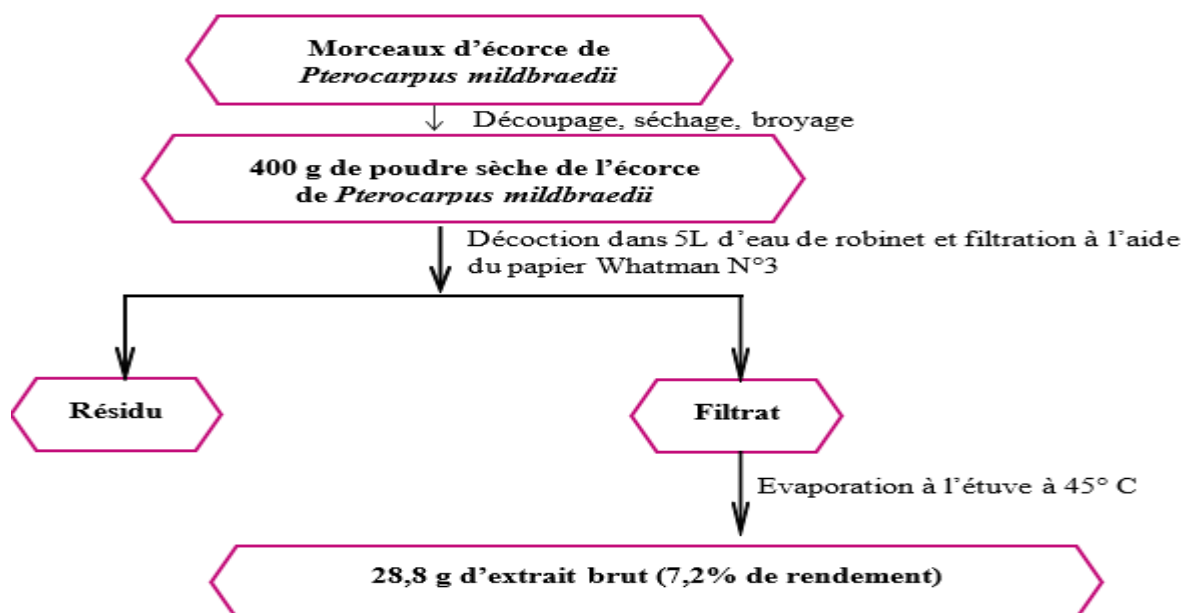


Figure 3 : Protocole d'extraction aqueuse de l'écorce de *Pterocarpus mildbraedii*.

II.2.2- Réalisation de l'ovariectomie bilatérale

L'ovariectomie est l'ablation chirurgicale des ovaires. Les animaux ont été ovariectomisés par une approche dorsale (Ngoungouré *et al.*, 2017). Ils ont au préalable été anesthésiés par injection d'une dose de 10 mg/kg de diazépam (Valium) de concentration 5 mg/mL suivie une minute après d'une injection d'une dose de 50 mg/kg de kétamine de concentration 10 mg/mL. Les injections ont été faites par voie intrapéritonéale. Une fois endormi, l'animal a été placé en décubitus ventral sur une planche à dissection en liège. Une portion du bas du dos a ensuite été épilée et la zone épilée a été désinfectée à l'aide d'un bout de coton imbibé d'alcool 95°. Une fine incision transversale a été faite sur la peau au niveau de la zone épilée. A l'aide d'une pince fine, le péritoine a été incisé et l'ouverture a été maintenue pour pouvoir extraire la masse contenant l'ovaire. L'ovaire a été séparé de la corne utérine à l'aide de ciseaux fins. Ensuite la masse grasseuse a été réintroduite à l'intérieur et le péritoine suturé. A la fin, la peau a été suturée et la blessure a été pansée avec de la bétadine et de la pénicilline en pommade pendant deux semaines jusqu'à guérison complète. Les animaux du lot « *Sham-operated* » ont subi une chirurgie blanche.

II.2.3- Evaluation des effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'ostéoporose ménopausique

II.2.3.1- Préparation des solutions

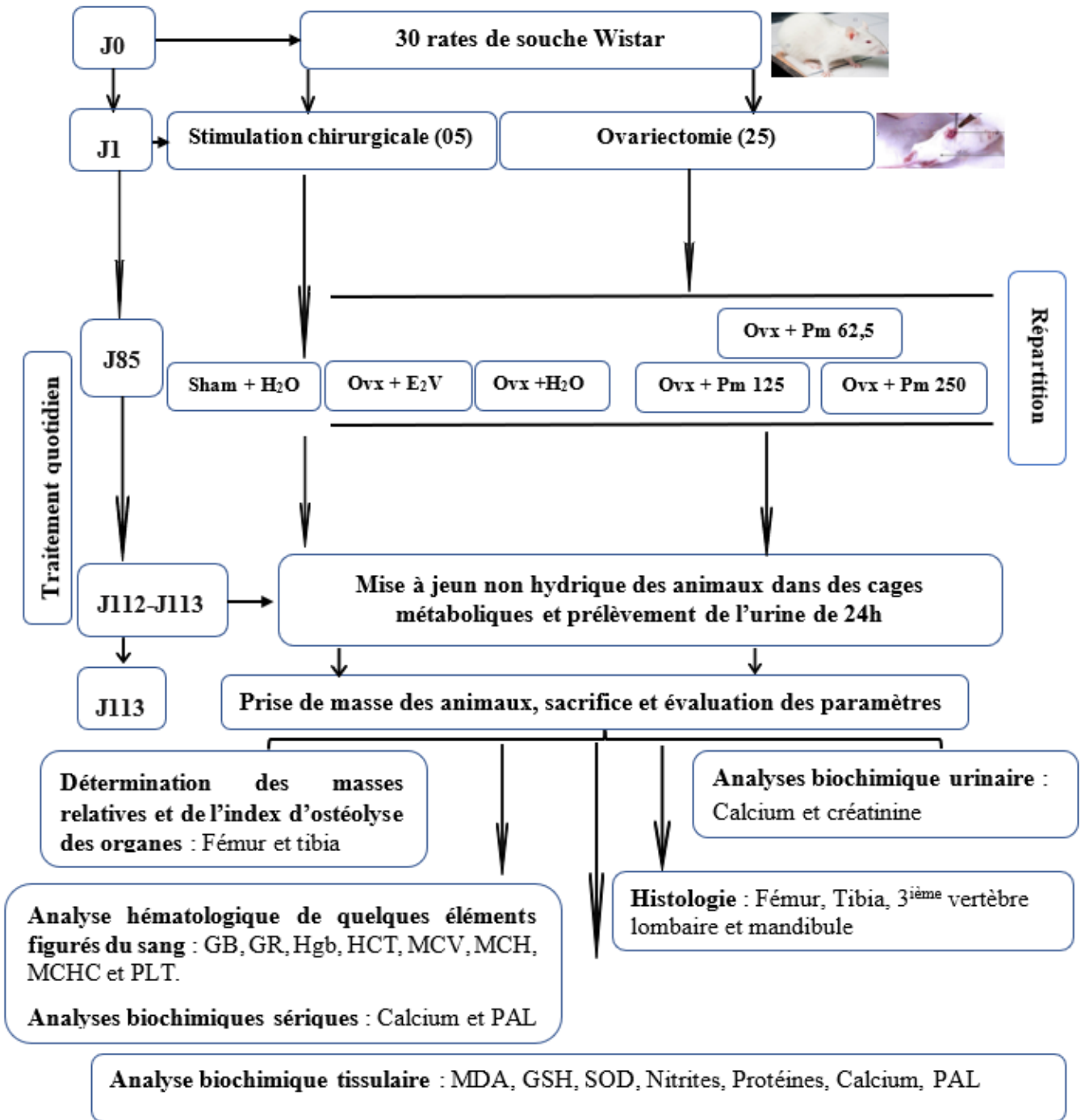
L'ensemble des solutions utilisées dans le cadre de ce travail ont été préparé suivant les protocoles décrit dans l'annexe 1.

II.2.3.2- Détermination de la dose équivalente chez l'humain et de la dose chez le rat

Les recommandations du tradithérapeute ont permis d'obtenir à partir de 500 mL de filtrât, 1,41 g d'extrait brut après séchage. Cette masse d'extrait a été divisée par 70 kg puis multipliée par 1000 pour obtenir une dose équivalente humaine (DEH) égale à 20,14 mg/kg. La dose utilisée chez le rat a été déterminée en multipliant la DEH par le facteur de conversion (6,2) selon la méthode décrite par Nair et Jacob (2016) ce qui a permis d'obtenir une dose d'environ 125 mg/kg. Cette dose a été encadrée en la divisant par 2 et par 4 puis en la multipliant successivement par 2 et 4 pour obtenir les doses de 62,5, 31,25, 250 mg/kg et de 500 mg/kg. Sur la base des travaux de Bindzi et collaborateurs en 2024 les doses efficaces utilisées pour traiter quelques complications liées à la ménopause étaient 62,5, 125 et de 250 mg/kg. Ces doses ont été utilisées pour traiter les animaux ovariectomisés. Connaissant la dose (mg/kg) à administrer, la masse (kg) de l'animal et les concentrations (mg/mL) de solution à administrer aux rats, le volume (mL) de l'extrait à administrer a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Volume(mL)} = \frac{\text{Dose (mg/kg)} \times \text{Masse (kg)}}{\text{Concentration (mg/mL)}}$$

II.2.3.3- Protocole expérimental



Pm : *Pterocarpus mildbraedii*

Figure 4 : Schéma synoptique du protocole d'évaluation des effets de l'extrait aqueux de l'écorce de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'ostéoporose ménopausique.

II.2.3.4- Préparation des échantillons

II.2.3.4.1- Obtention du sérum

Le sang artérioveineux a été collecté dans des tubes secs étiquetés et centrifugés à 3000 trs/min à 4°C pendant 15 minutes, à l'aide d'une centrifugeuse de marque Eppendorf 5804 R, Hamburg. Le sérum

obtenu a été recueilli et conservé au congélateur à -20°C dans des tubes eppendorf pour l'évaluation ultérieure des paramètres biochimiques sériques.

II.2.3.4.2- Obtention des homogénats

Les homogénats ont été réalisés avec une portion de 0,2 g de la tête du fémur et du tibia qui ont été broyée à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique sur bac de glaces. Il a été ajouté au broyat de fémur et de tibia 3 mL de tampon phosphate salin (0,1 M ; pH 7,4). Les mélanges ont ensuite été transférés dans des tubes à essai secs étiquetés, puis centrifugé à 3000 tours/min à 4°C pendant 25 minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation a été collecté dans des tubes Eppendorf et conservé au congélateur à -20°C pour les analyses biochimiques tissulaires.

II.2.3.5- Détermination de la masse relative et de la densité minérale osseuse

- La masse relative osseuse est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Masse relative (\%)} = \frac{\text{Masse de l'organe}}{\text{Masse de l'animal}} \times 100$$

- La densité minérale osseuse a été déterminée par la méthode de la masse volumique décrite par Oumarou *et al.* (2017) selon la formule suivante :

$$\text{DMO(Kg/(mm}^3\text{))} = \frac{\text{M (Kg)} \times 1000 \text{ (Kg/mm}^3\text{)}}{\text{V (mm}^3\text{)}}$$

DMO = Densité Minérale Osseuse ; M = Masse du fémur ou du tibia ; V = Volume du fémur ou du tibia.

II.2.3.6- Analyses biochimiques

II.2.3.6.1- Evaluation de quelques marqueurs du métabolisme osseux

II.2.3.6.1.1- Dosage de la phosphatase alcaline sérique et osseuse

- **Principe**

En milieu alcalin, les phosphatases alcalines catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol et phosphate (Young et Freidman 2001). La vitesse d'apparition du p-nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité de la PAL du spécimen.

- **Mode opératoire**

La procédure mono réactive a été réalisée suivant le protocole décrit par le kit *BIOLABO*. Les différentes substances ont été introduites dans des tubes secs comme indiqué dans le tableau I.

Tableau I: Protocole du dosage de la phosphatase alcaline sérique et osseuse

	Blanc	Echantillon
Réactif de travail (µL)	100	100
Eau distillée (µL)	10	-
Sérum ou homogénat osseux (µL)	-	10

Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 1 minute à 37°C. L'absorbance des échantillons a été lue contre le blanc dans le sérum et contre le tampon phosphate saline dans le fémur toutes les minutes pendant 3 minutes en utilisant un spectrophotomètre (URIT 810) à une longueur d'onde de 405 nm.

L'activité de la phosphatase alcaline (PAL) a été déterminée par calcul à l'aide d'un facteur fournit par le kit :

$$\text{Activité PAL } \left(\frac{UI}{L}\right) = \Delta A \times F$$

ΔA = Variation de l'absorbance = [(A1-A0) + (A2-A1) + (A3-A2)] /3; **F** = Facteur de calcul fournit par le kit = **2757**.

A0 = Activité à la première minute.

II.2.3.6.1.2- Dosage du calcium

L'évaluation du taux de calcium sérique et tissulaire a été réalisé à l'aide du kit de marque *BIOLABO*.

➤ **Principe**

En milieu alcalin, le complexe 0-crésolphtaléine (CPC) réagit avec les ions calcium pour former un complexe coloré rouge foncé dont l'absorbance, mesurée à 570 nm, est proportionnelle à la concentration en calcium dans le spécimen (Clarck *et al.*, 1975).

➤ **Mode opératoire**

L'évaluation des taux de calcium sérique et tissulaire a été réalisée en pipetant des volumes de solution et de réactif tel que présenté dans le tableau II.

Tableau II: Protocole du dosage du calcium

	Blanc	Standard	Echantillon
R₁ (µL)	1000	1000	1000
R₂ (µL)	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	10	-	-
Standard (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Les tubes ont été agités puis incubés à température ambiante pendant 5 minutes. Les absorbances ont été lues au spectrophotomètre de marque URIT-810 contre le blanc à 570 nm.

R = Réactifs.

La concentration de calcium a été calculée par les formules suivantes :

➤ **Serum**

$$[\text{calcium}] = \frac{\text{Abs échantillon} - \text{Abs blanc}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanc}} \times \text{Conc. standard}$$

➤ **Urine de 24h**

$$[\text{calcium}] = \frac{\text{Abs échantillon} - \text{Abs blanc}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanc}} \times \text{Conc. standard} \times \text{vol(dL) urine de 24h}$$

➤ **Fémur et tibia**

$$[\text{calcium}] = \frac{\text{Abs échantillon} - \text{Abs blanc}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanc}} \times \text{Conc. standard} \times \text{vol(dL) homogénat}$$

[Calcium] = Concentration du calcium (mg/dL) ; **Abs blanc** = Absorbance blanc ; **Conc. Standard** = Concentration du standard (10) mg/dL; **Abs échantillon** = Absorbance de l'échantillon ; **vol** = volume.

II.2.3.6.2- Evaluation de quelques marqueurs du statut oxydant

II.2.3.6.2.1- Evaluation du glutathion réduit

➤ **Principe**

L'acide dinitro-2,2'-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements thiols (-SH) du glutathion et forme un complexe de coloration jaune dont l'absorption est maximale à 412 nm (Ellman, 1959).

➤ Mode opératoire

Dans les tubes à essai ont été introduits au préalable 100 µL d'homogénats (tubes échantillons) ou 100 µL de tampon Tris-HCl 50 mM ; pH = 7,4 (tube témoin). Ensuite, ont été ajoutés 1500 µL de réactif, d'Ellman. Les tubes ont été agités et incubés pendant 60 minutes à température ambiante et les absorbances ont été lues contre le blanc à 412 nm. La concentration de glutathion réduit (GSH) a été déterminée par la formule suivante :

$$[\text{GSH}] = \frac{\Delta \text{ Abs}}{\epsilon \times L \times m}$$

[GSH]= Concentration de GSH (mol/g d'organes) ; $\Delta \text{ Abs}$ = Abs essai-Abs blanc ; L = Trajet optique (1 cm) ; ϵ = Coefficient d'extinction molaire ($13600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; m = Masse de l'organe (g).

II.2.3.6.2.2- Dosage du malondialdéhyde

➤ Principe

Le malondialdéhyde (MDA) formé au cours de la peroxydation lipidique réagit avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et chaud, pour donner un complexe rose qui présente un maximum d'absorption à 530 nm au spectrophotomètre (Wilbur *et al.*, 1949). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de MDA présent dans le milieu.

➤ Mode opératoire

Dans des tubes contenant 250 µL d'homogénat (tubes échantillons) ou 250 µL de tampon Tris-HCl 50 mM ; pH = 7,4 (tube blanc) ont été introduits, 125 µL d'acide trichloro-acétique (TCA) 20 % et 250 µL d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %. Les tubes ont été bouchés à l'aide de billes de verre, chauffés à 90°C au bain-marie pendant 10 minutes, puis refroidis à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 tours/min à température ambiante pendant 15 minutes. Le surnageant a été pipeté et l'absorbance lue à 530 nm contre le blanc.

La concentration en MDA a été déterminée par la formule ci-dessous :

$$[\text{MDA}] = \frac{\Delta \text{ Abs}}{\epsilon \times L \times m}$$

[MDA]= Concentration de MDA (mol/g d'organes) ; $\Delta \text{ Abs}$ = Abs essai-Abs blanc ; ϵ = Coefficient d'extinction molaire ($15600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$) ; m = Masse de l'organe (g).

II.2.3.6.2.3- Dosage des nitrites

➤ Principe

En présence de l'amino-4-benzènesulfonamide (sulfanilamide) et de dichlorure de N-(naphtyl-1) -diamino-1,2-éthane (N-1-naphtyléthylènediamine) en milieu acide, les nitrites subissent une réaction de diazotation. Le produit est proportionnel à la quantité de nitrites présente dans l'échantillon (Green *et al.*, 1982).

➤ **Mode opératoire**

Le dosage des nitrites a été réalisé suivant le protocole présenté dans le tableau III.

Tableau III: Protocole du dosage des nitrites

	Blanc	Etalons						Echantillons
Tubes	0	1	2	3	4	5	6	X ₁X _n
Concentration de NaNO ₂ (µM)	0	0,03	0,06	0,12	0,25	0,50	1	-
Volume de NaNO ₂ (µL)	-	100	100	100	100	100	100	-
Echantillon (µL)	-	-	-	-	-	-	-	100
Eau distillée (µL)	500	400	400	400	400	400	400	400
Réactif de Griess (µL)	500	500	500	500	500	500	500	500
Absorbances obtenues	0	0,06	0,13	0,22	0,45	1,02	2,05	-

La courbe d'étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons à la concentration de NaNO₂ (Figure 5).

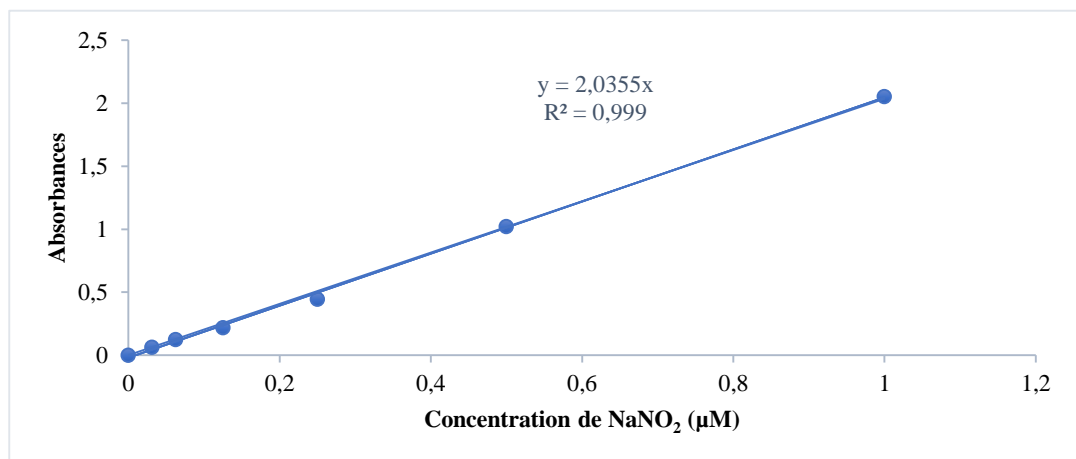


Figure 5 : Courbe d'étalonnage du dosage des nitrites.

Le taux de nitrites a été déterminé par la résolution de l'équation $y = 2,0355x$

II.2.3.6.2.4- Dosage de la catalase

➤ **Principe**

Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase. Le résidu se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable qui va être décomposé par la chaleur et formé un complexe vert (Sinha, 1972).

➤ **Mode opératoire**

Les tubes ont été remplis selon le protocole décrit dans le tableau IV pour le tracé de la courbe d'étalonnage de la catalase (Figure 6).

Tableau IV: Protocole du dosage de la catalase

Tubes	Blanc	Etalons					Echantillons	
	0	1	2	3	4	5	X ₁ ...X _n	
Eau distillée (µL)	50	-	-	-	-	-	-	-
Echantillons (µL)	-	-	-	-	-	-	50	50
Tampon phosphate (0,1 mM; pH 7,5) (µL)	750	-	-	-	-	-	750	750
Volume de H ₂ O ₂ (50 mM) (µL)	200	0	20	40	80	160	200	200

Les tubes ont été laissés à incuber à 25 °C pendant 1 minute.

Dichromate de potassium/acide acétique glacial (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
---	------	------	------	------	------	------	------	------

Après formation du précipité bleu, les tubes ont été chauffés à 100 °C pendant 10 minutes (apparition de la couleur verte) et refroidis à 25 °C.

Eau distillée (µL)	-	1000	980	960	920	840	-	-
Concentration de H ₂ O ₂ (mM)	-	0	2	4	8	16	-	-
Absorbances obtenues	-	0	0,007	0,014	0,025	0,052	-	-

La courbe d'étalonnage a été tracée en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons aux concentrations de H₂O₂ comme l'indique la figure 8.

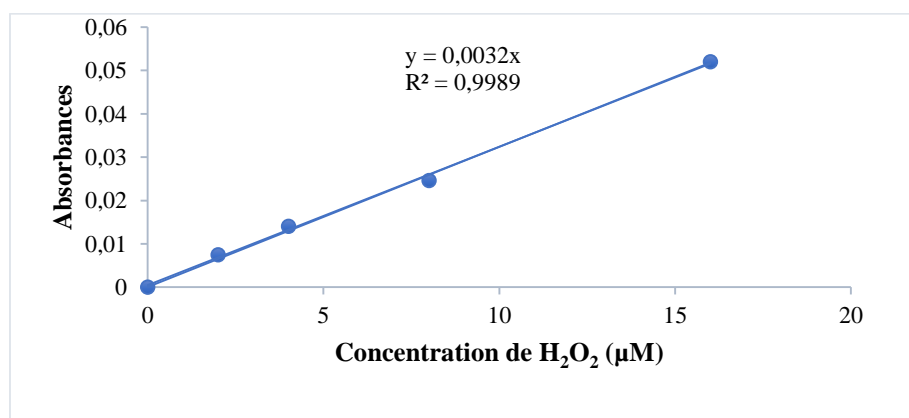


Figure 6 : Courbe d'étalonnage du dosage de la catalase.

L'activité spécifique de la catalase a été déterminée à partir de la formule suivante :

$$\text{Act CAT} = \frac{\Delta \text{ Abs}}{a \times t \times m}$$

Act CAT = Activité de la catalase (mM de H₂O₂/min/g d'organes) ; **Δ Abs** = Abs essai-Abs blanc ;

a = Pente de la courbe d'étalonnage (0,0032) ; **t**= durée de la réaction (1 minute) ;

m= Masse de l'organe (g).

II.2.3.6.2.5- Dosage de la super oxyde dismutase

➤ Principe

L'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome dans un milieu est inhibée en présence de la superoxyde dismutase (SOD). L'augmentation de l'absorbance, qui est proportionnelle à l'activité de la SOD, est notée entre 20 et 80 secondes à 480 nm.

➤ Mode opératoire

Dans les tubes tests, ont été introduits 134 µL d'homogénats d'organes et dans le tube blanc, 134 µL de tampon carbonate (0,05 M ; pH 10,2). Puis 1666 µL de tampon carbonate (0,05 M, pH 10,2) ont été introduits dans tous les tubes. La réaction a été déclenchée en ajoutant 200 µL d'adrénaline (0,3 mM) dans chaque tube. L'absorbance des échantillons à 480 nm a été mesurée à 20 et à 80 secondes contre celle du blanc.

L'activité de la SOD a été déterminée comme suit :

➤ **variation de l'absorbance: ΔA (min) = $A_{20S} - A_{80S}$**

➤ **% d'inhibition = $100 - ((\Delta A \text{ essai} \times 100) / \Delta A \text{ blanc})$**

➤ **1 unité de SOD = 50% d'inhibition.**

L'activité spécifique de la SOD (unité de SOD/g d'organes) = (nombre d'unité de SOD/mL/g d'organes)

A_{20S} = Absorbance mesurée à 20 secondes ; A_{80S} = Absorbance mesurée à 80 secondes ;

ΔA_{essai} = Variation de l'absorbance de l'échantillon ; ΔA_{blanc} = Variation de l'absorbance du blanc.

II.2.3.6.3- Dosage des protéines totales

➤ Principe

En milieu basique, le tartrate de sodium et de potassium forme avec les ions cuivriques un complexe soluble. L'addition d'une protéine déplace le cuivre lié au tartrate pour former un complexe cuivro-protéique de couleur violette. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la solution (Gornall *et al.*, 1949).

➤ Mode opératoire

Le dosage des protéines totales a été réalisé suivant la méthode de Biuret. Les tubes ont été remplis suivant le tableau V.

Tableau V: Protocole du dosage des protéines totales

	Blanc		Étalons				Echantillons		
Tubes	0	1	2	3	4	5	6	X ₁X _n	
SAB (µL)	0	50	100	150	200	250	300	-	-
Eau distillée (µL)	600	550	500	450	400	350	300	590	590
Réactif de Biuret (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Echantillons (µL)	-	-	-	-	-	-	-	10	10
Quantité de protéines (mg)	0	0,15	0,30	0,45	0,6	0,75	0,90	-	-

**Le contenu de chaque tube a été homogénéisé et incubé pendant 10 minutes à température ambiante.
L'absorbance a été lue contre le blanc à 540 nm.**

Absorbances obtenues (nm) 0 0,01 0,02 0,05 0,06 0,07 0,08 0,17- -

SAB= Sérum Albumin Bovin ; **0=** Tube blanc ; **1-6=** Tubes étalons ; **X1-Xn=** Tubes échantillons.

La courbe d'étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons à la quantité de protéines. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'équation $y = 0,1115x$ (Figure 7).

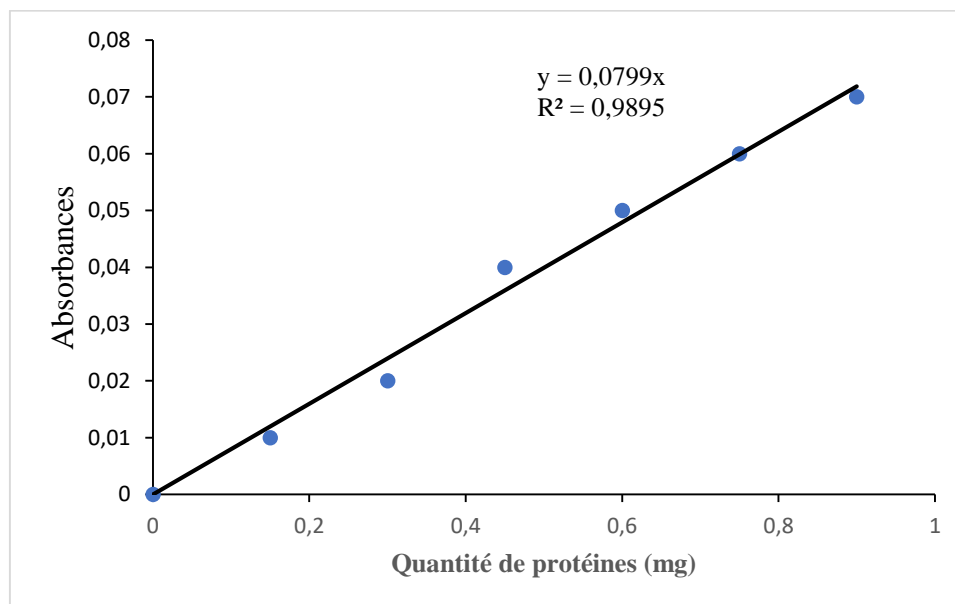


Figure7 : Courbe d'étalonnage du dosage des protéines.

II.2.3.6.4-Dosage de la créatinine

➤ **Principe**

En milieu alcalin, la créatinine forme avec l'acide picrique un complexe rouge qui absorbe à 505 nm. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans le milieu réactionnel.

➤ **Mode opératoire**

Les concentrations en créatinine des échantillons ont été déterminées selon le protocole proposé par le kit Labkit (France). Les substances ont été introduites dans des tubes comme l'indique le tableau VI.

Tableau VI: Protocole du dosage de la créatinine

	Blanc	Standard	Echantillon
Réactif de travail (µL)	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	100	/	/
Etalon (µL)	/	100	/
Sérum (µL)	/	/	100

Le contenu des tubes a été bien mélangé. Après 30 secondes, l'absorbance A1 a été lue contre le blanc à 505 nm. Exactement 2 minutes après la première lecture, l'absorbance A2 a été lu à la même longueur d'onde. Le taux de créatinine sérique a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Créatinine (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ absorbance Echantillon}}{\Delta \text{ absorbance Standard}} \times \text{Standard}$$

Δ *absorbance* = différence entre l'absorbance lue à 1 min et à 2 min; [**Standard**] = concentration de l'étalon (2 mg/dL).

II.2.4- Etude des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* de *Pterocarpus mildbraedii*

II.2.4.1- Obtention des macrophages

L'isolement des macrophages primaires chez des rats d'environ 130 g a commencé par leur élicitation par injection intra-péritonéale de 0,5 mL d'une solution d'amidon 2 % (agent inflammatoire) (Titus *et al.*, 1995). Quatre jours après injection, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale puis le tampon PBS (0,1 M, pH 7,4) a été injecté par voie intrapéritonéale à l'aide d'une seringue à raison de 20 mL chez le rat pour la collecte des macrophages. Après massage de la cavité abdominale, le liquide intérieur a été recueilli lentement dans la seringue. La solution obtenue contenant les macrophages a été introduite dans les tubes Falcon de 15 mL. Ces tubes ont été centrifugés (3000 trs/min, 4°C, 10 min) et le surnageant a été éliminé. Le culot obtenu contenant les cellules a été récupéré et a été conservée dans un congélateur à température -20 °C. Par la suite, les hématies ont été éliminées par choc osmotique en suspendant les cellules dans 1 mL d'une solution hypotonique de NaCl 0,05 M pendant 1 min (Bansal, 1987). L'isotonicité a été rétablie par ajout de 1 mL de NaCl 0,25 M. Le mélange a été de nouveau centrifugé (3000 trs/min, 4°C, 10 min), et le culot obtenu contenant en majorité les macrophages a été suspendu dans 2 mL de milieu de culture DMEM et maintenu dans la glace.

II.2.4.2- Test au bleu trypan

Ce test permet de vérifier l'intégrité membranaire des cellules afin de différencier au microscope les cellules vivantes des cellules mortes.

➤ Principe

La molécule de bleu trypan a tendance à infiltrer la cellule et une fois dans celle-ci, son exclusion dans le milieu extracellulaire se fait par un mécanisme nécessitant de l'énergie et seules les cellules possédant une source d'ATP sont capables de mettre en place un tel mécanisme. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule de bleu trypan et apparaîtra brillante au microscope tandis qu'une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleu.

➤ Mode opératoire

Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, il a été introduit successivement 25 µL de suspension cellulaire puis 225 µL de la solution de bleu trypan (0,2 % dans le NaCl 0,9%). Le mélange a été homogénéisé et 20 µL ont été introduit dans une cellule de Malassez et recouverts d'une lamelle. Les cellules ont enfin été observées au microscope optique (objectif : 400X) et comptées. La concentration des cellules/mL de milieu a été déterminée à l'aide de la formule ci-après.

$$N = n \times 100 \times 10^3 \times Fd$$

N= nombre de macrophages par mL de milieu (cellules/mL)

n= nombre de cellules comptées viables à l'aide des cellules de Malassez

Fd= facteur de dilution

II.2.4.3- Incubation des macrophages

Après comptage des cellules par l'hématimètre de Malassez, les cellules ont été réparties dans différents puits à raison de 104 cellules/µL. En effet, dans les puits tests et témoins positifs, 150 µL de cellules ont été introduit avec 50 µL de *Saccharomyces cerevisiae* (250 µg/mL) ; dans les puits du blanc 150 µL de cellules ont été introduit avec 50 µL de DMEM. La microplaque a été incubée dans un incubateur pendant 1h à 37 °C (5% de CO₂), puis 50 µL d'extrait à différentes concentrations (0,1, 1, 10, 100 et 1000 µg/mL) ont été ajoutées dans les puits tests et 50 µL de DMEM ont été ajoutés dans les puits du témoin positif et 50 µL de baicaline pour le standard. La microplaque a été de nouveau incubée dans un incubateur pendant 3h à 37 °C (5 % de CO₂). Les surnageants ont été utilisés pour les tests des dosages de l'oxyde nitrique tandis que les culots ont été utilisés pour les tests de dosages de la lipoxygénase et des enzymes lysosomales.

II.2.4.4- Evaluation de l'effet de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'activité de la phosphatase alcaline des macrophages

➤ Principe

La phosphatase alcaline des macrophages est stimulée en présence de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette enzyme hydrolyse le paranitrophenylphosphate (p-NPP), en paranitrophénol (p-NP) et phosphate inorganique. Le p-NP formé, présente une couleur jaune en milieu alcalin (pH 9,8). Un maximum d'absorption à 405 nm. L'augmentation de l'absorbance est directement proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline des macrophages.

➤ Mode opératoire

Les culots cellulaires obtenus dans la méthodologie II.2.4.1 ont été utilisés. Les culots obtenus ont été solubilisés avec 25 µL de Triton X-100, suivi de l'addition de 50 µL de p-nitrophénylphosphate (10

mM) et 50 µL de tampon glycine (0,1 M, pH 9,0). L'ensemble a été incubé pendant 30 min à 37°C. La réaction a été arrêtée par ajout de 100 µL de tampon NaOH (0,2 M, pH 12). L'absorbance a été mesurée à 405 nm et le pourcentage de variation de l'activité de l'enzyme lysosomale a été calculé en tenant compte des tubes témoins selon la formule ci-dessous :

$$\% \text{ variation de l'activité lysosomale} = \frac{(\text{Abs \acute{e}ssai} - \text{Abs t\acute{e}moin}) \times 100}{\text{Abs t\acute{e}moin}}$$

Abs= Absorbance.

II.2.4.5- Evaluation de l'effet de l'extrait de *Pterocarpus mildbraedii* sur la production d'oxyde nitrique par des macrophages

➤ Principe

Ce test repose sur la réaction de diazotation de Griess décrite en 1879. Le sulfanilamide et naphthyl éthylène diamine dihydrochloride (NED) compétissent pour le Nitrate dans la réaction acide. Au cours de la phagocytose, le monoxyde d'azote formé se complexe avec le réactif de Griess pour former un composé de coloration jaune qui absorbe à 550 nm (Sun *et al.*, 2003).

➤ Mode opératoire

Les surnageants obtenus précédemment ont été utilisés. 100 µL de surnageant ont été mélangés avec 100 µL du réactif de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl éthylène diamine dihydrochloride dans 2,5% v/v d'acide phosphorique). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min et l'absorbance a été mesurée à 550 nm. La quantité de nitrite a été mesurée par rapport à la courbe standard de nitrate de sodium quantifié. Le pourcentage d'inhibition de la production de l'oxyde nitrique a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs t\acute{e}moin} - \text{Abs \acute{e}ssai}}{\text{Abs t\acute{e}moin}} \times 100$$

Abs= Absorbance.

II.2.5- Analyse UHPLC-MS de *Pterocarpus mildbraedii*

Les spectres de masse à haute résolution (HRMS/MS) ont été acquis à l'aide d'un spectromètre Bruker QTOF équipé d'une source HESI, fonctionnant en mode négatif avec une gamme de masse de 100-1500pu et un taux de balayage de 1,00 Hz. Pour garantir des mesures de masse de haute précision avec un écart de 0,40 ppm. Le formiate de Sodium a été utilisé comme agent d'étalonnage avec un contrôle automatique du gain. Les paramètres expérimentaux comprenaient une tension de pulvérisation de 3,5 kV, une température capillaire de 200 °C et un gaz de gaine d'azote à un débit de 10 L/min. Le spectromètre a été connecté à un système UHPLC Thermo Fisher Ultimate 3000, composé d'une pompe LC, d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) avec une plage de détection de 190-600 nm, d'un échantillonneur automatique avec un volume d'injection de 5 µL et d'un four à colonne réglé à 35 °C. Les séparations ont été réalisées

à l'aide d'une colonne Synergi MAX-RP 100A (50x2mm, 2,5 μ de taille de particules) avec un gradient de H₂O (+0,1 % HCOOH) (A) et Acetonitrile (+0,1 % HCOOH) (B) à un débit de 500 μ L/min. Les échantillons ont été analysés en utilisant un programme de gradient dans lequel la composition a été maintenue à 95 % A pendant 1,5 minute, suivie d'un gradient linéaire jusqu'à 100 % B pendant 6 minutes. Après 6 minutes, le système a été maintenu à 100 % B pendant 2 minutes avant de revenir à la condition initiale (90 % A) en 1 minute et a été équilibré pendant 1 minute. L'identification des composés a été effectuée sur la base des composés précédemment identifiés dans le genre *Pterocarpus*.

II.2.6- Réalisation de l'amarrage moléculaire *in silico* de quelques composés contenus dans l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii*

Les composés comme la khrinone E (PubChem ID : 654651), le pterocarptriol (PubChem ID : 14805261), pteromarsupone (PubChem ID : 15406749), liquiritigénine (PubChem ID : 489599214) et l'acide caféique (PubChem ID : 689043) ont été acquis à partir de la base de données PubChem sous la forme de fichiers 3D SDF (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), qui ont ensuite été utilisés à des fins d'amarrage. Pour les enzymes, les codes PDB : 1QFC pour la phosphatase acide (PAC), PDB ID : 1RTG pour la "human matrix metalloproteinase 2" ont été sélectionnés dans la banque de données des protéines (PDB) du RCSB et télécharger au format de fichier PDB (<https://www.rcsb.org/>). Le logiciel utilisé pour l'amarrage était *Molegro virtual docker*. La méthode d'amarrage moléculaire a été utilisée pour prédire les interactions entre deux ou plusieurs molécules, la force du score d'amarrage et le type de liaison qui se produit. Le principe de l'amarrage est d'attacher un ligand au site actif de l'enzyme. Les résultats de l'amarrage ont été stockés au format PDB et les données relatives à l'affinité de la liaison ont été stockées dans Microsoft Excel. Les ligands utilisés dans ce processus d'amarrage moléculaire étaient tous des composés de *Pterocarpus mildbraedii*, identifiés à partir des résultats de tests phytochimiques utilisant la méthode LC-MS. L'affinité de liaison du ligand a été évaluée à l'aide de la fonction de notation et de la fonction de dock (Kcal/mol) crée par le logiciel "Molegro virtual docker". Le type de liaison 2D et 3D a été visualisé à l'aide du logiciel *Discovery Studio* v.2016. Cette visualisation a permis d'analyser le type de liaison et la distance entre les molécules qui interagissent.

II.2.7- Analyses statistiques

L'analyse statistique des valeurs obtenues a été réalisé à l'aide du logiciel *Graphpad Prism 8.0.1*. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (ESM). Les différentes valeurs ont été comparées à l'aide du test d'analyse des variances "one-way ANOVA", suivi du post-test de comparaison multiple de Tukey. Les différences étaient considérées comme significatives à partir de $p < 0,05$.



**CHAPITRE III:
RESULTATS ET
DISCUSSION**

III.1- Résultats

III.1.1- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'ostéoporose ménopausique

III.1.1.1- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur quelques paramètres anthropométriques

III.1.1.1.1- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la masse relative du fémur et du tibia

La figure 8 illustre les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la masse relative du fémur et du tibia chez les rates ovariectomisées. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné chez les rates une diminution significative ($p < 0,001$) de la masse relative osseuse de 33,02 % dans le fémur et de 33,22 % dans le tibia comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le fémur une augmentation significative ($p < 0,001$) de 11,81 % et de 8,45 % de la masse relative osseuse respectivement aux doses de 62,5 et de 250 mg/kg comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le tibia une augmentation significative ($p < 0,001$) de 28,04 %, de 30,46 % et de 38,33 % de la masse relative osseuse respectivement aux doses de 62,5, 125 et de 250 mg/kg comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

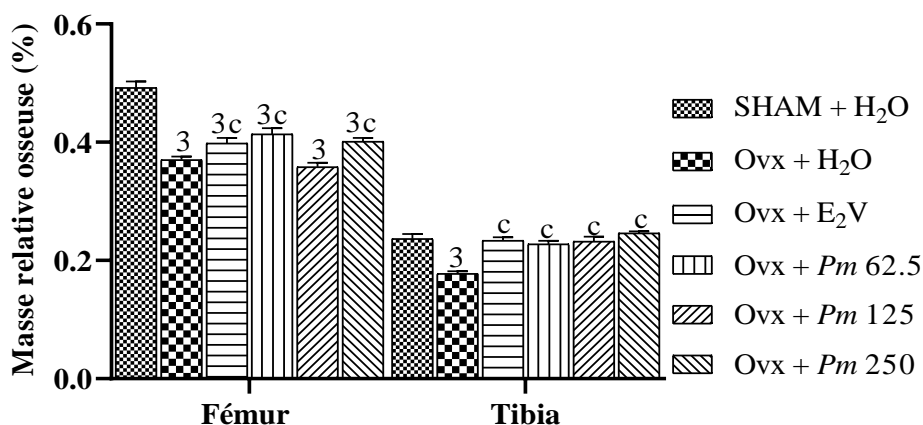


Figure 8 : Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la masse relative osseuse chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; $^1p < 0,05$; $^2p < 0,01$; $^3p < 0,001$, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; $^ap < 0,05$; $^bp < 0,01$; $^cp < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg , **Ovx + Pm 62,5**, **Ovx + Pm 125** et **Ovx + Pm 250** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, 125 et 250 mg/kg.

III.1.1.1.2- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la densité minérale osseuse du fémur et du tibia

Le tableau X présente les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la densité minérale osseuse du fémur et du tibia droit et gauche chez les rates ovariectomisées. Il ressort de ce tableau que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné chez les rates une diminution significative ($p < 0,05$) de 71,42 %, de 8,33 % et de 22,22 % de la densité minérale osseuse respectivement du fémur droit, tibia droit et du fémur gauche comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le fémur droit une augmentation significative de la densité minérale osseuse de 85,71 %, de 46,15 % et de 36,36 % respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$), de 125 mg/kg ($p < 0,001$) et de 250 mg/kg ($p < 0,01$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le tibia droit une augmentation significative de la densité minérale osseuse de 25 %, de 7,6 % et de 14,28 % respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$), de 125 mg/kg ($p < 0,01$) et de 250 mg/kg ($p < 0,001$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le fémur gauche une augmentation significative de la densité minérale osseuse de 43,75 %, de 30,76 % et de 18,18 % respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$), de 125 mg/kg ($p < 0,001$) et de 250 mg/kg ($p < 0,05$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le tibia gauche une augmentation significative ($p < 0,01$) de la densité minérale osseuse de 13,33 %, à la dose de 62,5 mg/kg comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

Tableau VII: Effets du traitement de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la densité minérale osseuse du fémur et du tibia des rates ovariectomisées

Paramètres Groupes	Densité minérale osseuse (kg/mm ³)			
	Fémur droit	Tibia droit	Fémur gauche	Tibia gauche
SHAM + H ₂ O	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,00
Ovx + H ₂ O	0,07 ± 0,00 ¹	0,12 ± 0,00 ¹	0,09 ± 0,00 ¹	0,13 ± 0,00
Ovx + E ₂ V	0,15 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,00 ^{2c}	0,13 ± 0,00
Ovx + Pm 62,5	0,49 ± 0,32 ^{2c}	0,16 ± 0,00 ^{3c}	0,16 ± 0,00 ^{3c}	0,15 ± 0,00 ^b
Ovx + Pm 125	0,13 ± 0,00 ^c	0,13 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^c	0,14 ± 0,00
Ovx + Pm 250	0,11 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,00 ^c	0,11 ± 0,00 ^a	0,12 ± 0,00 ³

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; ^cp < 0,01, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; SHAM + H₂O = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; Ovx + H₂O = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), Ovx + E₂V = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg , Ovx + Pm 62,5, Ovx + Pm 125 et Ovx + Pm 250 = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, 125 et 250 mg/kg.

III.1.1.2- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur quelques éléments figurés du sang

Le tableau XI illustre les effets de l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* sur quelques éléments figurés du sang chez les rates ovariectomisées. Il ressort de ce tableau que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné une augmentation significative ($p < 0,01$) du nombre de globules blancs, une diminution significative ($p < 0,05$) de 7,48 % de l'hématocrite, une diminution significative ($p < 0,001$) de 13,12 % du taux du volume corpusculaire moyen (VCM) et une diminution significative ($p < 0,01$) de 9,46 % du taux de moyenne corpusculaire en hémoglobine (MCH) comparativement aux animaux *Sham-operated*. *P. mildbraedii* a entraîné une diminution significative du nombre de globules blancs de 93,32 %, de 86,72 % et de 72,55 % respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,01$), de 125 mg/kg ($p < 0,01$) et de 250 mg/kg ($p < 0,05$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative du nombre de globules rouges de 16,51 % et de 17,97 % aux doses respectives de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$) et de 125 mg/kg ($p < 0,001$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative de l'hémoglobine de 19,78% et de 16 % respectivement, aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$) et de 125 mg/kg ($p < 0,01$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative de 18,76 % et de 16,42 % du taux d'hématocrite respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$) et de 125 mg/kg ($p < 0,001$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. En ce qui concerne le volume globulaire moyen, l'extrait de *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) de 6,87 % à la dose de 125 mg/kg comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

Tableau VIII: Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur quelques éléments figurés du sang chez les rates ovariectomisées

Groupes	SHAM + H ₂ O	Ovx + H ₂ O	Ovx + E ₂ V	Ovx + Pm 62,5	Ovx +Pm 125	Ovx + Pm 250
Paramètres						
GB (10³/μL)	4,44 ± 0,44	9,18 ± 1,23 ²	7,33 ± 0,57	4,75 ± 0,24 ^b	4,92 ± 0,44 ^b	5,32 ± 0,93 ^a
GR (10⁶/μL)	7,13 ± 0,03	7,51 ± 0,10	8,48 ± 0,09 ^{3c}	8,75 ± 0,08 ^{3c}	8,86 ± 0,05 ^{3c}	7,83 ± 0,28 ¹
Hgb (g/dL)	12,63 ± 0,31	12,13 ± 0,23	13,83 ± 0,22 ^a	14,53 ± 0,25 ^{2c}	14,07 ± 0,21 ^{1b}	13,23 ± 0,53
HCT (%)	50,23 ± 1,38	46,73 ± 0,47 ¹	54,47 ± 0,97 ^{2c}	55,50 ± 0,52 ^c	51,60 ± 0,72 ^a	50,50 ± 1,09
MCV (fL)	70,40 ± 1,66	62,23 ± 0,44 ³	64,17 ± 0,09 ³	63,43 ± 0,09 ³	58,23 ± 0,71 ^{3a}	61,07 ± 1,09 ³
MCH (pg)	17,70 ± 0,37	16,17 ± 0,31 ²	16,30 ± 0,10 ²	16,60 ± 0,16 ¹	15,90 ± 0,15 ³	16,73 ± 0,26
MCHC (g/dL)	25,17 ± 0,06	25,93 ± 0,33	25,40 ± 0,05	26,17 ± 0,22 ¹	27,27 ± 0,21 ^{3b}	27,27 ± 0,30 ^{3b}
PLT (10³/μL)	833,30 ± 14,16	791,00 ± 17,47	935,30 ± 29,02	889,30 ± 28,57	838,70 ± 75,70	795,00 ± 49,38

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,001 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg , **Ovx + Pm 62,5**, **Ovx + Pm 125** et **Ovx + Pm 250** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respective de 62,5, 125 et 250 mg/kg.

GB = Globules blancs ; **GR** = Globules rouges ; **Hgb** = Hémoglobine ; **HCT** = hématocrite ; **MO** = Monocytes ; **VCM** = Volume Globulaire Moyen ; **PLT**= Plaquette.

III.1.1.3- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la concentration de quelques marqueurs biochimiques du métabolisme osseux

III.1.1.3.1- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la concentration en calcium osseux, sérique et urinaire

Le tableau XII illustre les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur le taux de calcium dans le sérum, l'urine, le fémur et le tibia chez les rates ovariectomisées. Il en ressort que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné chez les rates une diminution significative ($p < 0,001$) du taux de calcium dans le sérum, le fémur et le tibia ainsi qu'une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de calcium dans les l'urines comparativement au animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans l'urine une diminution significative de la concentration en calcium aux doses respectives de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$), de 125 mg/kg ($p < 0,001$) et de 250 mg/kg ($p < 0,001$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le sérum, le fémur et le tibia une augmentation significative de la concentration en calcium respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$), de 125 mg/kg ($p < 0,001$) et de 250 mg/kg ($p < 0,001$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

Tableau IX: Effets du traitement à l'extrait aqueux l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la concentration osseuse, sérique et urinaire en calcium chez les rates ovariectomisées

Paramètres Groupes	Concentration en calcium			
	Urine (mg/dL)	Sérum (mg/dL)	Fémur (mg/dL)	Tibia (mg/dL)
SHAM + H ₂ O	48,58 ± 0,81	165,20 ± 7,01	180,40 ± 3,18	152,30 ± 1,98
Ovx + H ₂ O	127,70 ± 0,79 ³	42,64 ± 0,80 ³	34,91 ± 0,76 ³	20,15 ± 0,70 ³
Ovx + E ₂ V	38,64 ± 0,94 ^{3c}	149,60 ± 2,14 ^c	201,40 ± 1,84 ^{3c}	166,00 ± 3,71 ^{3c}
Ovx + Pm 6,5	68,20 ± 0,67 ^{3c}	65,26 ± 4,49 ^{3c}	107,70 ± 0,34 ^{3c}	62,78 ± 1,45 ^{3c}
Ovx + Pm 125	23,12 ± 0,38 ^{3c}	125,70 ± 2,45 ^{3c}	179,50 ± 2,30 ^c	176,50 ± 1,78 ^{3c}
Ovx + Pm 250	19,12 ± 0,74 ^{3c}	155,60 ± 2,70 ^c	112,30 ± 2,51 ^{3c}	118,70 ± 0,98 ^{3c}

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées recevant de l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + Pm 62,5**, **Ovx + Pm 125** et **Ovx + Pm 250** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, de 125 et de 250 mg/kg.

III.1.1.3.2- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'activité de la phosphatase alcaline osseux et sérique

La figure 9 illustre les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'activité de phosphatase alcaline (PAL) du fémur, du tibia (Figure 11 A) et du sérum (Figure 11 B) chez les rates ovariectomisées. Il en ressort de cette figure que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné chez les rates une

diminution significative ($p < 0,001$) de l'activité de la PAL dans le fémur, le tibia et le sérum comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'activité de la PAL dans le fémur et le tibia comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée (Figure 11 A). L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) de 10,36 % et de 27,15 % de l'activité de la PAL dans sérum (Figure 11 B) respectivement aux doses de 62,5 mg/kg et de 125 mg/kg comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée (Figure 11 B).

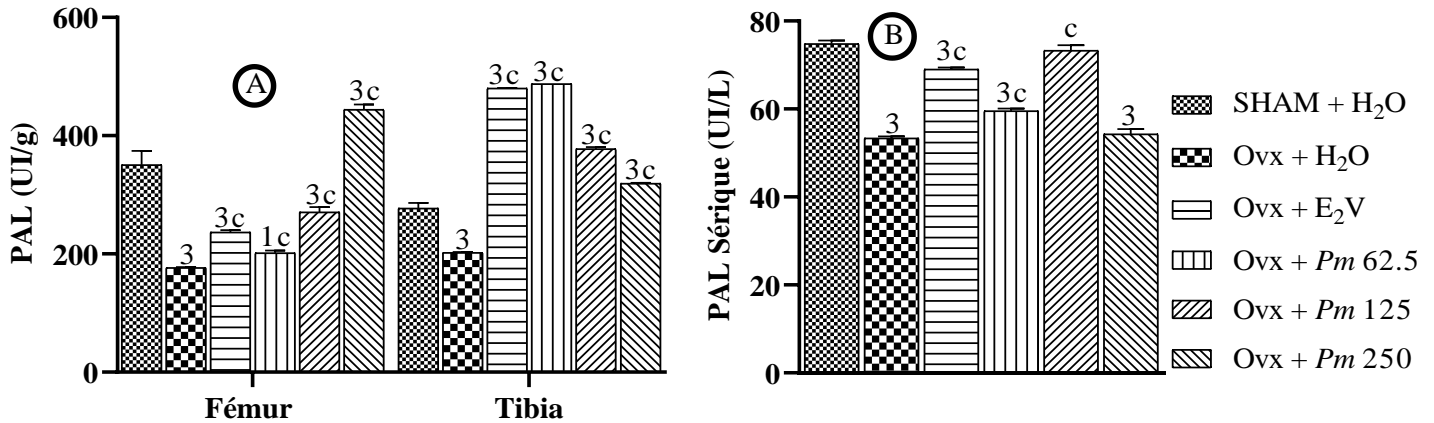


Figure 9 : Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'activité de la phosphatase alcaline chez les rates ovariectomisées dans le tissu osseux (A) et le sérum (B).

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + Pm 62,5**, **Ovx + Pm 125** et **Ovx + Pm 250** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, 125 et 250 mg/kg.

III.1.1.3.3- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur le taux de protéines osseux des rates ovariectomisées

La figure 10 révèle les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur le taux de protéine dans le fémur et le tibia chez les rates ovariectomisées. Il ressort de cette figure que l'ovariectomie après 112 jours a entraîné une diminution ($p > 0,05$) de 6,90 % et de 18,40 % du taux de protéine respectivement dans le fémur et le tibia comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux de protéine de 34,91% dans le fémur à la dose de 125 mg/kg comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. L'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative du taux de protéine de 23,88 % et de 46,4 % dans tibia respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,01$) et de 250 mg/kg ($p < 0,001$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

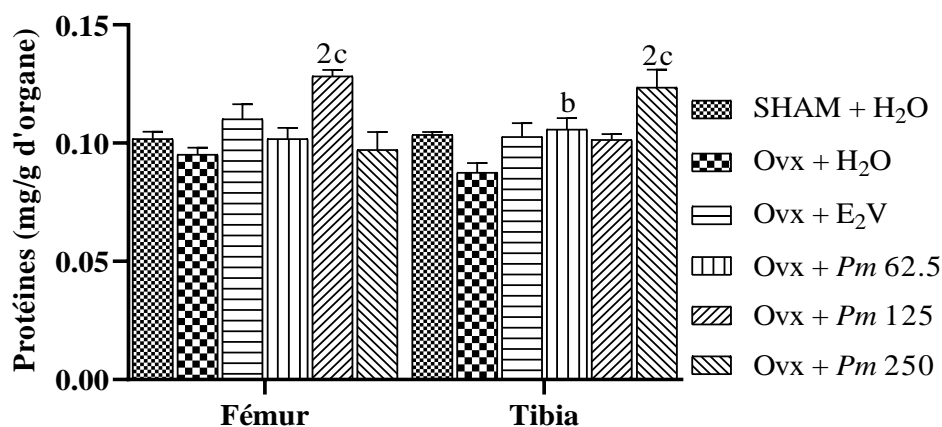


Figure 10: Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur le taux de protéines osseux chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; $n = 5$; ¹ $p < 0,05$; ² $p < 0,01$; ³ $p < 0,001$, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + Pm 62,5**, **Ovx + Pm 125** et **Ovx + Pm 250** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, 125 et 250 mg/kg.

III.1.1.3.4- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la concentration en créatinine et l'index d'ostéolyse chez les rates ovariectomisées

La figure 11 illustre les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la concentration en créatine (Figure 13 A) et l'index d'ostéolyse (Figure 13 B) chez les rates ovariectomisées. Il en ressort de cette figure que l'ovariectomie a entraîné chez les rates une diminution significative ($p < 0,001$) de 18,68 % du taux de créatinine et une augmentation significative ($p < 0,001$) de 67 % de l'index d'ostéolyse comparativement aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné une augmentation significative du taux de créatinine de 13,43 % et de 3 % respectivement aux doses de 62,5 mg/kg ($p < 0,001$) et de 250 mg/kg ($p < 0,05$) comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné une diminution significative ($p < 0,001$) de l'index d'ostéolyse respectivement aux doses de 62,5, 125 et de 250 mg/kg comparativement aux animaux Ovx recevant de l'eau distillée.

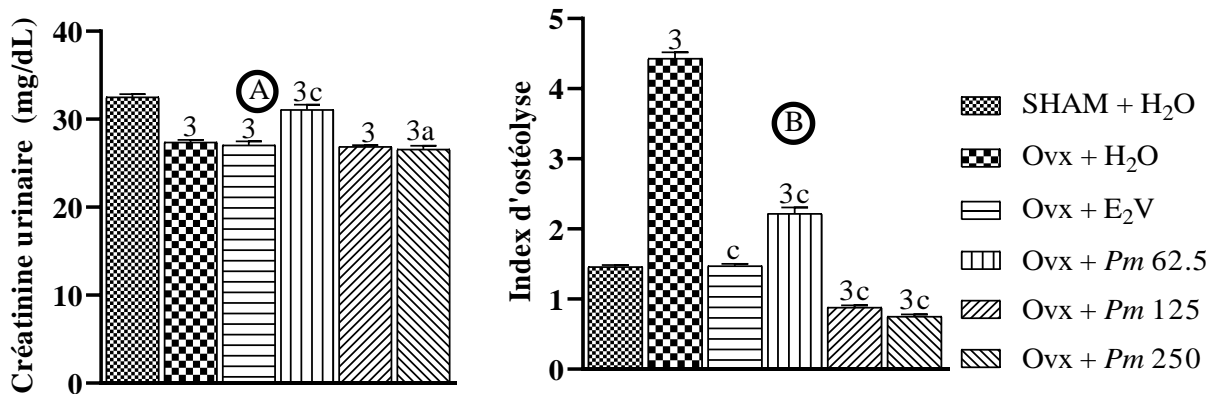


Figure 11 : Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la concentration de la créatinine dans l'urine (A) et l'index d'ostéolyse (B) chez les rates ovariectomisées.

Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg, **Ovx + Pm 62,5**, **Ovx + Pm 125** et **Ovx + Pm 250** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, 125 et 250 mg/kg.

III.1.1.4- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur quelques paramètres du statut oxydant osseux chez les rates ovariectomisées

La figure 12 illustre les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur quelques paramètres du statut oxydant dans le fémur et le tibia chez les rates ovariectomisées. Il en ressort que l'ovariectomie a entraîné dans le fémur une diminution significative (p < 0,001) de l'activité de la catalase (CAT) de 76,15 %, de la superoxyde dismutase (SOD) (p < 0,001), du taux de glutathion réduit (GSH) (p < 0,001) et augmenté significativement (p < 0,001) le taux de malondialdéhyde (MDA) de 31,32 % en comparaison aux animaux *Sham-operated*. L'ovariectomie a également entraîné également dans le tibia une diminution significative (p < 0,001) de l'activité de la catalase, de la superoxyde dismutase (SOD), du taux de glutathion réduit (p < 0,001), du taux de nitrites (p < 0,001) et une augmentation significative (p < 0,001) du taux de MDA en comparaison aux animaux *Sham-operated*. Le traitement à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a entraîné dans le fémur et le tibia une augmentation significative (p < 0,001) de l'activité de la catalase, de l'activité de la superoxyde dismutase, du taux de glutathion réduit, du taux de nitrites et une diminution significative (p < 0,001) du taux de MDA respectivement aux doses de 62,5, 125 et de 250 mg/kg comparativement aux témoins Ovx recevant de l'eau distillée.

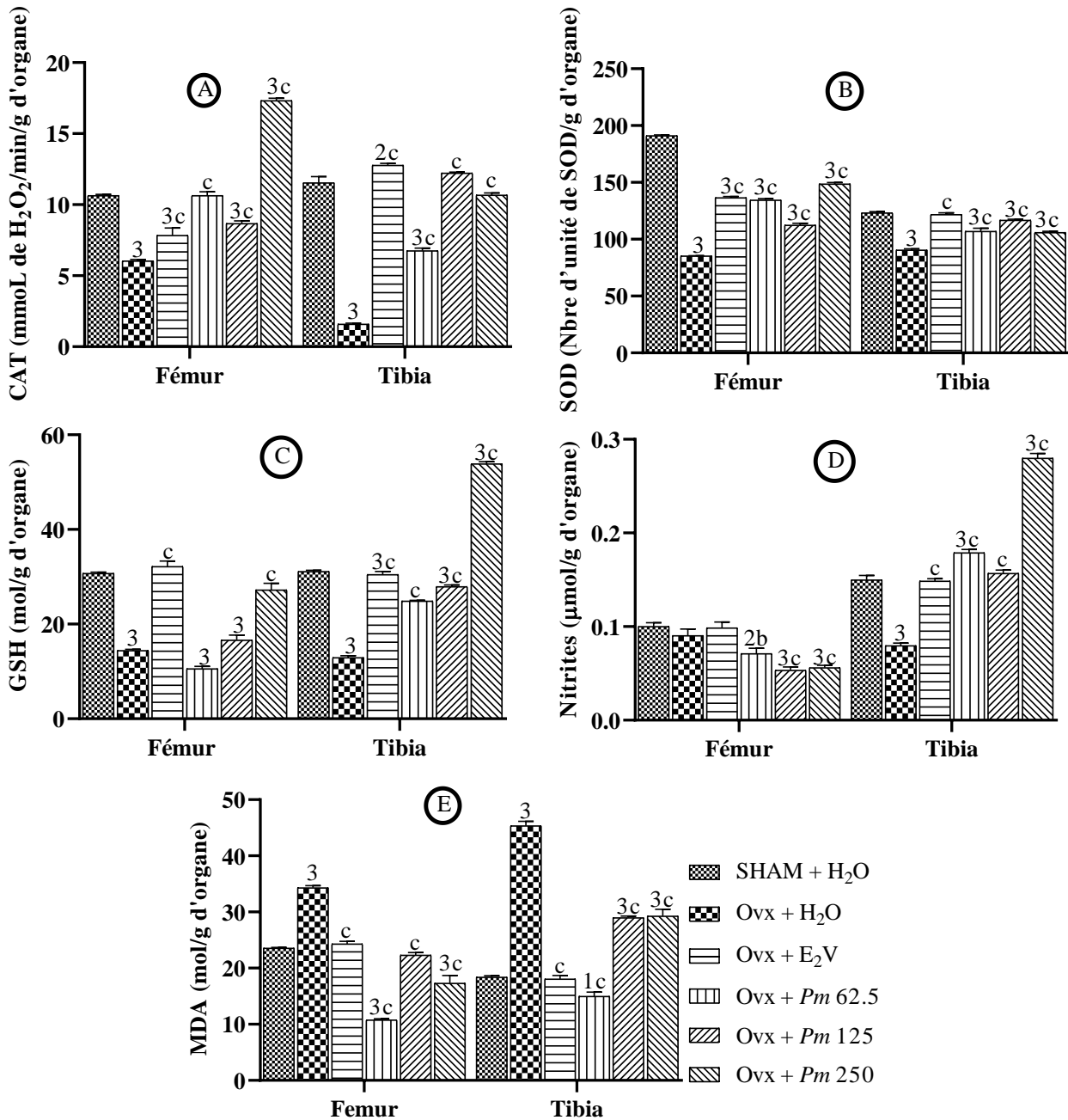
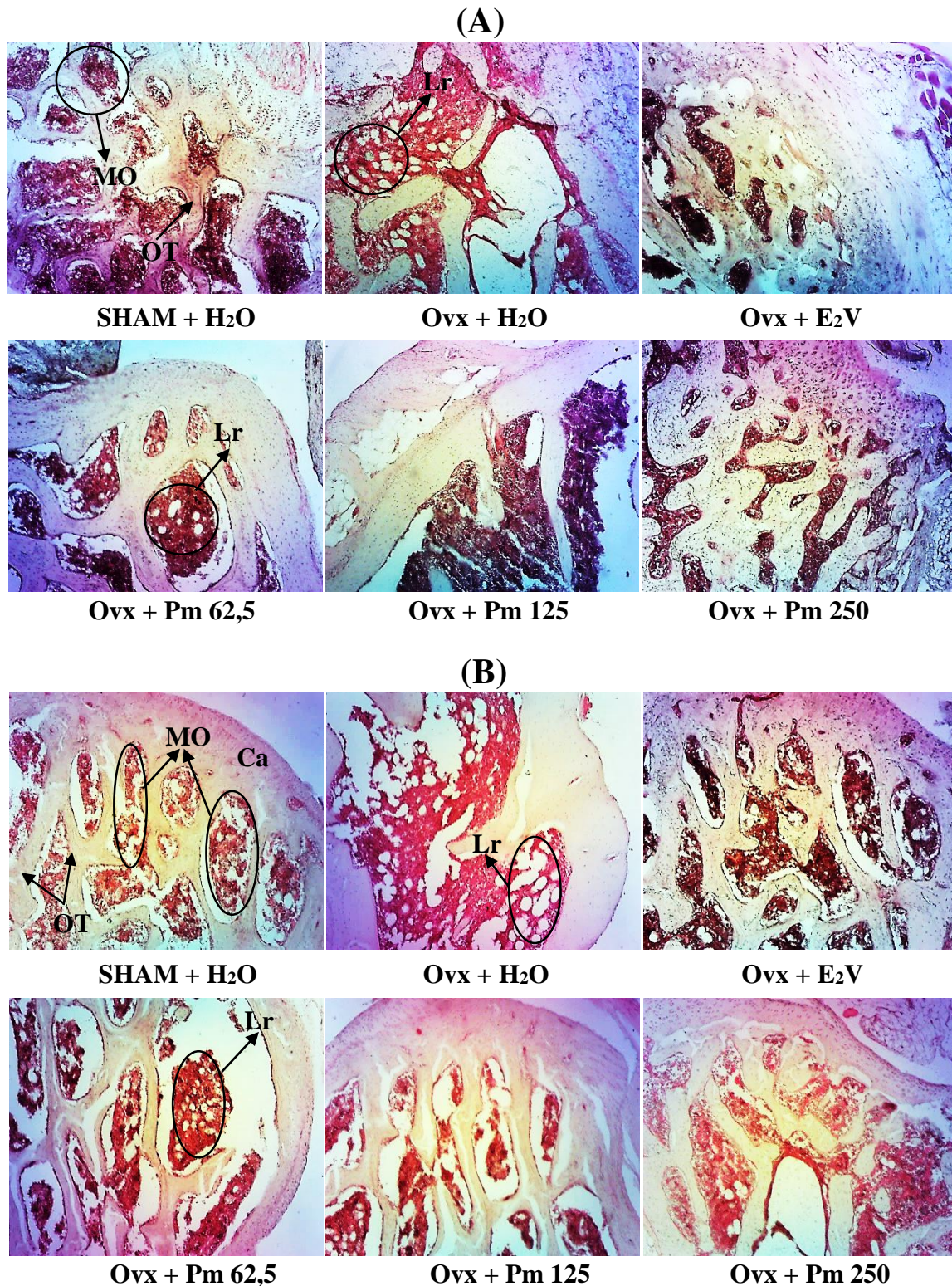


Figure 12 : Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur quelques paramètres du statut oxydant chez les rates ovariectomisées.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ESM ; n = 5 ; ¹p < 0,05 ; ²p < 0,01 ; ³p < 0,001, différence significative par rapport au Témoin *Sham-operated* ; ^ap < 0,05 ; ^bp < 0,01 ; ^cp < 0,001, différence significative par rapport aux rates ovariectomisées traitées à l'eau distillée ; **SHAM + H₂O** = Témoin *sham-operated* recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **Ovx + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **Ovx + E₂V** = Témoin positif recevant l'E₂V à la dose de 1 mg/kg , **Ovx + Pm 62,5**, **Ovx + Pm 125** et **Ovx + Pm 250** = Animaux traités à l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* aux doses respective de 62,5, 125 et 250 mg/kg. CAT (A) : catalase, SOD (B) : superoxyde dismutase, GSH (C) : glutathion réduit, MDA (E) : malondialdéhyde et Nitrites (D).

III.1.1.5- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la microarchitecture du fémur, de la vertèbre lombaire et du tibia chez les rates ovariectomisées

La figure 13 montre les effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la structure du fémur (A), du tibia (B) et de la 3^{ème} vertèbre lombaire (C) chez les animaux ovariectomisés. Cette figure laisse voir que l'ablation chirurgicale des ovaires a entraîné en comparaison aux animaux *sham-operated* une augmentation du nombre de lacunes de résorption au niveau du tibia, de la 3^{ème} vertèbre lombaire et du fémur. L'extrait aqueux a corrigé ces altérations comparativement aux animaux Ovx aux doses de 125 mg/kg et de 250 mg/kg.



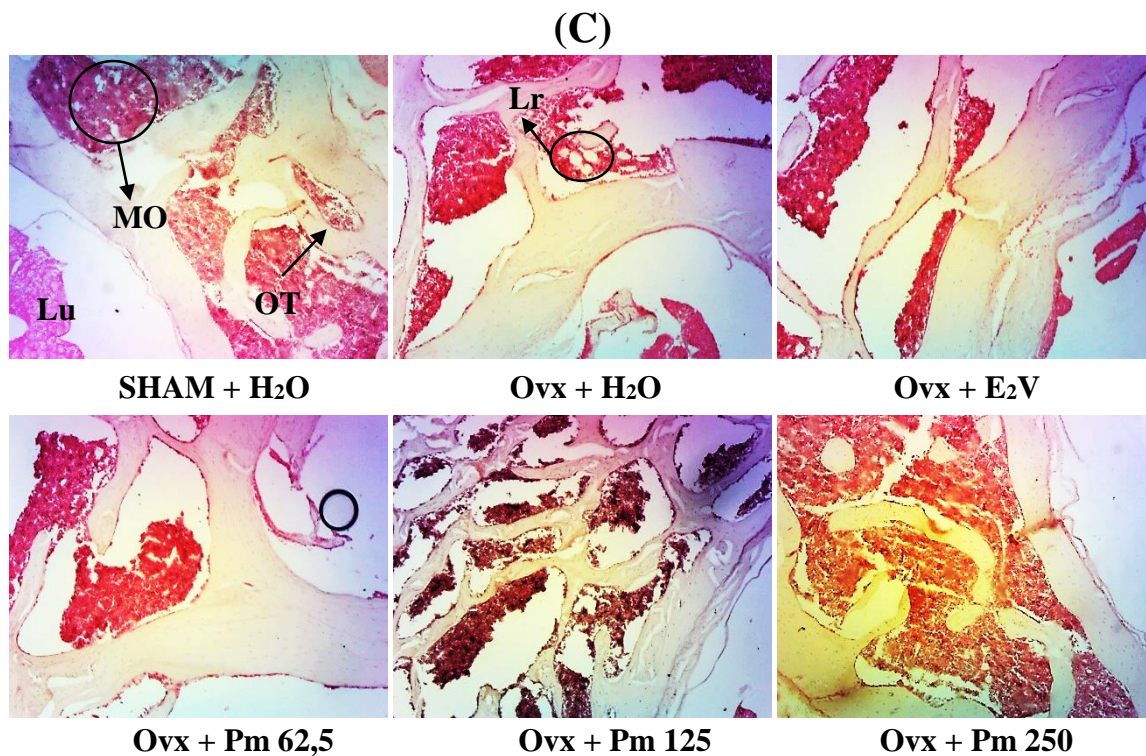


Figure 13 : Microphotographie présentant les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la structure du fémur (A), du tibia (B) et de la vertèbre lombaire 3 (C) chez les rates ovariectomisées (H-E, 100X).

LR = Lacune de résorption, **MO** = Moelle osseuse, **OT** = Os trabéculaire **Ca** = Cartilage. **SHAM + H₂O** = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; **OvX + H₂O** = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), **OvX + E₂V** = Témoin positif recevant le valérate d'œstradiol à la dose de 1 mg/kg, **OvX + Pm 62,5**, **OvX + Pm 125**, **OvX + Pm 250** = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, 125 et de 250 mg/kg.

III.1.1.6- Effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'expression du collagène dans le fémur et la vertèbre lombaire chez les rates ovariectomisées

La figure 14 montre les effets du traitement à l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la structure du fémur (A) et de la vertèbre lombaire (B) chez les rates ovariectomisées. Cette figure laisse voir en comparaison aux animaux *sham-operated* que l'ablation chirurgicale des ovaires a entraîné après 112 jours une diminution de la densité du collagène au niveau du fémur et de la vertèbre lombaire chez le témoin négatif (OvX+H₂O) se manifestant par la diminution de l'expression de la couleur bleu sur la photographie obtenu chez le témoin négatif (OvX+H₂O). L'extrait aqueux a corrigé ces altérations comparativement aux animaux OvX aux doses de 125 mg/kg et de 250 mg/kg se traduisant par l'augmentation de l'expression de la couleur bleu sur les photographies obtenues aux doses de 125 mg/kg et de 250 mg/kg.

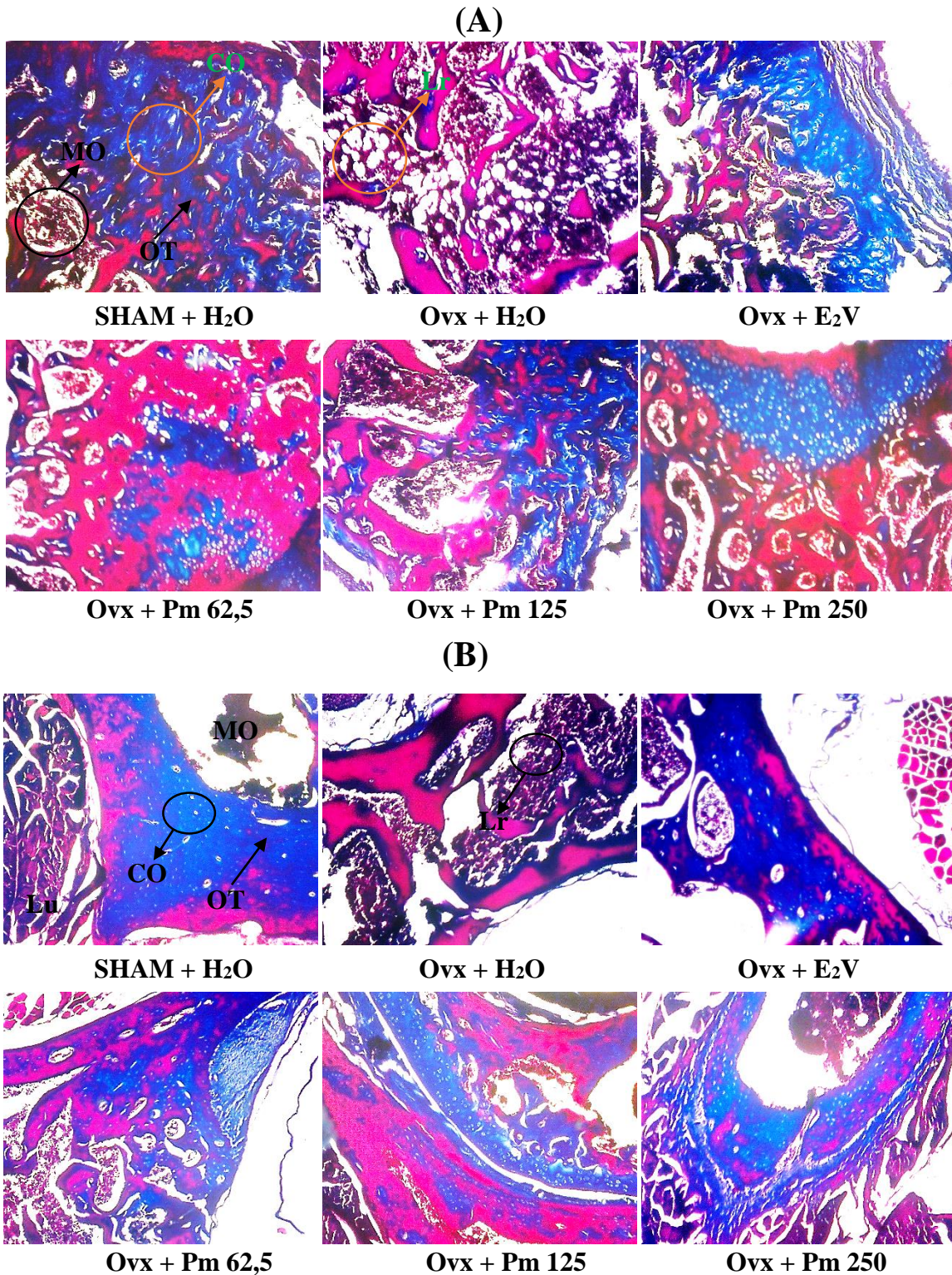


Figure 14 : Microphotographie montrant les effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur l'expression du collagène dans l'os trabéculaire du fémur (A) et de la vertèbre lombaire 3 (B) chez les rates ovariectomisées (Trichrome de Masson, 100X).

.LR = Lacune de résorption, MO = Moelle osseuse, OT = Os trabéculaire, VL- 3 =Vertèbre lombaire 3.

SHAM + H₂O = Témoin sham-operated recevant de l'eau distillée (10 mL/kg) ; Ovx + H₂O = Témoin négatif recevant de l'eau distillée (10 mL/kg), Ovx + E₂V = Témoin positif recevant le valérate d'œstradiol à la dose de 1 mg/kg, Ovx + Pn 62,5, Ovx + Pm 125, Ovx + Pm 250 = Rates ovariectomisées et recevant l'extrait aqueux du duramen de *P. mildbraedii* aux doses respectives de 62,5, 125 et de 250 mg/kg.

III.1.2- Effets anti-inflammatoires *in vitro* de l'extrait aqueux de *P. mildbraedii*

III.1.2.1- Effets de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur les activités de la phosphatase alcaline et de la 5-lipooxygénase

Les effets de l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* sur les activités de la phosphatase alcaline et de la 5-lipooxygénase sont résumés dans le tableau XIII. Ce tableau montre que *P. mildbraedii* a significativement augmenté l'activité de la phosphatase alcaline. Cette augmentation était concentration dépendante, allant de $87,72 \pm 12,46$ % à $532,33 \pm 32,89$ % pour des concentrations de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ et de 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Ces effets sont parallèles à ceux de la baïcaline, qui a augmenté cette activité de $150,39 \pm 10,14$ % à $769,26 \pm 28,23$ % pour des concentrations de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ et 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. *P. mildbraedii* a également montré une activité inhibitrice significative sur l'activité de la 5-lipooxygénase de manière dépendante de la concentration. Cette inhibition était maximale à 1000 $\mu\text{g/mL}$ et $78,67 \pm 5,45$ %, avec une CI_{50} de 69,29 $\mu\text{g/mL}$. La baïcaline a diminué cette activité de manière concentration dépendante, avec une inhibition maximale de $94,29 \pm 1,37$ % à 1000 $\mu\text{g/mL}$ et une CI_{50} de 22,85 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau X: Effet des extraits aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur les activités de la phosphatase alcaline et de la 5-lipooxygénase

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Activité de la PAL (%)		Inhibition de l'activité de la 5-lipooxygénase (%)	
	<i>P. mildbraedii</i>	Baïcaline	<i>P. mildbraedii</i>	Baïcaline
0,1	$87,72 \pm 12,46$	$150,39 \pm 10,14$	$23,67 \pm 4,94$	$23,75 \pm 1,58$
1	$135,25 \pm 7,65$	$177,51 \pm 7,23$	$34,47 \pm 8,56$	$40,88 \pm 1,21$
10	$201,56 \pm 21,91$	$199,62 \pm 9,25$	$55,24 \pm 6,82$	$52,30 \pm 3,96$
100	$322,49 \pm 43,88$	$229,56 \pm 15,21$	$63,83 \pm 3,57$	$85,15 \pm 1,23$
1000	$532,33 \pm 32,89$	$769,26 \pm 28,23$	$78,67 \pm 5,45$	$94,29 \pm 1,37$
IC₅₀ ($\mu\text{g/CmL}$)			69,74	22,85

Chaque valeur représente le pourcentage d'inhibition et est exprimé comme moyenne \pm SEM ; n=3.

III.1.2.2- Effets de *Pterocarpus mildbraedii* sur la production d'oxyde nitrique et la dénaturation de l'albumine

P. mildbraedii a montré (Tableau XIV) une activité inhibitrice significative sur la production de l'oxyde nitrique (NO) et la dénaturation de l'albumine de manière dépendante de la concentration. Cette inhibition a varié de $22,45 \pm 3,18$ % à $82,66 \pm 3,18$ % respectivement pour des concentrations de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ et 1000 $\mu\text{g/mL}$ avec une CI_{50} de 167,67 $\mu\text{g/mL}$ pour la production de NO, et de $20,44 \pm 1,22$ % à $69,55 \pm 0,79$ % respectivement pour des concentrations de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ et 1000 $\mu\text{g/mL}$ avec une CI_{50} de 67,71 $\mu\text{g/mL}$ pour la dénaturation de l'albumine. En parallèle, la baïcaline a inhibé de manière significative la production de NO

de manière concentration dépendante, avec un effet maximal de 97,43% à 1000 µg/mL et une CI₅₀ de 12,26 µg/mL, ainsi qu'une dénaturation de l'albumine, avec une inhibition maximale de 75,64 ± 0,70 % à 1000 µg/mL et une CI₅₀ de 25,74 µg/mL.

Tableau XI: Effet des extraits aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* sur la production de l'oxyde nitrique et la dénaturation de l'albumine

Concentration (µg/mL)	Inhibition de la production du NO (%)		Inhibition de la dénaturation de l'albumine (%)	
	<i>P. mildbraedii</i>	Baïcaline	<i>P. mildbraedii</i>	Baïcaline
0,1	22,45 ± 1,18	30,56 ± 2.12	20,44 ± 1,22	22,22 ± 0,92
1	35,80 ± 3,20	40,67 ± 2.67	32,77 ± 0,84	34,46 ± 0,60
10	49,25 ± 2,34	55,34 ± 6.75	49,11 ± 1,76	46,78 ± 1,18
100	68,33 ± 1,49	73,56 ± 3.09	60,67 ± 1,29	58,47 ± 1,44
1000	82,66 ± 3,18	93,48 ± 4.33	69,55 ± 0,79	75,64 ± 0,70
IC₅₀ (µg/mL)	67,67	38,29	67,71	25,74

Chaque valeur représente le pourcentage d'inhibition et est exprimé comme moyenne ± SEM ; n=3.

III.1.3- Identification des composés de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* par analyse UHPLC-MS

La spectrométrie de masse des ions et un chromatogramme de pic de base représentatif sont présentés sur la figure 15 et dans le tableau XV. L'HPLC-MS a permis d'identifier sept composés dont la liquiritigénine, l'acide caféïque, le pteromarsupone, la pteroyanine I, la khrinone E, le mono (2-ethylhexyl) phthalate et le pterocarptriol.

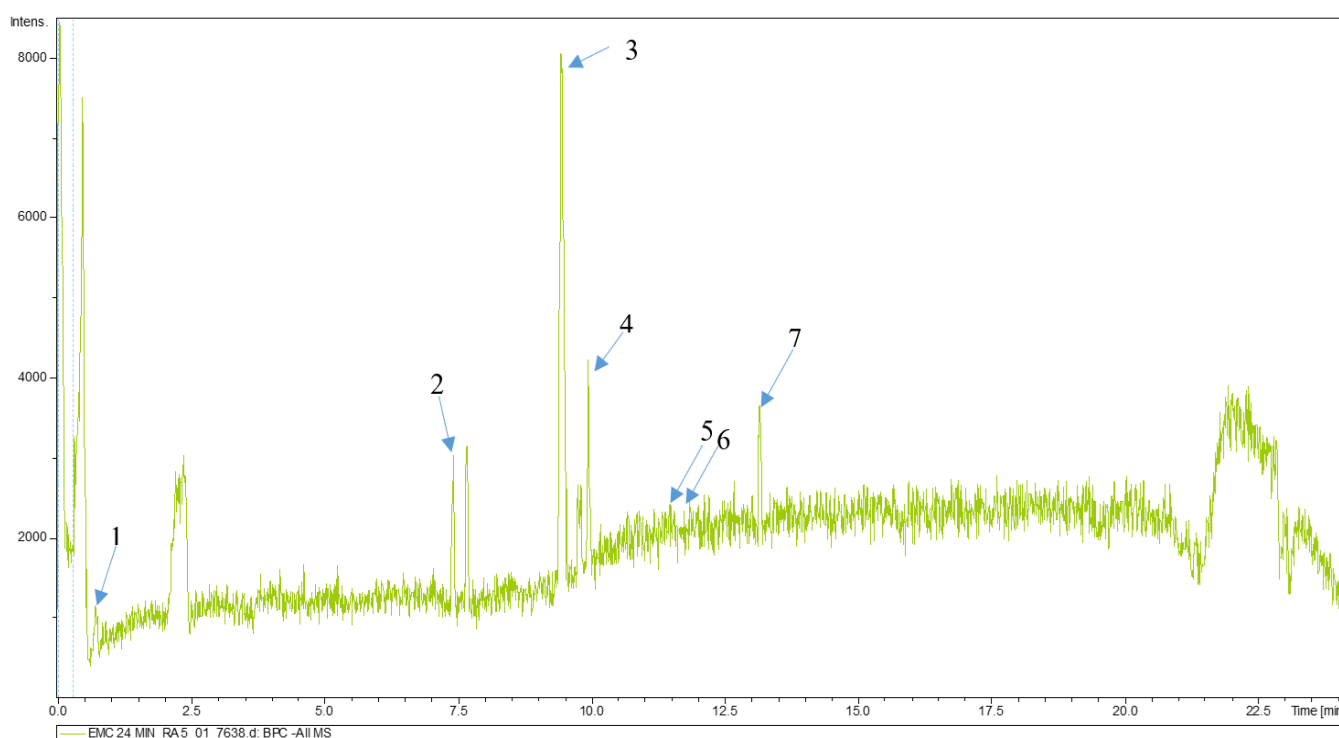
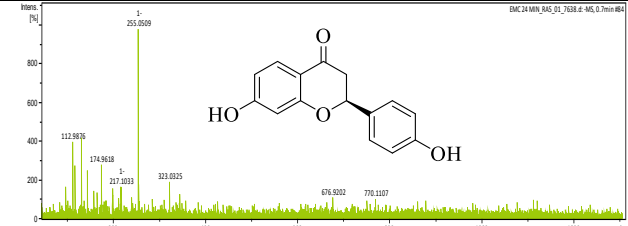
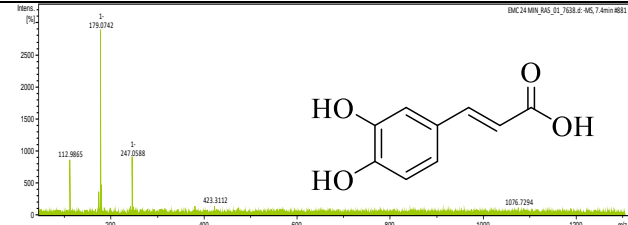
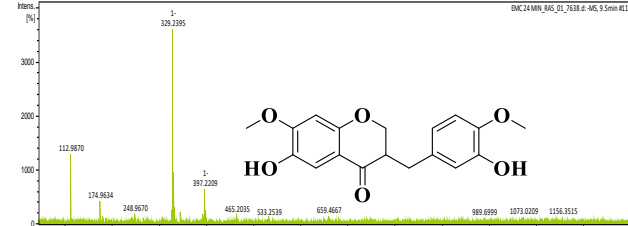
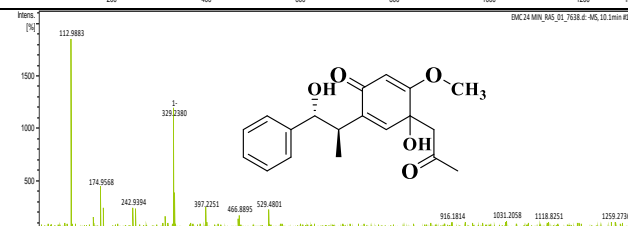
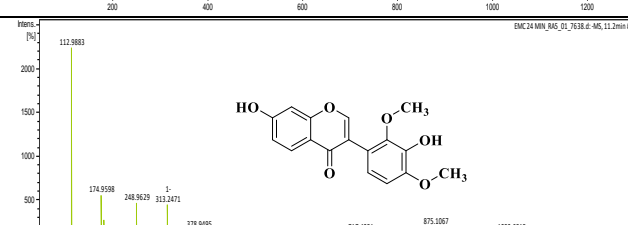
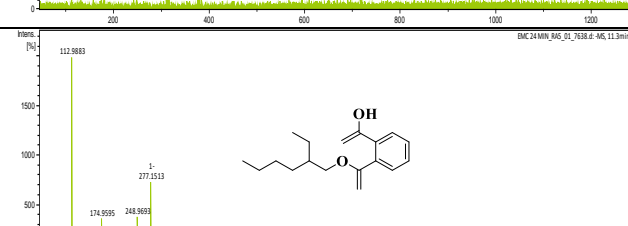
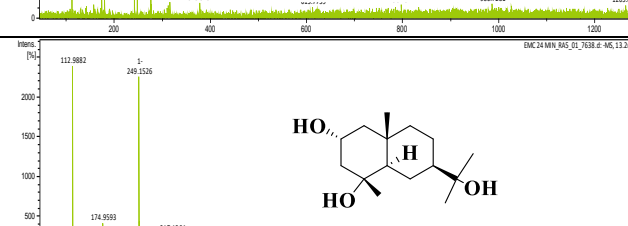


Figure 15 : Chromatogramme LC-MS et temps de rétention de l'extrait aqueux de *Pterocarpus milbraedii*.

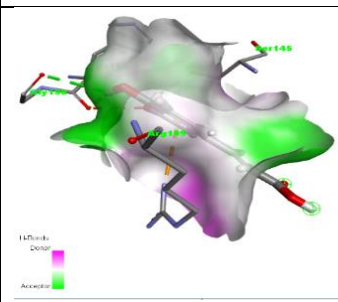
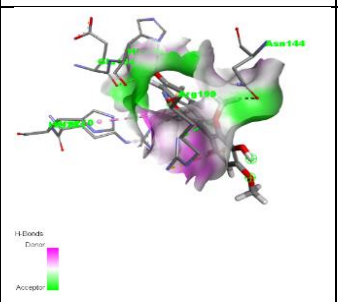
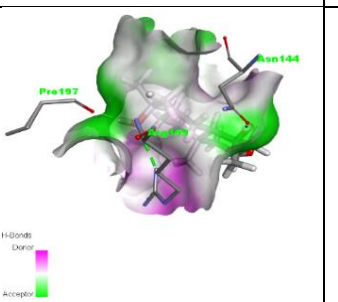
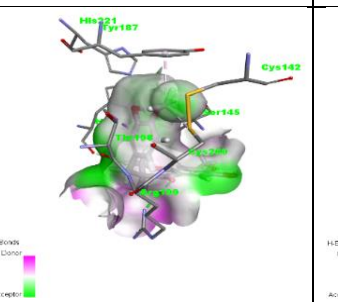
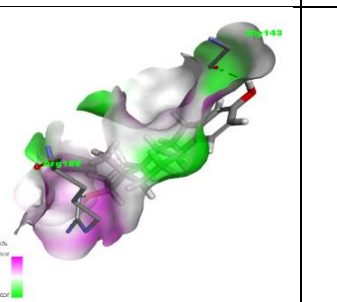
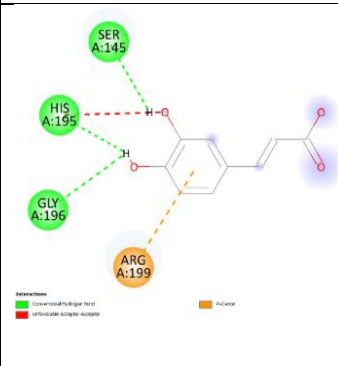
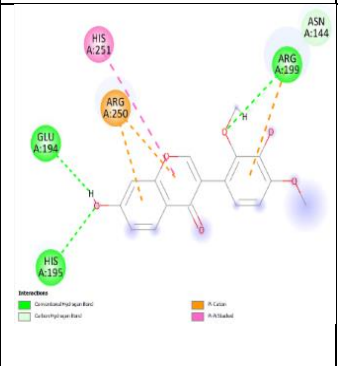
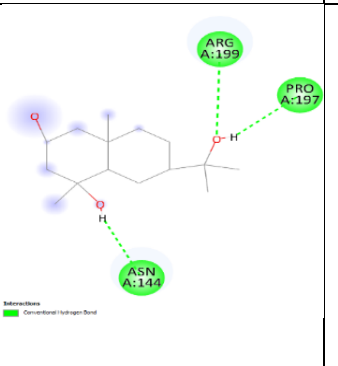
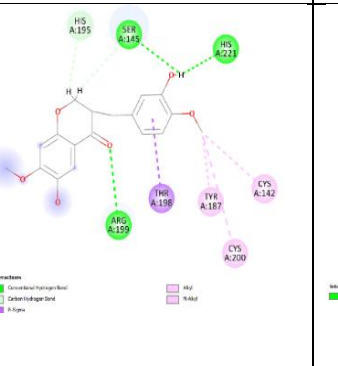
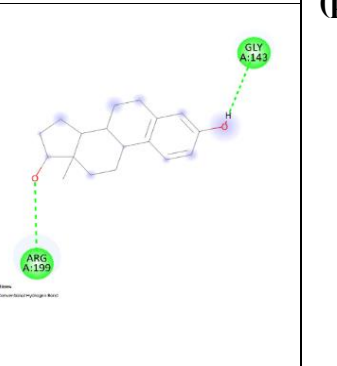
Tableau XII: Composés identifiés de l'extrait aqueux de *Pterocarpus milbraedii* et leurs masses spectrales

Composés (m/z)	Molécule ionique ou adduit ionique	Masses Spectrales
1- Liquiritigenine (m/z= 25,.07)	[M-H]	
2- acide caféique (m/z= 180,04)	[M-H]	
3-Pteromarsupone (m/z= 330,11)	[M-H]	
4- Pteroyanine I (m/z= 330,14)	[M-H]	
5- Khrinone E (m/z= 314,07)	[M-H]	
5- Mono (2-ethylhexyl) phthalate (m/z= 278,19)	[M-H]	
7- Pterocarptriol (m/z= 250,15)	[M-H]	

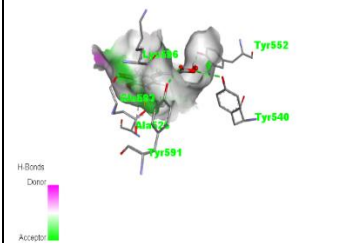
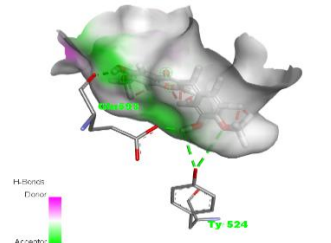
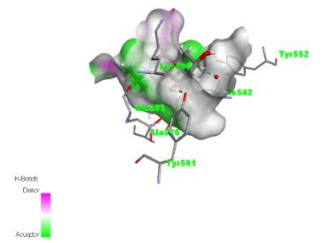
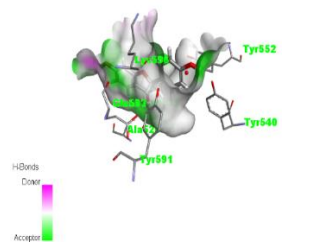
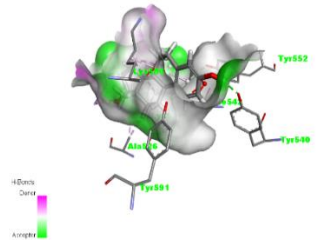
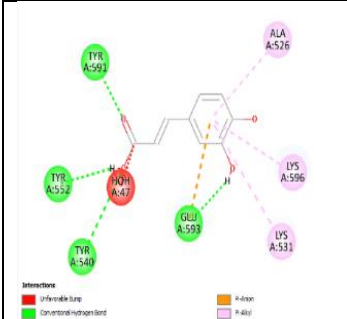
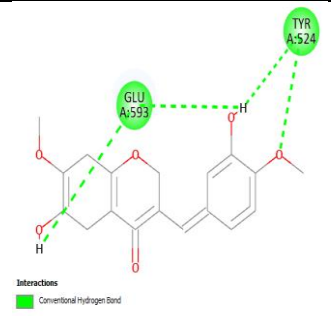
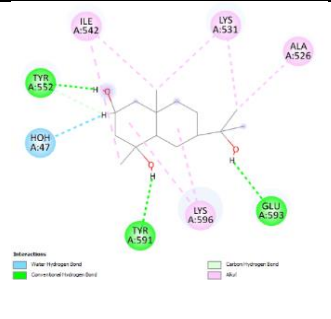
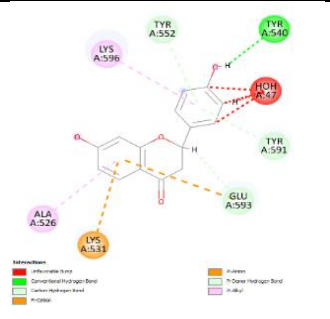
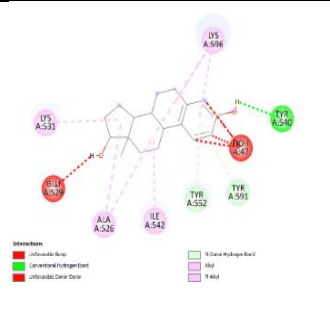
III.1.4- Amarrage moléculaire

Le tableau XVI illustre la nature des interactions entre l'acide caféique, la pteromarsurpone, le pterocarpritol, la liquiritigénine et l'œstradiol avec la phosphatase acide (PAC) et la *Human Matrix Métalloprotéinase 2* (HMP2) deux molécules fortement impliquées respectivement dans le processus de déminéralisation et résorption matricielle du tissu osseux, ainsi que les énergies de liaisons issues de leurs interactions. L'acide caféique se lie à la phosphatase acide par des résidus acides aminés Gly196, His195, Ser145 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -78,2 kcal/mol. La pteromarsurpone se lie à la phosphatase acide par des résidus acides aminés His195, Glu194, Arg199 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -63,1 kcal/mol. Le pterocarpritol se lie à la phosphatase acide par des résidus acides aminés Arg199, Asn144, Pro197 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -59,1 kcal/mol. La liquiritigénine se lie à la phosphatase acide par des résidus acides aminés Ser145, His221, Arg199 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -54,3 kcal/mol. L'œstradiol se lie se lie à la phosphatase acide par des résidus acides aminés Arg199, Gly143 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -65,8 kcal/mol. L'acide caféique se lie à la HMP2 par des résidus acides aminés Tyr540, Tyr552, Tyr591 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -64,3 kcal/mol. la pteromarsurpone se lie lie à la HMP2 par des résidus acides aminés Glu193, Tyr524 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -70,1 kcal/mol. Le pterocarpritol se lie à la HMP2 par des résidus acides aminés Tyr552, Tyr591, Glu593 avec des liaisons hydrogènes et une énergie de liaison de -56,7 kcal/mol. La liquiritigénine et l'œstradiol se lie à la HMP2 par des résidus acides aminés Tyr540 avec des liaisons hydrogènes et des énergies de respectives de -66,4 kcal/mol et de -54,2 kcal/mol.

Tableau XIII: Interactions 2D et 3D par liaison hydrogène des composés de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* avec les enzymes PAC et HMP

Interactions 2D et 3D par liaison hydrogène des composés de <i>P. mildbraedii</i> avec PAC					
Acide caféique	Pteromarsurpone	Pterocarptriol	Liquiritigénine	Oestradiol	Protéines cibles
					PAC (phosphatase acide)
					
<ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Acceptor-Acceptor Pi-Cation 	<ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond Pi-Cation Carbon Hydrogen Bond Pi-Pi Stacked 	<ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond 	<ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	<ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond 	Types de liaisons
-78.2	-63.1	-59.1	-54.3	-65.8	Energie de liaison ΔG (kcal/mol)

Interactions 2D et 3D par liaison hydrogène des composés de *P. mildbraedii* avec HMP2

Acide caféique	Pteromarsurpone	Pterocarptriol	Liquiritigénine	Oestradiol	Protéines cibles	
					<p>HMP2 (Human Matrix Métallo protéinase 2)</p>	
						
<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Unfavorable Bump ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Pi-Anion ■ Pi-Alkyl 	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Conventional Hydrogen Bond 	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Water Hydrogen Bond ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Alkyl 	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Unfavorable Bump ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Pi-Cation ■ Pi-Anion ■ Pi-Donor Hydrogen Bond ■ Pi-Alkyl 	<p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Unfavorable Bump ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Pi-Donor Hydrogen Bond ■ Alkyl ■ Pi-Alkyl 		<p>Types de liaisons</p>
-64.3	-70.1	-56.7	-66.9	-54.2	<p>Energie de liaison ΔG (kcal/mol)</p>	

III.2- Discussion

La présente étude a eu pour objectif principal l'évaluation des effets anti-ostéoporotiques de l'extrait aqueux des écorces du tronc de *P. mildbraedii* sur un modèle d'ostéoporose induit par ovariectomie chez la rate.

L'une des principales caractéristiques de l'ostéoporose ménopausique est la diminution de la masse relative et de la densité minérale osseuse du tissu osseux associée à une diminution du taux d'estrogènes circulants (Oumarou *et al.*, 2017) et à l'augmentation de l'activité inflammatoire (Yun et Lee, 2004). L'ovariectomie a entraîné dans le présent travail la baisse de la masse relative et de la densité minérale osseuse du fémur et du tibia associée à une augmentation du taux de globules blancs. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Owona *et al.* (2021) dans lesquels l'ovariectomie a entraîné la baisse de la masse relative et de la densité minérale osseuse du fémur et du tibia, ainsi que ceux de Seif (2014) dans lesquels l'ovariectomie a entraîné une augmentation du taux de globules blancs et de l'activité macrophagique. En effet, la baisse des œstrogènes est connue pour induire une inflammation osseuse et une surexpression des cytokines pro-inflammatoires par le biais de l'augmentation de certaines molécules tels que le monoxyde d'azote et la 5-lipoxygénase qui peuvent augmenter l'ostéoclastogénèse et la perte osseuse (Nakchbandi et Van der Merwe, 2009). L'augmentation par l'extrait de *P. mildbraedii* de la masse relative et de la densité minérale osseuse du fémur et du tibia associée à la baisse du taux de globules blancs traduirait une activité anti-résorptrice et anti-inflammatoire de la plante. De plus, dans le présent travail *P. mildbraedii* a montré *in vitro* un potentiel inhibiteur sur l'activité de la 5-lipoxygénase qui est une enzyme fortement impliquée dans l'activité ostéoclastique. Ceci s'expliquerait par le fait que *P. mildbraedii* posséderait des métabolites secondaires bioactifs capable d'induire une activité *estrogen-like*. Le profil LC-MS a permis l'identification de quelques composés responsables de cette activité *estrogen-like* de *P. mildbraedii* parmi lesquels : la liquiritigénine, l'acide caféique, le pteromarsupone, le pterocarptriol, la pteroyanine I, la Khironine E et le mono (2-ethylhexyl) phthalate. En effet, l'acide caféique, polyphénols identifiés dans l'extrait stimulerait la prolifération, la maturation et la différenciation des cellules ostéoblastiques (Melguizo-Rodríguez *et al.*, 2019 ; Tolba *et al.*, 2017). Cette différenciation ostéoblastique augmenterait la synthèse du facteur de croissance transformant β (TGF- β), qui est impliqué dans la réduction de la résorption osseuse (Zou *et al.*, 2021). De plus l'acide caféique inhiberait l'action du RANK-L impliqué dans les mécanismes moléculaires de l'inflammation et de la formation ostéoclastique. En effet, l'acide caféique induit une inhibition de la phosphorylation de "l'extracellular signal-regulated kinase" (ERK) et du "c-Jun N-terminal kinase" (JNK) ainsi qu'une inhibition du *nuclear translocation of c-Fos* qui à travers le RANK-L sont impliqués dans le processus de résorption osseuse (Xian *et al.*, 2012). Ces résultats sont similaires à ceux de Owona *et al.* (2021) qui ont montré que la perte osseuse peut être prévenue par administration des plantes douées d'activités oestrogéniques. D'autres travaux expliquent également la survenue de l'ostéoporose par une baisse des concentrations de calcium et de l'activité de la PAL au niveau du tissu osseux (Chitme *et al.*, 2009 ; Oumarou *et al.*, 2017).

La diminution de la concentration en calcium et de l'activité de la PAL dans le fémur et le tibia associée à l'augmentation de la concentration en calcium dans l'urine chez les animaux ovariectomisés sont très souvent corrélées à la perte osseuse (Alavizadeh et Hosseinzadeh, 2014). La hausse du taux de calcium urinaire traduirait un défaut de minéralisation osseuse dû à l'ostéoporose. Cette déminéralisation osseuse serait aussi attribuée entre autres à l'action de la phosphatase acide et la HMP2, deux enzymes impliquées grandement dans la mise en place de l'ostéoporose ménopausique. La phosphatase acide est une métalloenzymes responsable d'une déminéralisation osseuse par hydrolyse du phosphate organique du tissu osseux (Ek-Rylander et Andersson, 2010) et la HPM2 est une métalloenzymes responsable de la dégradation de la matrice protéique du tissu osseux (Fatemi *et al.*, 2020). L'action conjointe de ses molécules détériore et fragilise l'os davantage. Ces résultats sont soutenus dans la présente étude par l'augmentation de l'index d'ostéolyse (calcium urinaire/créatinine urinaire) au niveau du fémur et du tibia ainsi que la diminution de la densité en collagène osseux au niveau du fémur et de la vertèbre lombaire 3 chez les animaux ovariectomisés. Le traitement à l'écorce de *P. mildbraedii* a augmenté l'activité de la PAL et la concentration en calcium dans le fémur, le tibia et le sérum. Ce traitement a également induit une diminution de la concentration en calcium dans l'urine et une diminution de l'index d'ostéolyse associée à une augmentation de la densité en collagène du tissu osseux. En effet, selon les travaux de Rassi *et al.* (2002), les phytoœstrogènes auraient une action positive sur la minéralisation osseuse, la différenciation ostéoblastique, l'inhibition de l'activité ostéoclastique et stimuleraient l'activité de la phosphatase alcaline (Vergne *et al.*, 2008). Ce qui s'est matérialisé dans le présent travail par l'augmentation *in vitro* de l'activité de la PAL. L'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline osseuse dans les lots traités à l'extrait aqueux de l'écorce de *P. mildbraedii* traduirait une augmentation l'activité ostéoblastique qui est associée à la formation osseuse (Hewitt *et al.*, 2003). Ce résultat serait tributaire de l'action de la liquiritigénine présente dans l'extrait qui serait capable d'augmenter l'expression des marqueurs ostéoblastique notamment la PAL et le nombre d'ostéocytes (Yu *et al.*, 2023). De plus, l'amarrage moléculaire des composés identifiés dans l'extrait de *P. mildbraedii* à la phosphatase acide et la HPM2 contribuerait à cette amélioration. De par leur probable action d'inhibiteurs compétitifs, ces molécules réduiraient la fixation de ces enzymes sur des protéines et phosphates organiques osseux et participeraient ainsi à l'amélioration de la santé osseuse. Corroborant ainsi l'augmentation de la densité en collagène dans la structure histologique osseux des animaux traités à l'extrait aqueux *de P. mildbraedii* dans le présent travail.

Outre les processus biochimiques d'inflammation et de déminéralisation, le statut oxydant constitue un paramètre important dans la pathogenèse de l'ostéoporose. En effet, des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène affectent négativement l'ostéogénèse (Zhao *et al.*, 2021), laquelle se manifeste dans de nombreuses études par des altérations structurales du fémur et du tibia. Dans le présent travail, l'analyse des marqueurs du statut oxydant a révélé dans les homogénats du fémur et du tibia, une augmentation du taux de malondialdéhyde et une baisse des taux de glutathion réduit, de nitrites et des activités de la catalase et de la

superoxyde dismutase chez les animaux Ovx comparativement aux animaux *Sham-operated*. Ce qui traduit une augmentation des espèces oxydatives dans le fémur et le tibia chez les rates Ovx. En effet, l'ovariectomie est associée à une augmentation de l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase qui est une enzyme responsable de la formation des radicaux libres dans la mitochondrie (Alyson *et al.*, 2007). Ce stress oxydant était corrélé à une apparition sur les coupes histologiques du fémur et du tibia des lacunes de résorption. En effet, des preuves expérimentales ont montré que le stress oxydant induit l'apoptose des ostéocytes et des ostéoblastes, ce qui entraîne un déséquilibre dans le processus de remodelage avec une formation osseuse altérée et insuffisante qui se produit avec le vieillissement dont l'ostéoporose (Chen *et al.*, 2023). Ce stress oxydant osseux serait lié à la déficience œstrogénique post ovariectomie (Das, 2002). Ce résultat est similaire à celui de Oumarou *et al.* (2017) qui ont rapporté que l'ovariectomie entraînait chez les rates, un stress oxydant osseux marqué par une augmentation du taux de malondialdéhyde et une baisse du taux de glutathion réduit mais également une apparition des lacunes de résorption sur les coupes histologiques du fémur. Oumarou *et al.* (2017) ont rapporté que l'ovariectomie chez les rats entraînait également une discontinuité de l'os trabéculaire du tibia. En effet, les espèces réactives de l'oxygène formées dans des conditions d'hypo-œstrogénie stimuleraient la formation et l'activité des ostéoclastes, une diminution de la fonction ostéoblastique (Agidigbi et Kim, 2019), du recrutement des ostéoblastes et de la synthèse du collagène (Takeuchi *et al.*, 1997). Cette forte activité ostéoclastique stimulée par les radicaux libres expliquerait les altérations structurales du fémur et du tibia ainsi que la diminution de la densité en collagène dans le fémur observé dans la présente étude. L'administration de l'extrait de plante a inversé le sens de variation des taux fémoraux de glutathion réduit, de catalase, de superoxyde dismutase, de malondialdéhyde, diminué significativement le taux de nitrites, augmenté le taux de collagène fémorale et prévenu les altérations structurales du fémur et du tibia par rapport aux rates Ovx. L'extrait aurait donc une activité antioxydante et cytoprotectrice sur les cellules osseuses et protégerait l'os contre les dommages osseux induits par les radicaux libres. Les polyphénols et les flavonoïdes présents dans l'extrait de plante ont induit une augmentation du glutathion réduit dose dépendante traduisant une augmentation de l'activité ostéoblastique. En effet les ostéoblastes peuvent produire des espèces antioxydants tels que le glutathion peroxydase pour se protéger contre les espèces réactives de l'oxygène (Chen *et al.*, 2019). Ces polyphénols et les flavonoïdes possèderaient une activité antioxydante par réduction de l'expression et de l'activité de la NADPH oxydase (Zhang, 2016). Dans le présent travail, *P. mildbraedii* a également réduit *in vitro* la production de l'oxyde nitrique, ce qui expliquerait davantage son activité antioxydante. Ceci pourrait s'expliquer plus spécifiquement par l'action anti-ostéoclastogène de l'acide caféique et de ses dérivés qui médiée par les activités antioxydantes, bloqueraient la signalisation TRAF6/Akt et MAPK induite par le RANKL, ainsi que la signalisation M-CSF/c- Src responsable de la prolifération ostéoclastique (Ekeuku *et al.*, 2021). Ces activités expliqueraient les effets protecteurs de *P. mildbraedii* sur la santé osseuse des femmes ménopausées. Bien qu'efficace dans ce contexte, il serait tout aussi intéressant d'évaluer les effets de *P. mildbraedii* sur d'autres pathologies osseuses de par ses multiples effets.



CONCLUSION

La présente étude consistait à évaluer les effets anti-ostéoporotiques de l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* sur un modèle d'ostéoporose induits par l'ovariectomie chez la rate Wistar. Il en ressort que la déficience oestrogénique induite par ovariectomie a conduit à l'installation de l'ostéoporose primaire se traduisant par une diminution de la masse relative et de la densité minérale osseuse du fémur et du tibia associée à la diminution de la concentration en calcium, de l'activité de la phosphatase alcaline, de glutathion réduit et une augmentation du taux de malondialdéhyde dans le fémur et le tibia des animaux ovariectomisés recevant de l'eau distillée. *In vivo*, l'extrait aqueux de *P. mildbraedii* a amélioré ces différentes altérations en induisant l'augmentation de la masse relative des organes, de la densité minérale osseuse, de la concentration en calcium, de l'activité de la phosphatase alcaline de glutathion réduit et une diminution du taux de malondialdéhyde dans le fémur et le tibia. *In vitro*, *P. mildbraedii* a démontré une forte activité anti-inflammatoire sur la production d'oxyde nitrique et de la 5-lipoxygénase. Ces propriétés ont été attribuées à la présence de la liquiritigénine, l'acide caféique, le pteromarsupone, le pterocarpatriol, la pteroyanine I, la Khironine E et le mono (2-ethylhexyl) phthalate, dont certains posséderaient des actions inhibitrices sur l'activité de la phosphatase alcaline et de la *human matrix metalloproteinase 2*. De ces observations découlerait des propriétés œstrogénomimétiques, anti-inflammatoires et anti-ostéoporotiques attribués à *P. mildbraedii*, ce qui pourrait justifier son usage empirique. A la lumière de ces résultats, il conviendrait de promouvoir l'usage de cette plante pour la prise en charge de l'ostéoporose liée à la ménopause. Afin d'améliorer ce travail, il serait pertinent :

- d'évaluer les effets de *Pterocarpus mildbraedii* sur d'autres modèles d'ostéoporose et d'autres pathologies osseuses ;
- d'établir le profil toxicologique de l'extrait aqueux de *Pterocarpus mildbraedii* ;
- de procéder à la formulation d'un médicament traditionnel amélioré.



REFERENCES

- Adegbite A, Ezekwesili C, Okani, Chukwudi O.** (2015). Effects of ethanol and aqueous leaf extracts of *Pterocarpus mildbraedii* on the liver function and CD4 cells of the immune system in albino rats. *The Bioscientist*. 3: 79-87.
- Adegbite A et Ezekwesili C.** (2017). Effects of ethanol and aqueous leaf extracts of *Pterocarpus mildbraedii* on hematology parameters and cholesterol in albino rats. *African Journal of Biochemistry Research*. 11: 28-33.
- Agidigbi T et Kim C.** (2019). Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 20: 3576.
- Akinyeye R, Oluwadunsi A, Omoyeni A.** (2010). Proximate, mineral, anti-nutrients, phyto-chemical screening and amino acid compositions of the leaves of *Pterocarpus mildbraedii* Harms. *Electron Journal of Environment, Agriculture & Food Chemistry*. 9: 1322- 1333.
- Al Hamdany A, Al-Khatib A, Al-Sadi H.** (2019). An overview of the beneficial effects of quercetin on bone. *International Medical Journal*. 26: 142-145.
- Alavizadeh H et Hosseinzadeh H.** (2014). Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*. 64: 65-80.
- Allen M et Burr D.** (2019). Basic and Applied Bone Biology. *Academic Press; Cambridge, Massachusetts, United States of America. Bone Growth, Modeling, and Remodeling*. 478 p.
- Altindag O et Erel O.** (2008). Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology International*. 28: 317-321.
- Alyson A, Grant R, Anja E, Harald H, Christopher G.** (2007). Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation role of estrogen. *Stroke*. 38: 2142-2149.
- ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament).** (2012). Information importante de pharmacovigilance : risque accru de cancers lors de l'utilisation au long cours de spécialités à base de calcitonine nouvelles restrictions d'utilisation.
- Bandeira L et Lewiecki M.** (2022). Anabolic therapy for osteoporosis: Update on efficacy and safety. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 66: 707-716.
- Banfi G, Iorio E, Corsi M.** (2008). Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 46: 1550-1555.
- Bansal S.** (1987). Carbohydrate metabolism in the rat peritoneal macrophages. *Journal of Biosciences*. 12: 415-420.
- Bindzi G.** (2024). Effets de l'extrait aqueux du tronc de *Pterocarpus mildbraedii* (Fabaceae) Harms sur la dysbiose vaginale et quelques facteurs de risques des maladies cardiovasculaires induits par l'ovariectomie chez la rate Wistar. *Mémoire de master en physiologie animale, Université de Yaoundé I, Cameroun*. 81 p.

- Bosch C.** (2004). *Pterocarpus mildbraedii* Harms. *Plant Resource of Tropical Africa*. 3: 78-80.
- Camporez J, Jornayvaz F, Lee H.** (2013). Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. *Endocrinology*. 154: 1021-1028.
- Cenci S, Toraldo G, Weitzmann M, Roggia C, Gao Y, Qian WP, Sierra O, Pacifici R.** (2003). Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proceedings of the National Academic of Sciences United States of America*. 100: 10405-104010.
- Cenci S, Weitzmann M, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R.** (2000). Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *Journal of Clinical Investigation*. 106: 1229-1237.
- Chen K, Qiu P, Yuan Y, Zheng L, He J, Wang C, Guo Q, Kenny J, Liu Q, Zhao J.** (2019). Pseurotin A Inhibits Osteoclastogenesis and Prevents Ovariectomized-Induced Bone Loss by Suppressing Reactive Oxygen Species. *Theranostics*. 9: 1634-1650.
- Chen W, Manson J, Hankinson S, Rosner B, Holmes M, Willet W, Colditz G.** (2006). Unopposed estrogen therapy and risk for invasive breast cancer. *Archives Internal Medicine*. 166: 1027-1032.
- Chen Y, Tang W, Li H, Lv J, Chang L, Chen S.** (2023). Composite Dietary Antioxidant Index Negatively Correlates with Osteoporosis among Middle-Aged and Older US Populations. *American Journal of Translational Research*. 15: 1300-1308.
- Chisari E, Shivappa N, Vyas S.** (2019). Polyphenol- rich foods and osteoporosis. *Current Pharmaceutical Design*. 25: 2459-2466.
- Chitme H, Muchandi I, Burli S.** (2009). Effect of *Asparagus racemosus* Willd root extract on ovariectomized rats. *The Open Natural Products Journal*. 2: 16-23.
- Choi M, Yang J, Seo J, Kim Y, Kang S.** (2021). Prevalence and diagnosis experience of osteoporosis in postmenopausal women over 50: Focusing on socioeconomic factors. *plos one*. 16: e0248020.
- Clabaut M.** (2021). Effet de l'hormone stéroïdienne 17 β -estradiol sur deux souches de *Lactobacillus crispatus*, marqueur de l'homéostasie vaginale. Thèse de Doctorat, Université de Rouen Normandie, France. 352 p.
- Clarck W, Balinski S, Marie S, Zac B.** (1975). Spectrometric study of a direct determination of serum calcium. *Microchemical Journal*. 1: 22-23.
- Collins F, Rios-arce N, Schepper J, Jones A, Schaefer L, Britton R.** (2019). Beneficial effect of *Lactobacillus reuteri* 6475 on bone density in male mice is depend on lymphocytes. *Scientific Reports*. 9: 1-17.
- Crandall C et Newberry S.** (2014). Comparative Effectiveness of Pharmacologic Treatments to Prevent Fractures: An Updated Systematic Review. *Annals of Internal Medicine of Biological Sciences*. 12: 415-442.



ANNEXES

Annexe 1: Préparation des solutions

➤ Solution de valérate d'œstradiol

Le valérate d'œstradiol (Progynova®) utilisé se présente sous forme de comprimés de 2 mg du principe actif. Pour préparer cette solution de valérate d'œstradiol de concentration 0,60 mg/mL, 3 comprimés (soit 6 mg de valérate d'œstradiol) ont été écrasés, puis le volume a été complété à 10 mL. Cette solution a permis de traiter les rats du lot témoin positif.

➤ Solution de NaCl 0,9 %

Dans une fiole jaugée de 100 mL, 0,9 g de NaCl ont été dissout dans 30 mL d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

➤ Solution de formaldéhyde à 10 % et à 2 % tamponné

Pour préparer cette solution de formaldéhyde 10 % tamponné, 6,5 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et 4 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ont été ajoutés à 100 mL de formaldéhyde (HCHO) 37 %. Le volume de la solution obtenue a été porté à 1000 mL par ajout d'eau distillée. A partir de cette solution, du formaldéhyde à 2 % a été préparé par prélèvement de 50 mL de la solution de formaldéhyde à 10 % et 200 mL d'eau distillée ont été ajoutés.

➤ Tampon phosphate (0,1 M; pH 7,5)

Deux solutions ont été initialement préparées : 8,91 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ont été dissous dans de l'eau distillée pour un volume final de 500 mL et 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ont été dissouts dans de l'eau distillée pour un volume final de 500 mL. A 500 mL de la solution de phosphate disodique hydraté ont été ajoutés 70 mL de la solution de phosphate monosodique hydraté, puis goutte à goutte de la même solution a été ajoutée jusqu'à obtention d'un pH de 7,5.

➤ Solution d'isopropanol acidifié

Dans un bécher gradué de 300 mL, ont été introduit 299 mL d'Isopropanol et 1 mL d'acide chloridrique. Le mélange a été réaliser à l'aide de l'agitateur magnétique pendant 5min.

➤ Tampon phosphate salin (PBS) 0,1 M pH 7,4

Sels : phosphate disodique (Na_2HPO_4 : 3,07g) **phosphate monopotassique** (KH_2PO_4 : 0,75 g) ; **Chlorure de potassium** (KCl : 1,268 g) ; **Chlorure de sodium** (NaCl : 0,54 g)

Dans un bécher gradué de 250 mL, les différents sels ci-dessus ont été dissout dans 180 mL d'eau distillée. Le pH a été vérifier à l'aide d'un pH mètre et le volume a été complété à 250 mL avec de l'eau distillée puis le mélange a été homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 5min.

➤ **Solution d'amidon**

Dans une fiole graduée de 50 mL, 0,1g d'amidon ont été homogénéisés dans 5 mL de PBS sous agitateur magnétique.

➤ **Solutions de NaCl 0,05 M**

Dans une fiole jaugée de 100 mL, 59 mg de NaCl ont été dissout dans 10 mL d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété jusqu'à 20 mL avec de l'eau distillée.

➤ **Solutions de NaCl 0,25M**

Dans une fiole jaugée de 100 mL, 29 mg de NaCl ont été dissout dans 10 mL d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété jusqu'à 20 mL avec de l'eau distillée.

➤ **Solution de bleu de trypan à 0,2 %**

Dans une fiole jaugée de 100mL, 0,2 g de bleu trypan ont été dissout dans 30 mL d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

➤ **Solution d'acide phosphorique à 2,5 %**

Pour préparer la solution d'acide phosphorique à 2,5 %, 2,5 mL d'acide phosphorique (85 %) ont été prélevés et le volume final a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

➤ **Solution d'éosine alcoolique**

Trois grammes d'éosine ont été ajoutés dans un bécher puis nous y avons ajouté 100 mL d'eau distillée. A cette solution initiale, ont été ajoutés 125 mL d'alcool à 95 ° et 375 mL d'eau distillée. Tout ceci est homogénéisé et filtré. On ajoute alors deux gouttes d'acide acétique. La solution finale obtenue était laissée à l'abri de la lumière et filtrée avant usage.

➤ **Solution d'hématoxyline de Mayer**

Un gramme d'hématoxyline et 1000 mL d'eau distillée ont été mélangés et chauffés doucement jusqu'à 50°C. Au mélange chauffé, 0,2 g d'iodate de sodium et 50 g d'alun de potassium ont été ajoutés. L'ensemble a été agité jusqu'à dissolution de l'alun. Ensuite, 1 g d'acide citrique et 50 g de chloral hydrate ont été ajoutés à la solution précédente.

➤ **Solution de Griess**

Solution A

Dans une fiole jaugée de 50 mL, 0,05g de Naphtyléthylène diamine dihydrochloride ont été dissout dans 10 mL d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété jusqu'à la jauge avec de l'eau distillée sous agitateur magnétique.

Solution B

Dans une fiole jaugée de 50 mL, 0,5 g de Sulphanylamide ont été dissout dans 50 mL d'acide phosphorique à 2,5 %.

➤ **Solution du bleu de célestine à 0,5%**

Sous agitateur magnétique, 25 g de sulfate ferrique d'ammonium a été dissout dans 500mL d'eau distillée puis a été introduit 2,5 g de bleu de célestine B. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 2 à 3 min. Après refroidissement, la solution a été filtrée puis la glycérine y a été introduite.

➤ **Alcool acétifié à 1%**

Sous agitateur magnétique, 1 mL d'acide acétique a été homogénéisé dans 99 mL d'éthanol 100⁰.

➤ **Solution de fuchsine acide à 0,5%**

Sous agitateur magnétique, 0,5 g de fuchsine acide a été homogénéisée dans 20 mL d'eau distille. Puis, a été ajouté 0,5 mL d'acide acétique. L'ensemble a été complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

➤ **Solution d'acide phosphomolybdique à 1%**

Sous agitateur magnétique, 1g d'acide phosphomolybdique a été dissout dans 100 mL d'acide acétique. Dans l'ensemble a été ajouté 1000 mL d'eau distillée. Le volume total obtenu étant de 1100 mL

➤ **Solution de bleu de méthyle à 2%**

Sous agitateur magnétique, 2 g de bleu de méthyle a été dissout dans 20 mL d'eau distillée. Dans l'ensemble a été ajouté 2,5 mL d'acide. Le mélange obtenu a été complété à 100 mL avec d'eau distillée.

➤ **Préparation du Réactif d'Ellman**

Le réactif d'Ellman a été obtenu en faisant dissoudre 5 mg d'acide 2,2-dithio-5,5'- dinitrobenzoïque (DTNB) dans du tampon phosphate 0,1 M; pH 6,5 pour un volume final de 250 mL.

➤ **Solution de Sérum Albumine Bovin**

La solution de sérum albumine (SAB) (3 mg/mL) a été préparée en dissolvant 150 mg de SAB dans de l'eau distillée pour un volume final de 50 mL.

➤ **Eau acidifiée**

Sous agitateur magnétique, 1mL d'acide acétique a été homogénéisé dans 99 mL d'eau distillée.

Annexe 2 : Préparation du milieu de culture : Dubelcco's Minimal Essential Medium (DMEM)

La préparation du milieu de culture se fait dans un environnement aseptique. Pour créer une atmosphère de cette nature dans notre laboratoire, le milieu de culture a été préparé dans un environnement clos en présence des brûleurs de Bunsen. Pour 1 litre du milieu de culture, nous avons pesé 10 g de poudre DMEM et 0,5 g de NaHCO₃. On dissout l'ensemble dans un peu d'eau distillée (300 mL environ). On ajoute ensuite l'antibiotique Pénicilline de manière à obtenir les concentrations finales de 100 UI/mL respectivement puis le volume est complété à 1 litre avec l'eau distillée et le mélange obtenu est aussitôt filtré sous une unité de filtration fonctionnant en présence d'une pompe à vide ou des unités de microfiltration. Le milieu est immédiatement aliquoté dans les tubes Falcon stériles de 50 mL et conservé au frais à 4°.

